

Die Rolle der zellulären Seneszenz in der Knochenhomöostase und -regeneration

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Daniela Keller (geb. Mau)

aus Hameln

2021

Diese Dissertation wurde in der Zeit vom 01.12.2014 bis zum 21.07.2019 (mit einer Unterbrechung vom 07.12.2017 bis zum 24.09.2018) am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité und dem Institut für Prognostic Markers and Targeted Therapy des Berlin-Brandenburger Centrums für Regenerative Therapien (BCRT) unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Uwe Kornak und Dr.-Ing. Sven Geißler angefertigt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Uwe Kornak
Institut für Humangenetik
Universitätsmedizin Göttingen
Heinrich-Düker-Weg 12
37073 Göttingen
+49 551 39 69011
uwe.kornak@med.uni-goettingen.de

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Sigmar Stricker
Institut für Biochemie und Genetik
Freie Universität Berlin
Thielallee 63
14195 Berlin
+49 30 838 75799
sigmar.stricker@fu-berlin.de

Disputation am 24.09.2021

meinen Eltern

Danksagung

Der größte Dank gebührt Prof. Dr. Uwe Kornak und Dr. Sven Geißler, die mir die Bearbeitung dieses spannenden Projektes anvertraut haben, meine fachliche Ausbildung durch viele wissenschaftliche Diskussionen vorangetrieben haben und die Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten immer wieder neu entfachen konnten.

Eine wichtige Grundlage dieser Arbeit sind die Sleeping Beauty Transposon Vektoren, welche von Dr. Manfred Gossen zur Verfügung gestellt wurden und ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre- danke dafür.

Shimpei Kawamoto von der Osaka University möchte ich für die reibungslose Kooperation und problemlose Bereitstellung der Proben von p21 KO und DKO Mäusen danken.

Kate, danke für die Unterstützung bei der Planung und Erstellung des Tierversuchsantrages und der Durchführung der *in vivo* Experimente.

Agnes, dir möchte ich auch ein großes Dankeschön aussprechen. Die Arbeit mit dir war vor allem immer eines: effizient und unkompliziert.

Die gesamte Auswertung der μ CT-Scans wäre ohne deine Hilfe nicht möglich gewesen Mario. Auch bei dir möchte ich mich herzlich bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich noch bei Dr. David Meierhofer und Dr. January Weiner für die Expertise und tolle Zusammenarbeit der Omics Experimente bedanken.

Vielen lieben Dank auch an die ganzen tollen Kollegen und Mitstreiter.

Hardy, vielen Dank für deinen immerwährenden fachlichen Rat, die spannenden Diskussionen über Seneszenz und deine humorvolle und lebensfrohe Art, die den Arbeitsalltag immer aufgefrischt hat.

Björn, du hast ohne Frage immer geholfen, wo du konntest. Insbesondere der Studentenunterricht mit dir war mir eine große Freude. Sicherlich auch der Tatsache zu verdanken, dass du Micha und mich so toll auf die Begegnungen mit den Studenten vorbereitet hast.

Vicky, Claire, Magdalena, Denise, Alexej, Micha, Guido, Flori, Uta, Mohammed, Namrata, Lukas, Anja, Carola, Gaby und Susanne euch danke ich für die tolle Zusammenarbeit, eure unermüdliche Hilfsbereitschaft, die sogar spontane Kinderbetreuungsangebote enthielt und das tolle

Arbeitsklima, das ihr gemeinsam erzeugt habt. Auf euch war immer Verlass! Danke für die tolle Zeit mit euch.

Martin, vielen Dank dass du mich mit so viel Spaß und Humor in die große Kunst der Elektroporation von hMSCs eingeführt hast. Janosch, Julia, Ana, Dorit, Janine, Antje auch euch konnte ich jederzeit um Rat fragen und wusste eure helfenden Hände sehr zu schätzen.

Hervorheben möchte ich auch die tolle Zusammenarbeit mit dem MPI. Insbesondere die Tierpfleger, welche sich hervorragend um die Mauszucht und den Tiertransport gekümmert haben, sowie die spannenden und lehrreichen Seminare mit der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Mundlos.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir bei der Erfüllung all meiner Wünsche, Träume und Ziele mit grenzenloser Unterstützung immer zur Seite standen und stehen. Bruderherz auch du hast einen Großteil dazu beigetragen, dass ich eine unbeschwerte Zeit des Heranwachsens erleben durfte, in der ich mich frei entfalten und meinen Interessen folgen konnte. Ohne euch wäre diese Arbeit nie entstanden. Auch meine Schwiegereltern und meine Schwägerin („großen Schwester“) stehen mir immer mit Rat und Tat zur Seite, sodass ich euch ebenfalls von ganzem Herzen Danke sagen möchte.

Lieber Jo, liebe Finja, liebe Anna-Sophie, euch dreien muss ich wohl am meisten für eure Geduld mit mir danken. Für euren unermüdlichen Zuspruch und das Lachen, welches ihr mir immer wieder ins Gesicht und die Liebe, welche ihr mir ins Herz zaubert. Danke für alles- einfach danke dafür, dass ihr meine kleine Familie seid!

Allen meinen lieben Freunden danke ich für viele ermutigende Worte und einem immer offenen Ohr für mich.

Danke an alle Wegbegleiter in den letzten Jahren. Neben dem Fachlichen habe ich auch viel über mich und das Leben dazulernen dürfen. Vielen Dank für diese spannende gemeinsame Reise!

Zusammenfassung

Neueste wissenschaftliche Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es sich bei seneszenten Zellen nicht nur um gealterte oder geschädigte Zellen handelt, die sich nicht mehr weiter teilen können. Vielmehr scheinen sie auch an Prozessen beteiligt zu sein, in denen eine gesteigerte Gewebeneubildung und -umstrukturierung vollzogen wird. So wurden senescente Zellen sowohl im Zuge der Embryogenese als auch im Zusammenhang mit regenerativen Prozessen detektiert. Die Regeneration des Knochens ist besonders, da Knochen die Möglichkeit besitzt narbenfrei zu heilen. Jedoch führen 10-15% aller Frakturen, trotz adäquater konservativer oder chirurgischer Versorgung, zu einer gestörten Knochenheilung inklusive Pseudarthrosen. Nachdem die Behandlungsoptionen limitiert sind und oft mit multiplen Revisionseingriffen, prolongierter Immobilität und chronischen Schmerzen verbunden sind, ist die gestörte Knochenheilung mit einer hohen sozio-ökonomischen Belastung verbunden. Für die Entwicklung neuartiger Therapieformen ist daher das zelluläre und molekulare Verständnis der Knochenheilung von Bedeutung. Vor diesem Hintergrund ist eine Aufklärung der Rolle von seneszenten Zellen im Kontext der Knochenregeneration von großem wissenschaftlichem Interesse.

Da es sich bei den Zellzyklusinhibitoren $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ um etablierte Marker der zellulären Seneszenz handelt, wurde zunächst der Knochenphänotyp von $p16^{INK4a}$ - oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ -defizienten Mausmodellen untersucht. Hier zeigten sich keine pathologischen Auffälligkeiten. Bei zeitgleichem *Knockout* von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ hingegen konnte eine Reduktion der trabekulären Knochendichte der langen Röhrenknochen beobachtet werden. Für die weitere Untersuchung der Knochenregeneration wurde zunächst das $Cdkn2a^{tm1b}$ Mausmodell verwendet. Es handelt sich um einen globalen $p16^{INK4a}$ *Knockout*, welcher keine Auswirkungen auf die Regeneration des Femurs nach erfolgter, standardisierter Osteotomie hat. Ebenso wie eine zeitlich auf den Regenerationsprozess beschränkte Depletierung von $p16^{INK4a}$ -exprimierenden Zellen keinen Einfluss auf die Knochenheilungskinetik auf. Interessanterweise deuten Untersuchungen von heterozygoten $Cdkn2a^{tm1b}$ Mäusen auf eine gesteigerte Kallusbildung.

Zeitgleich stellen unterschiedliche Versuche verlässliche Seneszenzmarker zu definieren, die unabhängig vom Zelltyp und Seneszenz-induzierenden Stimulus sind, $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ als solche immer mehr in Frage. In diesem Kontext konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein duales, induzierbares Transposon-Transfektionssystem für humane Zellen etabliert werden. Die gezielte Überexpression von $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in hMSC im Vergleich zu anderen Seneszenzinduktionen ermöglicht die genauere Charakterisierung von seneszenten Zellen.

Summary

Recent scientific findings suggest that senescent cells are not only aged or damaged cells that can no longer continue to divide. Rather, they also appear to be involved in processes in which increased tissue formation and restructuring are accomplished. Thus, senescent cells have been detected both in the course of embryogenesis and in the context of regenerative processes. Regeneration of bone is special because bone has the ability to heal without scarring. However, 10-15% of all fractures, despite adequate conservative or surgical treatment, result in impaired bone healing including pseudarthrosis. Since treatment options are limited and often associated with multiple revision surgeries, prolonged immobility and chronic pain, impaired bone healing is associated with a high socio-economic burden. Therefore, cellular and molecular understanding of bone healing is of importance for the development of novel therapies. Against this background, elucidation of the role of senescent cells in the context of bone regeneration is of great scientific interest.

Since the cell cycle inhibitors $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF-1/Cip-1}$ are established markers of cellular senescence, the bone phenotype of $p16^{INK4a-/-}$ or $p21^{WAF-1/Cip-1-/-}$ -deficient mouse models was first investigated. Here, no pathological abnormalities were seen. In contrast, when $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF-1/Cip-1}$ were knocked out simultaneously, a reduction in trabecular bone density of the long tubular bones was observed. For further investigation of bone regeneration, the $Cdkn2a^{tm1b}$ mouse model was first used. This is a global $p16^{INK4a}$ knockout, which has no effect on femur regeneration after standardized osteotomy has been performed. Similarly, depletion of $p16^{INK4a}$ -expressing cells limited in time to the regeneration process did not show any effect on bone healing kinetics. Interestingly, studies of heterozygous $Cdkn2a^{tm1b}$ mice suggest increased callus formation.

At the same time, different attempts to define reliable senescence markers that are independent of cell type and senescence-inducing stimulus increasingly question $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF-1/Cip-1}$ as such. In this context, a dual inducible transposon transfection system for human cells was established in this PhD thesis. Targeted overexpression of $p16^{INK4a}$ or $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in hMSC compared to other senescence inductions allows for more accurate characterization of senescent cells.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich eidesstaatlich, dass ich meine vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und die benutzten Hilfsmittel und Literaturquellen vollständig angegeben habe. Ferner erkläre ich, dass die Dissertation bisher nicht in dieser oder leicht abgewandelter Form in einem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, 28.05.2021

Daniela Keller

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	- xiv -
Abbildungsverzeichnis	- xvii -
Tabellenverzeichnis	- xix -
1 Einleitung	- 20 -
1.1 Die Mannigfaltigkeit der zellulären Seneszenz.....	- 21 -
1.1.2 Viele Wege führen in die Seneszenz.....	- 24 -
1.1.3 Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP).....	- 25 -
1.1.4 Senolytika antagonisieren <i>senescent cell anti-apoptotic pathways</i> (SCAPs).....	- 27 -
1.1.5 p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} hemmen die Zellzyklusprogression.....	- 33 -
1.1.6 Die Besonderheit des <i>Cdkn2a</i> Genlokus.....	- 34 -
1.2 Knochen.....	- 36 -
1.2.1 Der Knochen- ein lebendiges Organ.....	- 38 -
1.2.2 Knochenregeneration.....	- 40 -
1.2.3 Seneszenz und Knochen.....	- 42 -
1.2.4 Verschiedene Mausmodelle zur Untersuchung der zellulären Seneszenz.....	- 44 -
1.2.5 Seneszenz als positiver Modulator von Regenerationsprozessen.....	- 46 -
2 Hypothese	- 49 -
3 Material und Methoden	- 50 -
3.1 Mausmodelle.....	- 50 -
3.1.1 <i>Cdkn2a Gene Trap</i> Mausmodell.....	- 50 -
3.1.2 p16-3MR Mausmodell.....	- 51 -
3.1.3 p21 ^{WAF-1/Cip-1} <i>Knockout</i> Mausmodell.....	- 52 -
3.1.4 p16 ^{INK4a} /p21 ^{WAF-1/Cip-1} DKO Mausmodell.....	- 53 -
3.1.5 Genotypisierung der <i>Cdkn2a</i> ^{tm1b} und p16-3MR Mäuse.....	- 53 -
3.1.6 Nachweis der p16 ^{INK4a} Expression in <i>Cdkn2a</i> ^{tm1b} Embryonen mittels X-Gal Färbung.....	- 55 -
3.2 Seneszenz und Knochenhomöostase.....	- 57 -
3.2.1 Probenentnahme.....	- 57 -
3.2.2 µCT Scan.....	- 57 -
3.2.3 Methylmethacrylat Einbettung und Schnitterfertigung.....	- 58 -
3.2.4 Färbung von MMA eingebetteten Knochenproben.....	- 58 -
3.2.5 Von Kossa/van Gieson Färbung.....	- 59 -
3.2.6 Toluidinblau-Färbung.....	- 59 -
3.2.7 Histo-morphometrie.....	- 60 -
3.2.8 RNA Isolation aus Knochengewebe.....	- 60 -
3.2.9 Isolation von murinen primären Osteoblasten aus <i>Calvariae</i>	- 60 -
3.2.10 Isolation und Kultivierung von MEFs.....	- 61 -
3.3 Knochenregeneration.....	- 62 -
3.3.1 Osteotomie.....	- 62 -
3.3.2 Ganciclovir Behandlung der p16-3MR Tiere.....	- 64 -
3.3.3 Entnahme und Aufarbeitung der Proben.....	- 64 -
3.3.4 µCT Scan und Auswertung.....	- 64 -
3.3.5 Genexpressionsanalysen der Kalli von Wildtyp Mäusen.....	- 65 -

3.4 Klonierung.....	- 66 -
3.4.1 Phusion PCR.....	- 66 -
3.4.2 Gelisolation.....	- 67 -
3.4.3 Restriktionsverdau.....	- 67 -
3.4.4 Ligation.....	- 68 -
3.4.5 Hitzeschock Transformation.....	- 69 -
3.4.6 Sequenzierung.....	- 70 -
3.5 hMSCs.....	- 72 -
3.5.1 Humane mesenchymale Stromazellen.....	- 72 -
3.5.2 Transfektion.....	- 73 -
3.5.3 Doxycyclin induzierte Überexpression von <i>p16^{INK4a}</i> und <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i>	- 74 -
3.5.4 Mitomycin Behandlung.....	- 74 -
3.5.5 Zellaktivität und Zellproliferation.....	- 74 -
3.5.6 Osteogene Differenzierung.....	- 75 -
3.5.7 Adipogene Differenzierung.....	- 77 -
3.5.8 RNA Isolierung aus Zellen.....	- 78 -
3.5.9 cDNA Synthese.....	- 79 -
3.5.10 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR).....	- 79 -
3.5.11 RNA Sequenzierung.....	- 80 -
3.5.12 Proteinisolation aus Zellen.....	- 82 -
3.5.13 Western Blot.....	- 82 -
3.5.14 Senolytika Behandlung.....	- 83 -
4 Ergebnisse.....	- 84 -
4.1 Analysen zum Einfluss der Seneszenz auf die Knochenhomöostase und Knochenregeneration im Mausmodell.....	- 84 -
4.1.1 Verifizierung des <i>p16^{INK4a} Knockouts</i> im <i>Cdkn2a Gene Trap</i> Mausmodell.....	- 84 -
4.1.2 Mitomycin C Behandlung induziert Seneszenz der <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> MEFs.....	- 86 -
4.1.3 Nicht nachweisbare <i>p16^{INK4a}</i> Expression während der murinen Embryogenese.....	- 87 -
4.1.4 <i>Cdkn2a Gene Trap</i> Mäuse zeigen einen normalen Knochenphänotyp.....	- 88 -
4.1.5 Die Genexpression verschiedener Knochenzellen Marker sprechen für einen unbeeinträchtigten Knochenumsatz der <i>Cdkn2a^{tm1b}</i> Tiere.....	- 91 -
4.1.6 Die Knochenmorphologie der langen Röhrenknochen ist unbeeinflusst durch eine <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> -Defizienz.....	- 92 -
4.1.7 <i>Cdkn1a/Cdkn2a</i> -defiziente Mäuse weisen eine verringerte trabekuläre Knochendichte auf.....	- 95 -
4.1.8 Reduzierte Genexpressionslevel für <i>Bone Remodeling</i> Marker in Tibiae von <i>p21KO</i> und <i>DKO</i> Tieren.....	- 98 -
4.2 Zelluläre Seneszenz und Knochenregeneration.....	- 100 -
4.2.1 Erhöhte Genexpression von <i>p16^{INK4a}</i> und <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> während der Knochenregeneration.....	- 100 -
4.2.2 Die <i>p16^{INK4a}</i> -Defizienz hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Knochenregeneration.....	- 101 -
4.2.3 GCV vermittelte Depletierung von <i>p16^{INK4a}</i> exprimierenden Zellen in Tibiae und Leber.....	- 104 -
4.2.4 Die temporäre Depletierung von <i>p16^{INK4a}</i> exprimierenden Zellen hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Frakturregeneration.....	- 106 -
4.2.5 Gesteigerte osteogene Differenzierung von <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Calvaria Osteoblasten.....	- 107 -
4.3 Die osteogene Differenzierung von hMSC geht mit erhöhter <i>p16^{INK4a}</i> Expression einher.....	- 110 -
4.3.1 Klonierungsstrategie für die induzierte Überexpression von <i>p16^{INK4a}</i> und <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> in hMSC.....	- 111 -

4.3.2 Doxycyclin induzierte $p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression.....	114 -
4.3.3 Induzierte Expression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ verringert die Proliferationskapazität von hMSC.....	117 -
4.3.4 Erhöhte $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Genexpression fördert die Wirkung von Senolytika auf hMSC.....	119 -
4.3.5 Eine Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ reduziert das Differenzierungspotenzial von hMSC.....	120 -
4.3.6 Die Genexpressionsprofile von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden und MMC behandelten hMSC differieren.....	122 -
5 Diskussion.....	134 -
5.1 Charakterisierung des $Cdkn2a^{tm1b}$ Mausmodells.....	135 -
5.2 $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Mäuse weisen einen unveränderten Knochenphänotyp auf.....	136 -
5.3 Die Qualität der Knochenregeneration ist unabhängig von einer $p16^{INK4a}$ Defizienz.....	138 -
5.4 Die temporäre Depletierung von $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellen zeigt keinen positiven Einfluss auf die Knochenregenerationskinetik.....	139 -
5.5 $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierende hMSC als Modell zur Untersuchung der Eigenschaften von seneszenten Zellen.....	141 -
5.6 Primäre Daten zur Untersuchung des Differenzierungspotenzials von hMSC mit erhöhten $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Expressionsleveln deuten auf einen inhibierenden Effekt hin.....	142 -
5.7 Die Genexpressionsprofile von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ positiven und mit MMC behandelten hMSCs differieren.....	143 -
5.8 Seneszenz bedeutet nicht immer gleich Seneszenz – ein Ausblick.....	145 -
6 Literaturverzeichnis.....	cxlviii -
7 Anhang.....	clxvi -
7.1 Materialien.....	clxvi -
7.2 Referenzsequenzen.....	clxxv -
7.2.1 pTOV-11_2APuroR_CDKN2A.....	clxxv -
7.2.2 pTOV-11_2APuroR_CDKN1A.....	clxxvii -
7.2.3 pTOV-11_2APuroR.....	clxxvix -

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	mikro
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
μCT	mikro-Computertomographie
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
Acp5	tartratresistente saure Phosphatase
A.dest	Aqua destillata
Ad.N/B.Pm	<i>adipocytes number per bone parameter</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
AM	adipogenes Differenzierungsmedium
ATP6V1E1	<i>ATPase H⁺ transporting V1 subunit E1</i>
BCRT	Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien
BGLAP	Osteocalcin (<i>bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein</i>)
BMAT	<i>bone marrow adipose tissue</i>
bp	Basenpaare
BS	<i>bone surface</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	<i>bone volume</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCL20	CC-Chemokinligand 20
cDNA	Coding DNA/ Copy DNA
CDK1,2,3,4,6	Cyclin-abhängige Kinase 1,2,3,4,6
Cdkn1a/p16 ^{INK4a}	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1a
Cdkn2a/p21 ^{WAF-1/Cip-1}	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2a
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB3L4	<i>cAMP responsive element binding protein 3 like 4</i>
Ctrl	Kontrolle
Ctsk	Cathepsin K
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDR	<i>DNA damage response</i>
DKO	<i>double knockout</i>
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
D+Q	Dasatinib und Quercetin
E2F	E2F Transkriptionsfaktor
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Expansionsmedium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
FGF23	<i>fibroblast growth factor 2</i>
Fx	Fraktur/Osteotomie
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir

GDNF	<i>glial cell derived factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLB1	β -D-Galactosidase
Gy	Gray/ Maßeinheit für ionisierende Strahlung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HMGB2	<i>high mobility group box 2</i>
HSV-TK	Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase
Ibsp	<i>Bone Sialoprotein</i>
JWI	Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KO	<i>knockout</i>
kV	Kilovolt
L	Liter
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LCS	lacuno-canaliculäres System
LMNB1	Lamin B1
LUC	Luciferase
M	Molar
mA	Milliampere
Mbar	Millibar
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
mg	Milligram
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miDAS	<i>mitochondrial dysfunction-associated senescence</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mm ³	Kubikmeter
MMC	Mitomycin C
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
ms	Millisekunde
MSC	Mesenchymale Stromazelle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Nd	<i>non detecable</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ob.N/B.Pm	<i>osteoblasts number per bone parameter</i>
Oc.N/B.Pm	<i>osteoclasts number per bone parameter</i>
OD	Optische Dichte
Ob	<i>obese gene</i>
OIS	<i>onccogene-induced senescence</i>
OM	osteogenes Differenzierungsmedium
OPG	Osteoprotegorin
ORF	<i>open reading frame</i>
Ot.N/B.Pm	<i>osteocytes number per bone parameter</i>

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-AA	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
pHPL	<i>pooled Human Platelet Lysate</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PLXNA3	Rezeptor der Klasse III Semaphorine; Plexin-A3
P1NP	<i>amino pro-peptide of type 1 collagen</i>
pNPP	4-Nitrophenylphosphat
PPARG	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RAB11A	<i>Ras-related protein Rab-11A</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
RER1	<i>retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>runt-related transcription factor-2</i>
s	Sekunde
SAD	<i>senescence-associated distension of satellites</i>
SAHF	<i>senescence-associated heterochromatic foci</i>
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SA-βGal	Seneszenz-assoziierten-β-Galactosidase-Färbung
SBB	Sudan-Black B
SCAP	<i>senescent cell anti-apoptotic pathways</i>
SOP	<i>standard operating procedure</i>
SOST	Sclerostin
Tb.Nb	<i>trabecular number</i>
Tb.Sp	<i>trabecular seperation</i>
Tb.Th	<i>trabecular thickness</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
thy1	CD90
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TV	<i>tissue volume</i>
ÜN	über Nacht
V	Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Well	Vertiefung
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Eigenschaften zellulärer Seneszenz.....	-23-
Abbildung 2: Die zelluläre Seneszenz als Schutzmechanismus bei vorliegender Zellschädigung.....	-25-
Abbildung 3: Skizze des Zellzyklus und seiner regulierenden Proteine.....	-34-
Abbildung 4: <i>Cdkn2a</i> Lokus kodiert für die Proteine <i>p16^{INK4a}</i> und <i>p19^{ARF}</i> bzw. <i>p14^{ARF}</i>	-35-
Abbildung 5: Aufbau eines langen Röhrenknochens.....	-37-
Abbildung 6: Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten: Knochenzellen, die maßgeblich an Knochenumbauprozessen beteiligt sind.....	-40-
Abbildung 7: Die vier Phasen der Knochenregeneration.....	-42-
Abbildung 8: Das <i>Cdkn2a^{tm1b}</i> Mausmodell ist abgeleitet von dem <i>Cdkn2a^{tm1a}</i> Mausmodell.....	-51-
Abbildung 9: <i>p16-3MR</i> Mausmodell.....	-52-
Abbildung 10: Schematische Darstellung des veränderten <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> Genlokus im <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> KO Mausmodell.....	-52-
Abbildung 11: Darstellung des <i>p16^{INK4a}</i> <i>Knockout</i> im <i>p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}</i> <i>Knockout</i> Mausmodell.....	-53-
Abbildung 12: ROIs für die Auswertung der Knochenparameter der langen Röhrenknochen.....	-58-
Abbildung 13: Osteotomie der Maus mit externem Fixateur.....	-63-
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Osteotomien unter Verwendung des <i>Cdkn2a^{tm1b}</i> Mausmodells.....	-63-
Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Osteotomien von <i>p16-3MR</i> Tieren inklusive GCV Behandlung.....	-64-
Abbildung 16: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der Generierung der Proben für die RNA-Sequenzierung.....	-82-
Abbildung 17: Schematische Darstellung des chronologischen Versuchsaufbaues der Senolytikatestung.....	-83-
Abbildung 18: Genexpressionslevel von <i>p16^{INK4a}</i> , <i>p19^{ARF}</i> und <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> im Knochengewebe der Röhrenknochen von adulten weiblichen <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Tieren.....	-84-
Abbildung 19: <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> MEFs zeigen ein gesteigertes proliferatives Verhalten.....	-85-
Abbildung 20: Seneszenzinduktion von <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> MEFs durch Bestrahlung und Mitomycin C (MMC) Behandlung geht mit erhöhter <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> Expression einher.....	-87-
Abbildung 21: Färbung der β -Galactosidaseaktivität von 10,5 und 12,5 Tagen alten <i>Cdkn2a^{+/+}</i> und <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Embryonen.....	-88-
Abbildung 22: Knochenphänotyp von 12 Wochen alten weiblichen <i>Cdkn2a^{+/+}</i> und <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Tieren.....	-89-
Abbildung 23: Knochenphänotyp von 12 Wochen alten männlichen <i>Cdkn2a^{+/+}</i> und <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Tieren.....	-90-
Abbildung 24: Genexpression von ausgewählten Osteoblasten (A), Osteozyten (B), Osteoklasten (C) und Adipozyten (D) Markern.....	-91-
Abbildung 25: Der Knochenphänotyp von adulten weiblichen <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> -defizienten Mäusen gleicht dem Knochenphänotyp der Kontrolltiere.....	-93-
Abbildung 26: Die Adipozytenanzahl der Röhrenknochen von <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> -defizienten Mäusen ist erhöht.....	-94-
Abbildung 27: Die relative Expression von <i>p16^{INK4a}</i> und <i>p19^{ARF}</i> ist im Knochen von <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> -defizienten Mäusen erhöht.....	-95-
Abbildung 28: Knochenhistologie und Auswertung der Strukturparameter von adulten <i>p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}</i> -defizienten Mäusen.....	-96-
Abbildung 29: Histomorphometrische Auswertung der Tibiae von DKO Mäusen an Toluidinblau-gefärbten Schnitten.....	-97-
Abbildung 30: Die reduzierte Knochendichte von <i>p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}</i> DKO Tibiae spiegelt sich in der erniedrigten Genexpression von Osteoblasten-, Osteozyten-, Osteoklasten- und Adipozytenmarkern wider.....	-99-
Abbildung 31: Gesteigerte Expressionslevel von <i>p16^{INK4a}</i> , <i>p19^{ARF}</i> und <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> während der Knochenregeneration.....	-100-
Abbildung 32: Zeitliche Abfolge der standardisierten Knochenregenerationsversuche der <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Tiere.....	-101-
Abbildung 33: Die Knochenregeneration von Kontrolltieren und <i>Cdkn2a^{tm1b/tm1b}</i> Tieren unterscheidet sich nicht.....	-102-
Abbildung 34: Die Knochenregeneration von <i>Cdkn2a^{+/tm1b}</i> Tieren resultiert in einer überschießenden Knochenformation.....	-103-
Abbildung 35: Die Knochenregeneration von <i>Cdkn2a^{+/tm1b}</i> Tieren 14 Tage nach standardisierter Osteotomie.....	-104-
Abbildung 36: Reduzierte Genexpression von <i>p16^{INK4a}</i> und <i>p21^{WAF-1/Cip-1}</i> in Tibia und Leber von <i>p16-3MR</i> Mäusen nach GCV Behandlung.....	-105-

Abbildung 37: Schematische Darstellung der Osteotomien unter GCV Behandlung mit dem p16-3MR Mausmodell.....	-106-
Abbildung 38: Die Knochenregeneration von transgenen GCV-behandelten p16-3MR Mäusen verläuft wie bei den Kontrolltieren.....	-107-
Abbildung 39: Osteoblasten, die aus dem Schädeldach von Cdkn2a ^{tm1b/tm1b} Mäusen isoliert wurden, weisen ein erhöhtes osteogenes Differenzierungspotenzial auf.....	-108-
Abbildung 40: Die Expression von p21 ^{WAF-1/Cip-1} ist während erfolgreicher osteogener Differenzierung reduziert.....	-109-
Abbildung 41: Relative p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} Expressionslevel während erfolgreicher osteogener Differenzierung von hMSC.....	-110-
Abbildung 42: Puromycin eignet sich am besten zur Selektion von transfizierten hMSC.....	-112-
Abbildung 43: Vektorkarten der induzierbaren Transposon-basierten p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} Überexpressionssysteme.....	-113-
Abbildung 44: Die Überexpression von p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} konnte in HeLa Zellen nachgewiesen werden.....	-114-
Abbildung 45: Der Nachweis von p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} konnte auf mRNA- und Proteinebene in immortalisierten humanen Fibroblasten erbracht werden.....	-115-
Abbildung 46: Mit 0,5µg/ml Medium Doxycyclin kann eine signifikante Überexpression des Zielgens unter der Kontrolle des Tet-On Promoters induziert werden.....	-116-
Abbildung 47: Repräsentativer Nachweis der Funktionalität des dualen Transposase/Transposon Vektorsystems in hMSCs anhand der p16 ^{INK4a} Überexpression.....	-116-
Abbildung 48: Die Zellproliferation von hMSC ist bei erhöhter Akkumulation von p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} erniedrigt.....	-118-
Abbildung 49: Dasatinib und Quercetin (D+Q) induzieren bei erhöhter Expression der Seneszenzmarker verstärkt Zellapoptose.....	-120-
Abbildung 50: Osteogene Differenzierung von hMSC durch p16 ^{INK4a} oder p21 ^{WAF-1/Cip-1} Überexpression unterbunden.....	-121-
Abbildung 51: Inhibierende Wirkung der p16 ^{INK4a} und p21 ^{WAF-1/Cip-1} Überexpression auf die adipogene Differenzierung von hMSC.....	-122-
Abbildung 52: Relative Genexpressionslevel von Seneszenzmarkern in Zellzyklus-arretierten hMSC.....	-125-
Abbildung 53: Hierarchische Clustering-Analyse der Expressionsprofile von den RNA Proben der Spender P546 und P785 visualisiert die zugrundeliegende Spendervariabilität.....	-126-
Abbildung 54: Hierarchische Clustering-Analyse der Expressionsprofile von den RNA Proben des Spenders P785.....	-127-
Abbildung 55: MA Plots der untersuchten Kontraste Ctrl vs. Ctrl Dox, Ctrl vs. Ctrl MMC, p16 vs. p16 Dox und p21 vs. p21 Dox.....	-128-
Abbildung 56: Das gemeinsame Expressionsprofil von hMSC, deren Zellzyklusarrest auf unterschiedliche Weise induziert wurde, umfasst 41 Gene.....	-129-
Abbildung 57: Das gemeinsame Expressionsprofil von humanen MSC und Fibroblasten, die in ihrem Zellzyklus arretiert wurden, zeigt 46 übereinstimmend regulierte Gene.....	-131-

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Senolytika werden im Rahmen von Klinischen Studien in verschiedenen Anwendungsbereichen getestet.....	-28-
Tabelle 2: Temperaturprogramm der Genotypisierungs-PCR.....	-54-
Tabelle 3: Genotypisierungsprimer.....	-55-
Tabelle 4: PCR-Ansatz der Genotypisierung.....	-55-
Tabelle 5: Fixierungspuffer X-Gal Färbung.....	-56-
Tabelle 6: Waschpuffer X-Gal Färbung.....	-56-
Tabelle 7: X-Gal Färbelösung.....	-56-
Tabelle 8: Proben für die Genexpressionsanalyse im Kallus von Wildtypmäusen.....	-65-
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Phusion PCR.....	-67-
Tabelle 10: Temperaturzyklen der Phusion PCR.....	-67-
Tabelle 11: Oligonukleotidsequenzen für die Phusion PCR.....	-67-
Tabelle 12: Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und Cfr9I.....	-68-
Tabelle 13: Restriktionsverdau mit den Enzymen NotI und Sall.....	-68-
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Ligation von Vektor und Insert.....	-69-
Tabelle 15: Verwendete Vektoren und deren Antibiotikaresistenzen für die selektive Anreicherung in Bakterien.....	-69-
Tabelle 16: Zusammensetzung des Abbruchreaktions-PCR Ansatzes.....	-70-
Tabelle 17: Temperaturprogramm für die Abbruch-PCR-Reaktion nach Sanger.....	-70-
Tabelle 18: Sequenzierungsprimer.....	-71-
Tabelle 19: Empfohlene Elektroporationsparameter unter Verwendung des Neon® Systems.....	-73-
Tabelle 20: Optimale Elektroporationsparameter für hMSC.....	-73-
Tabelle 21: Reaktionsansatz einer Elektroporation mit dem Neon® System.....	-73-
Tabelle 22: Elektroporationsparameter der hMSC unter Verwendung des Neon® Systems.....	-74-
Tabelle 23: Zusammensetzung für 1ml osteogenes Differenzierungsmedium.....	-76-
Tabelle 24: Zusammensetzung für 1ml adipogenes Differenzierungsmedium.....	-78-
Tabelle 25: Zusammensetzung für 1ml Nile Red/Hoechst Färbelösung.....	-78-
Tabelle 26: cDNA Synthese Master Mix.....	-79-
Tabelle 27: Temperaturprogramm der cDNA Synthese.....	-79-
Tabelle 28: qPCR Reaktionsansatz.....	-80-
Tabelle 29: qPCR Temperaturprogramm.....	-80-
Tabelle 30: Proben der RNA Sequenzierung.....	-81-
Tabelle 31: Verwendete Proben für die RNA-Sequenzierungsanalyse.....	-125-
Tabelle 32: Erhöhte und erniedrigte Genexpression von humanen MSC induziert durch MMC Behandlung, <i>p16^{INK4}</i> Überexpression und replikative Seneszenz.....	-130-
Tabelle 33: Gegenteilig regulierte Genexpression in hMSC durch unterschiedlich induzierten Zellzyklusarrest.....	-130-
Tabelle 34: Erhöhte und erniedrigte Genexpression von humanen MSC und Fibroblasten induziert durch MMC Behandlung, <i>p16^{INK4}</i> Überexpression, replikative Seneszenz, ionisierende Strahlung und Onkogenaktivität.....	-132-
Tabelle 35: Verbrauchsmaterialien.....	-clxvi-
Tabelle 36: Geräte.....	-clxvi-
Tabelle 37: Chemikalien.....	-clxvii-
Tabelle 38: Kits.....	-clxx-
Tabelle 39: Antikörper.....	-clxxi-
Tabelle 40: Software.....	-clxxi-
Tabelle 41: Vektoren.....	-clxxi-
Tabelle 42: Primersequenzen für die Genexpressionsanalyse humaner Proben.....	-clxxii-
Tabelle 43: Primersequenzen für die Genexpressionsanalyse muriner Proben.....	-clxxiii-

1. Einleitung

Die Proliferationsfähigkeit von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen ist eine der vielen Grundlagen des Lebens. Nur wenn Zellen die Fähigkeit zur Teilung besitzen, ist Wachstum möglich und neues Leben kann entstehen. Auch für Regenerationsprozesse ist die Proliferationskapazität von Zellen ein unumgänglicher Baustein. So lässt sich die sinkende Regenerationsfähigkeit mit fortschreitendem Alter unter anderem auf eine verringerte Proliferationsrate der Zellen zurückführen (Choudhery et al., 2012). Dieser elementare Prozess organischen Lebens ist über ein äußerst komplexes Signalgefüge koordiniert. Fehlgesteuerte Zellproliferation kann in Tumorwachstum oder einer verminderten Regenerationskapazität und somit vorzeitigen Alterung resultieren. Ein Zustand der Zelle, welcher dieses überlebenswichtige Proliferationspotenzial entbehrt, ist die zelluläre Seneszenz. Diese nicht mehr proliferativ aktiven Zellen akkumulieren in alternden Organismen nachweislich, sodass ihnen zumindest eine „Teilschuld“ für den Alterungsphänotyp zugeschrieben wird (Campisi & Robert, 2014; Hornsby, 2002; Jeyapalan, Ferreira, Sedivy, & Herbig, 2007).

Auch der Knochen, ein in unserer Vorstellung sehr starres und solides Gewebe, kann in die Jahre kommen. Es kommt zum altersbedingten Knochenschwund, der Osteoporose. Dies zeigt sich typischerweise in einer Verringerung der Knochendichte, die wiederum zu einem erhöhten Frakturrisiko führt. Ein Resultat einer gestörten Imbalance der permanent stattfindenden Knochenauf- und Abbauprozesse (Harvey, Dennison, & Cooper, 2010).

Aktuell vollzieht sich ein demographischer Wandel hin zu einer immer älter werdenden Bevölkerung (2012). Dies stellt eine große Herausforderung an unsere gesellschaftlichen Strukturen, insbesondere das Pflege- und Gesundheitssystem, dar. Neue Therapieansätze, um die Zunahme altersbedingter chronischer Erkrankungen zu minimieren, würden neben der Verbesserung der Lebensqualität des Einzelnen auch einen großen ökonomischen Vorteil mit sich bringen.

Umso bedeutender wird das genaue Verständnis der dem Alterungsprozess zu Grunde liegenden Mechanismen. Obwohl der Einfluss von seneszenten Zellen auf den Organismus in Kontext von Alterungsprozessen ein großes wissenschaftliches Interesse genießt, ist bislang noch wenig über das Vorhandensein und den etwaigen Nutzen von seneszenten Zellen in der Gewebshomöostase bekannt. Sollten senescente Zellen als therapeutischer Ansatzpunkt ins Visier genommen werden, sind auch diese Erkenntnisse unerlässlich. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Rolle von seneszenten Zellen in der Knochenhomöostase und Knochenregeneration im jungen Alter gelegt.

1.1 Die Mannigfaltigkeit der zellulären Seneszenz

Zelluläre Seneszenz wurde erstmalig im Jahre 1961 von Hayflick und Moorhead beschrieben (Hayflick & Moorhead, 1961). Die beiden Wissenschaftler beobachteten das Phänomen, dass *in vitro* kultivierte Zellen ein Limit ihrer Zellteilungen aufwiesen. Diese maximale Zellteilungsrate wurde nach seinem Entdecker als Hayflick Limit benannt. Bereits im Jahre 1965 wurde dieses Hayflick Limit als Zellstadium der Seneszenz deklariert (Hayflick, 1965). Der irreversible Verlust der Proliferationskapazität beschreibt das Hauptmerkmal von seneszenten Zellen (Rodier & Campisi, 2011). Die Irreversibilität ist ein wichtiger Bestandteil der Definition, denn sie ermöglicht die Abgrenzung von Seneszenz zur Quieszenz (Blagosklonny, 2011). Quieszente Zellen befinden sich in einem zeitlich begrenzten Zellzyklusarrest und können jederzeit wieder in den Zellzyklus eintreten (Terzi, Izmirli, & Gogebakan, 2016).

Der Verlust des Proliferationspotenzials der seneszenten Zellen wird begleitet von charakteristischen morphologischen Veränderungen, die *in vitro* beobachtet werden können (Hernandez-Segura, Nehme, & Demaria, 2018). Die Zellen vergrößern sich und flachen ab. Des Weiteren reichern sich Vakuolen in der Zelle an. Als mögliche Erklärung wird ein erhöhter Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER), durch eine Zunahme ungefalteter Proteine diskutiert (Denoyelle et al., 2006).

So können seneszente Zellen mittels der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidaseaktivität nachgewiesen werden, da sie eine Akkumulation von lysosomaler β -D-Galactosidase aufweisen (Lee et al., 2006). β -D-Galactosidase wird im humanen Organismus von dem Gen *GLB1* kodiert. Die β -Galactosidase gehört zu den Glycosidasen, die den farblosen kristallinen Feststoff 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (XGal) in Galactose und den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo spalten. Der blaue Farbstoff akkumuliert in den Zellen mit aktiven Glycosidasen und ermöglicht auf diese Weise den Nachweis der Enzymaktivität (Couffinhal et al., 1997). Dieser kolorimetrische Assay findet als sogenannte Blau-Weiß-Selektion vielseitige Verwendung in der Gentechnik, wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Cdkn2a GeneTrap* Mausmodell (siehe **3.1.1**). Die Besonderheit der in seneszenten Zellen akkumulierenden lysosomalen β -D-Galactosidase, ist ihr niedriges pH-Optimum. Somit ermöglicht die Durchführung des β -Galactosidaseaktivitäts Assay bei einem pH-Wert von 6, den spezifischen Nachweis von seneszenten Zellen *in vitro* und *in vivo* und wird als SA- β Gal Assay bezeichnet (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky, Campisi, & Toussaint, 2009) (Dimri et al., 1995).

Ein weiteres Merkmal seneszenten Zellen ist die Akkumulation von Lipofuscin. Es handelt sich um ein Aggregat aus oxidierten Proteinen, Lipiden, Oligosacchariden und Metallen, dessen Vorkommen charakteristisch für älteres Gewebe ist und ebenfalls vorrangig lysosomal vorliegt. Lipofuscin lässt sich über Sudan-Black B (SBB) anfärben (Georgakopoulou et al., 2013). Diese Methode wurde 2017 weiter optimiert (Salmonowicz & Passos, 2017).

Die veränderte Zellmorphologie seneszenten Zellen zeigt sich auch in der Gestalt eines vergrößerten Zellkerns, der eine irreguläre Form aufweist. Dies kann auf eine Degradierung der Kernlamina zurückgeführt werden. Diese Hypothese wird gestützt von der verringerten Expression von *LMNB1*, welches für das Laminin-bildende Protein LaminB1 kodiert, die für seneszenten Zellen beobachtet werden konnte (Freund, Laberge, Demaria, & Campisi, 2012). Aufgrund der drastischen morphologischen Veränderungen, ist auch eine Veränderung der Chromatinstruktur naheliegend. So wurden bereits 2003 von Narita et al. *senescence-associated heterochromatic foci* (SAHF) beschrieben (Narita et al., 2003). Hierbei handelt es sich um eine Komplexbildung aus Heterochromatin und dem Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (Rb) an Promotoren, die der Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor E2F unterliegen.

Ebenfalls konnte bei seneszenten Zellen eine Auflockerung der normalerweise kompakten Satelliten DNA der Centromere festgestellt werden. Diese wurden mittels DNA-Hybridisierung der Sonden *alpha-Sat* und *satellite II* nachgewiesen. Diese Beobachtung wird als *senescence-associated distension of satellites* (SAD) bezeichnet (Swanson, Manning, Zhang, & Lawrence, 2013). Ein weiteres Merkmal von seneszenten Zellen ist die Akkumulation von γ -H2AX im Zellkern. γ -H2AX ist die phosphorylierte Variante des Histons H2AX. Die Phosphorylierung dieses Histons tritt in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen oder Telomerverkürzungen auf und ist das Resultat der Aktivierung der *DNA damage response* (Albrecht et al.). γ -H2AX dient der Assemblierung des DNA Reparatur Komplexes (Kinner, Wu, Staudt, & Iliakis, 2008) (Celeste et al., 2002).

Neben der Phosphorylierung von H2A tritt auch die Trimethylierung des Histons H3 an Lysin 9 (H3K9me3) in seneszenten Zellen, aufgrund von DNA Schäden, verstärkt auf. H3K9me3 dient als Bindestelle für Tip60. Tip60 ist eine Acetyltransferase, welche über die Acetylierung von ATM die DDR Signalkaskade auslöst (Ayrapetov, Gursoy-Yuzugullu, Xu, Xu, & Price, 2014).

Während Histone verstärkt modifiziert werden, können sich seneszenten Zellen auch durch den Transfer von nukleären Proteinen in den extrazellulären Raum auszeichnen. Dies wurde von Davalos et al. für das Chromatin organisierende Protein *high mobility group box 1* (HMGB1) gezeigt (Davalos et al., 2013).

Die Beeinträchtigung der Zellkernintegrität und die Veränderungen der Chromatinstruktur haben ein stark verändertes Genexpressionsprofil zur Folge. Dieses variiert je nach Seneszenzstimulus und betroffenem Zelltyp. Als etablierte Marker für seneszenten Zellen gelten, aufgrund des arretierten Zellzyklus von seneszenten Zellen, erhöhte Genexpressionslevel der Zellzyklusinhibitoren *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* (siehe **1.1.5**) sowie reduzierte Expressionslevel von *LMNB1*. In einer großen Transkriptomics Analyse, wurde ein RNA Profil (*senescence core signature*) beschrieben, welches für jede humane seneszenten Zelle unabhängig vom Zelltyp, Seneszenz-Stimulus und Zeitpunkt nach Seneszenzinduktion zutreffen soll. Die Expression von 13 Genen war Seneszenz-abhängig reguliert. Entgegen den Erwartungen waren unter den 13 Genen keiner der obigen genannten, etablierten Marker (Hernandez-Segura et al., 2017). Hierbei ist anzumerken, dass *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* nicht zu der *senescence core signature* gezählt

wurden, da für diese Gene sowohl in seneszenten als auch in quieszenten Zellen eine erhöhte Genexpression festgestellt werden konnte.

Seneszente Zellen zeichnen sich nicht nur durch ein verändertes Transkriptom sondern auch durch ein proinflammatorisches Sekretom aus. Dieses wird als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) deklariert (siehe **1.1.3**) (Acosta et al., 2013). Der erhöhten sekretorischen Aktivität der Zellen, liegt auch eine gesteigerte metabolische Aktivität zugrunde (James et al., 2015; Nacarelli & Sell, 2017). Zeitgleich weisen seneszente Zellen eine Akkumulation von Mitochondrien mit einem erniedrigten Membranpotential auf (Passos et al., 2007; Tai et al., 2017). Der SASP ist ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Seneszenz und Quieszenz (Terzi et al., 2016). Neben dem SASP kommunizieren seneszente Zellen auch über interzellulären Proteintransfer mit ihrer Umgebung (Biran et al., 2015). Die parakrine Signalübertragung ermöglicht somit die Seneszenzinduktion von benachbarten Zellen, autokrine Signalübertragung verstärkt die Etablierung und den Erhalt des seneszenten Zellphänotyps (Alessio et al., 2019; Nelson et al., 2012).

Eine weitere interessante Eigenschaft von seneszenten Zellen ist die Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen (SCAPs) (Zhu et al., 2015). Die Bedeutung dieser Signalwege wird unter **1.1.4** genauer beschrieben.

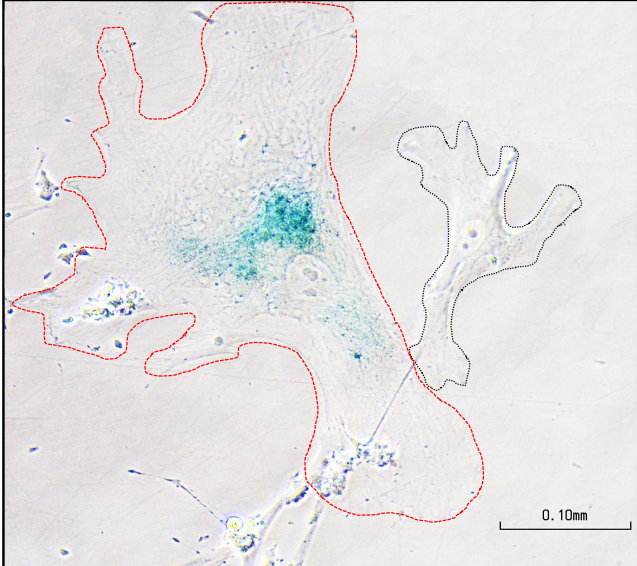
Mikroskopische Aufnahme einer seneszenten Zelle	Merkmale einer seneszenten Zelle
	<ul style="list-style-type: none"> • vergrößerte, abgeflachte Zellmorphologie • vergrößerter, unregelmäßig geformter Zellkern • ER Stress • Vesikelansammlung • Akkumulation von Mitochondrien • Lipofuscin • veränderte Chromatinstruktur/ epigenetische Veränderungen • Zellzyklusarrest • SASP • Aktivierung von SCAPs

Abbildung 1: Die Eigenschaften zellulärer Seneszenz

Die mikroskopische Aufnahme zeigt eine seneszente humane mesenchymale Stromazelle (rot umrandet) im Vergleich zu einer nicht-seneszenten humanen mesenchymalen Stromazelle (schwarz umrandet). Typische Merkmale der Seneszenz, wie eine Zellvergrößerung, ein irregulärer und vergrößerter Zellkern sowie Ablagerungen der blauen Pigmente im Zellzytoplasma nach durchgeführter SA-βGal Färbung sind zu erkennen.

Obwohl seneszente Zellen die wichtige Fähigkeit der Zellproliferation verlieren, kann ihr Vorkommen durchaus positive Auswirkungen für den Organismus haben. Hierbei scheint die zeitliche Dauer des Vorhandenseins von seneszenten Zellen von entscheidender Rolle zu sein. So ist ein temporäres Vorkommen von seneszenten Zellen vorrangig mit einem positiven Einfluss auf den Organismus attribuiert. Das zeitlich limitierte Auftreten von seneszenten Zellen konnte für Prozesse wie die Embryogenese, Tumorsuppression und Regeneration beobachtet werden.

Können die seneszenten Zellen hingegen nicht beseitigt werden und kommt es eventuell sogar zu einer Anreicherung dieser, wird der Organismus über ein anhaltendes proinflammatorisches Signal des SASP geschädigt (Coppe, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010). Dieser Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP) wird in Abschnitt **1.1.3** näher erläutert.

1.1.2 Viele Wege führen in die Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist eine schützende und alarmierende Zellantwort als Reaktion auf unterschiedliche Stressfaktoren. Der Phänotyp der zellulären Seneszenz ist abhängig vom betroffenen Zelltyp (Wiley et al., 2017) und dem auslösenden Stress-Stimulus (Campisi, 2013; Hernandez-Segura et al., 2018). Mittels *in vitro* Experimenten konnte bereits die Vielfalt der verschiedenen Stress-Stimulatoren näher untersucht werden. Dabei haben alle Stress-Stimulatoren eines gemeinsam, sie aktivieren die *DNA damage response* Signalkaskade (Albrecht et al.). Die Beobachtungen von Hayflick und Moorhead, dass Zellen nach Erreichen ihres Hayflick Limits seneszent werden, wird als replikative Seneszenz bezeichnet (Campisi, 1996). Jede Zellteilung geht mit einer Verkürzung der Telomere, GC-reiche Nukleotidsequenzen, die dem Schutz und der Stabilität von chromosomaler DNA dienen, einher. Durch eine kritische Telomerverkürzung ist die schützende Funktion für die DNA Integrität nicht mehr gewährleistet. In der Folge wird die *DNA damage* Signaltransduktion initiiert und die Zelle seneszent (Allsopp et al., 1995; Allsopp & Harley, 1995; Harley, Futcher, & Greider, 1990). Die replikative Seneszenz ist jedoch nur eine von vielen Stressantworten. Weitere Gruppen von Seneszenz-Stimuli sind eine erhöhte Onkogen-Expression (*oncogene-induced senescence*; OIS), epigenetische Veränderungen durch inhibierte DNA Methylasen und Histondeacetylasen (*epigenetically induced senescence*) sowie oxidativer Stress durch *reactive oxygen species* (ROS) (*oxidative stress-induced senescence*) und metabolischer Stress über eine mitochondriale Dysfunktion (*mitochondrial dysfunction-associated senescence*; miDAS) (Hernandez-Segura et al., 2018; Wiley et al., 2016). Des Weiteren lösen direkte Schäden der DNA eine DDR Antwort aus. So wurde für ionisierende oder ultraviolette Bestrahlung (*DNA-damage-induced senescence*), als auch für diverse Chemotherapeutika (*chemotherapy-induced senescence*) eine Seneszenz-induzierende Wirkung nachgewiesen (Munoz-Espin & Serrano, 2014; Petrova, Velichko, Razin, & Kantidze, 2016).

Doch nicht jede DDR Signaltransduktion mündet in dem Zustand der zellulären Seneszenz. Geringfügige DNA Schäden können behoben werden und die Zelle tritt wieder in den Zellzyklus ein. Handelt es sich um irreparable und anhaltende DNA Schäden, wird die zelluläre Seneszenz initiiert. Liegt eine Schädigung der DNA mit gravierenden Ausmaßen vor, wird die Zellapoptose ausgelöst (Burton & Krizhanovsky, 2014; Rodier et al., 2009).

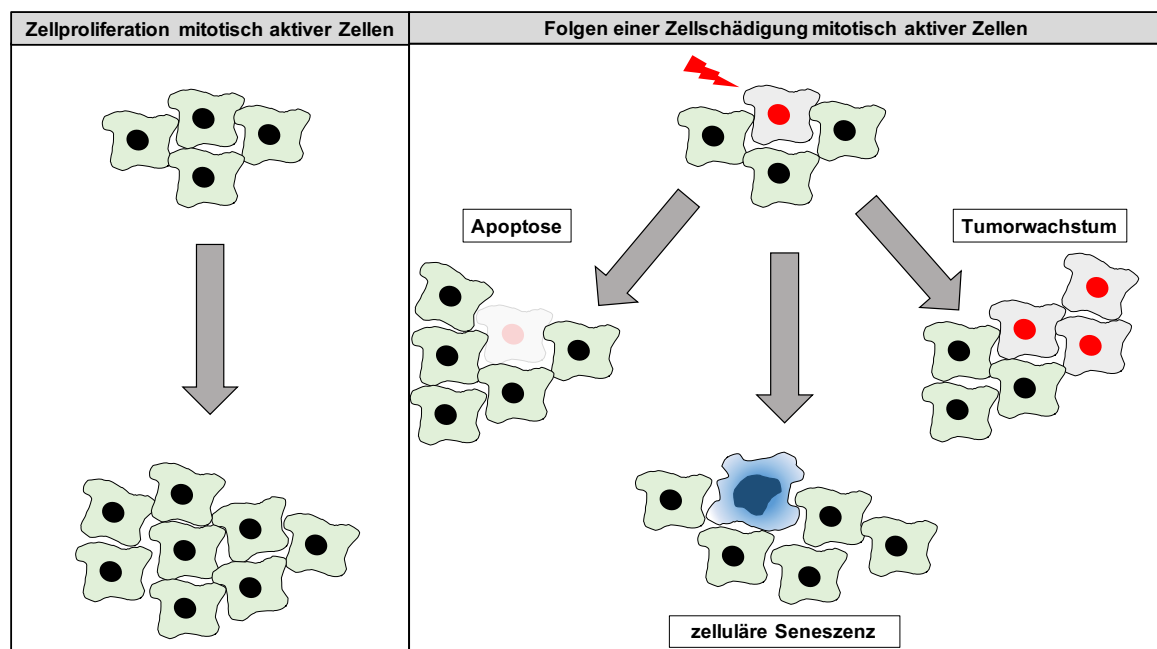


Abbildung 2: Die zelluläre Seneszenz als Schutzmechanismus bei vorliegender Zellschädigung

1.1.3 Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP)

Der SASP ist der Terminus für das aus Chemokinen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen bestehende Sekretom einer seneszenten Zelle. In seiner Komposition ist der SASP jedoch ein sehr heterogenes Merkmal der Seneszenz. Das Sekretom unterscheidet sich nicht nur ausgehend von dem betroffenen Zelltyp und dem auslösenden Stress-Stimulus, sondern verändert sich auch im zeitlichen Verlauf der Seneszenz (Hernandez-Segura et al., 2017) (Wiley et al., 2016) (Hoare et al., 2016). Die Transkription der SASP Komponenten wird vorrangig über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer'of activated B cells* (NF- κ B) vermittelt (Salminen, Kauppinen, & Kaarniranta, 2012). Weiteren Transkriptionsfaktoren wie GATA4 und C/EBP β (C. Kang et al., 2015) sowie dem NOTCH und dem JAK/Stat3 Signalweg (Hayakawa et al., 2015; Hoare et al., 2016) wird ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Transkription von SASP assoziierten Genen zugeschrieben. Neben der erhöhten Aktivität der Transkriptionsfaktoren, wird die Genexpression durch epigenetische Veränderungen gesteigert. Reduzierte Expressionslevel für die Histondeacetylase Sirtuin1 (SIRT1) sowie verringerte Di-

Methylierungen am 9. Lysin des Histon3 (H3K9me2). Von diesen epigenetischen Veränderungen sind unter anderem die Promotorbereiche der verlässlichen Seneszenzmarker IL-6 und IL-8 betroffen, sodass für IL-6 und IL-8 eine gesteigerte Transkription nachgewiesen werden kann (Hayakawa et al., 2015; A. Takahashi et al., 2012). Zusätzlich wird über das Chromatin-bindende high-mobility group protein B (HMGB2) die Bildung des stark kondensierten Heterochromatins unterbunden (Aird et al., 2016).

Ergänzend zu den epigenetischen Modifikationen greifen auf post-transkriptioneller Ebene Prozesse, die eine erhöhte Stabilität der SASP mRNA gewährleisten. Hierzu zählt die Stabilisierung anhand von RNA-bindenden Proteinen, die wiederum über den p38/MAPK Signalweg aktiviert werden (Alimbetov et al., 2016; Tiedje et al., 2012). Zusätzlich unterbindet die mTOR Signaltransduktion die Degradierung von SASP-mRNA (Herranz et al., 2015). Des Weiteren verstärkt die Translation des SASP Moleküls IL-1 α die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und C/EBP β (Kuilman et al., 2008; Laberge et al., 2015). Dies verstärkt die zelluläre Seneszenz über autokrine Wirkung und kann zeitgleich über parakrine Stimulation Seneszenz in benachbarten Zellen auslösen. Neben IL-1 α gehören auch Moleküle der TGF- β Superfamilie sowie auch VEGF, CCL2 und CCL20 zu den Seneszenz-stimulierenden SASP Faktoren (Acosta et al., 2013).

Nach erfolgter Transkription und Translation der SASP Moleküle schließt sich deren Sekretion an. Die Sekretion der SASP Faktoren kann auf drei unterschiedliche Arten erfolgen. Die SASP Moleküle können über Exosom-artige Vesikel in den extrazellulären Raum transportiert werden oder sie werden, sofern es sich um lösliche Produkte handelt, direkt freigesetzt (Jeon et al., 2019) (Lehmann et al., 2008; Takasugi et al., 2017). Die Sekretion von Transmembranproteinen erfolgt nach Abspaltung über Shedding-Enzyme wie ADAM17 (Effenberger et al., 2014; Morancho, Martinez-Barriocanal, Villanueva, & Arribas, 2015; Stow & Murray, 2013).

1.1.4 Senolytika antagonisieren *senescent cell anti-apoptotic pathways* (SCAPs)

Neben dem SASP ist ein weiteres Merkmal seneszenten Zellen ihre Resistenz gegenüber Apoptose. Dieser Effekt wird über eine Aktivierung diverser anti-apoptotischen Signalwege, die als *senescent cell anti-apoptotic pathways* (SCAPs) bezeichnet werden, vermittelt. Zu diesen SCAPs zählen bisweilen Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K)/ AKT Signalwege, Rezeptor Tyrosinkinasen, p53/p21/ Serpine und BCL-2/BCL-XL/MCL-1 Signalkaskaden (C. Kang, 2019).

Werden die SCAPs antagonisiert, resultiert dies in einer spezifischen Apoptoseinduktion seneszenten Zellen. Substanzen, die inhibierende Eigenschaften auf SCAPs haben, werden als Senolytika bezeichnet (Zhu et al., 2015). Diese Substanzen finden aktuell großes wissenschaftliches Interesse. In einem groß angelegten Versuch mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Therapie der Senolytika Dasatinib und Quercetin (D+Q) die Lebenszeit und Lebensqualität von Mäusen durch eine Depletierung von seneszenten Zellen verbessern konnte (Xu et al., 2018). Aktuell werden in klinischen Studien die Senolytika bereits als Therapieform bei Seneszenz-assoziierten Krankheiten untersucht. Die ersten veröffentlichten Daten entstammen einer Studie mit 14 Patienten, die an der idiopathischen Lungenfibrose litten. Die Patienten wurden über einen Zeitraum von drei Wochen mit einer kombinierten Therapie der Senolytika D+Q behandelt. Hier zeigte sich ein positiver Effekt auf die Mobilität der Patienten nach D+Q Behandlung (Justice et al., 2019). In einer weiteren Studie konnte erstmals der Nachweis einer D+Q-vermittelten Seneszenzdepletierung im menschlichen Organismus in Zusammenhang mit diabetischer Nephropathie erbracht werden (Hickson et al., 2019). Des Weiteren wurden auch die ersten Ergebnisse einer Phase I Studie der Verwendung von UBX0101 zur Behandlung von Osteoarthritis veröffentlicht. Die Unbedenklichkeit der UBX0101 Therapie konnte nachgewiesen werden, wie auch eine Schmerzreduktion für die Patienten (Hsu et al., 2020). Aufgrund der Heterogenität zellulärer Seneszenz ist eine kombinierte Therapie mit verschiedenen Senolytika am effektivsten. Neben D+Q wurden auch weitere Substanzen wie Navitoclax, Fisetin, A1331852, A1155463, ABT737, und FOXO4-DRI mit senolytischen Eigenschaften in unterschiedlichen Bereichen getestet (siehe **Tabelle 1**).

Tabelle 1: Senolytika werden im Rahmen von Klinischen Studien in verschiedenen Anwendungsbereichen getestet

Senolytika	Funktion	Anwendung	Klinische Studie
<p>Dasatinib (Zhu et al., 2015)</p>	<p>Thyrosinkinase Inhibitor</p>	<p>Neurodegenerative Erkrankungen, Idiopathische Lungenfibrose, Leberfibrose, Hepatische Steatose, Chronische Nierenerkrankung, Atherosklerose, Osteoarthrose, Osteoporose, Herzfunktionsstörungen</p>	<p><u>Titel:</u> ,Pilot Study to Investigate the Safety and Feasibility of Senolytic Therapy to Modulate Progression of Alzheimer's Disease (SToMP-AD)' 2020-2022; Phase I und II</p>
			<p><u>Titel:</u> , Senescence, Frailty, and Mesenchymal Stem Cell Functionality in Chronic Kidney Disease: Effect of Senolytic Agents' 2016-2020; Phase II</p>
<p>Quercetin (Zhu et al., 2015)</p>	<p>Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) Inhibitor</p>		<p><u>Titel:</u> ,Targeted Removal of Pro-Inflammatory Cells: An Open Label Human Pilot Study in Idiopathic Pulmonary Fibrosis' 2016-2019; Phase I; abgeschlossen</p> <p><u>Titel:</u> Targeting Cellular Senescence With Senolytics to Improve Skeletal Health in Older Humans: A Phase 2, Single-Center, 20-week, Open-Label, Randomized Controlled Trial. 2020-2023; Phase II</p>

Senolytika	Funktion	Anwendung	Klinische Studie
<p>Navitoclax (ABT263) (Zhu et al., 2016) (Chang et al., 2016)</p>	<p>Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w Inhibitor</p>	<p>Glaukom, Hämatoxizität, Sarkopenie, Gebrechlichkeit, Diabetes, Atherosklerose, Neurodegenerative Erkrankungen, Adipositas-induzierte Angst</p>	
<p>Fisetin (Yousefzadeh et al., 2018) (Zhu et al., 2017)</p>	<p>Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) Inhibitor</p>	<p>Insulinresistenz, Entzündung, Knochenresorption, Osteoarthritis, Physische Dysfunktion</p>	<p><u>Titel:</u> ,AFFIRM-LITE: A Phase 2 Randomized, Placebo- Controlled Study of Alleviation by Fisetin of Frailty, Inflammation, and Related Measures in Older Adults' 2018-2020; Phase II</p> <p><u>Titel:</u> AFFIRM: A Phase 2 Randomized, Placebo- Controlled Study of Alleviation by Fisetin of Frailty, Inflammation, and Related Measures in Older Women 2018-2020; Phase II</p>

Senolytika	Funktion	Anwendung	Klinische Studie
<p>Fisetin (Yousefzadeh et al., 2018) (Zhu et al., 2017)</p>	<p>Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) Inhibitor</p>	<p>Insulinresistenz, Entzündung, Knochenresorption, Osteoarthritis, Physische Dysfunktion</p>	<p><u>Titel:</u> ,Frailty, Inflammation, and Stem Cell Functionality in Chronic Kidney Disease' 2018-2025; Phase II</p> <p><u>Titel:</u> ,Senolytic Drugs Attenuate Osteoarthritis-Related Articular Cartilage Degeneration: A clinical Trial' 2020-2022; Phase I/II</p> <p><u>Titel:</u> Targeting Cellular Senescence With Senolytics to Improve Skeletal Health in Older Humans: A Phase 2, Single-Center, 20-week, Open-Label, Randomized Controlled Trial. 2020-2023; Phase II</p>
<p>A1331852 (Zhu et al., 2017)</p>	<p>BCL-XL Inhibitor</p>	<p>Leberfibrose, Hepatische Steatose</p>	
<p>A1155463 (Zhu et al., 2017)</p>	<p>BCL-XL Inhibitor</p>	<p>Leberfibrose, Hepatische Steatose</p>	
<p>ABT737 (Yosef et al., 2016)</p>	<p>Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w Inhibitor</p>	<p>Leberfibrose, Hepatische Steatose</p>	

Senolytika	Funktion	Anwendung	Klinische Studie
<p>UBX0101 (Jeon et al., 2017)</p>	<p>Proto-Onkogen Protein C MDM2 Inhibitor</p>	<p>Osteoarthritis, Osteoporose</p>	<p><u>Titel:</u> ,A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Dose Study of UBX0101 in Moderate to Severe, Painful Osteoarthritis of the Knee' 2019-2020; Phase II; abgeschlossen</p> <p><u>Titel:</u> ,A Phase 1, Double-Blind, Randomized, Placebo Controlled, Single Ascending Dose Study to Assess the Safety and Tolerability of UBX0101 in Moderate to Severe, Painful Osteoarthritis of the Knee' 2018-2019; Phase I; abgeschlossen</p> <p><u>Titel:</u> A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of Single and Repeat Dose Administration of UBX0101 in Moderate to Severe, Painful Osteoarthritis of the Knee 2020-2020; Phase I; abgeschlossen</p>

Einleitung

Senolytika	Funktion	Anwendung	Klinische Studie
			<p><u>Titel:</u> Long-Term Follow-Up Study of Patients With Moderate to Severe, Painful Osteoarthritis of the Knee Who Participated in a Randomized, Placebo-Controlled Study of UBX0101</p> <p><u>Beendet:</u> Studienziele konnten nicht erreicht werden</p>
<p>FOXO4-DRI (Baar et al., 2017) (Valentijn, Falke, Nguyen, & Goldschmeding, 2018)</p>	FOXO4 Inhibitor	Sarkopenie, Gebrechlichkeit, Glomerulosklerose	

Alle Angaben zu den klinischen Studien sind dem offiziellen Internetverzeichnis clinicaltrials.gov entnommen. Der letzte Zugriff erfolgte am 27.11.2020.

Eine weitere Gruppe von Substanzen, die gezielt den SASP unterbinden soll, sind die Senomorphika. Hierbei werden verschiedene Zielmoleküle adressiert. Der bekannteste Vertreter dieser Zielmoleküle ist NFκB (Chien et al., 2011). Der über NFκB vermittelte SASP kann über Metformin geblockt werden (Moiseeva et al., 2013). Hingegen inhibiert Ruxolitinib den JAK-Signalweg vermittelten SASP (Farr et al., 2017; Xu, Palmer, et al., 2015; Xu, Tchkonja, et al., 2015). Ebenfalls zu den Senomorphika zählt das immunsuppressive Medikament Rapamycin (R. Wang et al., 2017) (Pospelova et al., 2012) (Demidenko et al., 2009). Rapamycin inhibiert durch seine indirekte Bindung an mTOR eine weitere wichtige Signaltransduktion des SASP (Herranz et al., 2015; Laberge et al., 2015). Neben NFκB, JAK und mTOR Signalmolekülen werden auch BRD4 (Tasdemir et al., 2016), cGAS/STING (Dou et al., 2017; Gluck et al., 2017; Yang, Wang, Ren, Chen, & Chen, 2017), GATA4 (C. Kang et al., 2015) und p38 (Freund, Patil, & Campisi, 2011) als SASP Zielmoleküle beschrieben.

1.1.5 p16^{INK4a} und p21^{WAF-1/Cip-1} hemmen die Zellzyklusprogression

Der Zellzyklus ist ein hoch organisierter Prozess, der in der Teilung einer Zelle gipfelt. Dieser Prozess kann in vier Phasen aufgeteilt werden. Die eigentliche Phase der Zellteilung, die Mitose (M) ist dabei mit einer Dauer von ungefähr einer Stunde die kürzeste Phase. Nach abgeschlossener Mitose schließt sich die erste *gap* Phase, die G₁-Phase (G₁) an. Die *gap* Phasen dienen im Zellzyklus als Kontrollphasen. Bevor es zur DNA-Synthese in der S-Phase (S) kommt, wird überprüft, dass die Zellteilung fehlerfrei von statten gegangen ist. So schließt sich auch nach der DNA Verdopplung eine weitere *gap* Phase, die G₂-Phase (G₂) an. G₁, S und G₂ Phase bilden zusammen die Interphase (L. Liu, Michowski, Kolodziejczyk, & Sicinski, 2019). Seneszente Zellen verlassen dieses zyklische Modell in der G₁ Phase nach der Mitose und verweilen in einem irreversiblen Zellzyklusarrest (Gire & Dulic, 2015).

Die Übergänge der einzelnen Zellzyklusphasen unterliegen komplexen Kontrollmaschinerien, welche im Zellkern lokalisiert sind (Shackelford, Kaufmann, & Paules, 1999). Für den Übergang der Zellen von der G₁ in die S-Phase ist nach aktuellem Wissensstand die Aktivität der E2F Transkriptionsfaktoren essentiell, wodurch die Expression von Genen initiiert wird, deren Proteine das Fortschreiten des Zellzykluses von der G₁ in die S-Phase ermöglichen (Johnson & Schneider-Broussard, 1998). Die Aktivität von E2F wird durch die Interaktion mit phosphoryliertem Retinoblastoma Protein (RB_p) gehemmt. Über die Dephosphorylierung von RB erfolgt die Aktivierung von E2F (Giacinti & Giordano, 2006). Die Dephosphorylierung von RB erfolgt über die Cyclin abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4 und CDK6). Diese Kinasen werden aktiv, sobald sie einen Komplex mit D-Typ Cyclinen bilden (Romero-Pozuelo, Figlia, Kaya, Martin-Villalba, & Teleman, 2020). Neben den CyclinD-CDK4/6 Komplexen, sind auch Komplexe der E-Typ Cycline mit den Cyclin abhängigen Kinasen 1,2 und 3 (CDK1/2/3) involviert (Satyanarayana & Kaldis, 2009).

Zudem wird der Übergang von der G₁ Phase in die S Phase durch einen CDK2/CyclinE Komplex reguliert (Bertoli, Skotheim, & de Bruin, 2013). Die späte S Phase ist dann gekennzeichnet durch einen vorherrschenden Komplex aus Cyclin A2 mit CDK1 oder CDK2 (De Boer et al., 2008). Nachfolgend translokiert in der G₂ Phase Cyclin B in den Nukleus und aktiviert CDK1 (Furuno, den Elzen, & Pines, 1999). Dies signalisiert die Aufteilung des neu synthetisierten genetischen Materials in der S Phase auf die Tochterzellen (Gavet & Pines, 2010).

Neben den CDK Molekülen, die als positive Regulatoren für den Zellzyklus gelten, gibt es auch die Zellzyklusinhibitoren. Man unterscheidet hier zwei Gruppen. Zum einen die INK Proteine. Dazu zählen p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} (Canepa et al., 2007). Zum anderen die Gruppe der KIP/CIP Proteine. Hierzu gehören p21^{WAF-1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (Besson, Dowdy, & Roberts, 2008). Die Inhibierung des Zellzyklusprozesses erfolgt bei den INK Proteinen über eine Interaktion mit CDK4 und CDK6, sodass eine Verbindung der Cyclin abhängigen Kinasen mit den D Cyclinen unterbunden wird (Canepa et al., 2007). Die KIP/CIP Proteine hingegen interferieren

mit der Kinase-Aktivität von CDK1 und CDK2 (Ullah, Lee, & Depamphilis, 2009) (Cerqueira et al., 2014).

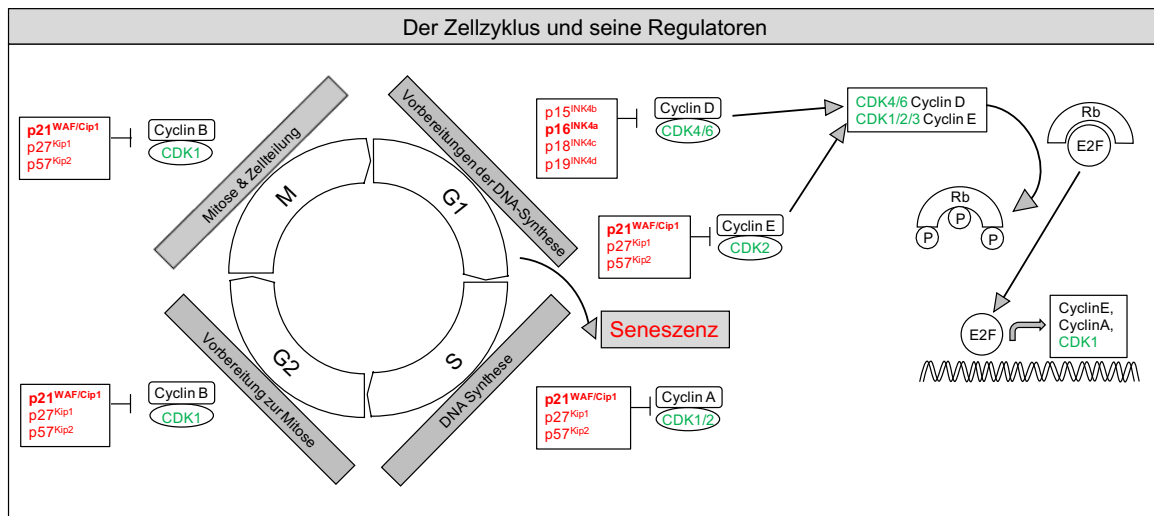


Abbildung 3: Skizze des Zellzyklus und seiner regulierenden Proteine

Diese Zusammenfassung stellt allerdings eine recht grobe Skizzierung der weitaus komplexeren Prozesse der Zellproliferation dar.

Wenngleich es mehrere Zellzyklusinhibitoren gibt, so gelten lediglich p16^{INK4a} und p21^{WAF1/Cip-1} als die Standardmarker der zellulären Seneszenz (Idda et al., 2020).

1.1.6 Die Besonderheit des *Cdkn2a* Genlokus

Der *Cdkn2a* Genlokus kodiert für zwei Proteine mit verschiedenen Funktionen. Dies ist für die Verwendung von *Cdkn2a* Mausmodellen sowie der Analyse von *Cdkn2a* Expressionsleveln, wie es Teil dieser Arbeit war, von großer Bedeutung.

Für den *Cdkn2a* Lokus sind drei verschiedene Splicevarianten, die für zwei unterschiedliche Proteine kodieren, bekannt. Bei zwei dieser Splicevarianten handelt es sich um die mRNA der strukturähnliche Isoformen von p16^{INK4a}. Alle Splicevarianten setzen sich aus drei Exons zusammen. Hierbei sind Exon 2 und Exon 3 bei allen drei Splicevarianten relativ ähnlich. Große Abweichungen bestehen allerdings für Exon 1. Teil der dritten Splicevariante ist das weiter *upstream* liegende Exon1 β . Bei den anderen Splicevarianten ist Exon1 α das erste Exon. Im murinen Organismus ist das Produkt der Translation der dritten Splicevariante als p19^{ARF} deklariert. Der *Cdkn2a* Lokus ist zwischen dem *Homo sapiens* und der *Mus musculus* stark konserviert. Nur die Bezeichnung des Proteins, welches auf die dritte Splicevariante zurückzuführen ist, variiert. Beim Menschen handelt es sich per Definition um das Protein p14^{ARF}.

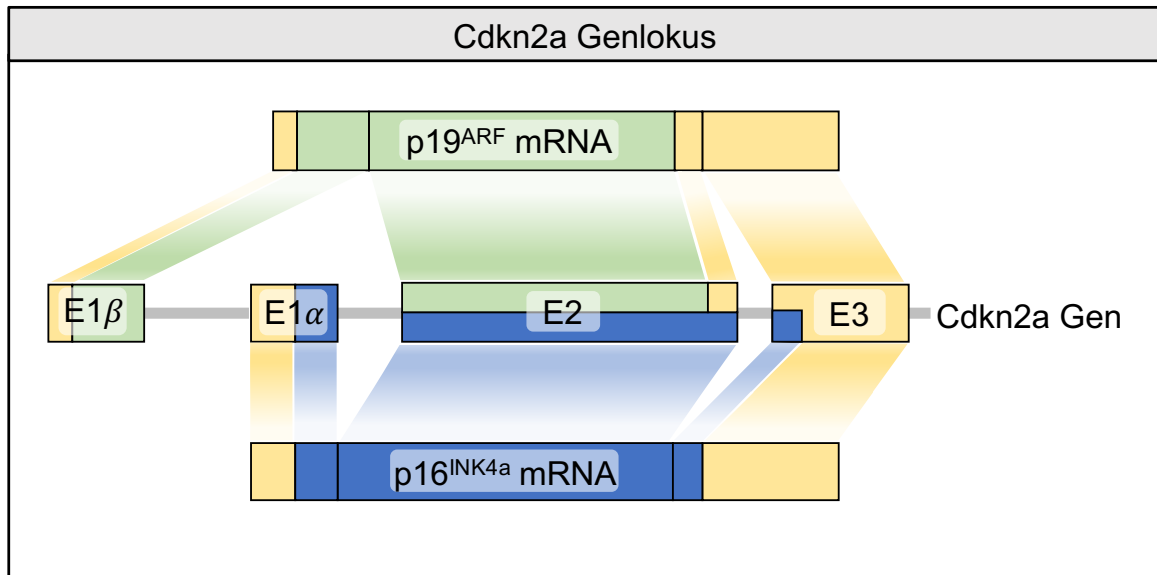


Abbildung 4: *Cdkn2a* Locus kodiert für die Proteine p16^{INK4a} und p19^{ARF} bzw. p14^{ARF}.

Dargestellt ist eine schematische Abbildung des *Cdkn2a* Genlokus der Maus. Dieser Locus kodiert für die Proteine p16^{INK4a} und p19^{ARF} in zwei überlappenden *open reading frames* (ORF). Die mRNA von p16^{INK4a} setzt sich aus Exon1α Exon2 (E2) und Exon 3 (E3) zusammen. Hingegen kodieren für das Protein p19^{ARF} die Exons E1β, E2 und E3. Der *Cdkn2a* Locus ist sehr konserviert zwischen Mensch und Maus. Lediglich die Bezeichnung der Proteine variiert. Im humanen Organismus wird das Protein p19^{ARF} als p14^{ARF} betitelt. Auch wenn p16^{INK4a} und p19^{ARF}/p14^{ARF} vom selben Genlokus kodiert werden, so unterscheidet sich ihr Funktionsweise deutlich (Clurman & Groudine, 1998).

1.2 Knochen

Das menschliche Skelett besteht aus 213 Knochen (Standring, 2004). Je nach Zählart kann es hier zu Abweichungen kommen. Das Skelett ist ein elementarer Bestandteil des Menschen. Es hat eine strukturgebende, stützende und schützende Funktion und befähigt ein Individuum als Befestigungspunkt für Muskeln und Sehnen zur Bewegung. Die einzelnen Knochen können in fünf Gruppen unterteilt werden: Röhrenknochen (*Ossa longa*), Plattknochen (*Ossa plana*), kurze kompakte Knochen (*Ossa brevia*), lufthaltige Knochen (*Ossa pneumatica*) und Sesambeine (*Ossa sesamoidea*) (J. Gordon Betts, 2013). Im Zuge dieser Arbeit wurden Untersuchungen am Oberschenkelknochen (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) durchgeführt. Beide Knochen gehören zu den langen Röhrenknochen. Zum besseren Verständnis, ist nachfolgend die Anatomie dieser Knochengruppe kurz erläutert.

Die distalen und proximalen Enden des langen Röhrenknochens werden als Epiphyse bezeichnet. Der Bereich dazwischen als Diaphyse. Der Übergang der Epiphyse zur Diaphyse wird von der Metaphyse gebildet. Die Diaphyse zeichnet sich durch eine kompakte Knochenstruktur (kortikalen Knochen) aus, welche die Markhöhle umschließt. Der kortikale Knochen grenzt sich über das Endosteum von der Markhöhle ab. Das Endosteum ist der Bereich in dem die Knochenformation, Knochenregeneration und der Knochenumbau stattfindet. Nach außen wird der kortikale Knochen vom Periosteum umschlossen, dieses enthält die für die Versorgung des kortikalen Knochens notwendigen Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße. Die Epiphyse ist ein Bereich des Knochens, der sich durch einen dünneren kortikalen Knochen auszeichnet, welcher ein feinstrukturiertes Knochenetzwerk (trabekulärer Knochen) nach außen abgrenzt. Hier findet sich auch das rote Knochenmark. Das Längenwachstum der langen Röhrenknochen findet im Bereich der Metaphyse statt. Kennzeichnend ist die Wachstumsfuge und eine Akkumulation von hyalinem Knorpel (B. Clarke, 2008) (J. Gordon Betts, 2013).

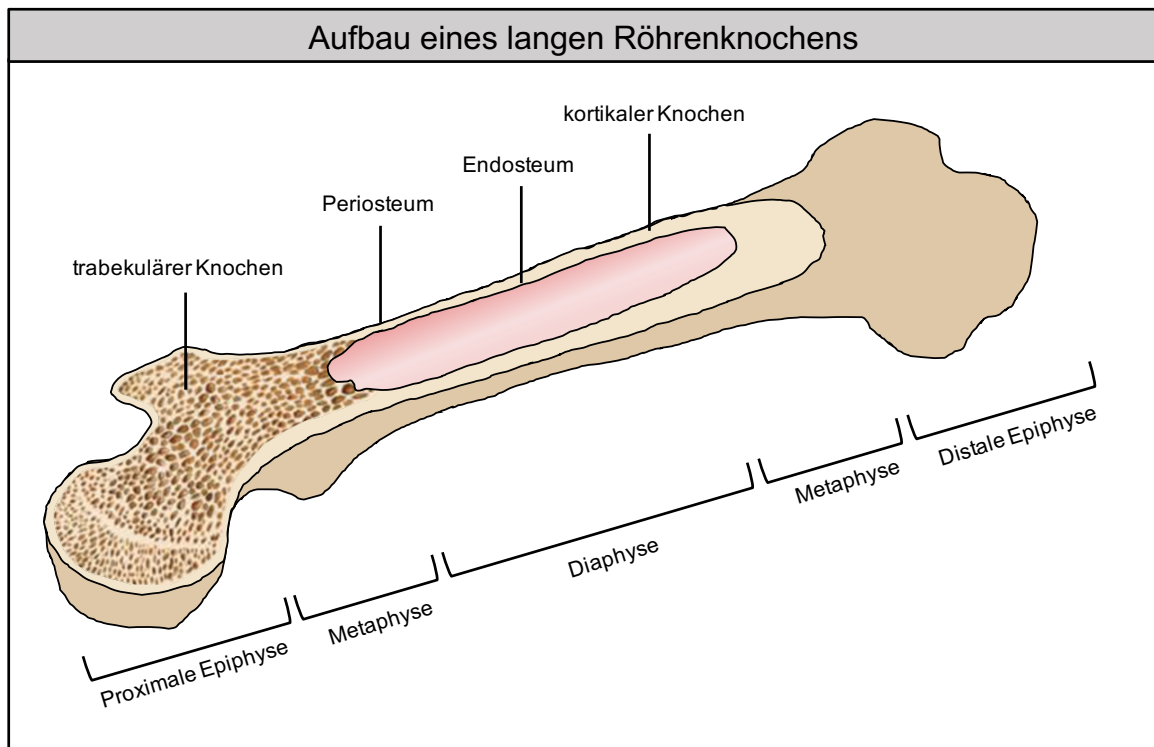


Abbildung 5: Aufbau eines langen Röhrenknochens

Die wesentlichen Bestandteile des Knochens sind der kortikale und trabekuläre Knochen sowie das Knochenmark. Der kompakte kortikale Knochen zeichnet sich durch ein Verhältnis von 4:1 der Knochenmasse zur Knochenoberfläche aus. Bei den feinen Strukturen des trabekulären Knochens ist das Verhältnis der Knochenmasse zur Knochenoberfläche genau umgekehrt und beläuft sich auf 1:4 (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Des Weiteren kann die Knochensubstanz des kompakten kortikalen Knochens und der feinen Knochenbälkchen des trabekulären Knochens in eine anorganische und eine organische Komponente dividiert werden (Lindsay M. Biga). Der anorganische Knochenanteil besteht zum größten Teil aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), einer kristallinen Struktur aus Calciumphosphat und Calciumcarbonat. Hydroxylapatitkristalle geben dem Knochen seine feste Struktur und machen den Knochen als Calcium und Phosphatreservoir zu einem wichtigen Modulator der Ionenhomöostase im Organismus (Zaidi, 2007). Neben Calcium und Phosphat gehören auch Carbonate, Citrate, Fluoride, Natrium, Kalium, und Magnesium zu den knochenbildenden Mineralien (Safadi, 2009).

Die organischen Knochenkomponenten tragen zu der Flexibilität der Knochen bei, sodass diese nicht brüchig werden. Hierzu zählen die Kollagenfasern und der im Verhältnis quantitativ geringere Anteil der Knochenzellen. Namentlich Osteoklasten und Osteoblasten sowie deren Vorläuferzellen und Osteozyten. Die Knochenzellen werden im nachfolgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.2.1 Der Knochen- ein lebendiges Organ

Knochen befindet sich in einem empfindlichen Gleichgewicht aus permanentem Knochenaufbau und Knochenabbau. Dieser Prozess wird als *bone remodeling* bezeichnet. Durch den ständigen Knochenumbau wird auch die Beseitigung von kleinen Mikrofrakturen, die durch die alltägliche Belastung auftreten, beseitigt. Zudem kann über den Knochenabbau das physiologisch optimale Calciumlevel erzielt werden. So werden pro Jahr 10% des menschlichen Skelettes erneuert (Cohen, 2006). Dieses Gleichgewicht der Knochenformation und -resorption unterliegt dem fein abgestimmten Zusammenspiel der Aktivität unterschiedlicher knochenspezifischer Zellen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Osteoklasten sind die bislang einzigen Zellen, denen eine knochenresorbierende Funktion attribuiert wird. Sie reifen aus der Fusion von hämatopoetischen Zellen, wie den Monozyten und Makrophagen, heran, wodurch mehrkernige Zellen entstehen (Teitelbaum SL, 2000). Die Bindung von RANKL an den RANK Rezeptor der mehrkernigen Fusionszelle und der zeitgleichen Stimulation durch M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) über den cFMS Rezeptor initiiert die Differenzierung zum Osteoklasten (Miyamoto, 2001). RANKL wird unter anderem von Osteoblasten sezerniert. Auch der RANKL Antagonist Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher *Decoy*-Rezeptor, wird von Osteoblasten sekretiert (Simonet WS et al., 1997; Lacey DL et al., 1998). Hier wird bereits die enge und auch komplexe Kommunikation zwischen den Knochenzellen deutlich. Aktive Osteoklasten sind auf der Knochenoberfläche zu finden. Dort bilden sie über einen apikalen Ring aus Aktin eine *sealing zone* aus. Die *sealing zone* schirmt den auf die Weise entstehenden Bereich zwischen Osteoklasten und Knochenoberfläche zur Umgebung hin ab, wodurch eine Resorptionslakune ausgebildet werden kann. Die zur Knochenoberfläche gewandte Zellmembran ist wellig (*ruffled border*) und ist mit dem in der Natur häufig zu beobachtendem Prinzip der Oberflächenvergrößerung zu erklären (Mulari M et al., 2003; Vaananen K et al., 2005). Für den Prozess der Knochenresorption müssen die Hydroxylapatitkristalle im mineralisierten Knochen abgebaut werden. Dies wird über eine Ansäuerung der Resorptionslakune auf einen pH-Wert von 4,5 erreicht. Protonenpumpen der welligen Plasmamembran transportieren Wasserstoff-Ionen in die Resorptionslakune. In Kombination mit den über den Chlorid-Kanal Clc7 ausgeschütteten Chlorid-Ionen, wird die Ansäuerung komplettiert (Kornak et al., 2001). Der Knochenabbau wird zusätzlich unterstützt, durch die Sekretion der Phosphatase TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase*) und Peptidasen wie Cathepsin K (Briggs et al., 2011) (Lausch et al., 2011). Cathepsin K spaltet bei niedrigem pH-Wert die helikalen und Telopeptid Regionen von Kollagen (Wilson, Peters, Saftig, & Bromme, 2009) (Troen, 2004). Die im Serum oder Urin enthaltenen Kollagenabbauprodukte können Auskunft über die Osteoklastenaktivität eines Organismus geben (Teitelbaum, 2000) (Gowen, 1999).

Osteoblasten sind die Zellen, die aktiv an der Knochenformation beteiligt sind. Sie leiten sich von mesenchymalen Vorläuferzellen ab. Neben der Differenzierung zu Osteoblasten können

mesenchymale Stromazellen zu Chondrozyten, Myozyten, Fibroblasten und Adipozyten differenzieren (Pittenger et al., 2019). Den verschiedenen Stadien der osteogenen Differenzierung können gesteigerte Expressionslevel unterschiedlicher Marker zugeordnet werden. Erhöhte Expressionslevel des Transkriptionsfaktors Runx2 deuten auf eine beginnende Osteoblastendifferenzierung hin (Kawane et al., 2018). Ebenfalls ein Marker für Osteoblasten ist die Alkalische Phosphatase (ALP). Erhöhte Expressionslevel von ALP zeigen sich insbesondere in den frühen Differenzierungsprozessen (Aubin, 2001). ALP wird eine wichtige Funktion in den frühen Mineralisierungsprozessen der noch unkalzifizierten frisch gebildeten Knochenmatrix, dem Osteoid, zugeschrieben (Orimo, 2010).

Reife aktive Osteoblasten haben eine charakteristische kuboidale Form, sezernieren eine ECM die zu 95% aus Typ-I Kollagen besteht und Glykoproteinen wie Osteocalcin, Osteopontin, *Bone Sialoprotein* sowie weitere Cytokine und Wachstumsfaktoren enthält. Osteocalcin (*bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*; BGLAP) ist neben Kollagen das Protein, welches am häufigsten in der Knochenmatrix vorkommt. Osteocalcin wird von reifen Osteoblasten sekretiert und hat einen Einfluss auf die Mineralisierung der Knochenmatrix. Folglich dient Osteocalcin als Marker für die Knochenformation und für die späte Osteoblastogenese bzw. für reife Osteoblasten (Tsao et al., 2017). Osteoprotegerin (OPG) ist ein *Decoy*-Rezeptor für RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*). Wie bereits für Osteocalcin beschrieben, handelt es sich bei OPG um einen Marker von reifen Osteoblasten (Udagawa et al., 2000). Neben dem *Decoy*-Rezeptor Osteoprotegerin zählt auch RANKL selbst zu den Markern reifer Osteoblasten (Cao, 2018). Als später Marker für den Differenzierungsprozess von Osteoblasten gilt hingegen das *Bone Sialoprotein* (Ibsp) (Malaval et al., 2008) (Gordon et al., 2007).

Den quantitativ größten Anteil der Knochenzellen bilden mit 90-95% die langlebigen Osteozyten (Bonewald, 2011). Osteozyten sind terminal differenzierte Osteoblastenvorläuferzellen, die in der mineralisierten Knochenmatrix eingemauert sind. Das Verhältnis von Osteozyten zu Osteoblasten beläuft sich auf 10:1 (Manolagas, 2000). Osteozyten haben vielseitige Funktionen, die über die Regulation der Knochenhomöostase hinausgehen. So regeln Osteozyten über endokrine Mechanismen den Phosphatmetabolismus in Niere und Nebenschilddrüse (Dallas, Prideaux, & Bonewald, 2013). Die neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse ergänzen das Portfolio der Osteozytenfunktion um die Mechanosensation und Mechanotransduktion und dem daraus resultierenden Knochenauf- oder abbau (Yavropoulou & Yovos, 2016). Hierfür eignen sich Osteozyten insbesondere, da sie über ihre dendritischen Fortsätze die Knochenmatrix durchspannen und das lacuno-canaliculäre System (LCS) ausbilden (Qin, Liu, Cao, & Xiao, 2020). *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF 23) ist ein relevantes Hormon für die Phosphat-Homöostase und dem Metabolismus von Vitamin D (Shimada, Kakitani, et al., 2004). Zeitgleich ist es ein wichtiger Osteozytenmarker (Bonewald & Wacker, 2013). FGF23 führt zu einer erhöhten Phosphatausscheidung über die Niere (Berndt & Kumar, 2007) und zu einer verringerten

Phosphataufnahme über Darm und Knochen (Shimada, Hasegawa, et al., 2004). Somit reguliert FGF23 maßgeblich die Serum-Phosphatlevel.

Neben FGF23 ist auch Sclerostin SOST ein Marker für Osteozyten. Sclerostin wird von Osteozyten sekretiert und fungiert als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalweges über welchen maßgeblich der Knochenaufbau reguliert wird (Suen & Qin, 2016). So handelt es sich bei Romosozumab um einen bereits zugelassenen Sclerostin Antikörper für die Behandlung von manifester Osteoporose bei post-menopausalen Frauen. Allerdings zeigt dieser Antikörper kardiovaskuläre Nebenwirkungen, sodass bereits ein weiterer Sclerostin-Antikörper in Klinischen Studien erprobt wird (Mullard, 2019).

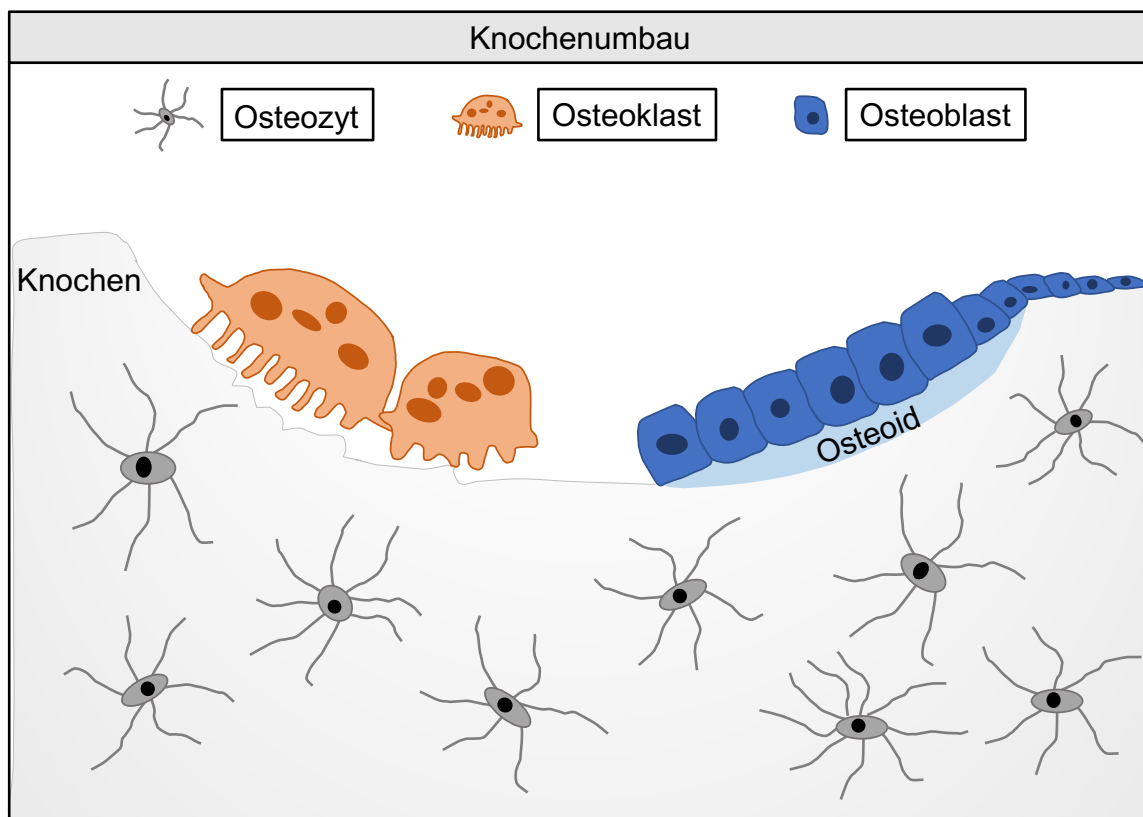


Abbildung 6: Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten: Knochenzellen, die maßgeblich an Knochenumbauprozessen beteiligt sind.

1.2.2 Knochenregeneration

Der Knochen gehört zu den menschlichen Geweben, die zu einer Regeneration fähig sind. Wird der Knochen in Folge einer zu großen mechanischen Belastung gebrochen, kann dieser im Idealfall narbenfrei verheilen (Galatz, Gerstenfeld, Heber-Katz, & Rodeo, 2015). Diese Regeneration ist ein komplexer Prozess aus einem Zusammenspiel von Signalmolekülen und

unterschiedlichen Zellen (Schmidt-Bleek, Petersen, Dienelt, Schwarz, & Duda, 2014) (Ai-Aql, Alagl, Graves, Gerstenfeld, & Einhorn, 2008). Für Knochenregenerationsprozesse kann eine grobe Unterteilung in zwei verschiedene Formen unternommen werden: die direkte (primäre) Knochenheilung und die indirekte (sekundäre) Knochenregeneration. Die direkte Knochenregeneration erfolgt, wenn die Frakturrenden unter Kompression zusammenliegen. Da in dieser Arbeit ein Osteotomiemodell verwendet wurde, um die Knochenregeneration zu untersuchen, werden im Folgenden die Phasen der indirekten (sekundären) Knochenregeneration beschrieben. Die indirekte Knochenheilung tritt auf, wenn ein Frakturspalt oder eine große Mobilität der Knochenfragmente vorliegt (Marsell & Einhorn, 2011). Der gesamte Prozess kann in vier Einzelphasen unterteilt werden, die sich jeweils durch eine bestimmte Zusammensetzung der vorherrschenden Signalmoleküle zum jeweiligen Regenerationszeitpunkt und der beteiligten Zellen auszeichnen. Dabei gehen die Phasen fließend ineinander über und sind nicht immer klar abgrenzbar (Schlundt et al., 2015). Die initiale Phase der Knochenregeneration ist gekennzeichnet von einer Verletzung des Knochens, die mit einer Gefäßverletzung einhergeht. Das austretende Blut gerinnt an der Frakturstelle. Es bildet sich ein Hämatom und erste Immunzellen akkumulieren an der Fraktur (Opal, 2000). Zeitgleich wird eine proinflammatorische Reaktion initiiert, die die Rekrutierung weiterer Immunzellen zur Verletzung zur Folge hat. Neben der Immunantwort wird auch die Angiogenese über die proinflammatorischen Signalgebung unterstützt (Schell et al., 2017). Wurde die für die Heilung notwendige Immunantwort ausgelöst, muss die Entzündung eingedämmt werden, um eine Regeneration zu ermöglichen. Im Folgenden wird die proinflammatorische Antwort auf die Fraktur durch eine anti-inflammatorische Signalkaskade abgelöst (Maruyama et al., 2020). Das Hämatom wird mit fortschreitender Knochenregeneration durch einen weichen Kallus ersetzt, der dem Knochen etwas Stabilität zurückgibt. Die Phase des weichen Kallus beschreibt die zweite Phase des Regenerationsprozesses. Über die Revaskularisierung der Fraktur werden die Zellen mit neuen Nährstoffen versorgt. Es folgt die Einwanderung von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) in den Frakturspalt. Diese differenzieren in Chondrozyten, welche Knorpelgewebe aufbauen. Darüber hinaus setzt sich der weiche Kallus aus einem Fibrin- und Kollagen-reichem granuliertem Gewebe zusammen, wobei es sich vorrangig um Kollagen des Types I und III handelt (Sheen & Garla, 2020). Der Prozess einer neuen Knochenbildung wird als Ossifikation bezeichnet. Verläuft diese über eine Zwischenstufe von hypertrophen Chondrozyten, spricht man, wie auch in diesem Fall, von einer endochondralen Ossifikation (Mackie, Ahmed, Tatarczuch, Chen, & Mirams, 2008). Durch einen osteogenen Signalstimulus findet eine Transformation des weichen Kallus in einen harten Kallus statt. Dies ist die dritte Phase der Knochenregeneration. Anstelle der Chondrozyten treten Osteoblasten, die eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix auslösen (Sheen & Garla, 2020). Der harte Kallus unterscheidet sich jedoch noch vom vollständig regenerierten Knochen anhand der Knochenstruktur. So weist der harte Kallus eine Geflechtknochenstruktur auf (Han et al., 2016). In der abschließenden, vierten

Knochenregenerationsphase dem Knochenumbau, wird der Geflechtknochen sukzessive abgebaut und neuer Lamellenknochen wird gebildet (Schmidt-Bleek et al., 2014).

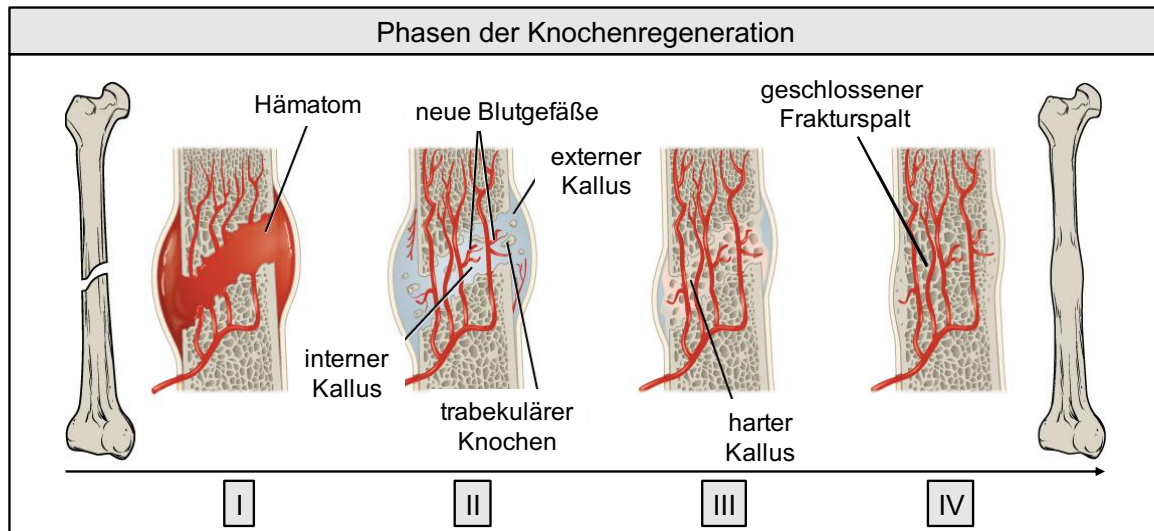


Abbildung 7: Die vier Phasen der Knochenregeneration

Die initiale Phase der Knochenregeneration zeichnet sich durch die Bildung eines Hämatoms aus. Die zweite Phase ist gekennzeichnet durch einen weichen Kallus, welcher sich mit Übergang in die dritte Phase in einen harten Kallus umwandelt. Die abschließende vierte Phase der Knochenregeneration ist durch den stattfindenden Knochenumbau gekennzeichnet.

Modifizierte Abbildung von (<https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-5-fractures-bone-repair/>; Zugriff November 2020)

1.2.3 Seneszenz und Knochen

Mit dem Alter wird der Knochen brüchiger. Die Knochendichte nimmt ab und das Risiko für eine Fraktur steigt (Ensrud, 2013) (Liang & Chikritzhs, 2016). Bereits 1968 wurde von Newton-John und Morgan diskutiert, ob die altersbedingte Osteoporose als eine Krankheit oder einfach als Erscheinungsbild eines seneszenten Knochens betrachtet werden sollte (H.F. Newton-John, 1968; Morgan & Newton-John, 1969). Seitdem hat sich im Bereich der Knochenforschung viel getan. Mit der Entdeckung der unterschiedlichen Knochenzellen, konnte der Entstehung der Osteoporose ein grundlegendes Prinzip zugeschrieben werden. Das Gleichgewicht von Knochenaufbau und Knochenabbau ist zugunsten des Knochenabbaus verschoben (Parfitt, 1982). Zudem reichert sich Knochenmarksfettgewebe (*bone marrow adipose tissue*; BMAT) im Knochen an (Muruganandan, Govindarajan, & Sinal, 2018). Die verringerte Knochenformation kann in einer Reduktion der verfügbaren Osteoblastenvorläuferzellen, einer gestörten Osteoblastogenese oder

Osteoblastenaktivität begründet liegen. Gegenteiliges gilt für die Osteoklasten. Eine erhöhte Anzahl von Osteoklastenvorläuferzellen, eine gesteigerte Osteoklastogenese oder Osteoklastenfunktion begünstigen die Entwicklung einer Osteoporose. Da Knochenmarksadipozyten und Osteoblasten mesenchymale Vorläuferzellen haben, kann die Akkumulation von Knochenmarksadipozyten auf einen Differenzierungsschritt der MSCs hin zu Adipozyten einer der Gründe der verringerten Knochenformation sein (Paccou, Penel, Chauveau, Cortet, & Hardouin, 2019).

Neben der absoluten Knochendichte darf die Knochenstruktur nicht vernachlässigt werden. Veränderungen der Knochenstruktur können ebenfalls die Flexibilität des Knochens und somit seine Brüchigkeit beeinflussen (Boskey & Coleman, 2010).

Eine mögliche Erklärung für eine altersbedingte gestörte Knochenhomöostase könnte die reduzierte Stammzellverfügbarkeit liefern.

Im Zuge des Alterungsprozesses eines Organismus akkumulieren Zellschäden, die im Wesentlichen auf den Verlust der genomischen Stabilität, Telomerverkürzungen, epigenetischen Veränderungen, einer unterbundenen Proteostasis, mitochondrialer Dysfunktion begleitet von einer gestörten Wahrnehmung der Nährstoffverfügbarkeit und veränderten interzellulären Kommunikation zurückzuführen sind (DiLoreto & Murphy, 2015). In Folge ist die Stammzellverfügbarkeit reduziert und seneszente Zellen können verstärkt beobachtet werden (Oh, Lee, & Wagers, 2014) (van Deursen, 2014). Die Annahme, dass diese Veränderungen auch ursächlich für eine altersbedingte Veränderung der Knochenmorphologie sind, konnte mittels diverser Mausmodelle bestärkt werden. Hier wurde neben dem natürlichen Alterungsprozess auch die vorzeitige Alterung eines Organismus untersucht, wie sie bei progeroiden Erkrankungen auftritt. Das Modell der Maus eignet sich dafür besonders gut, aufgrund der genetischen und pathophysiologischen Ähnlichkeiten im Vergleich zum Menschen. Hinzu kommen die kurze Reproduktionszeit und die geringen Tierhaltungskosten (Elefteriou & Yang, 2011). Ein entscheidender Unterschied des murinen Modelles ist die fehlende Menopause der weiblichen Tiere (Koebele & Bimonte-Nelson, 2016). Insbesondere, da für den Menschen der sinkende Östrogenspiegel der Menopause mit einem erhöhten Risiko für Osteoporose assoziiert ist (Ji & Yu, 2015).

Die erstmalige eindeutige Identifikation von unterschiedlichen seneszenten Zelltypen im Knochen, wurde 2016 veröffentlicht (Farr et al., 2016). Hierbei wiesen vorrangig B-Zellen, T-Zellen myeloide Zellen, Osteoblastenvorläuferzellen und Osteozyten erhöhte Genexpression von Seneszenzmarkern auf. Eine gesteigerte Genexpression der SASP Marker sowie auch der Nachweis von SADs konnte nur für myeloide Zellen und Osteozyten nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse von Farr et al. wurden kurze Zeit später von den Beobachtungen der Gruppe von Marie Almeida ergänzt. Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass Osteozyten alter männlicher und weiblicher Mäuse erhöhte Expressionslevel unter anderem von *p16^{INK4a}* und *γ-H2AX* aufwiesen (Piemontese et al., 2017). Des Weiteren konnten die Wissenschaftler mittels

Untersuchungen an einer *Osx-1Cre;TdRFP* Mauslinie die Osteoblastenvorläuferzellen, Osteoblasten und Osteozyten gezielt hinsichtlich seneszenten Eigenschaften mit zunehmendem Alter der Mäuse untersuchen (Kim et al., 2017). Entgegen den Beobachtungen von Farr et al., konnten Kim et al. zeigen, dass nicht nur die Anzahl der Osteoblastenprogenitorzellen mit dem Alter zunimmt, sondern dass auch der Anteil von Osteoblastenvorläuferzellen zunimmt, die seneszenten Eigenschaften aufweisen. Mittels des Senolytikums ABT263 konnten diese Eigenschaften signifikant minimiert werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Farr et al. wiesen diese Zellen eine erhöhte Genexpression von *p21^{WAF-1/Cip-1}* nicht aber von *p16^{INK4a}* auf. Unter Verwendung des *p16-3MR* Mausmodells (3.1.2) konnten die Wissenschaftler zeigen, dass die altersbedingte gesteigerte Osteoklastogenese und Adipogenese unterbunden werden kann. Die Osteoblastogenese bleibt dabei unbeeinträchtigt und der altersbedingte Knochenverlust konnte nicht reduziert werden (Kim et al., 2019).

Farr et al. hingegen konnten unter Verwendung des *INK-ATTAC* Mausmodells, dem Einsatz von Senolytika sowie der Unterbindung des SASP einen signifikant erhöhenden Effekt auf die Knochendichte im Alter nachweisen (Farr et al., 2017). Zusätzlich konnten die Wissenschaftler in einer weiteren Veröffentlichung ihrer Forschungsergebnisse zeigen, dass die altersbedingte Zunahme von seneszenten Zellen im Knochengewebe unabhängig von einer vorliegenden Östrogendefizienz einzutreten scheint.

1.2.4 Verschiedene Mausmodelle zur Untersuchung der zellulären Seneszenz

So mannigfaltig wie sich die Seneszenz zeigt, so divers sind auch die Mausmodelle, mit denen sie untersucht wird. Neben den Analysen mit normal gealterten Tieren, werden auch Methoden angewandt, um die Seneszenz in jungen Tieren zu initiieren. Hierzu zählen neben der Behandlung der Tiere mit ionisierender (Christophorou, Ringshausen, Finch, Swigart, & Evan, 2006) (Y. Wang, Schulte, LaRue, Ogawa, & Zhou, 2006) (Le et al., 2010) und ultravioletter Strahlung (Zeng et al., 2014) auch die Nutzung von genotoxischen Arzneimitteln, Zytostatika, die ihre Anwendung vor allem im Rahmen der Chemotherapie von Krebserkrankungen finden. Hierzu zählen DNA Replikation Stress Induktoren wie Bromodeoxyuridine (Ross et al., 2008) (Kolb, Pedersen, Ballermann, Gibb, & Whishaw, 1999), die gezielte Induktion von DNA Schäden durch DNA Topoisomeraseinhibitoren wie Doxorubicin (Demaria et al., 2017) (Zhang et al., 2019) und DNA Crosslinker wie Cisplatin (Demaria et al., 2017). Auch alkylierende Wirkstoffe wie Cyclophosphamid (Jiang et al., 2013) (Crouch et al., 2017) (Schmitt et al., 2002) aus der Gruppe der Stickstoff-Lost-Verbindungen. Aber auch Arzneimittel mit weitaus komplexeren Effekten wie Bleomycin (Aoshiba et al., 2013; Aoshiba, Tsuji, & Nagai, 2003).

Viele weitere Chemotherapeutika finden vorrangig Anwendung in der Seneszenzinduktion bei Zellkulturexperimenten. Hierzu zählen Etoposid (Nagano et al., 2016), Hydroxyurea (Yeo et al.,

2000), Actinomycin C (Robles & Adami, 1998), Mitomycin C (McKenna, Traganos, Zhao, & Darzynkiewicz, 2012). Auch diverse epigenetische Modulatoren wie 5-aza-2-Deoxycytidine ein Vertreter der DNA Methyltransferase Inhibitoren (Futami, Maita, & Katagiri, 2019), Histon Deacetylaseinhibitoren wie Natriumbutyrate (Nakagawa, Sasagawa, & Itoh, 2018) und Trichostatin A (Munro, Barr, Ireland, Morrison, & Parkinson, 2004), Histon Acetyltransferaseinhibitoren wie C646 (Yan et al., 2013) und Histon Methyltransferaseinhibitoren wie BRD4770 (Yuan et al., 2012) gelten als Seneszenz-induzierende Reagenzien.

Ferner reihen sich auch *Reactive Oxygen Species* (ROS) wie Hydrogenperoxide und Paraquat (McCormack & Di Monte, 2003) (Pezzoli & Cereda, 2013) (Tanner et al., 2011) (Chinta et al., 2018) in die Riege der Seneszenzinduktoren ein. ROS entstehen bei normalen metabolischen Prozessen. Jedoch zeigt sich, dass eine Ansammlung dieser im Zuge der Alterung eines Organismus vorliegt (Harman, 1956) (Perez et al., 2009). Dies führt zur oxidativen Schädigung von Makromolekülen und Geweben. Die natürlichen Gegenspieler von ROS sind Antioxidantien. Ist der Stoffwechsel dieser Antioxidantien gestört, wie bei dem Cu/Zn-superoxide dismutase Sod1^{-/-} Mausmodell, so verkürzt sich auch bei diesen Mäusen die Lebenszeit um 30% und es treten vorzeitige altersphänotypische Veränderungen auf (Zhang et al., 2013) (Zhang et al., 2017).

Des Weiteren kommen verschiedene genetisch modifizierte Mausmodelle zum Einsatz. Da eine Verkürzung der Telomere zur Seneszenzinduktion führt, findet das Terc^{-/-} Mausmodell Anwendung in der Seneszenzforschung. Bei diesem Modell handelt es sich um ein *Knockout* Modell für die katalytische Telomerase Reverse Transkriptase (TERT). Dies führt zu einer Verkürzung der Telomere um 3-5 Kb pro Mausgeneration (Blasco, 2002).

Ein weiteres Merkmal, dass mit dem Alter und folglich der Anreicherung von seneszenten Zellen einhergeht, ist die Zunahme von DNA Schädigungen. So kommt es auch verstärkt zu DNA Doppelstrangbrüchen (Sedelnikova et al., 2004). In einem Mausmodell, welches induzierte DNA Doppelstrangbrüche in den Leberzellen erzeugt, konnte gezeigt werden, dass diese DNA Schäden die Alterungsprozesse des Lebergewebes beschleunigen konnten (White et al., 2015).

Auch bei dem Ercc1^{-Δ} Mausmodell kommt es zur Akkumulation von DNA Schädigungen durch die Beeinträchtigung eines DNA Reparatur Mechanismus. Bei dem Ercc1^{-Δ} Mausmodell handelt es sich um ein hemizygoten Ercc1-Defizienz Mausmodell. Ercc1^{-Δ} Mäuse weisen ein *loss-of-function* Allel und ein hypomorphes Allel auf. Das hypomorphe Allel kodiert für ein um sieben Aminosäuren verkürztes Protein (Weeda et al., 1997). ERCC1 ist eine nicht-katalytische Untereinheit, die zusammen mit dem Protein XPF eine strukturspezifische Endonuklease bildet. Die Endonuklease trägt eine wesentliche Rolle in dem *nucleotide excision repair* (NER) Prozess. Eine beeinträchtigte Funktion von ERCC1 geht mit einer Akkumulation von DNA Schäden einher. ERCC1 Mäuse weisen eine vorzeitige Alterung von vielen Organen sowie eine verkürzte Lebenszeit auf. Sie haben eine Lebenserwartung von sieben Monaten und exprimieren 5% der normalen ERCC1-XPF Level (Dolle et al., 2011).

DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) katalysiert Methylierungsprozesse und den Erhalt von Methylierungen im Zuge der Zellproliferation. Auch die Genomstabilität wird über DNMT1 reguliert. Ein globaler *Knockout* von *Dnmt1* ist embryonal letal (E. Li, Bestor, & Jaenisch, 1992). Die Untersuchung von heterozygoten Mäusen zeigte eine Verstärkung von alterstypischen Funktionsbeeinträchtigungen ohne die Lebenszeit der Tiere signifikant zu reduzieren (L. Liu et al., 2011). Ein konditioneller *Knockout* von *Dnmt1* in Hepatozyten bedingt eine Ansammlung seneszenten Zellen im Lebergewebe (Kaji et al., 2016).

BUBR1 ist als Serin-Threonin Kinase in Prozessen wie der Assemblierung des mitotischen Spindelapparates und der korrekten Auftrennung der Schwesterchromatiden involviert (Malureanu et al., 2009) (Kulukian, Han, & Cleveland, 2009) (Guo, Kim, Ahmad, Zhang, & Mao, 2012). Der globale *Knockout* ist embryonal letal. Das BubR1^{H/H} Mausmodell führt zu einer 90%igen Reduktion des funktionellen BUBR1 Proteins. Diese Tiere weisen eine vorzeitige Alterung auf (Baker et al., 2004) (Hartman, Wengenack, Poduslo, & van Deursen, 2007) (Matsumoto et al., 2007). Zeitgleich kann eine Akkumulation von seneszenten Zellen im Auge, Fettgewebe und Skelettmuskeln nachgewiesen werden (Baker et al., 2008). Eine Depletierung der *p16^{INK4a}*-exprimierenden Zellen des BubR1^{H/H} Mausmodells wirkt dem vorzeitigen Alterungsprozess entgegen und verlängert die Lebenszeit der Tiere (Baker et al., 2011).

1.2.5 Seneszenz als positiver Modulator von Regenerationsprozessen

Basierend auf der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage scheinen seneszente Zellen Regenerationsprozesse zu beeinflussen. Ob dieser Einfluss positiver oder negativer Natur ist, hängt von der Anzahl seneszenten Zellen und der Art ab, wie der Zustand der zellulären Seneszenz ausgelöst wurde. Ferner ist die Dauer ihres Vorkommens von Bedeutung. Bei der Betrachtung von Regenerationsprozessen kann eine Unterteilung in Untergruppen erfolgen. Man unterscheidet zwischen Wundheilung, Gewebeerneuerung und komplexer Regeneration. Der Terminus Wundheilung umschreibt die vollständige oder unvollständige Gewebewiederherstellung nach einer Hautverletzung. Die Gewebeerneuerung beschreibt die Erneuerung eines verletzten Organs unter Narbenbildung. Einzig bei der Regeneration wird das zuvor auf unterschiedliche Art und Weise geschädigte Gewebe über komplexe Zellproliferations- und Differenzierungsprozesse wieder vollständig und ohne Narbenbildung hergestellt. (Galliot, Crescenzi, Jacinto, & Tajbakhsh, 2017).

Während eine fortschreitende, persistierende Akkumulation von seneszenten Zellen die Entwicklung von degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Bussian et al., 2018), Athereosklerose (Childs et al., 2016), Osteoporose (Farr et al., 2017), Osteoarthritis (Jeon et al., 2017) und Parkinson (Chinta et al., 2018) durch eine anhaltendes inflammatorische Milieu zu begünstigen scheint, konnte hingegen für die Unterbindung vieler Krankheiten ein positiver

Effekt von seneszenten Zellen beschrieben werden. Hierzu zählt neben der tumorsuppressiven Eigenschaft von seneszenten Zellen (Campisi, 2001) auch ein anti-fibrotischer Effekt, der für die Haut (Jun & Lau, 2010), die Leber (Krizhanovsky et al., 2008) und viele weitere Organe beschrieben wurde (Munoz-Espin & Serrano, 2014).

2014 erschien die erste wissenschaftliche Veröffentlichung von Demaria et al., die einen direkten positiven Effekt von seneszenten Zellen auf die Wundheilung darstellte und zusätzlich einen möglichen Mechanismus für diesen Einfluss der nicht-proliferativen Zellen diskutierte. Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass seneszente Zellen die Wundheilungskinetik über die Sekretion von PDGF-AA fördern. PDGF-AA wiederum unterstützt die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche eine wichtige Rolle für die Wundheilung spielen (Demaria et al., 2014).

Des Weiteren deuten Untersuchungen im Zebrafisch auf einen positiven Einfluss von seneszenten Zellen auf regenerative Prozesse. So konnte gezeigt werden, dass die 50%ige Amputation der Brustflosse des Zebrafisches zum Auftreten von seneszenten Zellen an der Verletzungsstelle zu einem frühen Regenerationszeitpunkt führte. Die Detektion von seneszenten Zellen nahm vom distalen zum proximalen Flossenbereich sowie von frühen Regenerationszeitpunkten bis hin zu späteren Regenerationszeitpunkten ab. Dies konnte mittels SA- β Gal Färbung visualisiert werden und zeigte sich auch anhand erhöhter Expressionslevel von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}*. Eine zeitgleiche Behandlung der Tiere mit dem Senolytikum ABT-263 (Navitoclax) oder Quercetin führte zu einer Verschlechterung des Regenerationspotentials (Da Silva-Alvarez et al., 2020). Interessanterweise lassen sich seneszente Zellen im Flossengewebe während der Zebrafischentwicklung nicht nachweisen (Villiard et al., 2017).

Neben dem Zebrafisch haben auch Salamander die unglaubliche Fähigkeit zur vollständigen Wiederherstellung einer Gliedmaße nach vorangegangener Amputation. Aus diesem Grund spielt dieses Tiermodell eine sehr große Rolle in dem Forschungsfeld der regenerativen Medizin. Die Arbeiten von Yun et al. zeigen ein gleiches Muster, wie es bereits für die Zebrafische beschrieben wurde. Während der normalen Entwicklung der Salamandergliedmaßen können keine seneszenten Zellen nachgewiesen werden. Werden die Gliedmaßen amputiert, ermöglicht die Methode der SA- β Gal Färbung die Detektion von seneszenten Zellen auf der Amputationsebene. Das Vorhandensein seneszenten Zellen ist auf die mittlere Regenerationsphase beschränkt. Nach dieser Phase nimmt die Detektierbarkeit von seneszenten Zellen sukzessive ab (Yun, Davaapil, & Brockes, 2015).

Da regenerative Prozesse maßgeblich von der Kapazität zur Gewebsneubildung abhängig sind, ist nicht nur die Zellproliferation sondern auch das Zelldifferenzierungspotential ein wesentlicher Faktor für eine erfolgreiche Regeneration (Abad et al., 2013). Diesbezüglich ist die Zellreprogrammierung ein wichtiger Mechanismus. Auch in Bezug auf das Potenzial zur Zellreprogrammierung und somit der Anreicherung von differenzierungsfähigen Zellen, deuten

erste Experimente auf einen SASP-vermittelten positiven Effekt seneszenten Zellen hin (Mosteiro et al., 2016), (Chiche et al., 2017), (Ritschka et al., 2017).

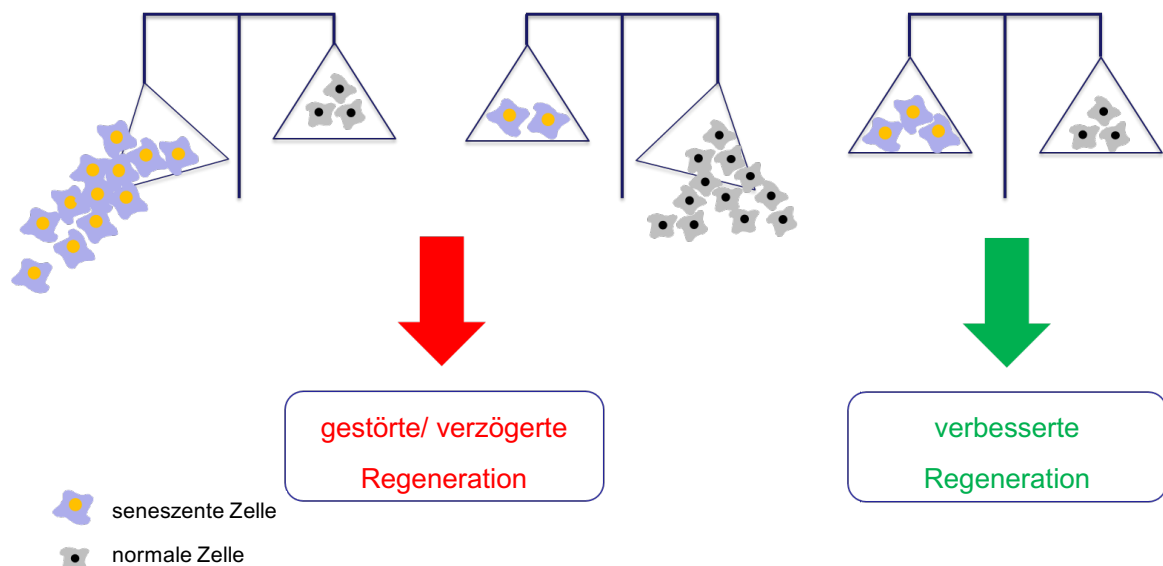
2. Hypothese

Der Einfluss von seneszenten Zellen auf den Organismus wird aktuell umfassend in der medizinischen Molekularbiologie diskutiert. Dabei wird die positive Rolle von seneszenten Zellen als Tumorsuppressionsmechanismus neben dem negativen Aspekt der Beteiligung an Alterungsprozessen schon sehr lange erforscht. Neuere Forschungsergebnisse deuten jedoch auf eine weitaus komplexere Bedeutung der seneszenten Zellen für den Organismus hin. So konnte gezeigt werden, dass seneszente Zellen auch während der Embryogenese temporär präsent sind und auch für Regenerationsprozesse eine unterstützende Funktion übernehmen.

Besonders die Regeneration des Knochens ist ein spannender Prozess, da das Knochengewebe die seltene Eigenschaft besitzt narbenfrei zu heilen. Bislang wurde die zelluläre Seneszenz in Verbindung mit der Knochenheilung noch nicht untersucht und sollte mit Hilfe dieser Arbeit adressiert werden.

Folgende Hypothese wurde dieser Arbeit zugrunde gelegt: Seneszente Zellen sind erforderlich für die optimale Knochenregeneration. Somit beeinträchtigt das Fehlen von seneszenten Zellen die Knochenregeneration. Die positive Eigenschaft auf regenerative Prozesse vermitteln seneszente Zellen über den *senescence-associated secretory phenotype (SASP)*.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden verschiedene, sich ergänzende experimentelle Strategien verfolgt.



3. Material und Methoden

Eine detaillierte Liste der verwendeten Materialien ist dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

3.1 Mausmodelle

Für die Untersuchung des Einflusses der zellulären Seneszenz auf die Knochenhomöostase und die Knochenregeneration wurden vier verschiedene Mausmodelle verwendet. Die Zucht der Versuchstiere erfolgte am Max-Planck Institut für Molekulare Genetik (Berlin, Deutschland). Die Tiere wurden in Gruppen von 3 bis 5 Tieren gehalten und hatten einen *ad libitum* Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Die Temperatur betrug konstant 21°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60-70%. Ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden wurde erzeugt. Die Zucht der Mäuse sowie die Durchführung der Osteotomien erfolgte im Einklang mit dem Tierschutzgesetz und wurde von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales von Berlin (LaGeSo) genehmigt (G 0174/16).

3.1.1 Cdkn2a Gene Trap Mausmodell

Das Cdkn2a^{tm1b} Gene Trap Mausmodell leitet sich von dem C57BL/6N-A^{tm1Brd}Cdkn2atm1a(EUCOMM)^{Wtsi}/Wtsileg Mausmodell ab, welches von Infrafrontier (München, Deutschland) bezogen wurde.

Aus dem tm1a *Knockout-First* Allel wurde über die Verpaarung mit einer ubiquitär-exprimierenden Cre-Maus das tm1b-LacZ Tagged Null Allel erzeugt. Dieses Modell wurde in dieser Arbeit verwendet. Die im Cdkn2a^{tm1a} Mausmodell zusätzlich enthaltene Neomycin-Kassette sowie das Exon2 wurden entfernt. Im Intron1 liegt weiterhin das Reporterkonstrukt aus dem Transkriptionsfaktor *engrailed homeobox 2* (En2 SA), der ribosomalen Eintrittsstelle *IRES* und der *lacZ* Sequenz (bakterielle β -Galactosidase). So können Cdkn2a^{+/+} Mäuse als Referenz-Tiere mit einer normalen *Cdkn2a* Expression verwendet werden, heterozygote Tiere (Cdkn2a^{+/tm1b}) enthalten ein WT Allel und ein Reporterallel. Diese Tiere können verwendet werden, um die *Cdkn2a* Expression *in vivo* mittels der Expression des Reporters nachzuverfolgen. Homozygote Tiere (Cdkn2a^{tm1b/tm1b}) wiederum eignen sich als *Knockout* Modell. Da das Exon2 des *Cdkn2a* Genlokus nicht nur für *p16^{INK4a}* sondern auch für *p19^{ARF}* kodiert (siehe **1.1.6**), ist bei hetero- und homozygoten Tieren sowohl die Expression von *p16^{INK4a}* als auch von *p19^{ARF}* beeinflusst (siehe **4.1.1**).

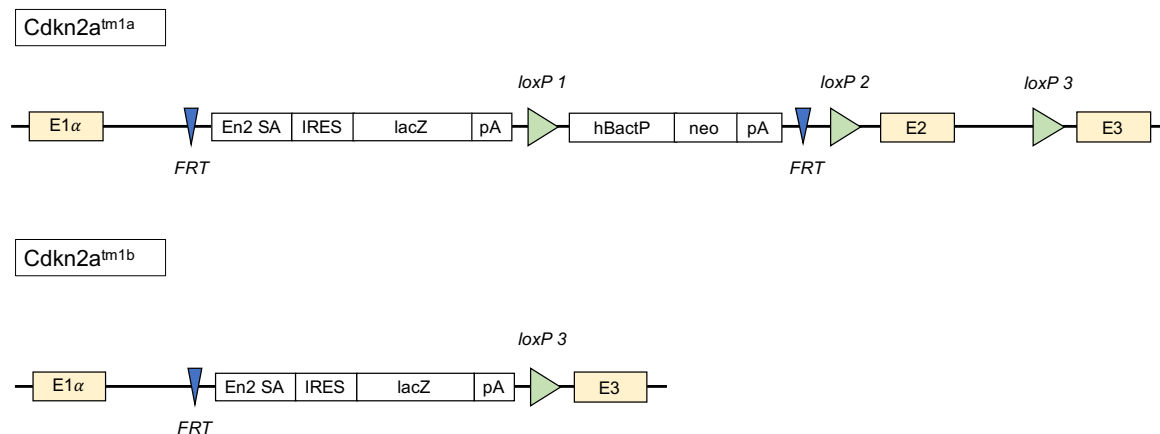


Abbildung 8: Das *Cdkn2a*^{tm1b} Mausmodell ist abgeleitet von dem *Cdkn2a*^{tm1a} Mausmodell

Die *lacZ* Reporter-kassette wurde zusammen mit einer Neomycinresistenz in den intronischen Bereich zwischen Exon1 α und Exon2 in den murinen *Cdkn2a* Genlocus integriert (*Cdkn2a*^{tm1a} Mausmodell). Über die Kreuzung der *Cdkn2a*^{tm1a} Tiere mit einem ubiquitär exprimierenden Cre-Rekombinase Mausmodell wurde die *Cdkn2a*^{tm1b} Mauslinie generiert. Aufgrund der Deletion des Exon2 ist in *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Tieren die Synthese von p16^{INK4a} unterbunden.

3.1.2 p16-3MR Mausmodell

Des Weiteren wurde für dieses Projekt das Mausmodell p16-3MR verwendet. Dieses Modell wurde erstmalig im Dezember 2014 beschrieben (Demaria et al., 2014).

In dem transgenen p16-3MR Mausmodell geht die Expression des Gens *p16*^{INK4a} mit einer Expression eines *trimodality reporter fusion* (3MR) Proteins einher. Dieses Reporterkonstrukt besteht aus einer Renilla Luciferase (LUC), dem monomeren rot fluoreszierendem Protein (mRFP) und der Thymidin-Kinase des Herpes-Simplex-Virus (HSV-TK) (Ray, De, Min, Tsien, & Gambhir, 2004). Anhand der Aktivität der Luciferase sowie der Fluoreszenz des mRFPs können *Cdkn2a*-exprimierende Zellen im lebenden Organismus detektiert werden. Ferner können diese Zellen gezielt, durch Verabreichen des Virostatikums Ganciclovir, eliminiert werden. Somit ermöglicht dieses Mausmodell die gezielte Deletion von seneszenten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Regenerationsprozesses einer Fraktur. Ganciclovir ist ein Nukleosid-Analogon des Guanins. Es wird von der viralen Kinase (HSV-TK) zum Monophosphat phosphoryliert. Dies ermöglicht wiederum die weitere Phosphorylierung zum Ganciclovir-Triphosphat durch die zelleigenen Kinasen. Wird dieses Ganciclovir-Triphosphat bei der DNA-Synthese eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Das eingebaute Ganciclovir-Triphosphat enthält keine Hydroxidgruppe für die weitere Anknüpfung eines Desoxynucleosid-Triphosphates. Dies führt zur replikationsabhängigen DNA-Doppelstrangbrüchen und anschließender Caspase-vermittelter Apoptose durch mitochondriale DNA Schäden (Laberge et al., 2013). Allerdings ist der Mechanismus im Detail noch nicht verstanden (Tomicic, Thust, & Kaina, 2002).

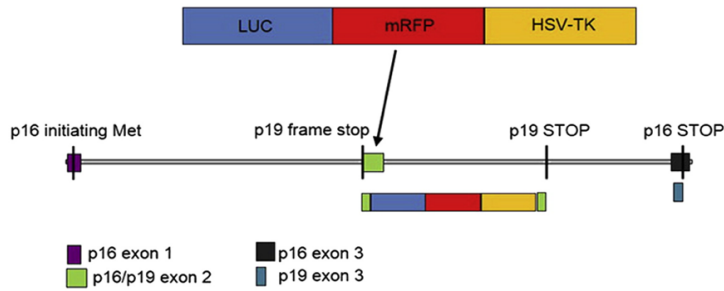


Abbildung 9: p16-3MR Mausmodell

Transgenes Konstrukt des p16-3MR Mausmodells. Unter der Kontrolle eines 50 Kilobasen Fragmentes des *p16^{INK4a}* Promoters wird die Expression der Reportergene für die Luciferase (LUC) und das monomere rot fluoreszierende Protein (mRFP) gesteuert. Neben den Sequenzen für die beiden Reporter-moleküle liegt auch die Expression des Gens der Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) unter der Kontrolle von diesem Promotor (Abbildung aus (Demaria et al., 2014)).

3.1.3 *p21^{WAF-1/Cip-1}* Knockout Mausmodell

Neben *p16^{INK4a}* ist *p21^{WAF-1/Cip-1}* ein anerkannter Marker für Seneszenz. Im Folgenden ist ein *p21^{Cip1}* *Knockout* Mausmodell beschrieben, dessen Knochenproben im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die Proben wurden zur Verfügung gestellt von Assistant Professor Ph.D. Shimpei Kawamoto, Department of Molecular Microbiology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan.

Der *p21^{WAF-1/Cip-1}* *Knockout* wurde durch eine 3kb Deletion erzeugt. Diese Deletion erfasst das gesamte zweite Exon des Genlokusses. Exon2 kodiert für 90% der kodierenden Sequenz des *p21^{WAF-1/Cip-1}* Genlokusses (Deng, Zhang, Harper, Elledge, & Leder, 1995).

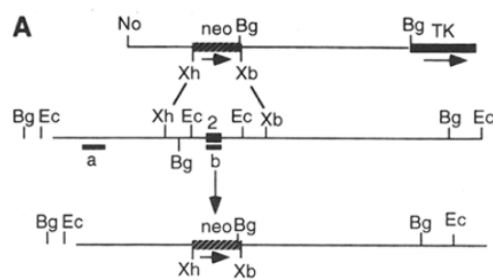


Abbildung 10: Schematische Darstellung des veränderten *p21^{WAF-1/Cip-1}* Genlokus im *p21^{WAF-1/Cip-1}* KO Mausmodell

Die angegebene Deletion befindet sich in dem zweiten Exon. Eine *PGK-neo Kasette* (oben abgebildet) wurde durch die XbaI (Xb) und XhoI Restriktionsschnittstellen anhand von homologer Rekombination in die *p21^{WAF-1/Cip-1}* Gensequenz integriert und erzeugte somit eine Deletion des zweiten Exons in einer Länge von 3kb (Abbildung von (Deng et al., 1995)).

3.1.4 p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1} DKO Mausmodell

Abschließend wurde der Knochenphänotyp eines doppelten *Knockout* Modelles (DKO) für p16^{INK4a} und p21^{WAF-1/Cip-1} untersucht. Der p21^{WAF-1/Cip-1} *Knockout* wurde bereits im vorriegen Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Der p16^{INK4a} KO wurde bei dem DKO Modell durch eine Deletion des Exon1 α des *Cdkn2a* Lokus erzeugt. Die Deletion umfasst die ersten 35 Codons des p16^{INK4a} Genes (Sharpless et al., 2001).

Die untersuchten Knochenproben wurden ebenfalls zur Verfügung gestellt von Assistant Professor Ph.D. Shimpei Kawamoto, Department of Molecular Microbiology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan.

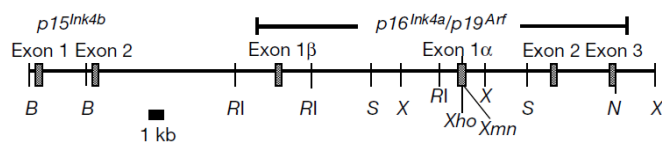


Abbildung 11: Darstellung des p16^{INK4a} *Knockout* im p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1} *Knockout* Mausmodell

Schematische Darstellung des *Cdkn2a* Genlokus. Die angegebene Deletion befindet sich in dem Exon1 α (Abbildung von (Sharpless et al., 2001)).

3.1.5 Genotypisierung der *Cdkn2a*^{tm1b} und p16-3MR Mäuse

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde eine Ohrbiopsie entnommen. Nach der Zugabe von 50 μ l eines Lysepuffers (25mM NaOH, 0,2mM EDTA) wurde diese für mindestens 30 Minuten bei 95°C erhitzt. Es folgte eine Abkühlung der Proben auf Eis und die Zugabe von 50 μ l Neutralisationspuffer (40mM TrisHCl). Die Proben wurden durchmischt und die Zellreste mittels Zentrifugation pelletiert. 1 μ l der DNA-Lösung wurde für die PCR-Reaktion verwendet.

Für die Genotypisierungen sowohl der *Cdkn2a*^{tm1b} Tiere als auch der p16-3MR Tiere wurde ein Thermocycler von GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) verwendet. Die nachfolgende Tabelle fasst das Temperaturprogramm der PCR Reaktionen zusammen:

Tabelle 2: Temperaturprogramm der Genotypisierungs-PCR

Wiederholungen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1x	95	3:00
3x	95	0:30
	61	0:45
	72	1:30
3x	95	0:30
	59	0:45
	72	1:30
3x	95	0:30
	57	0:45
	72	1:30
33x	95	0:30
	55	0:45
	72	1:30
1x	72	10:00
	4	∞

Die Genotypisierung der *Cdkn2a^{tm1b}* Mäuse erfolgte anhand von drei PCR Reaktionen. Die Kombination der Primer *Cdkn2a_48298_F* und *Cdkn2a_R2* lieferte bei vorhandenem *Cdkn2a* Wildtyp Allel ein Produkt von 470bp. Die *tm1b Gene Trap* Kasette wurde anhand zweier PCR Reaktionen nachgewiesen. Die Primerkombination *Cdkn2a_48298_F* und *CAS_R1_Term* wiesen mit einem Produkt von 131bp den Beginn der inserierten *lacZ* Reporter-kasette nach. Wiederum 213bp war das Produkt der Primerkombination *Cdkn2a_FRT_F2* und *Cdkn2a_FRT_R3* groß. Diese Reaktion ermöglicht die Unterscheidung zwischen der *tm1a* und *tm1b* Mauslinie.

Für die Genotypisierung der *p16-3MR* Mäuse wurden zwei PCR Reaktionen verwendet. Das *p16^{INK4a}* Wildtyp Allel konnte mittels der Primerkombination *p16-3MR_F* und *p16_3MR_WT_rev* bei einer Produktgröße von 220bp nachgewiesen werden. Die PCR Reaktion für den Nachweis des Reportertransgenes hingegen resultierte in einem PCR Produkt mit einer Länge von 269bp. Für diese Reaktion wurden die Primer *p16_3MR_F* und *p16_3MR_TG_rev* eingesetzt.

Die nachfolgenden Tabellen geben die verwendeten Primersequenzen sowie die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes wieder.

Tabelle 3: Genotypisierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz
p16_3MR_F	5'- CAA CGT TCA CGT AGC AGC TC -3'
p16_3MR_WT_rev	5'-TCG CAC GAT GTC TTG ATG TC -3'
p16_3MR_TG_rev	5'-CTC GAT GTG AGG CAC GAC -3'
Cdkn2a_48298_F	5'- AGA GTG GAT GGG GAT TCA GG -3'
Cdkn2a_R2	5'- GAT CAG ACA TCC ACA GTC AG- 3'
CAS_R1_Term	5'- TCG TGG TAT CGT TAT GCG CC-3'
Cdkn2a_FRT_F2	5'-CAC TGC ATT CTA GTT GTG GTT TGT CC-3'
Cdkn2a_FRT_R3	5'-CTT ACG CAA GAG CTG AAG GGC AG-3'

Tabelle 4: PCR-Ansatz der Genotypisierung

Reagenz	Volumen in μ l
Fire Pol Mix	4
Primer F (10 μ M)	0,4
Primer R (10 μ M)	0,4
H ₂ O	14,2
DNA	1

3.1.6 Nachweis der p16^{INK4a} Expression in Cdkn2a^{tm1b} Embryonen mittels X-Gal Färbung

Der Nachweis der p16^{INK4a} Expression in Embryonen konnte indirekt über die enzymatische Aktivität der bakteriellen β -Galactosidase erfolgen (siehe **3.1.1**). Hierbei weist die Umsetzung des farblosen 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo auf die Aktivität der β -Galactosidase hin. Zur X-Gal Färbung der 10,5 und 12,5 Tage alten Cdkn2a^{tm1b} Embryonen wurde das Protokoll vom Sanger Institut verwendet (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/resources/mouse/sigtr/XGalStaining.pdf>) und wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

Die Embryonen wurden freipräpariert und in eine 6 Wellplatte transferiert. In jedem Well wurde 1xPBS vorgelegt. Nachdem die Embryonen mit 1xPBS gewaschen wurden, erfolgte die Fixierung mit dem X-Gal Fixierungspuffer für 30 Minuten. Nach der Fixierung wurden die Embryonen dreimal für jeweils 15 Minuten mit dem Waschpuffer behandelt. Die Färbung mit der X-Gal Färbelösung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C. Die X-Gal Färbelösung wurde vor Gebrauch filtriert, um die Kristallbildung während des Färbeprozesses auf ein Minimum zu reduzieren. Die Platte wurde zusätzlich mit Parafilm luftdicht abgeschlossen.

Den nachfolgenden Tabellen ist die Zusammensetzung der Fixier-, Wasch- und Färbelösungen zu entnehmen.

Tabelle 5: Fixierungspuffer X-Gal Färbung

Reagenz	Konzentration
EGTA	5mM
MgCl ₂	2mM
Glutaraldehyd	0,2%
1xPBS	

Tabelle 6: Waschpuffer X-Gal Färbung

Reagenz	Volumen in µl
MgCl ₂	2mM
1xPBS	

Tabelle 7: X-Gal Färbelösung

Reagenz	Volumen in µl
MgCl ₂	2mM
Kaliumhexacyanidoferrat(II) K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O	5mM
Kaliumhexacyanidoferrat(III) K ₃ Fe(CN) ₆	5mM
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid X-Gal	1mg/ml
1xPBS	

3.2 Seneszenz und Knochenhomöostase

3.2.1 Probenentnahme

Die langen Röhrenknochen (Femur und Tibia) wurden von 12 Wochen alten Tieren der Cdkn2a^{tm1b} Mauslinie untersucht. Die Tiere wurden unter Isofluran euthanisiert, die Knochen wurden freipräpariert und das umliegende Muskelgewebe entfernt. Anschließend wurden die Proben für 24 Stunden in 4%PFA bei RT fixiert. Dann wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe jeweils für 24 Stunden bei 4°C entwässert (70%, 80% und 100%). Die μ CT Analyse der Proben erfolgte, sobald die Proben in 80%igen Ethanol überführt wurden.

Proben der p21^{WAF/Cip-1} *Knockout* und p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1} *Doppel-Knockout* Mäuse wurden in 4%PFA von Kooperationspartnern der Osaka University in Japan zugeschickt. Es folgte die Ethanolreihe vor Ort in Berlin.

3.2.2 μ CT Scan

Für die Analysen der Knochenphysiologie in der Homöostase wurde die Methode der hochauflösenden mikro-Computertomographie (μ CT) verwendet. Die Scans der Knochenproben wurden mit dem SKYSCAN 1172 durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 80kV und 124mA unter Verwendung eines 0,5mm Aluminiumfilters. Die Auflösung der Scanaufnahmen betrug 5 μ m. Während der Messung befanden sich die Proben in einer 70%igen Ethanollösung in einem speziell für die Mausknöchel angefertigten Probenhalter. Zur Weiterverarbeitung der μ CT-generierten Dateien wurden diese mit der Software NRecon rekonstruiert. Für die Rekonstruktion wurde ein minimaler *Threshold* von 0,00 und ein maximaler *Threshold* von 0,1 gewählt. Des Weiteren wurde eine *Beam Hardening* Korrektur von 30% eingestellt.

Je nach Fragestellung wurde ein anderer Bereich der Gesamtaufnahme für die Auswertung (*region of interest* = ROI) festgelegt. Die ROI für die Auswertung des trabekulären Knochen der langen Röhrenknochen (Tibia und Femur) wurde 300 μ m distal der Wachstumsfuge beginnend ein Bereich von 500 μ m ausgewertet. Die Auswertung des kortikalen Knochens erfolgte ebenfalls für einen 500 μ m Bereich beginnend 1800 μ m distal der Wachstumsfuge (siehe **Abbildung 12**).

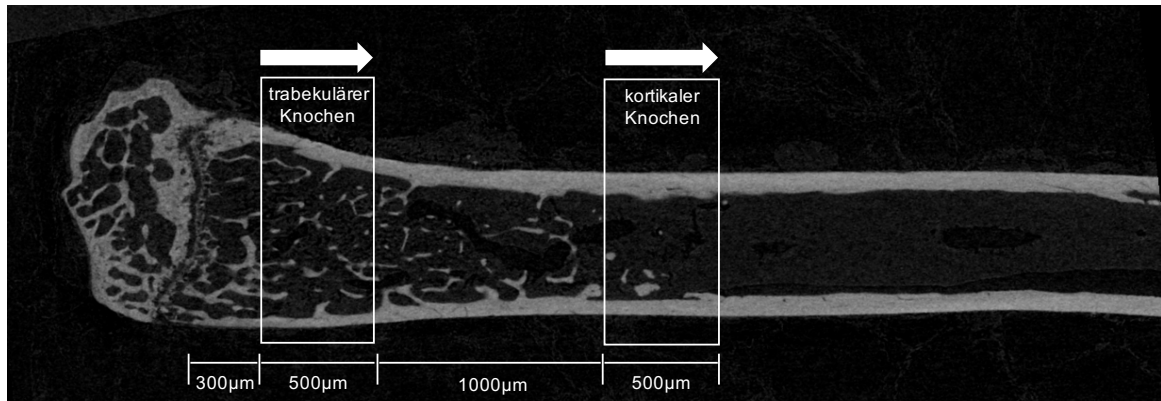


Abbildung 12: ROIs für die Auswertung der Knochenparameter der langen Röhrenknochen

Dargestellt sind die Bereiche zur Auswertung der Knochenparameter des trabekulären und des kortikalen Knochens.

3.2.3 Methylmethacrylat Einbettung und Schnitthanfertigung

Für die Einbettung der Knochenproben in Methylmethacrylat (MMA), musste die Proben vollständig entwässert werden. Nach Fixierung und ersten Dehydrierungsschritten (siehe 3.2.1) der Proben wurden diese für 24 Stunden in einem Ethanol: Aceton Gemisch (1:1) inkubiert. Daraufhin folgte eine weitere Inkubation in 100% Ethanol für weitere 24 Stunden bei 4°C. Anschließend erfolgte zweimal die Inkubation in Xylol für jeweils 2 Stunden. Abschließend wurden die Knochen jeweils 24 Stunden in die Infiltrationslösung I und II überführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C. Die Polymerisationsreaktion der Methylmethacrylat Einbettung wurde unter niedrigem Druck (200mbar; RT) gestartet. Hierzu wurden zu der Gießlösung N,N-Dimethyl-p-toluidin hinzugefügt (500µl/100ml Gießlösung). Die Polymerisationsreaktion wurde dann bei Normaldruck und 4°C abgeschlossen. Von den eingebetteten Proben wurden am Leica RM2255 Mikrotom Schnitte von 5µm Dicke angefertigt.

Infiltrationslösung I: 1000ml destabilisiertes MMA, 3,3g Benzoylperoxid, 100ml Polyethylenglycol

Infiltrationslösung II: 1000ml destabilisiertes MMA, 3,3g Benzoylperoxid,
100ml Polyethylenglycol

Gießlösung: 1000ml destabilisiertes MMA, 6,6g Benzoylperoxid, 100ml Polyethylenglycol

3.2.4 Färbung von MMA eingebetteten Knochenproben

Bevor die MMA eingebetteten Präparate histologisch weiter aufgearbeitet werden konnten, mussten diese entplastet werden. Zu diesem Zweck wurden die Proben dreimal à 5 Minuten in

einer 2-Methoxyethylacetat Lösung inkubiert. Es folgte eine Bewässerung der Schnitte durch eine absteigende Ethanolreihe: 2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, 50 % Ethanol für jeweils 2 Minuten. Abschließend wurden die Präparate in Aqua dest überführt.

3.2.5 Von Kossa/van Gieson Färbung

Das nachfolgend beschriebene Protokoll der von Kossa/van Gieson Färbung entspricht der Sybil Version02 (<https://www.sybil-fp7.eu/node/106>; Zugriff Oktober 2020). Mittels der von Kossa/van Gieson Färbung kann mineralisierter Knochen (schwarz) von Kollagen und Bindegewebe (rot) sowie Muskulatur und Erythrozyten (gelb) unterschieden werden. Zuerst wurden die Schnitte mit einer 3%igen Silbernitratlösung behandelt (5 Minuten). Nach einem Waschschrift über 10 Minuten mit Aqua dest wurde die Schwarzfärbung des mineralisierten Knochens mittels Sodaformollösung (5 Minuten) entwickelt. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült (10 Minuten). Es folgte eine Inkubation mit einer 5% Natriumthiosulfatlösung (5 Minuten). Überschüssiges Färbereagenz wurde erneut unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) entfernt. Abschließend erfolgte die van Gieson Färbung der Schnitte mittels van Gieson Lösung (20 Minuten), gefolgt von einer kurzen Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80%, 96%) und einer dreimaligen Inkubation in Xylol (à 5 Minuten). Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Entellan eingedeckt.

3% Silbernitrat-Färbelösung: 3g Silbernitrat auf 100ml Aqua dest

Soda-formol-Lösung: 12,5g Natriumcarbonat, 187ml Aqua dest, 5% Natriumthiosulfat (5g auf 100ml Aqua dest), van Gieson Lösung, 2,5g Säurefuchsin, 900ml gesättigte Pikrinsäure, 100ml Glycerol, 5ml konzentrierte Salpetersäure

3.2.6 Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung ermöglicht eine Unterscheidung der Osteoblasten (blau) von den Osteoklasten (türkisblau). Zusätzlich grenzen sich die angefärbten Zellkerne durch ein dunkles Blau ab, sodass die Mehrkernigkeit der Osteoklasten ersichtlich wird. Für die Toluidin-Färbung wurden die Präparate mittels einer 30-minütigen Inkubation in einer 1%igen Toluidinblau O Lösung (pH 4,5) gefärbt. Wie bereits unter 3.2.5 beschrieben wurden die Schnitte abschließend über eine aufsteigende Ethanolreihe bewässert, dreimal in Xylol überführt (à 5 Minuten) und mit Entellan eingedeckt.

Toluidinblau-Lösung: 1g Toluidinblau O auf 100ml Aqua dest; pH mit HCl auf 4,5 eingestellt

3.2.7 Histomorphometrie

Anhand von Toluidinblau-gefärbten unentkalkten Acrylatschnitten erfolgte die Bestimmung der Anzahl von Osteoblasten, Osteoklasten und Adipozyten (*osteoblasts number per bone parameter*, Ob.N/B.Pm.; *osteoclasts number per bone parameter*, Oc.N/B.Pm.; *ostocytes number per bone parameter*, Ot.N/B.Pm; *adipocytes number per bone parameter*, Ad.N/B.Pm). Hierfür wurde das Osteomeasure Histomorphometrie-System (OSTEOMETRICS INC., Atlanta, Georgia, USA) verwendet (Parfitt et al., 1987) (Dempster et al., 2013).

3.2.8 RNA Isolation aus Knochengewebe

Zur Isolation von RNA aus Knochengewebe wurden die rechten Tibiae der Mäuse verwendet. Um eine homogenisierte Zellsuspension zu erhalten, wurde das gefrorene Gewebe mit einem eigens dafür angefertigten Hammer und Stanzkonstruktion, unter zeitgleicher Kühlung durch flüssigen Stickstoff, pulverisiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde unmittelbar in ein RNase und DNase freies Reaktionsgefäß mit 500µl TRI Reagent® überführt, um eine Degradierung der RNA zu verhindern. Die Proben wurden durchmischt, abzentrifugiert und der Überstand in ein neues DNase und RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren RNA Isolationsschritte entsprechen den Angaben der Hersteller des Direct-zol™ RNA Mini-Prep KIT (Zymo Research). Die anschließende cDNA Synthese sowie Genexpressionsanalyse ist unter **3.5.9** und **3.5.10** beschrieben.

3.2.9 Isolation von murinen primären Osteoblasten aus Calvariae

Primäre Osteoblasten wurden aus Schädeldächern von 3-5 Tagen alten Mäusen isoliert. Hierzu wurden die Mäuse enthauptet die Calvariae unter Entfernung des Chondrocraniums und anderen Gewebebestandteilen freipräpariert. Die Schädeldächer wurden kurz mit sterilem PBS gespült. Danach erfolgte der primäre Aufschluss des Gewebes. Die Calvariae wurden bei 37°C mit jeweils 2ml vorgewärmter Verdauung (Serum-freies alpha-MEM mit 0,1% Collagenase und 0,2% Dispase) pro Schädeldach für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden erneut für 30 Minuten mit frischer Verdauung behandelt. Die Trennung von überschüssigem Gewebe und den primären Osteoblasten voneinander erfolgte mittels Zellsieb (70µm). Die Zellen wurden daraufhin pelletiert (1200rpm, 5 Minuten, RT) und die Reaktion der Enzyme über die Zugabe von serumhaltigem alpha-MEM (mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS (hitzeinaktiviert)) gestoppt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in einer Dichte von $25 \cdot 10^3$ /ml ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen wurde bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Die Differenzierung der primären Osteoblasten erfolgte, nach Erreichen der Konfluenz, durch die Zugabe von 200mM β-Glycerolphosphat und 8mM Ascorbat zum Medium. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die Auswertung der osteogenen Differenzierung erfolgte wie unter **3.5.6** beschrieben.

3.2.10 Isolation und Kultivierung von MEFs

Für die Isolation von primären murinen Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*; MEFs) wurden E13,5 alte Embryonen aus dem Uterus von tragenden Weibchen entnommen. Den Embryonen wurde der Kopf abgetrennt und die Organe entfernt. Das übrige Gewebe wurde in 1xPBS gewaschen und zerkleinert, nachdem die Schwanzspitze zu Genotypisierungszwecken entnommen wurde. Es folgte eine Trypsinierung des Gewebes für 10 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen über einen 0,45µm Filter vereinzelt und in Kultivierungsmedium (DMEM high glucose mit 10% FCS, 1% Ultra-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin) überführt. Abschließend wurden die Zellen gezählt und die gewünschte Zellzahl ausplattiert.

3.3 Knochenregeneration

Für die Untersuchungen des Einflusses seneszenten Zellen auf die Knochenregeneration wurden standardisierte Osteotomien 10 Wochen alter weiblicher Mäuse durchgeführt. Als Modelle für die Seneszenz wurden die *Cdkn2a^{tm1b}* (siehe 3.1.1) und *p16-3MR* (siehe 3.1.2) Tiere verwendet.

Die Durchführung der Osteotomien erfolgte an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Der Transport der Tiere aus der Zucht vom Max-Planck Institut für Molekulare Genetik zum FEM erfolgte eine Woche vor Beginn der Versuchsdurchführung.

Die Belastung der Versuchstiere durch die Osteotomie wurden als mittel eingestuft, aufgrund des an den ersten postoperativen Tagen auftretenden Wundschmerzes an den Pins und der Osteotomie.

3.3.1 Osteotomie

Das verwendete standardisierte murine Osteotomiemodell (Bonnarens & Einhorn, 1984) wurde für Tiere der *Cdkn2a^{tm1b}* und *p16-3MR* Mauslinie durchgeführt. Es wurden ausschließlich weiblich Tiere im Alter von 10 Wochen verwendet. Im Vergleich zu einer 3 Punkt-Biegungsfraktur wird bei dem verwendeten Modell einer Weichteilverletzung verhindert. Der verwendete Fixateur ist sehr stabil und erlaubt nur äußerst geringe Fragmentbewegungen im µm-Bereich.

Die Osteotomie erfolgte am linken Femur. Zuerst wurden die Mäuse gewogen. Die Tiere erhielten bereits vor Beginn der Operation in inhalativer-Isofluran Narkose subkutan Clindamycin (45mg/kg) als Antibiose und Buprenorphin (Temgesic) (0,03 mg/kg) als Schmerzmittel. Der operative Bereich wurde desinfiziert und rasiert. Durch einen etwa 2mm langen lateral longitudinalen Hautschnitt zwischen Knie und Hüfte konnte ein mid-diaphysealer Zugriff erfolgen. Ohne den Ischiasnerv in Mitleidenschaft zu ziehen wurde das Femur über die stumpfe Präparation des *Musculus vastus lateralis* und des *Musculus biceps femoris* freigelegt. Der externe Fixateur wurde lateral und parallel zum Femur angebracht. Dafür wurden nacheinander Bohrungen für die vier Pins vorgenommen (Durchmesser von 0,45mm) und diese mit der externen Platte verbunden (MouseExFix, RISystem, Davos, Switzerland). Ein 0,7mm breiter Frakturspalt wurde mittels Handbandsäge initiiert (RISystem, Davos, Switzerland). Abschließend wurde der Frakturspalt gespült, die Wunde verschlossen und die Tiere zurück in ihren Käfig gebracht. Der Aufwachprozess der Tiere wurde überwacht. Die weiterführende Schmerzbehandlung der Tiere erfolgte über Tramadol (25mg/L) im Trinkwasser bis zum dritten postoperativen Tag. Durch die bereits initiale subkutane Buprenorphin Gabe sind die Tiere schmerzfrei, sodass die Trinkwasser- und Futteraufnahme auf normalem Wege stattfinden kann.

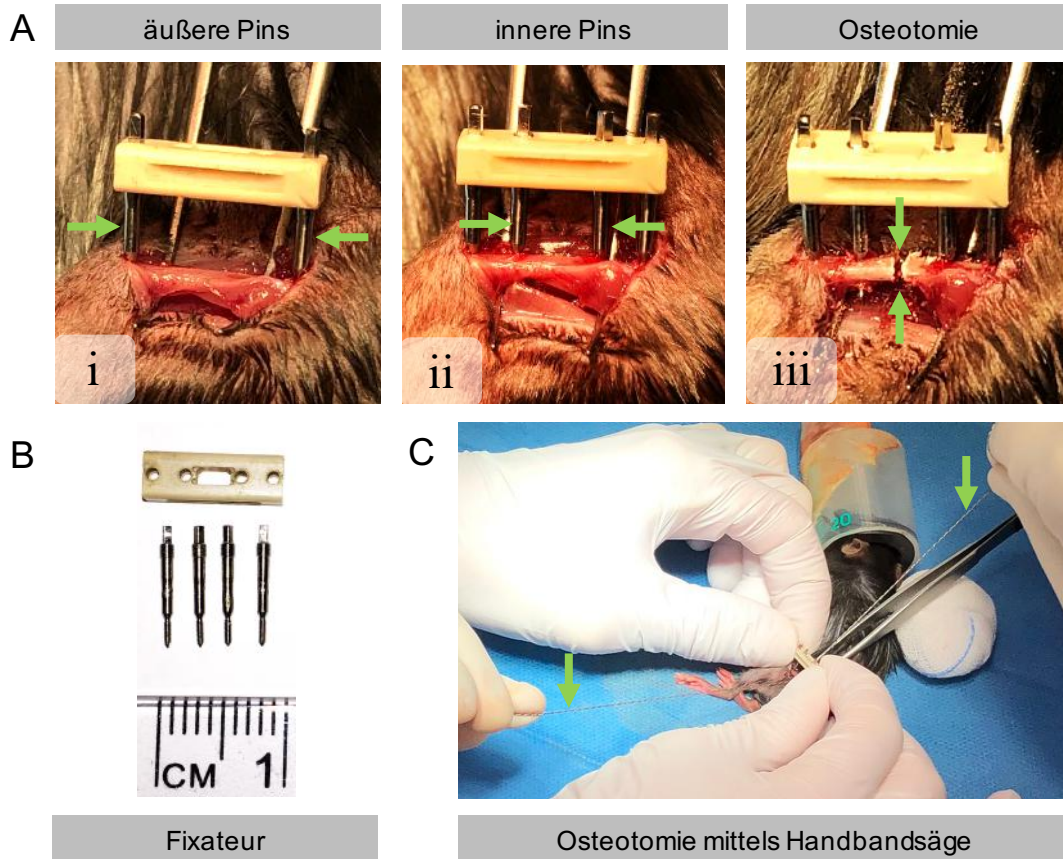


Abbildung 13: Osteotomie der Maus mit externem Fixateur

Bilder, die während des operativen Eingriffes an der Maus aufgenommen wurden, sollen den Prozess der Osteotomie veranschaulichen. A) Zeitlicher Ablauf vom Setzen des externen Fixateurs bis zum osteomierten Knochen. Das Femur wurde bereits freigelegt. Dann werden die äußeren Pins über Bohrungen in den Knochen geschraubt (i). Es folgen die inneren Pins (ii). Erst wenn der externe Fixateur vollständig angebracht ist, wird das Femur mit einer Handbandsäge mittig zwischen den inneren Pins durchtrennt (iii). B) Zeigt die Einzelteile des externen Fixateurs. C) Die Maus ist während der Operation unter inhalativer Narkose. Während des Durchtrennens des Femurs werden Femur und Fixateur von einer Person fixiert, während eine weitere Person mittels Handbandsäge (grüne Pfeile) den Knochen durchtrennt.



Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Osteotomien unter Verwendung des Cdkn2a^{tm1b} Mausmodells

3.3.2 Ganciclovir Behandlung der p16-3MR Tiere

Die Ganciclovir Behandlung der p16-3MR Tiere erfolgte während der ersten zwei post-operativen Wochen. In diesem Zeitraum von 14 Tagen wurde den entsprechenden Tieren tägliche 25mg/kg Ganciclovir in PBS gelöst intraperitoneal verabreicht. Die erste Injektion erfolgte direkt nach der Operation, während die Tiere noch nicht von der inhalativen-Isofluran Narkose erwacht waren.

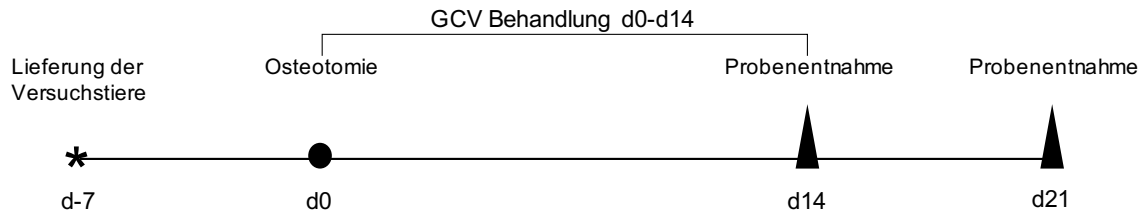


Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Osteotomien von p16-3MR Tieren inklusive GCV Behandlung

3.3.3 Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Die Probenentnahme erfolgte sowohl für die *Cdkn2a^{tm1b}* als auch für die p16-3MR Tiere 14 und 21 Tage nach Osteotomie. Zur Entnahme der Proben wurden die Tiere in tiefer Narkose, nach terminaler intrakardialer Blutentnahme, durch Überstreckung des Halses euthanisiert. Für die Narkose wurde intraperitoneal ein Gemisch aus Ketamin (60mg/kg) und Medetomidine (0,3mg/kg) verabreicht. Danach erfolgte die Entnahme beider *Ossa femora* sowie der Tibiae. Die Femura wurden der histologischen Analyse zugeführt und die Tibiae für die weitere Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.4 μ CT Scan und Auswertung

Die dreidimensionale Knochenformation wurde mittels hochauflösender μ CT untersucht. Zu diesem Zweck wurden die freipräparierten Femura in 4%PFA für 6h bei 4°C fixiert. Die fixierten Proben wurden mit PBS gespült und der externe Fixateur wurde jeweils entfernt. Anschließend wurde der Scan mittels dem Viva40 μ CT (Scanco Medical AG®, Switzerland) durchgeführt. Die Messung erfolgt bei 70kVp, 114 μ A, 8W und einer resultierenden Auflösung von 10,5 μ m. Ein Scan setzte sich aus 424 (426) Einzelscans zusammen, welche den Bereich zwischen den gesetzten inneren Pins erfasst.

Für die Analyse der Scans wurde ein von Mario Thiele (Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration; JWI) geschriebenes Fiji PlugIn verwendet. Anfang und Ende des Frakturspaltes werden durch 50% verbleibenden kortikalen Knochen definiert. Der auszuwertende Bereich umfasste 200 Scanaufnahmen.

3.3.5 Genexpressionsanalysen der Kalli von Wildtyp Mäusen

Die RNA von murinen Wildtyp Kallusproben 3, 7 und 14 Tage nach Osteotomie wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Unfallchirurgie JWI, Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Die Analyse der Genexpression erfolgte nach den beschriebenen Methoden zur cDNA Synthese und qPCR (siehe 3.5.9 und 3.5.10).

Eine Auflistung der verwendeten Proben ist nachfolgenden dargestellt.

Tabelle 8: Proben für die Genexpressionsanalyse im Kallus von Wildtypmäusen

Zeitpunkt nach induzierter Osteotomie	Probenanzahl
4d	n=5
7d	n=6
14d	n=6

3.4 Klonierung

Ziel des Klonierungsvorhabens war die Generierung eines induzierbaren Überexpressionsmodells für *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* in humanen Zellen. Die Schwierigkeit einer gezielten Überexpression von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* in hMSC liegt zum einen an der geringen proliferativen Kapazität der hMSC, und der Limitierung der zur Verfügung stehenden Zellen, da es sich um primäre Spenderzellen handelt. Ferner stellt die Transfektion von hMSC eine besondere Herausforderung dar. Erschwerend hinzu kommt die proliferativ inhibierende Wirkung der zu untersuchenden Proteine *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}*. Es musste folglich ein System entwickelt werden, dass eine maximale Transfektionseffizienz für die hMSC ermöglicht. Des Weiteren ist eine Expansion der positiv transfizierten Zellen unabdingbar. Dies setzt eine induzierbare Überexpression der Zielgene voraus. So kann die Zellzahl positiv transfizierter Zellen maximiert werden und die Expression von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* zum Versuchsbeginn initiiert werden. Von Dr. Manfred Gossen (Institut für Biomaterialforschung, BCRT) wurde uns ein Tet-On basiertes duales Transposon Vektorsystem zur Verfügung gestellt. Ein Vektor kodiert für die Sleeping Beauty Transposase 100. Der zweite Vektor kodiert für das Transposon, welches unter der Kontrolle eines Tet-On Systems liegt. Neben der Integration der Zielgene *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* auf dem Transposonvektor wurde eine Puromycin-Resistenz für die Selektion positiv transfizierter Zellen über eine 2A Site in den transponierbaren Bereich des Transposonplasmides integriert. Mittels Phusion PCR wurde die 2A Site gekoppelte Puromycin-Resistenz cDNA von dem Vektor *pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0* (Addgene #62987) als Template amplifiziert. Es folgte die Integration der Sequenz über den Restriktionsverdau der Enzyme *BamHI* und *Crf9I* in den Zielvektor. Aufgrund der Verwendung dieser Restriktionsenzyme, folgt in einem weiteren Klonierungsschritt die Integration der *p16^{INK4a}* oder *p21^{WAF-1/CIP-1}* cDNA in den Zielvektor, da diese Sequenzen ebenfalls die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *Crf9I* aufwiesen. Die cDNA wurde mittels Phusion PCR amplifiziert und über Restriktionsverdau und anschließender Ligation in den Transposonvektor integriert. Als Templates für die Phusion PCR wurden *pBabepuro3-p16Flag* (Addgene #24934) und *Flag p21 WT* (Addgene #16240) verwendet. Als Restriktionsenzyme fungierten *NotI* und *Sall*.

3.4.1 Phusion PCR

Zur Amplifikation der zu inserierenden Fragmente wurde eine Phusion PCR der gewünschten Sequenz durchgeführt. Die Besonderheit dieses PCR Verfahrens liegt in der Korrekturlesefunktion der Phusion Polymerase begründet. Die nachfolgenden Tabellen geben die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Temperaturzyklen sowie die jeweiligen Primersequenzen wieder.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Phusion PCR

Reagenz	Volumen in µl
Template [15ng/µl]	2
dNTPs	1
GC Puffer	10
Primer F (10µM)	2,5
Primer R (10µM)	2,5
DMSO	1
Phusion Polymerase	0,5
H ₂ O (Nuklease-frei)	30,5
Gesamtvolumen	50

Tabelle 10: Temperaturzyklen der Phusion PCR

Wiederholungen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1x	98	3:00
30x	98	0:10
	72	0:30
	72	0:20
1x	72	10:00
	4	∞

Tabelle 11: Oligonukleotidsequenzen für die Phusion PCR

Klonierung von	Bezeichnung	Sequenz
2A Site Puro	for Xma	5' -TCCCCCGGG GAGGGCAGAGGAAGTCTG- 3'
	rev BamH	5' -CGCGGATCC TCAGGCACCGGGCTTGCG- 3'
p16 ^{INK4a}	for	5' -ATAAGAAT GCGGCCGC CTATTTATCGTCATCGTC- 3'
	rev	5' -ACGC GTCGAC ATGGAGCCGGCGGCTGAC- 3'
p21 ^{WAF/Cip-1}	for	5' -ACGC GTCGAC ATGGACTACAAAGACGAT- 3'
	rev	5' -ATAAGAAT GCGGCCGC TTAGGGCTTCTCTTGA- 3'

3.4.2 Gelisolation

Die amplifizierten Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Invisorb® Spin DNA Extraction Kit C250 (STRATEC Molecular GmbH) aus dem Gel, nach den Angaben des Herstellers mit 30µl H₂O isoliert.

3.4.3 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden die Reaktionsansätze (siehe **Tabelle12/13**) über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. In zwei getrennten Reaktionsansätzen wurde zum einen das amplifizierte Phusion PCR Produkt und zum anderen der Zielvektor geschnitten.

Tabelle 12: Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und Cfr9I

Reagenz	Volumen in μl
BamHI	1
Cfr9I (XmaI)	2
10x Puffer Cfr9I	3
Phusion PCR Produkt/ Vektor (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1
H ₂ O (Nuklease-frei)	23
Gesamtvolumen	30

Tabelle 13: Restriktionsverdau mit den Enzymen NotI und SalI

Reagenz	Volumen in μl
NotI	2
SalI	1
10x Puffer Fast Digest	3
Phusion PCR Produkt/ Vektor (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1
H ₂ O (Nuklease-frei)	23
Gesamtvolumen	30

Die 5' Phosphatreste des geschnittenen Vektors wurden, nach Restriktionsverdau, mittels der Zugabe von 2 μl FastAP zum Restriktionsansatz für weitere 20 Minuten bei 37°C entfernt. Somit konnte eine Selbstligation des Vektors verhindert werden. Die Reaktion wurde durch eine Temperaturerhöhung des Reaktionsansatzes auf 75°C für 5 Minuten abgestoppt. Abschließend wurden die Restriktionsansätze mittels des DNA Purification Kits $\mu\text{SB Spin PCRapace C250}$ (INVITEK Molecular GmbH) aufgereinigt und konnten für die Ligation weiterverwendet werden.

3.4.4 Ligation

Die Ligation erfolgte im Verhältnis 3:1 (Insert: Vektor) wobei 100ng des Vektors eingesetzt wurden. Für die Berechnung der benötigten DNA Menge des *Inserts* wurde nachfolgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Länge des PCR-Produkts (in bp)}}{\text{Länge des Vektors (in bp)}} \times 100\text{ng Vektor} \times 3 = \text{ng Insert}$$

Neben den zu ligierenden DNA-Fragmenten erfolgte die Zugabe von 1 μl T4-DNA Ligase und 2 μl 10x T4-Ligasepuffer. Die Ligationsreaktion wurde für 3 Stunden bei RT in einem Gesamtvolumen von 10 μl durchgeführt, welches durch die Zugabe des entsprechenden Volumens von Nuklease-freiem Wasser eingestellt wurde. Der Ligationsreaktionsansatz ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Ligation von Vektor und Insert

Reagenz	Volumen in μl
Insert	x
Vektor	x
10x T4-Ligasepuffer	2
T4-DNA Ligase	1
H ₂ O (Nuklease-frei)	x
Gesamtvolumen	10

3.4.5 Hitzeschock Transformation

2 μl des Ligationsansatzes wurden in *E. coli top 10 CC* transformiert. Die Zugabe des Ligationsansatzes erfolgte zu 75 μl Bakterienkultur auf Eis. Nach 30 Minuten wurde die eigentliche Transformation mittels Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 250 μl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM Glucose, pH=7). Die Bakterienkultur wurde 45 Minuten bei 350rpm kultiviert und abschließend für eine Über-Nacht (ÜN) Kultur bei 37°C auf Agar-Platten (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) ausplattiert.

Die einzelnen Klone wurden am nächsten Tag gepickt, ein Sicherheitsausstrich der Klone angefertigt und einer ÜN-Kultur in 2 ml LB-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Ampicillin zugeführt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Vektoren mittels Plasmid Mini Kit (QIAGEN) isoliert.

Dieses Verfahren wurde auch verwendet, um die Plasmide über eine Retransformation erneut anzureichern. Hierbei ist zu beachten, dass für die unterschiedlichen Vektoren, verschiedene Antibiotikaresistenzen für die anschließende selektive Kultivierung zum Tragen kamen. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 15: Verwendete Vektoren und deren Antibiotikaresistenzen für die selektive Anreicherung in Bakterien

Vektor	Resistenz	Antibiotikumkonzentration im Medium
pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
pTOV-11	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
pTOV-11_2APuroR_CDKN1A	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
pTOV-11_2APuroR_CDKN2A	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
pCMV(CAT)T7-SB100(AL)	Chloramphenicol	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
pBabepuro3-p16Flag	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Flag p21 WT	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.4.6 Sequenzierung

Die Überprüfung der Korrektheit der generierten und isolierten DNA Plasmide erfolgte mittels der DNA Sequenzierung nach Sanger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Analysiert wurde in diesem Fall nur der veränderte Bereich des Plasmides. Hierzu wurden Sequenzierungsprimer gewählt, die die Insertionsschnittstelle flankieren. Der Reaktionsansatz für die Kettenabbruch PCR Reaktion nach Sanger sowie das Temperaturprogramm für dies Reaktion geben die **Tabellen 16** und **17** wieder.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Abbruchreaktions-PCR Ansatzes

Reagenz	Volumen in μ l
Plasmid	1
Sequenzierprimer	0,5
Big Dye Terminator Reaktionspuffer	1,7
Big Dye Terminator	0,3
H ₂ O (Nuklease-frei)	6,5
Gesamtvolumen	10

Tabelle 17: Temperaturprogramm für die Abbruch-PCR-Reaktion nach Sanger

Wiederholungen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1x	95	3:00
36x	95	0:30
	55	0:15
	60	3:00
1x	60	10:00
	4	∞

Nach erfolgter PCR Reaktion wurden die Produkte über den Biomek NXP-Roboter aufgereinigt. Der eigentliche Schritt der Sequenzierung erfolgte mittels Kapillarelektrophorese und Laserdetektion. Die Auswertung des Ergebnisses wurde mit der Software Geneious durchgeführt. Die jeweiligen Referenzsequenzen sind dem Anhang zu entnehmen.

Tabelle 18: Sequenzierungsprimer

Analyse von	Bezeichnung	Sequenz
p16 ^{INK4a} /p21 ^{WAF/Cip-1} Insert	p16 for sequ	5' - TTC CGT ACC ACT TCC TAC CC -3'
p16 ^{INK4a} /p21 ^{WAF/Cip-1} Insert	p16 rev sequ	5' - TGG TTT GTC CAA ACT CAT CAA - 3'
p16 ^{INK4a} /p21 ^{WAF/Cip-1} Insert	shp16 for sequ	5' - TAA ACC AGG GCG CCT ATA AA - 3'
p16 ^{INK4a} /p21 ^{WAF/Cip-1} Insert	shp16 rev sequ	5' - TGG TTT GTC CAA ACT CAT CAA - 3'
2A Site + Puromycinresistenz	2APuro sequ1 (for)	5' - TTG ATA TGC TGC CTG CTG AC - 3'
2A Site + Puromycinresistenz	2APuro sequ2 (rev mittig)	5' - AGG CCT TCC ATC TGT TGC T - 3'
2A Site + Puromycinresistenz	2APuro sequ3 (rev Ende)	5' - TGG GTA TAA ATG GCG GTA AGA - 3'

Erfolgreiche Klonierungsprodukte wurden mittels Midi/Maxi Präparationen angereichert und ein Cryostock der Bakterienkultur angelegt.

3.5 hMSCs

Arbeiten mit hMSCs erfolgten nach SOPs der Arbeitsgruppe Geißler des Julius Wolff Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité, Berlin. Die Methoden werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

3.5.1 Humane mesenchymale Stromazellen

Die Isolation primärer humaner mesenchymaler Stromazellen (hMSCs) erfolgte nach dem Protokoll von Pittenger (Pittenger et al., 1999) und wird im Folgenden näher beschrieben. Primäre hMSCs wurden von Knochenproben isoliert, welche von Patienten während einer Hüft-der Gelenkprothetischen Operation gewonnen wurden.

Nachdem ansteckende Krankheiten ausgeschlossen wurden, wurde das Knochenmark in 50ml PBS gelöst und filtriert (100µm). Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20ml PBS gelöst. 10ml der Zellsuspension wurden vorsichtig zu 25ml Histopaque® hinzugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 Minuten bei 1160 x g, konnten die hMSCs anhand des Dichtegradienten aus der Interphase isoliert werden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS über erneute Zentrifugationsschritte gewaschen und in DMEM *low glucose*, 10% FCS aufgenommen. Für die Zellexpansion wurden T300 Zellkulturflaschen verwendet. Sobald die Zellen an der Oberfläche adhärent waren, wurde nach 4 Tagen der erste Mediumwechsel vollzogen. Nach weiteren 10 Tagen wurden die Zellen zum ersten Mal passagiert (P1). Die Zellen wurden für eine weitere Passage expandiert und je nach Bedarf direkt für den Versuch verwendet oder cryokonserviert.

Die Identifikation der hMSCs erfolgte nach Angaben der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (Krampera et al., 2013) (Dominici et al., 2006).

Kryokonservierte Zellen wurden schonend im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald die Zellsuspension flüssig vorlag, wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß mit 4ml Expansionsmedium (DMEM *low glucose*, 10% pHPL, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamax) überführt. Diese wurden für 5 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Durch Verwerfen des Überstandes wurden Dimethylsulfoxid-Rückstände beseitigt. Das Zellpellet wurde gelöst und die Zellen in einer T300 Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Bei Erreichen von einer 80%igen Konfluenz, erfolgte entweder der Einsatz der Zellen für den jeweiligen Versuch oder die Zellen wurden passagiert. Mediumwechsel der Zellen erfolgte, falls nicht anders angegeben, alle drei- vier Tage.

3.5.2 Transfektion

Für die gezielte Überexpression der Seneszenzmarker p16^{INK4a} und p21^{WAF-1/Cip-1} wurden die hMSCs mit dem unter 3.4 beschriebenen dualen Transposon Konstrukt transfiziert. Von Seiten des Herstellers werden nachfolgende Transfektionsparameter für hMSC empfohlen:

Tabelle 19: Empfohlene Elektroporationsparameter unter Verwendung des Neon® Systems

Angaben für eine Reaktion	
Stromspannung	990 V
Dauer	40ms
Anzahl Impulse	1

([https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-culture/neon-protocols.par.79302.file.dat/mesenchymal%20stem%20cell%20\(hmsc\)-bone%20marrow.pdf](https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-culture/neon-protocols.par.79302.file.dat/mesenchymal%20stem%20cell%20(hmsc)-bone%20marrow.pdf)
Zugriff Oktober 2020)

Unsere Versuche zeigten jedoch, dass die Transfektionseffizienz gesteigert werden konnte, wenn die Parameter wie folgt gewählt wurden.

Tabelle 20: Optimale Elektroporationsparameter für hMSC

Angaben für eine Reaktion	
Stromspannung	1050 V
Dauer	40ms
Anzahl Impulse	1

Die Transfektion der hMSCs erfolgte mittels Elektroporation unter Verwendung des Neon® Systems nach den Angaben des Herstellers. Die nachfolgende Tabelle, fasst die Elektroporationsparameter zusammen:

Tabelle 21: Reaktionsansatz einer Elektroporation mit dem Neon® System

Angaben für eine Reaktion	
Reaktionsvolumen	100µl
Zellzahl	4*10 ⁵
R Buffer	100µl- x µl DNA
SB 100	3µg
pTOV	27µg

Tabelle 22: Elektroporationsparameter der hMSC unter Verwendung des Neon® Systems

Angaben für eine Reaktion	
Stromspannung	1050 V
Dauer	40ms
Anzahl Impulse	1

Die Reaktion wurde pro zu transfizierendes Konstrukt dreimal wiederholt und die Zellen nach erfolgter Elektroporation in eine T75 Flasche transferiert und für zwei Wochen mit 1µg/ml Puromycin selektiert. Im Anschluss erfolgte eine Expansion der Zellen, bis die gewünschte Zellzahl für die Versuche erreicht war. Die hMSC wurden in Passage 4+2 für die beschriebenen Versuche verwendet.

3.5.3 Doxycyclin induzierte Überexpression von p16^{INK4a} und p21^{WAF-1/Cip-1}

Die Überexpression von p16^{INK4a} und p21^{WAF-1/Cip-1} in der Zielzelle erfolgte über die Zugabe von 0,5µg/ml Doxycyclin zum Kultivierungsmedium. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

3.5.4 Mitomycin Behandlung

Mitomycin C (MMC) ist ein chemotherapeutisches Reagenz, welches in der Tumorthherapie seit 1974 zum Einsatz kommt (Ravina et al., 2011). Mitomycin C gehört aufgrund seiner bi-alkylierenden Eigenschaften zur Gruppe der alkylierenden Agenzien. Durch die Übertragung von bis zu zwei Alkylgruppe pro MMC Molekül auf die Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Phosphat- und Sulfhydrylgruppen der Ribonukleinsäuren der DNA, interkaliert MMC in die DNA. So entstehen DNA Quervernetzungen, die eine zytostatische Wirkung haben (Pratt et al., 1994). Die Behandlung der hMSCs mit Mitomycin C (Stocksolution: 0,5mg in 5% DMSO PBS) erfolgte einen Tag nach dem Ausplattieren der Zellen für den jeweiligen Versuch. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 20µg Mitomycin C/ml Medium behandelt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und in frischem Medium inkubiert.

3.5.5 Zellaktivität und Zellproliferation

Um das Zellproliferationsverhalten zu bewerten, wurde neben der Zellverdopplung auch die Zellaktivität bestimmt. Für diese Analyse wurde eine PrestoBlue® (ThermoFisher SCIENTIFIC) Färbung verwendet. Hierfür wird das Expansmedium entfernt und durch eine 1x PrestoBlue/

Expansionsmedium Lösung ersetzt. Das reduktive Milieu von metabolisch aktiven Zellen bedingt die Modifikation von PrestoBlue® zu einem fluoreszierenden Reagenz. Über die quantitative Auswertung der Fluoreszenzmessung nach einer Inkubationszeit von einer Stunde unter normalen Zellkultivierungsbedingungen, können Rückschlüsse über die Zellvitalität gewonnen werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Extinktion von 560nm und einer Emission von 590nm unter Verwendung des Tecan Readers.

Für die Bestimmung der Zellverdopplung wurde das CyQuant Cell Proliferation Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen werden mit einer Konfluenz von 30% ausplattiert, das entspricht für hMSC einer Zellzahl von 2400 Zellen/cm² Kultivierungsfläche. Zu den gewünschten Analysezeitpunkten wurden das Zellmedium entfernt, die Zellen 2x mit 1xPBS gewaschen und die Zellkulturplatten anschließend bei -80°C gelagert. Die Lagerung erfolgte, bis alle Platten für die unterschiedlichen Analysezeitpunkte vollständig gesammelt waren, sodass eine zeitgleiche Aufarbeitung der unterschiedlichen Analysezeitpunkte gewährleistet werden konnte. Sobald die gefrorenen Zellrasen aufgetaut waren, wurde die CyQuant Analyse durchgeführt.

Um die Proliferationsrate in Form der Populationsverdopplung an einem definierten Tag angeben zu können, wurde folgende Formel zur Berechnung angewandt:

$$\text{Populationsverdopplung an Tag X} = \frac{\log(\text{Zellzahl an Tag X [RFU]}/\text{Zellzahl an Tag 0 [RFU]})}{\log 2}$$

Die Einheit RFU steht hierbei für die relative Fluoreszenz Einheit (RFU, engl.: *relative fluorescence units*).

3.5.6 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung erfolgte nach dem Standardverfahren der Arbeitsgruppe Prognostic Markers and Targeted Therapy des Berlin Brandenburg Centrums für Regenerative Therapien (BCRT) (Jaiswal, Haynesworth, Caplan, & Bruder, 1997) (Grassel, Stockl, & Jenei-Lanzl, 2012) (Krause, Seckinger, & Gregory, 2011).

Die Zellen wurden in einer 80%igen Konfluenz (6400 Zellen/cm²) ausplattiert. Die Zellzählung erfolgte mittels CasyTT. Am darauffolgenden Tag wurde die osteogene Differenzierung induziert. Die Zusammensetzung für das osteogene Differenzierungsmedium (OM) ist der Tabelle 20 zu entnehmen. Die Kontrollzellen wurden weiterhin in normalem Expansionsmedium kultiviert. Als weiterer Faktor kam die Doxycyclin Behandlung mit ins Spiel, sodass sich pro Zelllinie 4 Gruppen ergaben: 1) Zellen, die mit EM kultiviert werden. 2) Zellen, die mit EM und Doxycyclin behandelt

werden. 3) Zellen, die in OM kultiviert werden und 4) Zellen, die mit OM und Doxycyclin behandelt werden. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage.

Tabelle 23: Zusammensetzung für 1ml osteogenes Differenzierungsmedium

Substanz	Volumen	Konzentration
L-Ascorbinsäure	1µl	50µM
beta-Glycerolphosphat	50µl	10mM
Dexamethason	10µl	0,1µM
Penicillin/Streptomycin	10µl	1x
Glutamax	10µl	1x
FCS	100µl	10%
DMEM- low glucose	819µl	

Das osteogene Differenzierungspotenzial der Zellen wurde anhand der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der mineralisierten Matrix beurteilt.

Die Alkalische Phosphatase (ALP) spielt eine maßgebliche Rolle für die Knochenentwicklung und Knochenhomöostase. So steigt die Aktivität der ALP zu Beginn der osteogenen Differenzierung stark an. Somit gilt die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als anerkannter Marker für die osteogene Differenzierung. Die enzymatische Tätigkeit der ALP lässt sich über die Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu 4-Nitrophenolat nachweisen. Diese Umsetzung lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm detektieren. Vor der Messung wurden die Zellen mit vorgewärmten ALP Puffer gewaschen. Es folgte eine 10-minütigen Inkubation von 100µl ALP Puffer und 100µl pNPP, ebenfalls vorgewärmt, zu jedem Well der Zellkulturplatte. Durch die Zugabe von 200µl 1M Natriumhydroxidlösung wurde die Reaktion nach 10 Minuten gestoppt. Aus jedem Well wurden 2x 100µl in eine neue 96 Wellplatte für die Messung der enzymatischen Aktivität bei einer OD=405nm transferiert. Die Berechnung der enzymatischen Aktivität erfolgte über nachfolgende Formel:

$$c = (E - E_0) / \epsilon \times d$$

c	=	molare Konzentration [mol/L]
E	=	Extinktion (OD) bei 405nm
E ₀	=	Extinktion des Blanks (OD) bei 405nm
ε	= 18450 L x mol ⁻¹ x cm ⁻¹ =	molarer Extinktionskoeffizient
d	= 0,3294 cm	= Schichtdicke des mit 100µl gefüllten 96er Wells

Zusätzlich wurde die Matrixmineralisierung im Zuge der osteogenen Differenzierung quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Alizarinrotfärbung. Zu den gewählten Zeitpunkten wurde das Kultivierungsmedium entfernt und die Zellen durch eine 10-minütige Inkubation bei RT mit 4% PFA in 1x PBS fixiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Vor der Durchführung der Alizarinrotfärbung erfolgte eine relative Bestimmung der Zellzahl anhand einer fluoreszierenden Färbung der DNA durch die Verwendung einer Hoechst-Färbelösung. Zuerst erfolgte die Bestimmung des Blankwertes. Hierfür wurden die Emission bei 461nm nach einer Extinktion bei 352nm der mit 1xPBS bedeckten Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei RT im Dunkeln mit einer Hoechstlösung (1:1000) inkubiert. Nach einem Waschschriff der Zellen mit 1x PBS folgte die erneute Detektion des Fluoreszenzsignals bei $\lambda=352\text{nm}/461\text{nm}$ der Zellen in 1xPBS. Im Anschluss wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen und mit einer 0,5%igen Alizarinrot-Lösung (pH=4,2) für 10 Minuten inkubiert. Mineralisierte Matrix wird durch die Farblösung rot angefärbt. Überschüssige Farbe wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Aqua dest. abgetragen. Die Zellen wurden durch die weitere Lagerung ohne Flüssigkeit getrocknet und die angefärbte mineralisierte Matrix photographisch festgehalten. Für die Quantifizierung wird der verbliebene Farbstoff durch die Zugabe von je 200 μl Cetylpyridiniumchlorid gelöst. 100 μl wurden in eine neue 96 Well übertragen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen.

3.5.7 Adipogene Differenzierung

Neben dem osteogenen ist auch das adipogene Differenzierungspotenzial von hMSC für regenerative Prozesse entscheidend. Für die Untersuchung der adipogenen Differenzierung werden die hMSC mit einer Konfluenz von 150% (12000 Zellen/cm²) ausplattiert. Die Induktion der adipogenen Differenzierung beginnt durch die Zugabe von adipogenen Differenzierungsmedium (AM) initiiert. Dies geschieht 24h, nachdem die Zellen ausplattiert wurden, sodass die Zellen vollständig an der Oberfläche der Wellplatten adherieren können.

Es ergaben sich, wie auch für die osteogene Differenzierung beschrieben, pro Zelllinie 4 Gruppen unterschiedlicher Kultivierungsbehandlungen: 1) Zellen, die mit EM kultiviert werden. 2) Zellen, die mit EM und Doxycyclin behandelt werden. 3) Zellen, die in AM kultiviert werden und 4) Zellen, die mit AM und Doxycyclin behandelt werden. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Wichtig für Herstellung des AM ist, dass vor der Verwendung die Indomethacin Mikrokristalle herausgefiltert werden. Diese sind zytotoxisch. Aus diesem Grund werden alle Komponenten bis auf das FCS zusammengeführt und das Medium anschließend nochmal über einen 0,22 μm Filter filtriert. Erst danach erfolgt die Zugabe des FCS.

Tabelle 24: Zusammensetzung für 1ml adipogenes Differenzierungsmedium

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Insulin 335µM	6µl	2µM
IBMX 500mM	1µl	500µM
Indomethacin50mM	2µl	100µM
Dexamethason 1mM	1µl	1µM
Penicillin/Streptomycin	10µl	1x
Glutamax	10µl	1x
FCS	100µl	10%
DMEM- low glucose	819µl	

Die Quantifizierung der adipogenen Differenzierung erfolgte anhand der Nile Red Färbung. Die Angaben zu den nachfolgend verwendeten Volumina bezieht sich auf die adipogene Differenzierung in einem 48 Well Zellkulturplattenformat.

Zunächst wurden die Zellen mittels 200µl/ Well 4% PFA in 1x PBS für 10 Minuten bei RT fixiert und im Anschluss mit 1x PBS gewaschen. Um das Hintergrundsignal bestimmen zu können wurden 150µl/Well 1x PBS zugegeben und eine Messung des Fluoreszenzsignales bei $\lambda=352\text{nm}/461\text{nm}$ durchgeführt. Die Nile Red/Hoechst Färbung wurde für 20 Minuten im Dunkeln bei RT durchgeführt mit 150µl/Well. Dabei setzt sich die Färbelösung wie folgt zusammen:

Tabelle 25: Zusammensetzung für 1ml Nile Red/Hoechst Färbelösung

Substanz	Verdünnung
1% Saponin	(1:5)
1mg/ml Hoechst	(1:1000)
1mg/ml Nile Red	(1:1000)
1x PBS	1000µl

Nach 20 Minuten werden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und erneut mit 150µl 1x PBS bedeckt und im Plate Reader gemessen. Zuerst wurde das Hoechstsignal bei $\lambda=352\text{nm}/461\text{nm}$ bestimmt und im Anschluss das Nile Red Signal bei $\lambda=485\text{nm}/538\text{nm}$.

3.5.8 RNA Isolierung aus Zellen

Die Isolation der RNA aus Zellen, die in Kultur gehalten worden, erfolgte unter Verwendung des Direct-zol™ RNA Mini-Prep KIT (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers zu dem jeweiligen gewünschten Analysezeitpunkt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

Um die isolierte RNA Auf unterschiedliche Genexpressionen untersuchen zu können, wurde die RNA Konzentration mittels NanoDrop ermittelt und die RNA über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

3.5.9 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte über reverse Transkription der RNA. Verwendet wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Für die cDNA Synthese wurde 1µg RNA in 11µl Wasser vorgelegt. Zu jedem Reaktionsansatz wurde 1µl Random Hexamer Primer hinzugegeben und für 5 Minuten bei 70°C denaturiert. Erst nach der Denaturierung wurden jeweils 8µl des Mastermixes (siehe **Tabelle 26**) hinzugegeben. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 26: cDNA Synthese Master Mix

Reagenz	Volumen in µl
5x Puffer	4
10mM dNTP	2
Ribonuklease Inhibitor	1
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase	1
Gesamtvolumen	8

Das gesamte Temperaturprogramm der cDNA Synthese Reaktion ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 27: Temperaturprogramm der cDNA Synthese

Wiederholungen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1x	70	5:00
Pause für die Zugabe des Master Mixes		
1x	42	60:00
1x	70	10:00
	4	∞

3.5.10 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse der realtiven Expressionslevel verschiedener Gene wurde die Methode der quantitativen *real-time* PCR verwendet. Für diese Methode wird die RNA über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wird dann in einer Echtzeit quantitativen PCR Verfahren analysiert. Es wird ein fluoreszierender Farbstoff eingesetzt, der mit der generierten doppelsträngigen DNA interkaliert. Für jeden PCR Zyklus wird die Intensität des Fluoreszenzsignales detektiert. Ein stärkeres Fluoreszenzsignal lässt bei einer gleichen Menge

eingesetzter cDNA auf ein höheres Expressionslevel des zu untersuchenden Genes schließen. Zur Kontrolle wird dieses Signal relativ zum Signal eines etablierten *house-keeping* Genes bewertet. Bei *house-keeping* Genen handelt es sich um konstitutiv exprimierte Gene, deren Expression unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen ist. Für die beschriebenen Versuche in dieser Arbeit wurde auf Gapdh als *house-keeping* Gen zurückgegriffen. Für das zu untersuchende Gen werden Primer nach Möglichkeit exonübergreifend gewählt, um auszuschließen, dass fälschlicherweise genomische DNA nachgewiesen wird. Für jede qPCR-Reaktion werden 10ng cDNA eingesetzt. Die nachfolgende Tabelle gibt den Reaktionsansatz für eine qPCR wieder.

Tabelle 28: qPCR Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen in μ l
5x Hot FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix	4
Primer Forward (2,5 μ M)	1
Primer Reverse (2,5 μ M)	1
H ₂ O (Nuklease-frei)	4
cDNA (10ng)	10
Gesamtvolumen	20

Die qPCR wurde mittels des QuantStudio® 3 Real-Time PCR System durchgeführt. Die Einstellungen für das Temperaturprogramm sind der **Tabelle 29** zu entnehmen. Anhand einer anschließenden Dissoziationsreaktion konnte gewährleistet werden, dass es sich um die Amplifikation des zu untersuchenden Zielgenes handelt.

Tabelle 29: qPCR Temperaturprogramm

Wiederholungen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1x	95	10:00
40x	95	00:15
	60	01:00
	4	∞

Die Auswertung der qPCR erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode.

3.5.11 RNA Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Transkriptom von hMSC untersucht, die entweder über eine einmalige Behandlung der Zellen mit Mitomycin C oder die kontinuierliche Überexpression der Seneszenzmarker p16^{INK4a} und p21^{WAF/Cip-1} in den Zellzyklusarrest versetzt wurden.

Für die RNA Sequenzierung wurden hMSC von zwei verschiedenen Spendern verwendet P546, P785. Die hMSC von beiden Spendern wurden wie unter **3.5.2** beschrieben mit den jeweiligen Konstrukten für p16^{INK4a} und p21^{WAF/Cip-1} transfiziert.

Da die Überexpression von p16^{INK4a} und p21^{WAF/Cip-1} mittels Doxycyclinbehandlung induziert wurde, wurde zur Kontrolle auch der Effekt einer Doxycyclinbehandlung auf die untransfizierten Kontrollzellen untersucht. Zusätzlich wurde auch das Transkriptom der transfizierten Zellen ohne Doxycyclinbehandlung mit analysiert. Dies ergibt sieben Proben pro Analysezeitpunkt: Ctrl, Ctrl + Mitomycin C, Ctrl + Doxycyclin, p16^{INK4a}, p16^{INK4a} + Doxycyclin, p21^{WAF/Cip-1} und p21^{WAF/Cip-1} + Doxycyclin. Untersucht wurden zwei Zeitpunkte, 10 und 20 Tage nach Mitomycin C Behandlung bzw. beginnender Doxycyclinbehandlung. Dies ergibt eine Gesamtzahl von 28 Proben, die in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst sind.

Tabelle 30: Proben der RNA Sequenzierung

	Spender	
	P546	P785
d10	Ctrl	Ctrl
	Ctrl + MMC	Ctrl + MMC
	Ctrl + Dox	Ctrl + Dox
	p16 ^{INK4a}	p16 ^{INK4a}
	p16 ^{INK4a} + Dox	p16 ^{INK4a} + Dox
	p21 ^{WAF/Cip-1}	p21 ^{WAF/Cip-1}
	p21 ^{WAF/Cip-1} + Dox	p21 ^{WAF/Cip-1} + Dox
d20	Ctrl	Ctrl
	Ctrl + MMC	Ctrl + MMC
	Ctrl + Dox	Ctrl + Dox
	p16 ^{INK4a}	p16 ^{INK4a}
	p16 ^{INK4a} + Dox	p16 ^{INK4a} + Dox
	p21 ^{WAF/Cip-1}	p21 ^{WAF/Cip-1}
	p21 ^{WAF/Cip-1} + Dox	p21 ^{WAF/Cip-1} + Dox

Die Aussaat der Zellen erfolgte an Tag -1 in 6 Wellplatten mit jeweils 61400 Zellen pro Well. Die Aussaat erfolgte in Triplikaten. Die Triplikate wurden zum Analysezeitpunkt zu einer Probe zusammengeführt. Die Mitomycin C Behandlung der Zellen erfolgte einmalig an Tag 0 des Experimentes (siehe **3.5.4**). Die Behandlung der Zellen mit Doxycyclin hingegen erfolgte über den gesamten Zeitraum des Experimentes, beginnend an Tag 0. Das Medium wurde alle zwei bis vier Tage gewechselt.

Die nachfolgende Graphik fasst den zeitlichen Ablauf des Experimentes zusammen.

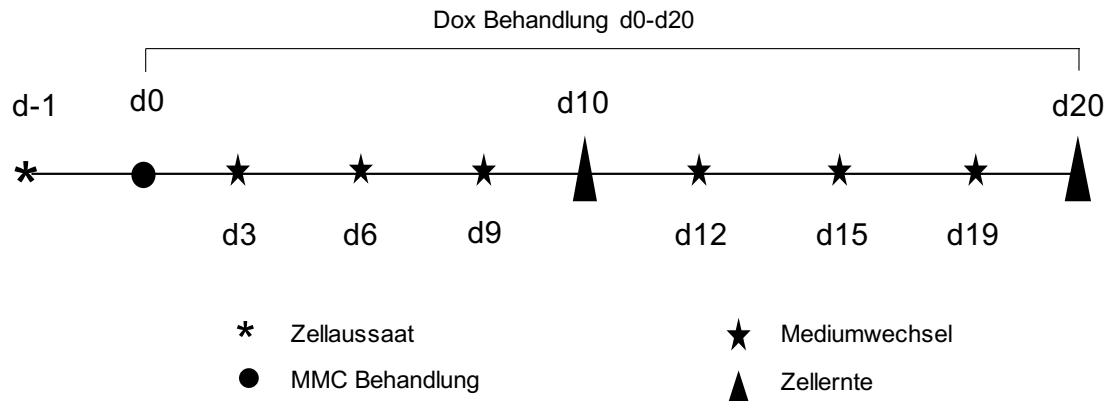


Abbildung 16: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der Generierung der Proben für die RNA-Sequenzierung

Vor der RNA Isolation wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Well 300µl zol hinzugegeben. Um die maximale Probenausbeute zu erreichen wurden die Zellen zusätzlich mittels Zellschaber von der Kultivierungsoberfläche gekratzt. Die Trizolsuspensionen der Triplikate wurden gesammelt in ein neues RNA/DNase freies Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende RNA Isolation erfolgte wie unter **3.5.8** beschrieben.

3.5.12 Proteinisolation aus Zellen

Zur Proteinextraktion wurde das Kultivierungsmedium der Zellen entfernt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl RIPA-Puffer (150mM NaCl, 50mM Tris, 5mM EDTA, 1% TritonX-100, 025% Desoxycholat, 01% SDS) zu jedem Well, bei der Verwendung einer 6-Well Kultivierungsplatte. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst. Das Proteinextrakt wurde für die weitere Aufarbeitung in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.5.13 Western Blot

Zur Probenvorbereitung wurde zunächst die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben mittels BCA Assay (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Von jeder Probe wurden 20µg Protein eingesetzt. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel wurden die Proben mit 5x Ladepuffer (250mM Tris; 20% Glycerol; 10% SDS; 2% 2-Mercaptoethanol; 0,25% Bromphenolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 98°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und durchliefen bei 60V das Sammelgel und die anschließende Auftrennung im Trenngel erfolgte dann bei 120V. Für den Lauf des SDS-Geles wurde das Mini-Protean 3 System (BioRad) und der Laufpuffer (25mM Tris; 0,2M Glycin; 0,1% SDS) verwendet. Der Transfer aus dem Gel auf die 0,2µm Nitrozellulosemembran (BioRad) erfolgte bei 150mA mittels des PerfectBlue Semi-Dry

Elektroblotter (PeqLab) unter Verwendung des Transferpuffers (1,5M Tris; 0,4% SDS (pH8,8)) für 1,5 Stunden. Nach dem Transfer wurden unspezifische Antikörperbindestellen der Membran für eine Stunde blockiert (5% Magermilch; 0,2% NP40 in 1xTBS). Die nachfolgende Bindung des primären Antikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht in der Blockierlösung. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal à 5 Minuten gewaschen (0,1% NP40 in 1xTBS). Daraufhin erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für eine Stunde bei RT. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal à 5 Minuten gewaschen. Für die Detektion des gebundenen sekundären Antikörpers wurde das Western Lightning Plus-ECL System (PerkinElmer) in Kombination mit dem Chemi-Smart System (Vilber Lourmat) verwendet.

3.5.14 Senolytika Behandlung

Zur weiteren Charakterisierung der p16^{INK4a} und p21^{WAF/Cip-1} überexprimierenden Zellen hinsichtlich seneszenten Merkmale, wurde der Einfluss der Senolytika Dasatinib und Quercetin auf die Zellviabilität untersucht. hMSC der Spender P546 und P785 wurden entweder mit den Konstrukten für die p16^{INK4a} und p21^{WAF/Cip-1} Überexpression transfiziert und diese Überexpression über einen Zeitraum von 10 Tagen mittels Doxycyclinbehandlung induziert (siehe 3.5.3). Verglichen wurde der Effekt der Senolytika zu unbehandelten untransfizierten Kontrollzellen derselben Spender, sowie Zellen, die an Tag0 des Experimentes einmalig mit Mitomycin C behandelt wurden (siehe 3.5.4). Für den Versuch wurden 48 Wellplatten verwendet und die Zellen wurden in einer Konzentration von 1800 Zellen pro Well ausplattiert. Nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Senolytika, 1µM Dasatinib/1µM Quercetin oder 10µM Dasatinib/10µM Quercetin, stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 3 Tage. Am zweiten und vierten Tag, nach erfolgter Senolytikabehandlung, wurde die Zellquantität mittels CyQuant Cell Proliferation Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC) bestimmt. Die Analyse erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

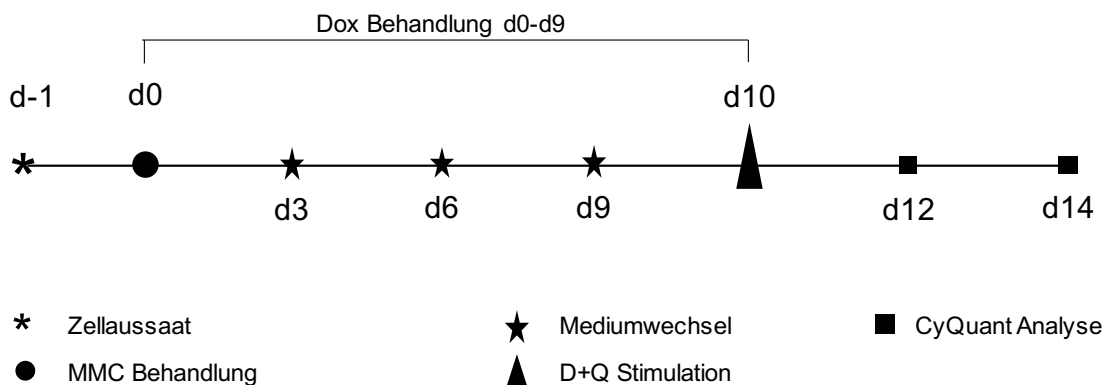


Abbildung 17: Schematische Darstellung des chronologischen Versuchsablaufes der Senolytikatestung

4 Ergebnisse

4.1 Analysen zum Einfluss der Seneszenz auf die Knochenhomöostase und Knochenregeneration im Mausmodell

Die Untersuchungen des Einflusses von seneszenten Zellen auf die Knochenhomöostase und -regeneration, erfolgte im Mausmodell. Die verwendeten Mausmodelle sind detailliert unter **3.1.1-3.1.4** beschrieben. Die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren 2a (Cdkn2a, p16^{INK4a}) und 1a (Cdkn1a, p21^{WAF-1/Cip-1}) gelten als etablierte Seneszenzmarker. Entsprechend wurden Mausmodelle mit unterbundener Genexpression von *Cdkn2a* und *Cdkn1a* für die Untersuchungen der Knochenmorphologie und -regeneration verwendet. Im Fokus dieser Arbeit stehen die *Cdkn2a* Mausmodelle. In Kooperation mit der Osaka University/Japan wurden Proben zur Verfügung gestellt, um die Knochenmorphologie von *Cdkn1a* *Knockout* (p21KO) und *Cdkn2a/Cdkn1a* *Knockout* (DKO) Mäusen zu untersuchen.

4.1.1 Verifizierung des p16^{INK4a} *Knockouts* im *Cdkn2a* Gene Trap Mausmodell

Zur Überprüfung der Funktionalität des *Cdkn2a* *Knockouts* wurde zunächst der *Gene Trap* Locus sequenziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Ergebnis entsprach den Angaben des Herstellers. Im nächsten Schritt wurde die Genexpression im Knochengewebe der langen Röhrenknochen untersucht. Da der *Cdkn2a* Locus sowohl für p16^{INK4a} als auch für p19^{ARF} kodiert, wurde die Expression beider Zellzyklusinhibitoren überprüft. Die Expression von p16^{INK4a} war in homozygoten *Gene Trap* Tieren deutlich reduziert. Des Weiteren war auch die Expression von p19^{ARF} erniedrigt. Überraschenderweise war die Expression von p21^{WAF-1/Cip-1} der *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Tiere in den Tibiae erhöht (siehe **Abbildung 18**).

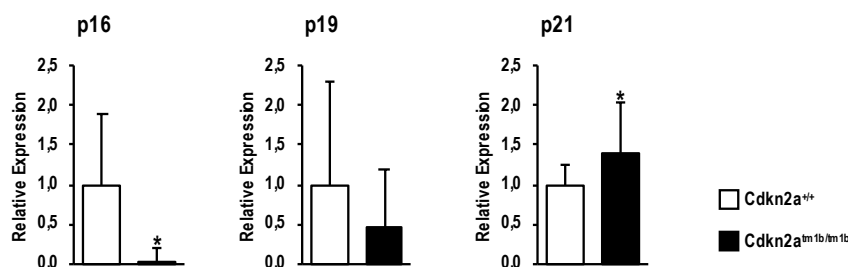


Abbildung 18: Genexpressionslevel von p16^{INK4a}, p19^{ARF} und p21^{WAF-1/Cip-1} im Knochengewebe der Röhrenknochen von adulten weiblichen *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Tieren.

Die Expression von p16^{INK4a} ist nur geringfügig nachweisbar. Auch die Expression von p19^{ARF} ist reduziert, während die Genexpression von p21^{WAF-1/Cip-1} signifikant erhöht ist. n=4 (*Cdkn2a*^{+/+} Proben; n=4 *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Proben; *p<0,05 (TTest))

Ferner wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) von $Cdkn2a^{+/+}$, $Cdkn2a^{+/tm1b}$ und $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Tieren isoliert und deren Proliferationsverhalten *in vitro* analysiert. Wie für einen $Cdkn2a$ Funktionsverlust zu erwarten, wiesen die $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs eine signifikante Erhöhung der Populationsverdopplungen auf. Das proliferative Verhalten wurde täglich über einen Zeitraum von drei Tagen untersucht. Die Anzahl der Populationsverdopplungen der $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Zellen war signifikant höher als die der $Cdkn2a^{+/+}$ Zellen und niedriger verglichen zu den $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs.

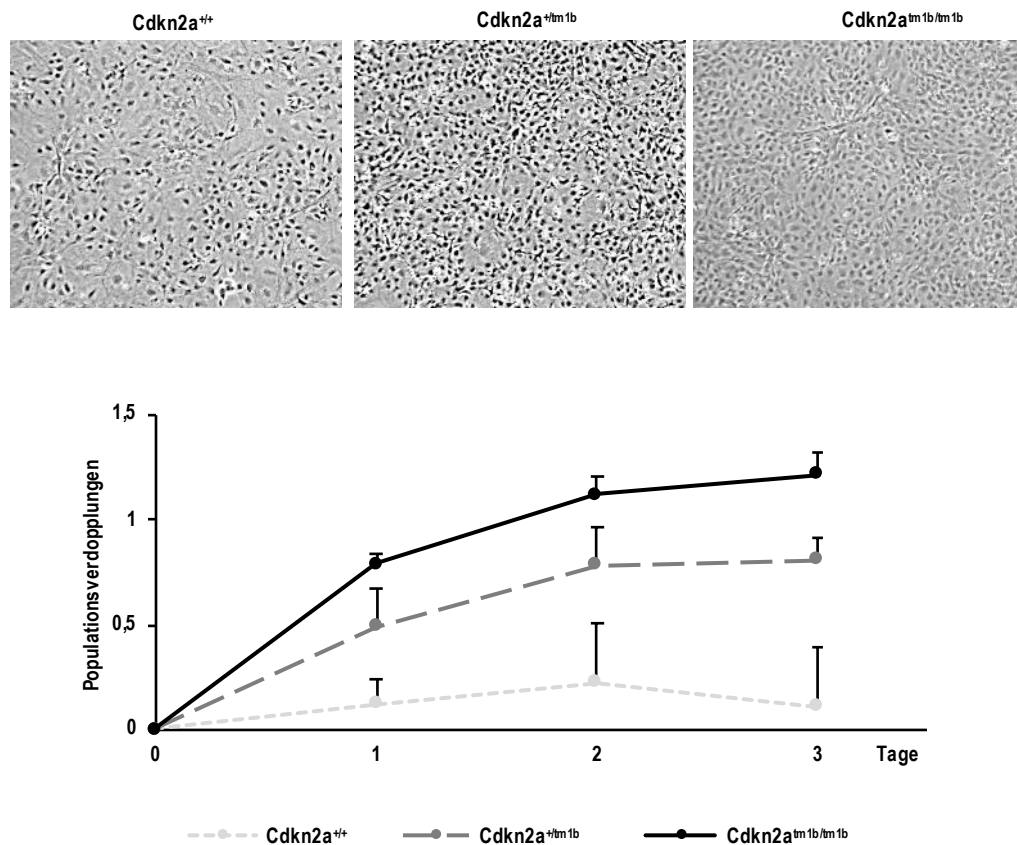


Abbildung 19: $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs zeigen ein gesteigertes proliferatives Verhalten.

Gezeigt werden $Cdkn2a^{+/+}$, $Cdkn2a^{+/tm1b}$ und $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs, deren Zellverdopplungen über einen Zeitraum von 3 Tagen analysiert wurde. Die $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs proliferieren am stärksten, die $Cdkn2a^{+/+}$ am schwächsten und die $Cdkn2a^{+/tm1b}$ MEFs weisen ein mittleres Proliferationsverhalten auf.

4.1.2 Mitomycin C Behandlung induziert Seneszenz der $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs

Im nächsten Schritt wurde die bakterielle β -Galactosidaseaktivität, welche über die *Gene Trap* Kassetten kodiert wird, nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden $Cdkn2a^{+/+}$, $Cdkn2a^{+/tm1b}$ und $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs mit Röntgenstrahlen einer Dosis von 30Gy behandelt, um Seneszenz und somit die Expression von *Cdkn2a* zu induzieren. Eine Woche später wurden die Zellen einer X-Gal Färbung unterzogen. Weder unbestrahlte noch bestrahlte $Cdkn2a^{+/+}$ Zellen wiesen eine Blaufärbung auf. Die stärkste Blaufärbung konnte für die $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs beobachtet werden. Ebenfalls konnte eine β -Galactosidaseaktivität für heterozygote $Cdkn2a$ MEFs nachgewiesen werden jedoch zu einem deutlich geringeren Anteil als für die homozygoten Zellen. Die Analyse der relativen Genexpression der Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ von $Cdkn2a^{+/+}$, $Cdkn2a^{+/tm1b}$ und $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ MEFs nach Mytomycin C vermittelter Seneszenzinduktion zeigt, dass die Seneszenzinduktion mit einer gesteigerten Expression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ einhergeht. Dieser Effekt nimmt über den betrachteten Zeitraum von 3-14 Tagen nach Seneszenzstimulus ab. Für $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Zellen konnte keine gesteigerte $p16^{INK4a}$ Expression nach Seneszenzinduktion nachgewiesen werden und für $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Zellen war eine $p16^{INK4a}$ Expression nicht nachweisbar.

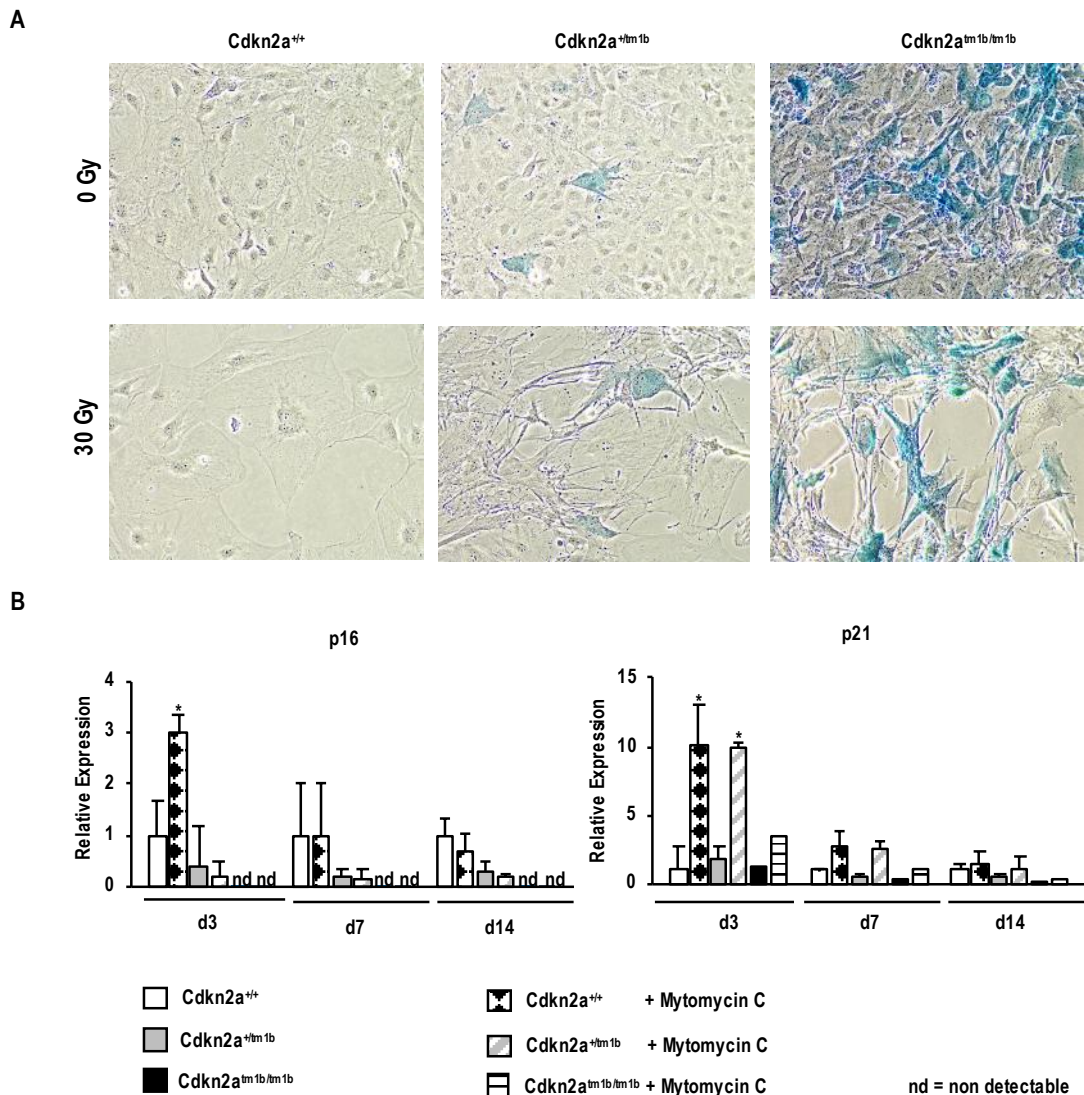


Abbildung 20: Seneszenzinduktion von Cdkn2a^{tm1b/tm1b} MEFs durch Bestrahlung und Mitomycin C (MMC) Behandlung geht mit erhöhter p21^{WAF-1/Cip-1} Expression einher.

MEFs von Cdkn2a^{+/+}, Cdkn2a^{+/tm1b} und Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tieren wurden isoliert und mit MMC behandelt. (A) Eine Woche später wurde eine X-Gal Färbung durchgeführt. Die Blaufärbung der Zellen spricht für die Aktivität der bakteriellen β -Galaktosidase, welche unter dem Promoter von *p16^{INK4a}* in Cdkn2a^{+/tm1b} und Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tieren exprimiert wird. (B) Zusätzlich wurde an den Tagen 3, 7 und 14 nach der MMC Behandlung RNA der jeweiligen MEFs isoliert und auf die Expressionslevel von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* untersucht. *p<0,05 (TTest)

4.1.3 Nicht nachweisbare *p16^{INK4a}* Expression während der murinen Embryogenese

Da bereits Muñoz-Espin et al. und Storer et al. beschrieben wurde, dass *p21^{WAF-1/Cip-1}* während der Embryogenese temporär exprimiert wird, wurden die 10,5 und 12,5 Tage alten Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Embryonen hinsichtlich der *Cdkn2a* Expression untersucht. Die Analyse erfolgte indirekt über die Expression der bakteriellen β -Galactosidase der *Gene Trap* Kasette von homozygoten Tieren (**Abbildung 21**). Die Embryonen weisen eine altersgerechte Entwicklung auf. Insbesondere die

Entwicklung der Gliedmaßen scheint unbeeinträchtigt von dem *Cdkn2a* Knockout zu sein. Über die X-Gal Färbung konnte zu keinem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung eine Expression von *Cdkn2a* detektiert werden.

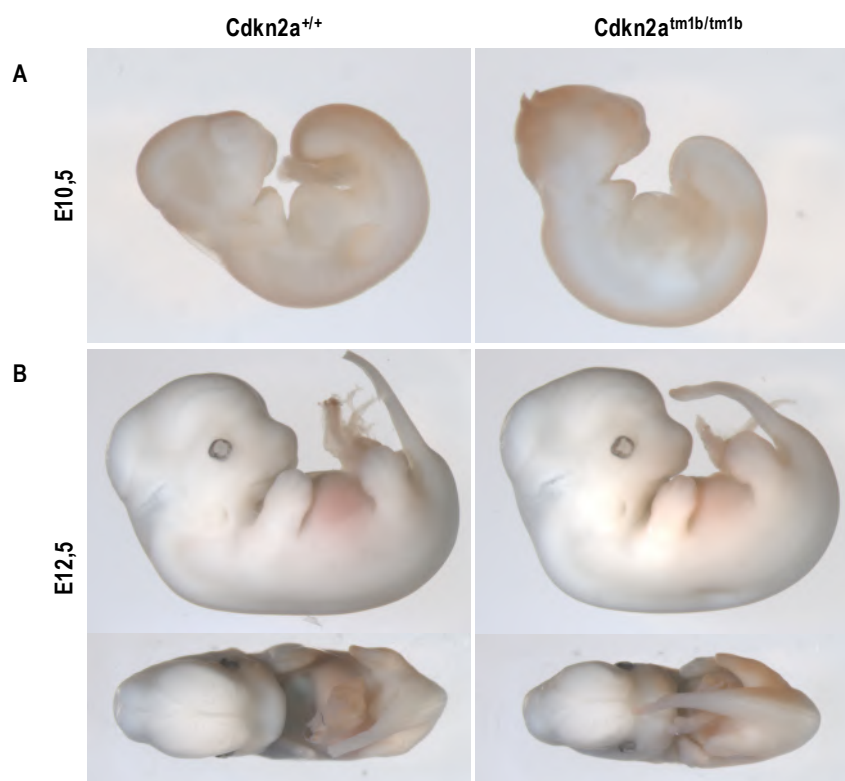


Abbildung 21: Färbung der β-Galactosidaseaktivität von 10,5 und 12,5 Tagen alten *Cdkn2a*^{+/+} und *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Embryonen.

Für die 10,5 (A) und 12,5 (B) Tage alten *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Embryonen konnte keine β-Galactosidaseaktivität mittels einer 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) Färbung nachgewiesen werden. Die Embryonen weisen eine altersgerechte Entwicklung auf.

4.1.4 *Cdkn2a* Gene Trap Mäuse zeigen einen normalen Knochenphänotyp

Im Folgenden wurde die Knochenmorphologie der *Cdkn2a*-defizienten Mäuse in der Knochenhomöostase evaluiert. Zu diesem Zweck wurden die Tibiae von 12 Wochen alten weiblichen *Cdkn2a*-defizienten Mäusen und Kontrolltieren zunächst mittels μCT analysiert und anschließend unentkalkte Histologieschnitte angefertigt. Die Analyse der Tibiae zeigte keine Veränderungen der *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Tiere hinsichtlich der Knochendichte (BV/TV), der Anzahl (Tb.Nb) sowie der Dicke (Tb.Th) und dem Abstand (Tb.Sp) der Trabekel der Spongiosa im Vergleich zu den Kontrolltieren. Neben dem trabekulären Knochen wurde auch der kortikale Knochen sowie die Knochendicke untersucht. Bei den erhobenen Parametern handelt es sich um die kortikale Dicke der Kortizes (*Cortical Thickness*) sowie des Volumens der Knochenmarkshöhle des Knochenschaftes (*Medullary Bone Volume*) und dem Gesamtvolumen des Knochengewebes

aus Knochen und Knochenmark innerhalb des Periostes (*Volume within the Periosteal Envelope*). Für keinen der erhobenen Werte war ein Unterschied zu den Daten der Kontrolltiere zu verzeichnen.

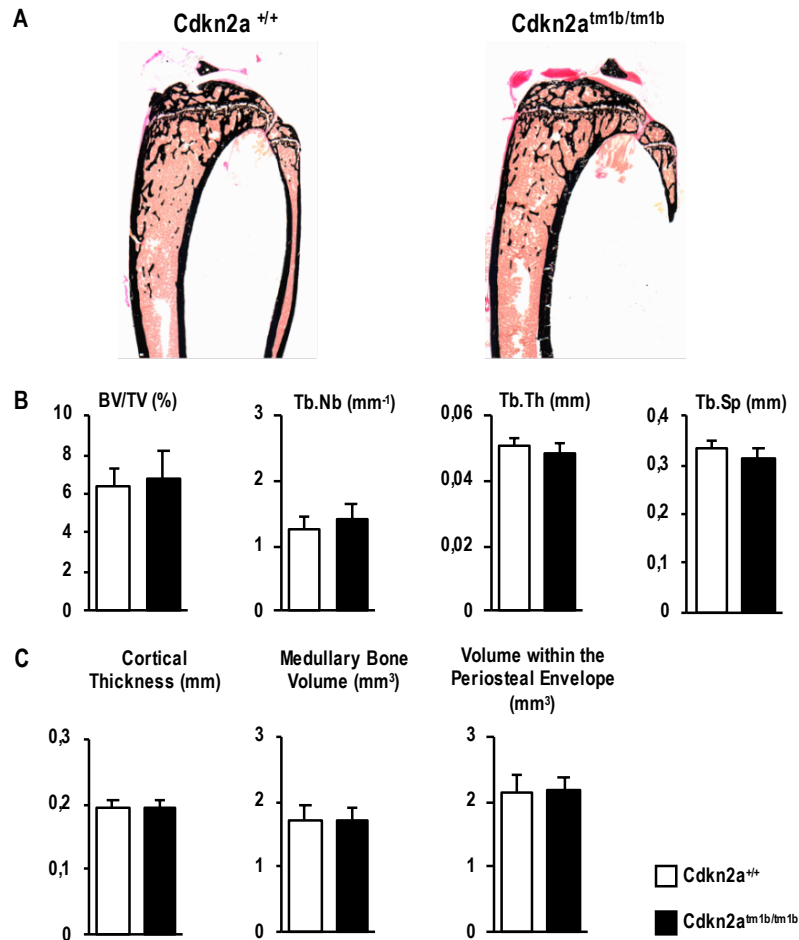


Abbildung 22: Knochenphänotyp von 12 Wochen alten weiblichen *Cdkn2a*^{+/+} und *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Tieren.

(A) Von Kossa van Gieson Färbung von 4µm dicken MMA Schnitten der linken Tibia. Die mineralisierte Matrix weist eine Schwarzfärbung auf. (B) Knochendichte (BV/TV), Anzahl der Trabekel (Tb. Nb), Dicke der Trabekel (Tb. Th) und Abstand der Trabekel zueinander (Tb. Sp) des trabekulären Knochens der Tibiae. (C) Dicke des kortikalen Knochens (*Cortical Thickness*), Volumen der Markhöhle (*Medullary Bone Volume*), Volumen des Gewebes innerhalb des Periosts (*Volume within the Periosteal Envelope*). (*Cdkn2a*^{+/+} n=5; *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} n= 9)

Da sich der weibliche und männliche Knochenphänotyp grundsätzlich stark unterscheidet, wurden dieselben Analysen des trabekulären und kortikalen Knochens für männliche 12 Wochen alte *Cdkn2a*^{+/+} und *Cdkn2a*^{tm1b/tm1b} Mäuse durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied der erhobenen Daten (**Abbildung 23**).

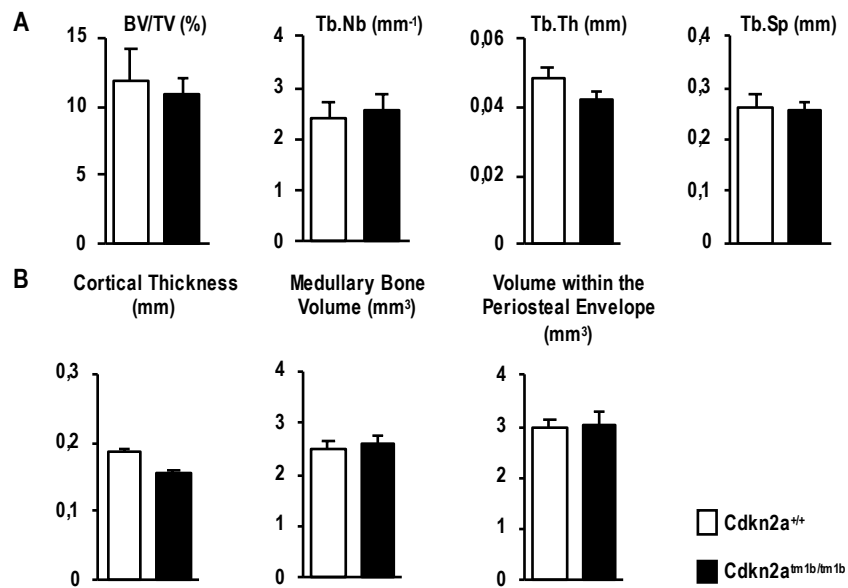


Abbildung 23: Knochenphänotyp von 12 Wochen alten männlichen Cdkn2a^{+/+} und Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tieren.

(A) Trabekuläre Knochenparameter: Knochendichte (BV/TV), Anzahl (Tb.Nb), Dicke (Tb.Th) und Abstand (Tb.Sp) der Trabekel. (B) Dicke des kortikalen Knochens (*Cortical Thickness*), Markhöhlenvolumen der Diaphyse (*Medullary Bone Volume*) und Gesamtvolumen des Gewebes innerhalb des Periosts (*Volume within the Periosteal Envelope*). (Cdkn2a^{+/+} n= 5; Cdkn2a^{tm1b/tm1b} n= 5)

4.1.5 Die Genexpression verschiedener Knochenzellen Marker sprechen für einen unbeeinträchtigten Knochenumsatz der $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Tiere

Die morphologische Auswertung des Knochenphänotyps wurde durch die molekularbiologische Betrachtung der Genexpressionslevel verschiedener Osteoblasten-, Osteozyten-, Osteoklasten- und Adipozytenmarker unterstützt (**Abbildung 24**). Zu diesem Zweck wurde die RNA aus der gesamten rechten Tibia gewonnen.

Für alle untersuchten Marker konnten keine signifikanten Veränderungen detektiert werden.

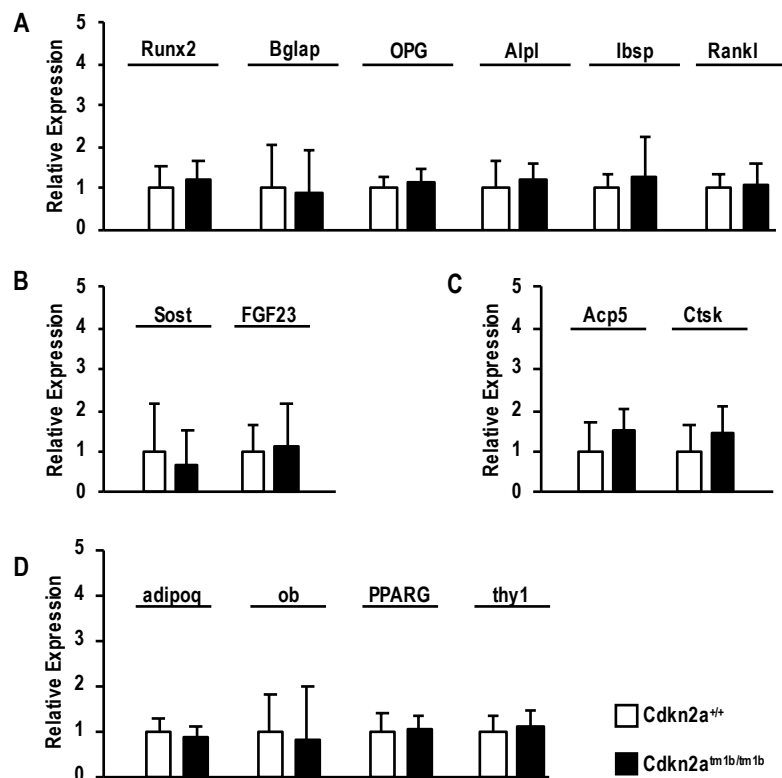


Abbildung 24: Genexpression von ausgewählten Osteoblasten (A), Osteozyten (B), Osteoklasten (C) und Adipozyten (D) Markern.

Untersucht wurde die gesamte RNA der rechten Tibia von 12 Wochen alten weiblichen Tieren. Es konnte kein signifikanter Unterschied der untersuchten Genexpressionslevel festgestellt werden. (n=5 $Cdkn2a^{+/+}$ n=4 $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$)

4.1.6 Die Knochenmorphologie der langen Röhrenknochen ist unbeeinflusst durch eine $p21^{WAF-1/Cip-1}$ -Defizienz

Neben *Cdkn2a* ist auch *Cdkn1a* als Zellzyklusinhibitor ein etablierter Marker von seneszenten Zellen, die sich in einem proliferativen Arrest befinden. Wenngleich bei unseren Untersuchungen keine Veränderungen der Knochenmorphologie von adulten *Cdkn2a Knockout* Tieren in der Homöostase zu verzeichnen war, war die Beobachtung der zeitgleich erhöhten *Cdkn1a* Genexpression besonders interessant. Die fehlende proliferativ-hemmende Wirkung von *Cdkn2a* scheint über eine gesteigerte *Cdkn1a* Expression kompensiert zu werden (**Abbildung 18**). Folglich stellte sich die Frage, wie der Knochenphänotyp der *Cdkn1a Knockout* Mäuse aussieht. Ferner war von großem Interesse, ob der Verlust von *Cdkn1a* umgekehrt mit einer gesteigerten *Cdkn2a* Expression einhergeht.

Untersucht wurde die Knochenmorphologie von adulten weiblichen *Cdkn1a Knockout* und Kontrolltieren in der Knochenhomöostase mittels μ CT Analysen und unentkalkter Knochenhistologie der rechten Tibiae.

Die Ergebnisse der μ CT Scans zeigen eine unveränderte trabekuläre und kortikale Knochenmorphologie der *Cdkn1a Knockout* Mäuse (**Abbildung 25**).

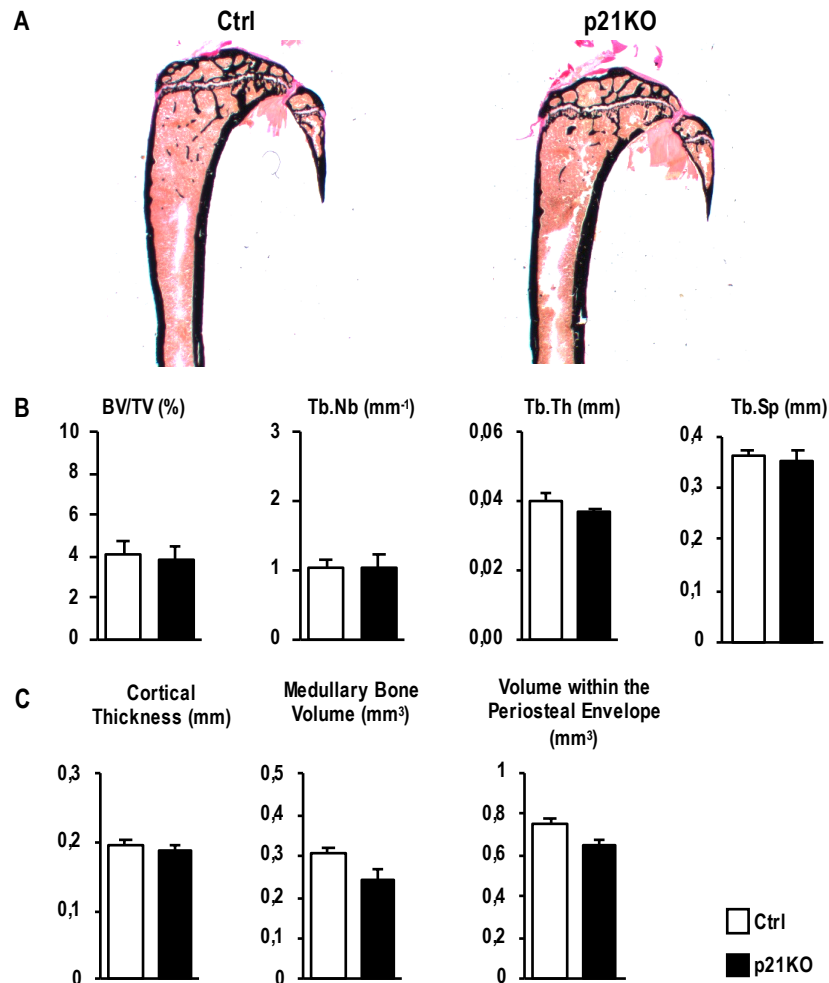


Abbildung 25: Der Knochenphänotyp von adulten weiblichen $p21^{WAF-1/Cip-1}$ -defizienten Mäusen gleicht dem Knochenphänotyp der Kontrolltiere.

Untersucht wurde der Knochenphänotyp der Röhrenknochen von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ KO Mäusen (n=4; Alter: 21 Wochen) relativ zu der Kontrollgruppe (n=5 Wildtypiere, Alter: 25 Wochen). (A) Zeigt repräsentative unentkalkte Histologieschnitte, die mittels von Kossa/van Gieson gefärbt wurden. (B) Fasst die quantitative Auswertung der trabekulären Knochenparameter zusammen, die mittels μ CT Scans bei einer Auflösung von 5μ m erhoben wurden. Analysiert wurde die Knochendichte (BV/TV), die Trabekelanzahl (Tb.Nb), die Dicke der Trabekel (Tb.Th) sowie der Abstand der einzelnen Trabekel zueinander (Tb.Sp). (C) Zusammenfassung der Ergebnisse die für die Kortizes der Röhrenknochen erhoben wurden. Betrachtet wurde die Dicke des kortikalen Knochens (*Cortical Thickness*). Des Weiteren wurde das Volumen der Markhöhle (*Medullary Bone Volume*) sowie das Gesamtvolumen des Gewebes innerhalb des Periosts (*Volume within the Periosteal Envelope*) bestimmt.

Um auf molekularer Ebene eine histomorphometrische Aussage treffen zu können, wurden unentkalkte Toluidinblau-gefärbte Schnitte angefertigt anhand derer die Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Adipozyten im Verhältnis zum trabekulären Knochengewebe ausgezählt wurden (**Abbildung 26**).

Knockout von *Cdkn1a* konnte auf diese Weise verifiziert werden. Interessanterweise zeigten sich signifikant erhöhte Expressionslevel sowohl von *p16^{INK4a}* als auch von *p19^{ARF}*, die mit dem *Knockout* von *Cdkn1a* im Knochengewebe einhergehen. Dem Verlust der *p21^{WAF-1/Cip-1}* vermittelten zellzyklusinhibierenden Funktion scheint die erhöhte Genexpression des *Cdkn2a* Locus kompensierend entgegenzuwirken.

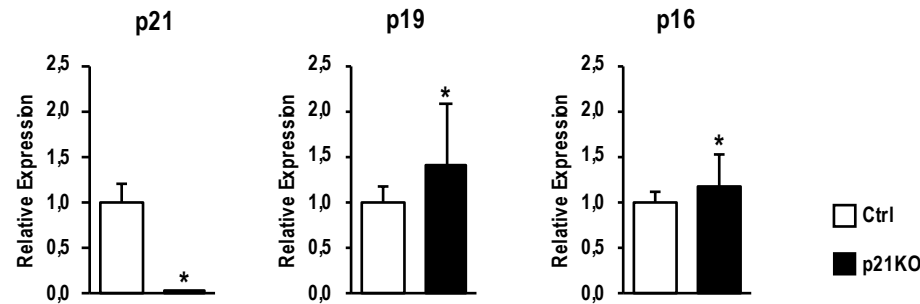


Abbildung 27: Die relative Expression von *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* ist im Knochen von *p21^{WAF-1/Cip-1}*-defizienten Mäusen erhöht.

Die RNA aus der rechten Tibia von (n=7; Alter: 13 Wochen) *p21^{WAF-1/Cip-1}*-defizienten Mäusen und (n=7; Alter: 13 Wochen) Wildtyp-Tieren wurde isoliert, in cDNA transkribiert und die relative Expression von *p21^{WAF-1/Cip-1}*, *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* evaluiert. Die signifikant reduzierte Genexpression von *p21^{WAF-1/Cip-1}* verifiziert den vorliegenden p21KO. Zeitgleich sind die Expressionslevel von *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* in der Tibia von *p21^{WAF-1/Cip-1}*-defizienten Mäusen erhöht. *p<0,05 (TTest)

4.1.7 *Cdkn1a/Cdkn2a*-defiziente Mäuse weisen eine verringerte trabekuläre Knochendichte auf

Aufgrund der scheinbar kompensatorisch erhöhten Genexpressionslevel von *Cdkn1a* oder *Cdkn2a* bei vorliegendem *Knockout* des jeweils anderen Genes, wurde nachfolgend die Knochenmorphologie adulter *Cdkn1a* und *Cdkn2a*-defizienter (DKO) Mäuse untersucht. Die Knochenproben der DKO Mäuse wurden, wie bereits die Proben der *Cdkn1a Knockout* Tiere, über eine Kooperation mit der Osaka University zur Verfügung gestellt.

Die Analysen der trabekulären Knochenparameter der Röhrenknochen zeigte eine signifikante Reduktion der Knochendichte (BV/TV). Diese Reduktion scheint auf eine verringerte Anzahl einzelner Trabekel (Tb.Nb) der Spongiosa zurückzuführen zu sein. Weitere Eigenschaften wie die Dicke der Trabekel (Tb.Th) und der Abstand dieser zueinander (Tb.Sp) scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Diese Veränderung der Knochenmasse spiegelt sich jedoch nur im trabekulären Knochen wider. Die Dicke des kortikalen Knochens blieb unbeeinflusst.

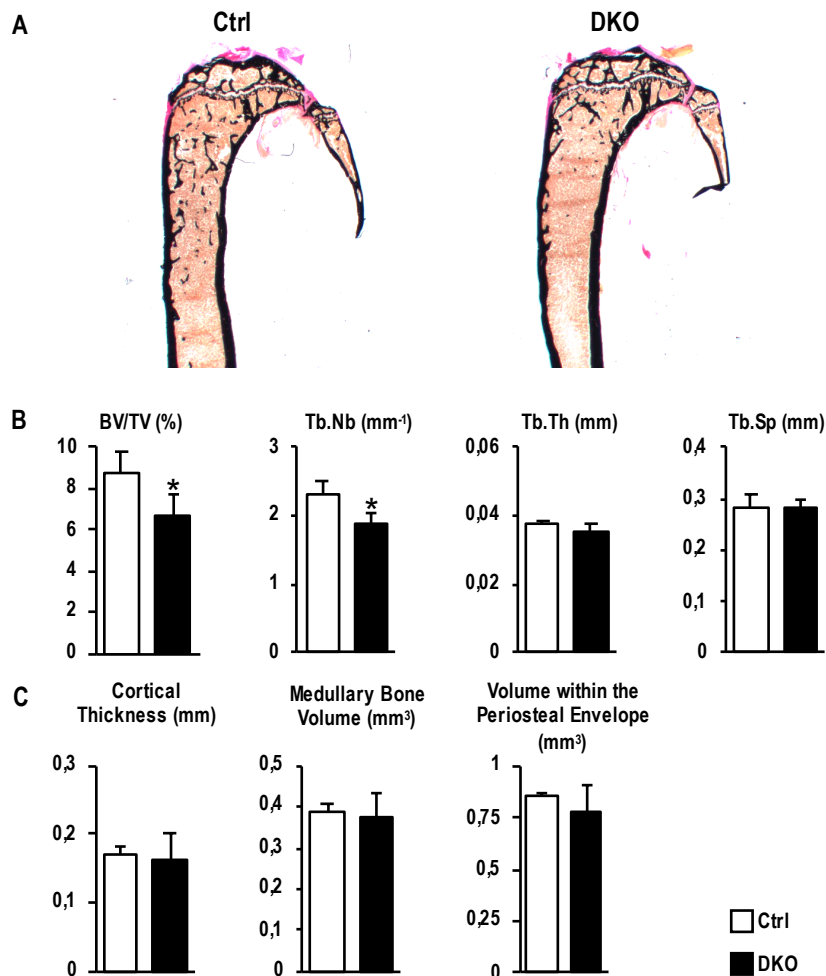


Abbildung 28: Knochenhistologie und Auswertung der Strukturparameter von adulten $p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}$ -defizienten Mäusen.

(A) Unentkalkte Knochenschnitte wurden nach von Kossa/van Gieson gefärbt und zeigen die reduzierte Knochendichte (BV/TV) der Röhrenknochen von männlichen DKO Mäusen (n=4, Alter: 16 Wochen) im Vergleich zu Wildtyptieren (n=4, Alter: 16 Wochen). Die trabekulären (B) und kortikalen (C) Knochenparameter wurden mittels μ CT Scan quantifiziert. Die reduzierte Knochendichte von DKO Mäusen ist auf eine reduzierte Trabekelanzahl (Tb.Nb) zurückzuführen. Für die Dicke der Trabekel (Tb.Th) und den Abstand der Trabekel zueinander (Tb.Sp) konnten keine Veränderungen im Zuge der $p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}$ -Defizienz festgestellt werden. Auch die Dicke der Kortizes (Cortical Thickness), das gesamte Volumen des Gewebes innerhalb des Periosts (*Volume within the Periosteal Envelope*) und das Volumen der Markhöhle (*Medullary Bone Volume*) blieben unverändert. * $p < 0,05$ (TTest)

Die weiterführende histomorphometrische Aufarbeitung der Proben anhand von Toluidinblaufärbten unentkalkten Knochenschnitten, ließ auf eine allgemeine Reduktion des Knochenumsatzes schließen. So waren sowohl die Anzahl der Osteoblasten und Osteozyten reduziert wie auch die Anzahl der Osteoklasten im Verhältnis zur Knochenmasse. Die Anzahl der Adipozyten hingegen schien geringfügig erhöht zu sein.

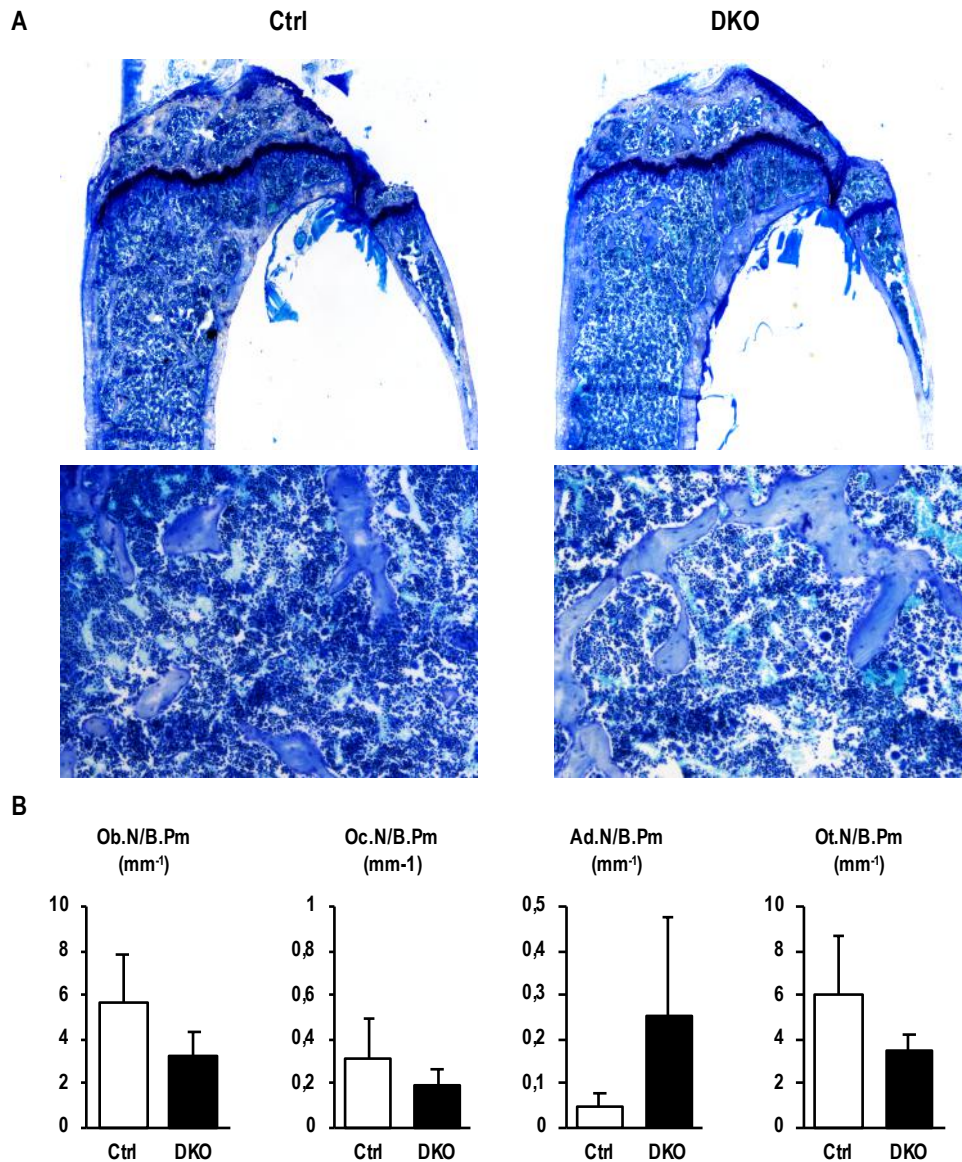


Abbildung 29: Histomorphometrische Auswertung der Tibiae von DKO Mäusen an Toluidinblaufärbten Schnitten.

Gezeigt werden repräsentative Toluidinblau-Färbungen unentkalkter Schnitte von Kontrolltieren (n=4, Alter: 16 Wochen) und *p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}*-defizienten (n=4, Alter: 16 Wochen) Tibiae (A). Es konnte eine Reduktion der Osteoblasten- (Ob.N/B.Pm), Osteozyten- (Ot.N/B.Pm), sowie der Osteoklastenzahl (Oc.N/B.Pm) festgestellt werden. Zeitgleich wurde eine Erhöhung der Adipozytenzahl (Ad.N/B.Pm) dokumentiert. Keine der beobachteten Veränderungen war signifikant.

4.1.8 Reduzierte Genexpressionslevel für *Bone Remodeling* Marker in Tibiae von p21KO und DKO Tieren

Eine nähere Untersuchung der beobachteten Unterschiede der Knochenmorphologie auf Zellebene von p21KO und DKO Tieren erfolgte anhand der Genexpressionsanalyse von Osteoblasten-, Osteozyten-, Osteoklasten- und Adipozytenmarkern von RNA Proben der Tibiae. Bei den Osteoblastenmarkern zeigt sich eine zunehmend reduzierte Expression der untersuchten Marker von Wildtypproben über p21KO Proben hin zu DKO Proben. Eine Ausnahme stellt die unveränderte *Rankl* Expression von p21KO und DKO Proben im Vergleich zur Kontrollproben dar. Die gleiche Tendenz wie für die Osteoblastenmarker zeichnet sich auch für den Osteozytenmarker Sclerostin (*Sost*) ab. Gegensätzlich verhält es sich für den zweiten betrachteten Osteozytenmarker *FGF23*. Für die Untersuchung der relativen Expressionslevel von *FGF23* sei aber auch auf die große Heterogenität der Ergebnisse innerhalb der Gruppen hingewiesen, welche sich in den großen Standardabweichungen widerspiegelt.

Eine im Vergleich zu den Kontrolltieren reduzierte Expression in den Tibiae ließ sich ebenfalls für die Osteoklastenmarker tartratresistente saure Phosphatase (*Acp5*) sowie auch für *Cathepsin K* (*Ctsk*) nachweisen. Ebenfalls ist die Reduktion der jeweiligen Genexpression in den Proben der DKO Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlicher ausgeprägt als in den Proben der p21KO Mäuse.

Gleiches lässt sich für die relative Genexpression der untersuchten Adipozytenmarker *Adiponektin* (*adipoq*), *Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma* (*PPARG*) und *CD90* (*thy1*) feststellen. Die stärkste Reduktion der jeweiligen Genexpression konnte für die Proben der DKO Tiere nachgewiesen werden. Hingegen war die Reduktion der Genexpression in den Proben der p21KO Mäuse nicht so stark ausgeprägt, wie es für die DKO Tiere detektiert werden konnte. Unverändert zeigt sich die relative Genexpression des murinen *obese* Genes (*ob*) in den Knochenproben von Kontrolltieren, p21KO Tieren und DKO Tieren.

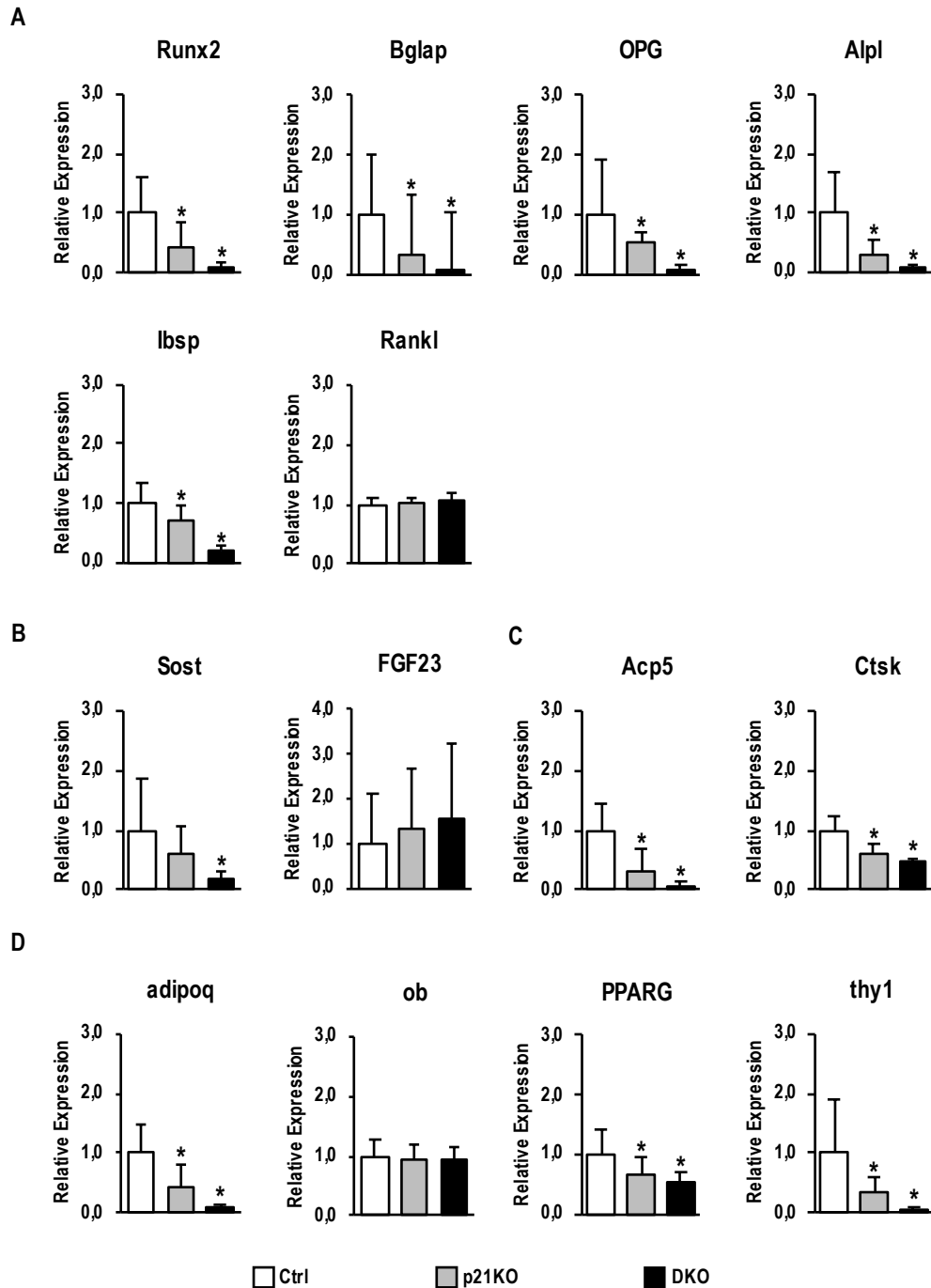


Abbildung 30: Die reduzierte Knochendichte von $p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}$ DKO Tibiae spiegelt sich in der erniedrigten Genexpression von Osteoblasten-, Osteozyten-, Osteoklasten- und Adipozytenmarkern wider.

Die Genexpression von Osteoblasten- (A), Osteozyten- (B), Osteoklasten- (C) und Adipozytenmarkern (D) in der rechten Tibiae von weiblichen Kontrolltieren (n=7, Alter: 13 Wochen), weiblichen $p21^{WAF-1/Cip-1}$ -defizienten Mäusen (n=7, Alter: 13 Wochen) und weiblichen $p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}$ -defizienten Tieren (n=6, Alter: 13 Wochen) ist in dieser Abbildung zusammengefasst. * $p < 0,05$ (TTest)

4.2 Zelluläre Seneszenz und Knochenregeneration

Der alleinige Verlust der *Cdkn2a* Expression führt zu keinem Knochenphänotyp. Jedoch scheinen sowohl $p16^{INK4a}$ als auch $p21^{WAF-1/Cip-1}$ wichtig für das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels zu sein, wie die Untersuchungen der Proben von DKO Tieren zeigt. Bei einer plötzlichen Störung der Knochenhomöostase, in Form einer Fraktur, kann dieser kompensatorische Mechanismus gegebenenfalls nicht mehr greifen und führt in $p16^{INK4a}$ -defizienten Tieren zu einer gestörten Knochenregeneration. Diese Hypothese wurde nachfolgend untersucht.

4.2.1 Erhöhte Genexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ während der Knochenregeneration

Neben dem Einfluss auf die Knochenhomöostase sollte auch der Einfluss von Seneszenz auf das Regenerationspotenzial des Knochens untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zuerst die Expression der Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ im Kallus von WT Mäusen 3, 7 und 14 Tage nach Durchführung der standardisierten Osteotomie untersucht.

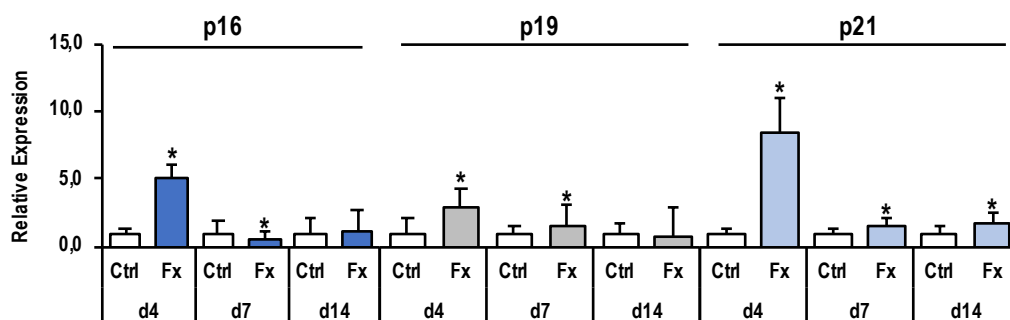


Abbildung 31: Gesteigerte Expressionslevel von $p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ während der Knochenregeneration.

Dargestellt ist die Genexpression von $p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ an Tag 4, 7 und 14 nach standardisierter Osteotomie der linken Femora im Kallusgewebe weiblicher Tiere (Fx). Die Expression wird relativ im Verhältnis zur Expression im Gewebe der kontralateralen Kontrolle dargestellt (Ctrl). (Ctrl d4 n=5; Fx d4 n=5; Ctrl d7 n=6; Fx n=6; Ctrl n=6; Fx n=6) * $p < 0,05$

Es zeigt sich eine erhöhte Expression beider Seneszenzmarker während der frühen Regenerationsphasen (3 und 7 Tage nach Osteotomie). 14 Tage nach dem induzierten Frakturspalt kann keine erhöhte Expression mehr für $p16^{INK4a}$ und $p19^{ARF}$ festgestellt werden, jedoch weiterhin für $p21^{WAF-1/Cip-1}$.

4.2.2 Die $p16^{INK4a}$ -Defizienz hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Knochenregeneration

Um die Knochenregeneration von $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Mäusen zu untersuchen, wurden standardisierte Osteotomien der linken Femora der Tiere durchgeführt (siehe **3.3.1**). Da die Tiere für den Versuch aus einer anderen Tierhaltung importiert werden mussten, wurde der eigentliche Versuch erst eine Woche nach dem Transport begonnen, damit sich die Tiere akklimatisieren konnten. Die Analyse der Knochenregeneration erfolgte drei Wochen nach der Induktion der Fraktur (Fx21d).

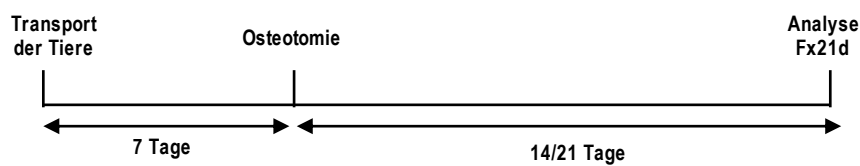


Abbildung 32: Zeitliche Abfolge der standardisierten Knochenregenerationsversuche der $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Tiere.

Nach 21 Tagen wurden die Mäuse euthanisiert, die Femora entnommen und ein μ CT Scan der Region um den induzierten Frakturspalt angefertigt. Die Auswertung der μ CT Scans zeigte, dass die Knochenregeneration sich zu diesem Zeitpunkt zwischen den Kontrolltieren und den $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Tieren nicht unterscheidet. Dies wird bereits bei einer visuellen Einschätzung anhand der 3D-Rekonstruktion der μ CT Scans deutlich (siehe **Abbildung 33**). Eine genauere Quantifizierung des neu gebildeten mineralisierten Knochengewebes bestätigte diese Einschätzung. Bei den erhobenen Parametern handelt es sich um das Kallusvolumen (BV), die Knochendichte des neu gebildeten Knochens (BV/TV), sowie die Anzahl (Tb.Nb), die Dicke (Tb.Th) und der Abstand der Trabekel (Tb.Sp) des Kallusgewebes zueinander.

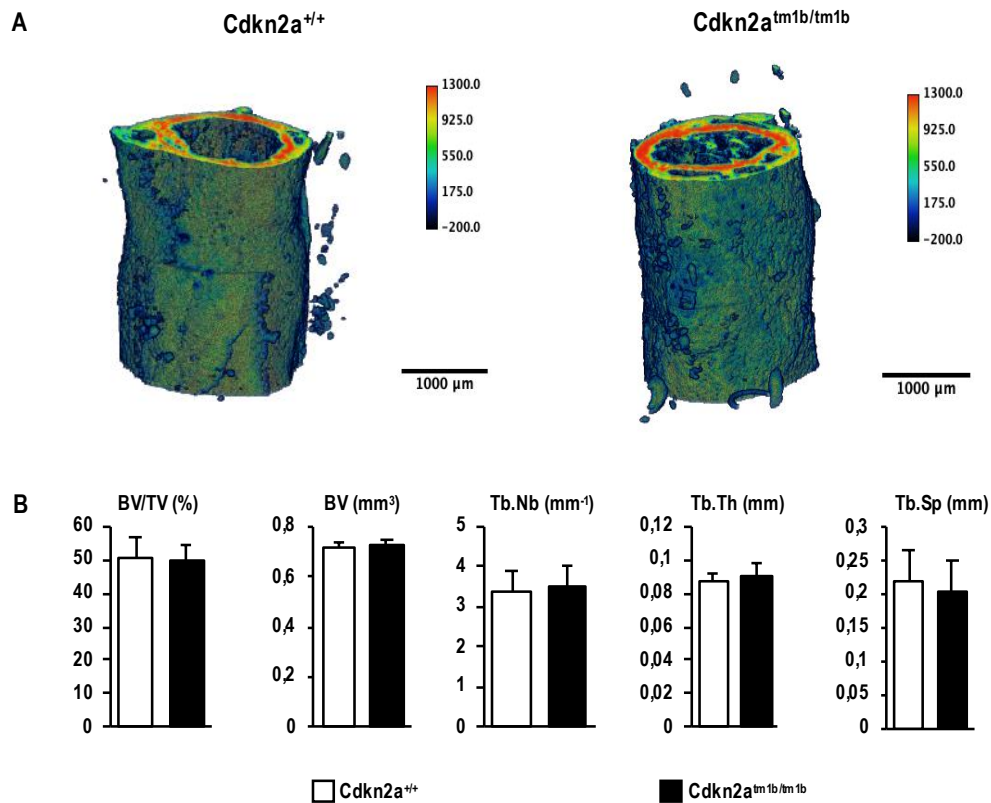


Abbildung 33: Die Knochenregeneration von Kontrolltieren und Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tieren unterscheidet sich nicht.

Dargestellt sind die (A) 3D-Rekonstruktionen der μ CT Scans bei einer Auflösung von 10,5 μ m. (B) Quantifizierung des neu gebildeten mineralisierten Knochengewebes im Zuge der Regeneration. Ausgewertet wurden das Kallusvolumen (BV), die Kallusdichte (BV/TV) sowie die Anzahl (Tb.Nb), Dicke (Tb.Th) und der Abstand (Tb.Sp) der Kallustrabekel. (n=7 Cdkn2a^{+/+} Proben; n=8 Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Proben)

Des Weiteren wurde auch die Knochenregeneration von vier heterozygoten Cdkn2a^{tm1b} Tieren untersucht. Hier zeigte sich überraschenderweise eine verstärkte Kallusformation im Vergleich zu den Cdkn2a^{+/+} und Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tieren. Allerdings handelt es sich, aufgrund der geringeren Probenzahl um vorläufige Ergebnisse.

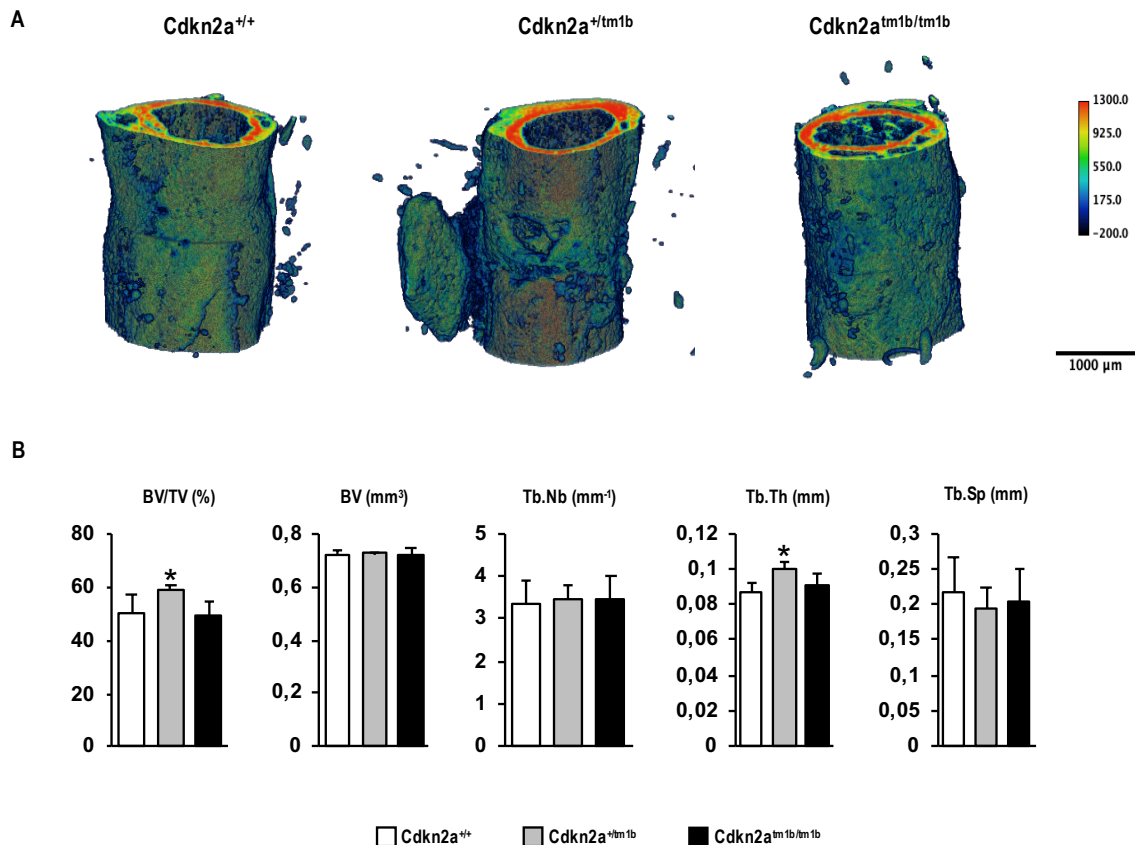


Abbildung 34: Die Knochenregeneration von Cdkn2a^{+tm1b} Tieren resultiert in einer überschießenden Knochenformation.

Abbildung A) zeigt die 3D-Rekonstruktionen der μ CT Scans von Cdkn2a^{+/+} (n=7), Cdkn2a^{+tm1b} (n=4), Cdkn2a^{tm1b/tm1b} (n=8) Tieren 21 Tage nach Durchführung einer standardisierten Osteotomie. Der Scan erfolgte bei einer Auflösung von 10,5 μ m. B) Mittels der μ CT Analysen konnte das neu gebildete, mineralisierte Knochengewebe quantifiziert werden. Erhoben wurden die Werte für die Kallusdichte (BV/TV), das Kallusvolumen (BV) sowie die Anzahl (Tb.Nb), die Dicke (Tb.Th) und den Abstand (Tb.Sp) der Kallustrabekel. *p<0,05

Diese Beobachtungen konnten auch zu einem früheren Regenerationszeitpunkt, 14 Tage nach Frakturinduktion, nachgewiesen werden.

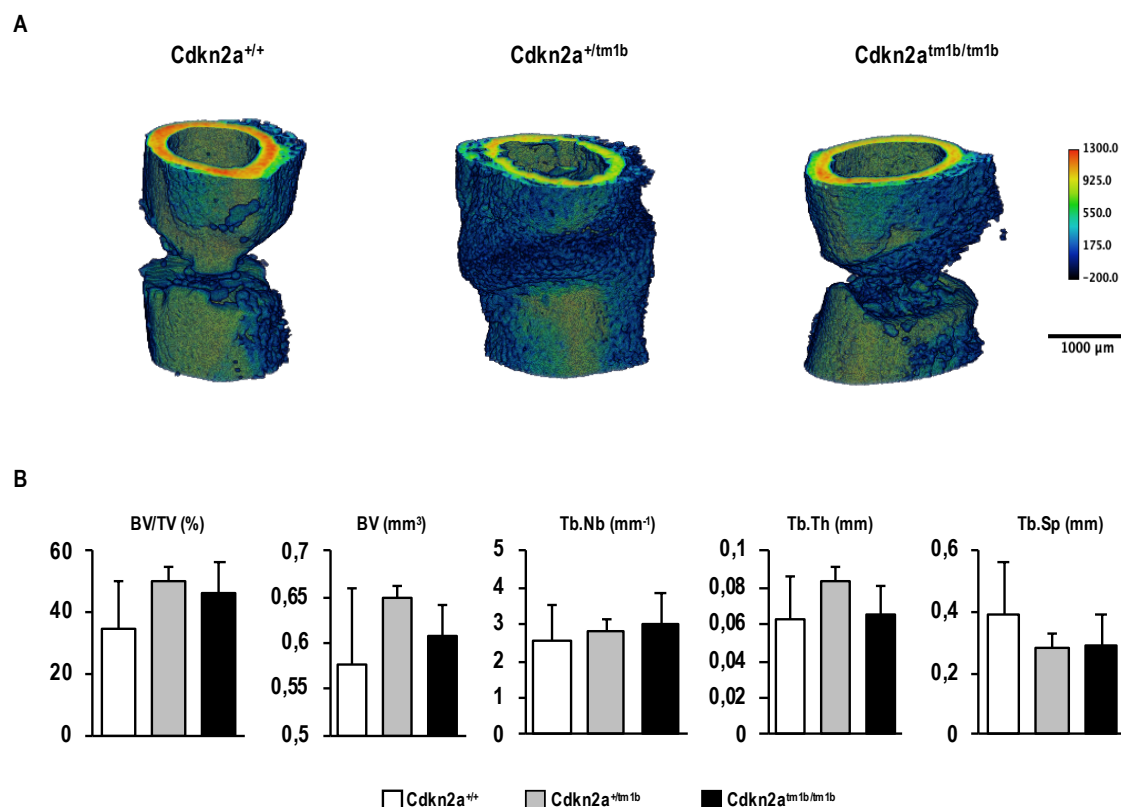


Abbildung 35: Die Knochenregeneration von Cdkn2a^{+/tm1b} Tieren 14 Tage nach standardisierter Osteotomie.

Dargestellt sind die (A) 3D Rekonstruktionen der μ CT Scans, bei einer Auflösung von $10,5\mu\text{m}$, von Cdkn2a^{+/+} (n=5), Cdkn2a^{+ / tm1b} (n=3), Cdkn2a^{tm1b / tm1b} (n=7) Tieren 14 Tage nach induzierter Fraktur. (B) Quantifizierung des neu gebildeten mineralisierten Knochengewebes im Zuge der Regeneration. Ausgewertet wurden das Kallusvolumen (BV), die Kallusdichte (BV/TV) sowie die Anzahl (Tb.Nb), die Dicke (Tb.Th) und der Abstand (Tb.Sp) der Kallustrabekel.

4.2.3 GCV vermittelte Depletierung von p16^{INK4a} exprimierenden Zellen in Tibiae und Leber

Da bereits die Untersuchungen der Knochenhomöostase gezeigt haben, dass sich der Knochenphänotyp von Cdkn2a^{tm1b / tm1b} Tieren nicht von dem der Kontrolltiere unterscheidet und die Hypothese im Raum steht, dass dies in einem über p21^{WAF-1/Cip-1} vermittelten kompensatorischen Effekt begründet liegt, wurden die Untersuchungen hinsichtlich der Knochenregeneration ebenfalls mit dem p16-3MR Mausmodell durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.2). In einer Veröffentlichung von Demaria et al. konnte gezeigt werden, dass p16-3MR Mäuse unter Ganciclovir (GCV) Behandlung den gleichen verzögernden Effekt auf die Wundheilungskinetik aufweisen wie p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1} DKO Mäuse (Demaria et al., 2014). Da DKO Mäuse einen Knochenphänotyp in der Homöostase aufweisen, bietet das p16-3MR Modell

jedoch einen großen Vorteil: $p16^{INK4a}$ exprimierende Zellen können zu einem gewünschten Zeitpunkt depletiert werden. So weisen die Mäuse zu Beginn des Versuches einen gleichen Phänotyp wie die Kontrolltiere auf. Um den Effekt der Depletierung von $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellen durch die Ganciclovir Behandlung im Röhrenknochen nachweisen zu können, wurde die mRNA der kontralateralen Tibia der osteotomierten Mäuse isoliert und die Expressionslevel von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ untersucht (Abbildung 36).

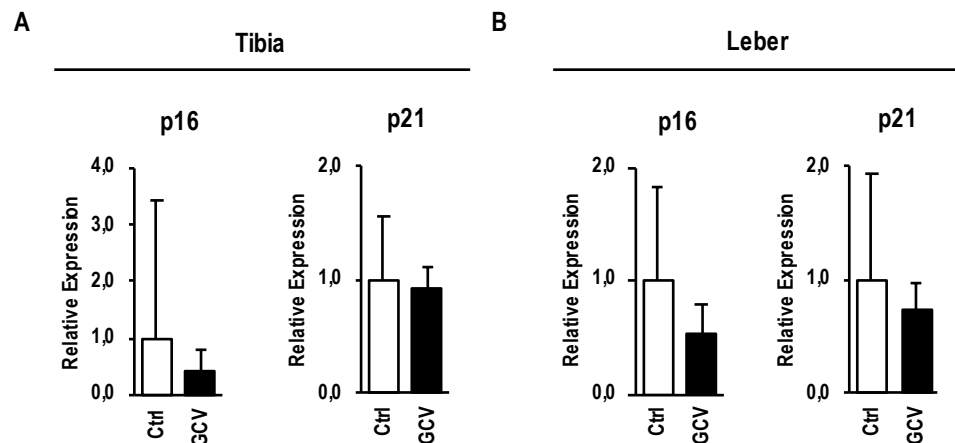


Abbildung 36: Reduzierte Genexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in Tibia und Leber von $p16$ -3MR Mäusen nach GCV Behandlung.

Die relativen Expressionslevel von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ sind in der Tibia (A) und der Leber (B) reduziert, wenn die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich intraperitoneal 25mg/kg GCV verabreicht bekommen haben. Untersucht wurden die Proben von jeweils drei weiblichen Tieren pro Gruppe (n=3). Keiner der Vergleiche zeigte signifikante Unterschiede.

Die Expression von $p16^{INK4a}$ in der Tibia ist nach GCV Gabe tendenziell reduziert. Da die Werte für die einzelnen Tiere so schwanken, ist dieses Ergebnis nicht signifikant. Hingegen bleibt die Genexpression von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ von einer GCV Behandlung unbeeinflusst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in älteren Tieren, insbesondere im Gehirn und der Leber, die $p16^{INK4a}$ Expression zunimmt und eine GCV Behandlung diese wieder normalisiert (Kim et al., 2019). Aus diesem Grund wurden neben der Tibia auch die Genexpressionslevel in der Leber untersucht. Hier zeigt sich für beide Seneszenzmarker eine Reduktion der Expression, wenngleich auch diese nicht signifikant ist.

4.2.4 Die temporäre Depletierung von $p16^{INK4a}$ -exprimierenden Zellen hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Frakturregeneration

Der zeitliche Ablauf der durchgeführten Osteotomien mit dem p16-3MR Mausmodell unterscheidet sich zu dem *Cdkn2a Gene Trap* Mausmodell nur in zwei Punkten. Erstens wurde den transgenen Tieren täglichen intraperitoneal 25mg/kg GCV injiziert. Zweitens erfolgte die Analyse des Regenerationsfortschrittes bereits nach 14 Tagen (siehe **Abbildung 37**).

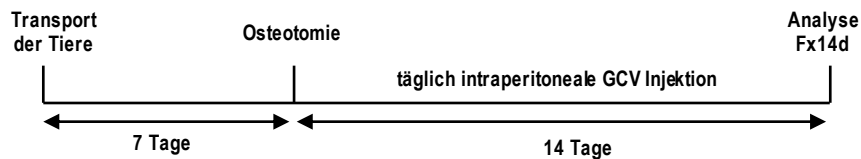


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Osteotomien unter GCV Behandlung mit dem p16-3MR Mausmodell.

Der frühere Analysezeitpunkt wurde gewählt, da bereits in der Publikation von Demaria et al. beschrieben wurde, dass der Effekt von Seneszenz auf die Regeneration in der Heilungskinetik begründet liegt. Aus diesem Grund wurde die initiale Versuchsdurchführung so geplant, dass zu den repräsentativen Analysepunkten der Knochenregeneration 3, 7, 14 und 21 Tage (siehe **1.2.2**) nach Frakturinduktion die Kallusformation mittels *in vivo* μ CT untersucht werden sollte. Mit diesem Verfahren wird die Darstellung des Regenerationverlaufes pro Tier ermöglicht. Dieser Versuchsansatz konnte jedoch nicht weiter verfolgt werden, da eine unerwünschte Wechselwirkung zwischen Ganciclovir und der Medetomidinhydrochlorid/Ketaminhydrochlorid-Narkose auftrat. Durch die GCV-Behandlung wird das Narkosemittel, welches für die *in vivo* μ CT-Durchführung verwendet wird, nicht mehr abgebaut und die Belastung für die Tiere im Versuch wäre zu hoch. Da die Methode des *in vivo* μ CTs nicht verwendet werden konnte, musste im weiteren Verlauf ein terminaler Analysezeitpunkt zur Untersuchung der Proben *ex vivo* festgelegt werden. Die Analyse erfolgte nach 14 Tagen, um einen eventuellen Unterschied in der Heilungskinetik abbilden zu können. Zu diesem Zeitpunkt ist der Kallus bereits so weit mineralisiert, dass eine Analyse mittels μ CT möglich ist, jedoch ist die Regeneration noch nicht abgeschlossen, sodass Unterschiede in der Regenerationskinetik untersucht werden können.

Abbildung 38 fasst die Ergebnisse der Frakturregenerationsexperimente mit dem p16-3MR Mausmodell zusammen. Wie bereits für die *Cdkn2a^{tm1b/tm1b}* Tiere konnte auch für die mit GCV-behandelten p16-3MR Tiere kein Unterschied für die Knochenregeneration festgestellt werden.

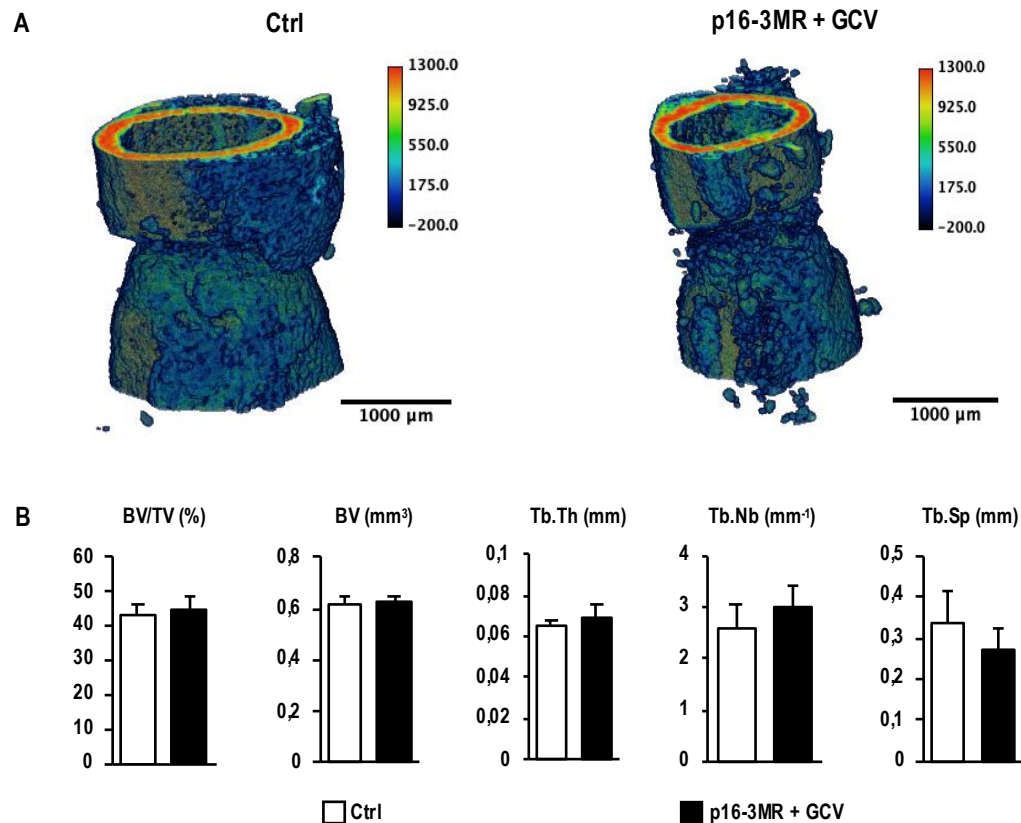


Abbildung 38: Die Knochenregeneration von transgenen GCV-behandelten p16-3MR Mäusen verläuft wie bei den Kontrolltieren.

Transgene weibliche p16-3MR Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen einer Osteotomie des linken Femurs unterzogen zusammen mit einer Gruppe von Kontrolltieren. Die Knochenregenerationsphase betrug 14 Tage. In diesem Zeitraum wurde den transgenen p16-3MR Tieren täglich 25mg/kg GCV intraperitoneal injiziert. Nach 2 Wochen wurde die Knochenformation in dem induzierten 0,7mm breiten Frakturspalt mittels μ CT Scan analysiert. Die Auflösung des Scans betrug 10,5 μ m. (A) zeigt repräsentative 3D-Rekonstruktionen der μ CT Scans für die jeweiligen Gruppen. (B) fasst die Quantifizierung der Knochenformationsparameter zusammen. Ausgewertet wurde das Volumen des mineralisierten Kallus (BV), die Knochendichte der neuen Knochenmasse (BV/TV) sowie die Anzahl (Tb.Nb), Dicke (Tb.Th) und der Abstand (Tb.Sp) der Kallustrabekel. (n=8 Ctrl; n=8 p16-3MR +GCV)

4.2.5 Gesteigerte osteogene Differenzierung von $\text{Cdkn2a}^{\text{tm1b/tm1b}}$ Calvaria

Osteoblasten

Während in der Knochenhomöostase von $\text{Cdkn2a}^{\text{tm1b/tm1b}}$ Tieren kein Unterschied des Knochenphänotyps im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten war, zeigten die isolierten Osteoblasten aus dem Schädeldach von jungen Mäusen ein unerwartet erhöhtes Differenzierungspotenzial (**Abbildung 39**). Die Osteoblasten wurden, wie unter **3.2.9** beschrieben, isoliert und kultiviert. Durch die Zugabe von β -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure zum Medium wurde die osteogene Differenzierung initiiert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde die Differenzierung gestoppt und eine Alizarinrot-Färbung durchgeführt. Mit diesem Verfahren kann

die gebildete mineralisierte Matrix gefärbt werden. Die Intensität der Färbung kann anschließend quantifiziert werden und liefert somit einen Rückschluss über den Grad der Differenzierung der Osteoblasten. Zusätzlich wurde an den Tagen 0 und 5 nach Differenzierungsbeginn der Verbrauch von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) bestimmt (**Abbildung 39C**). Die Ermittlung des Umsatzes von pNPP ermöglicht einen Rückschluss auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Ein erhöhtes Differenzierungspotenzial von Osteoblasten geht mit einer gesteigerten ALP Aktivität einher. Sowohl die gemessene ALP Aktivität als auch die Alizarinrot-Färbung zeigen, dass die $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Osteoblasten stärker differenzieren.

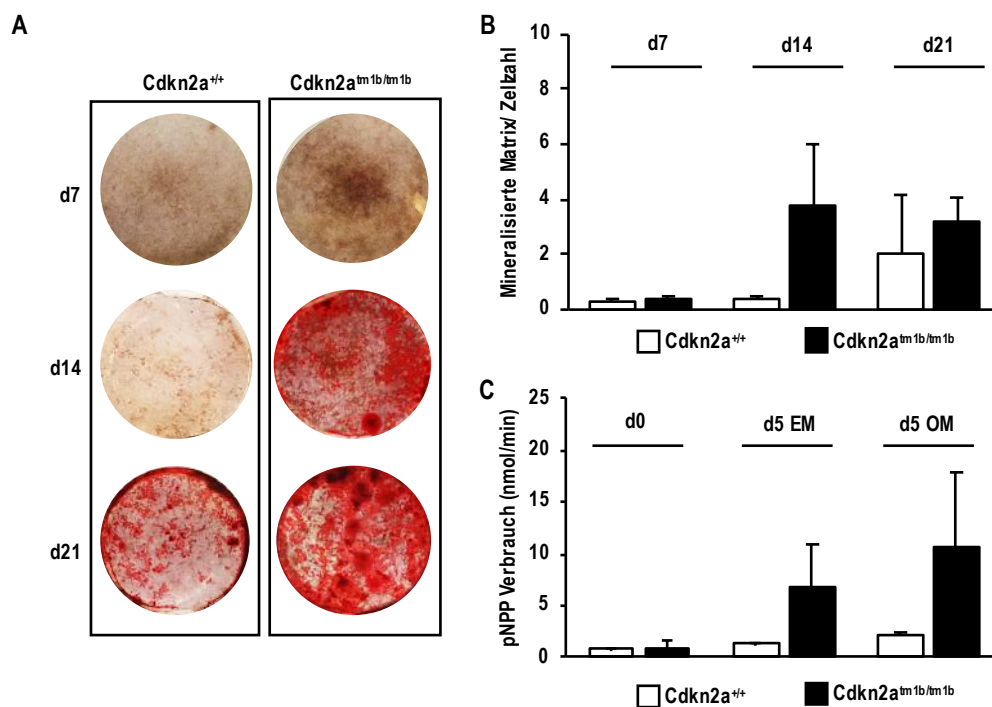


Abbildung 39: Osteoblasten, die aus dem Schädeldach von $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Mäusen isoliert wurden, weisen ein erhöhtes osteogenes Differenzierungspotenzial auf.

Calvaria-Osteoblasten wurden von 5 Tagen alten $Cdkn2a^{+/+}$ ($n=2$) und $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ ($n=3$) Tieren isoliert. Die osteogene Differenzierung wurde mittels β -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure initiiert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde eine Alizarinrot-Färbung durchgeführt (A) und anschließend relativ zu der Zellzahl pro Well quantifiziert (B). Sowohl die Intensität der Alizarinrot-Färbung als auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen am pNPP Verbrauch war deutlich erhöht für die kultivierten Osteoblasten der $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Mäuse. Beides lässt auf ein gesteigertes osteogenes Differenzierungspotenzial der $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Osteoblasten schließen.

Während die Genexpression von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in der Knochenhomöostase kompensierend zu der $p16^{INK4a}$ -Defizienz erhöht war, zeigte sich eine reduzierte $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Expression während der osteogenen Differenzierung von $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Allgemein nimmt die Expression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Alp Expression von $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$

Osteoblasten im Vergleich zu *Cdkn2a*^{+/+} Osteoblasten beobachtet werden. Die Expression von *Rankl* hingegen unterscheidet sich im Rahmen der Differenzierung nicht.

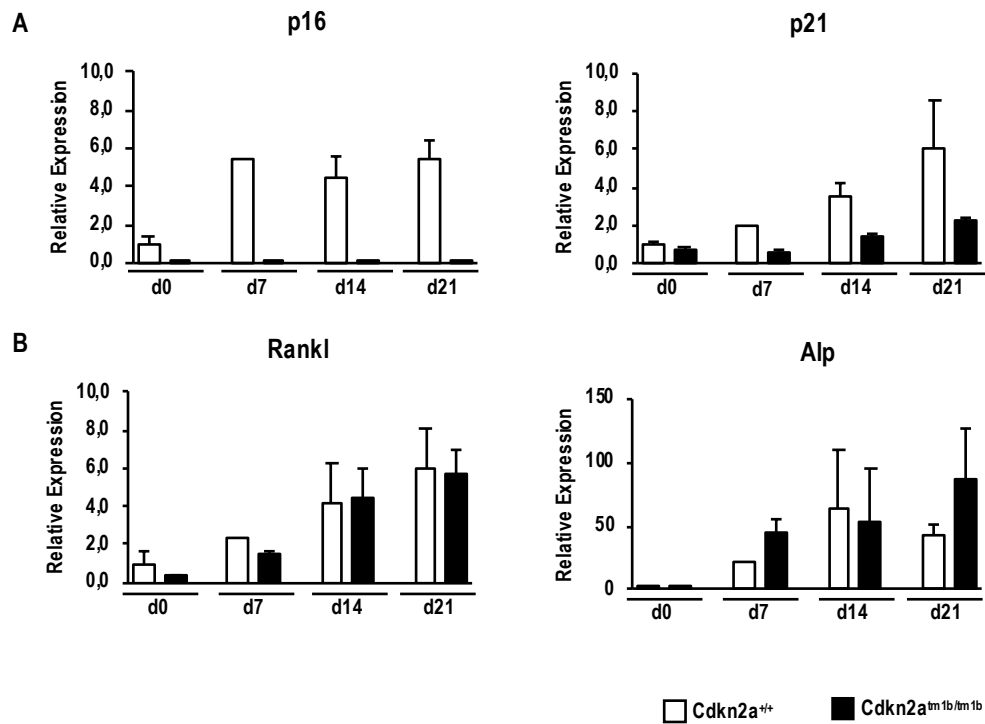


Abbildung 40: Die Expression von *p21*^{WAF-1/Cip-1} ist während erfolgreicher osteogener Differenzierung reduziert.

Neben der funktionellen Auswertung der osteogenen Differenzierung wurde die Expression von *p16*^{INK4a} und *p21*^{WAF-1/Cip-1} (A) sowie von den osteogenen Marker *Rankl* und *Alp* (B) evaluiert. (n=2)

4.3 Die osteogene Differenzierung von hMSC geht mit erhöhter $p16^{INK4a}$

Expression einher

Untersuchungen zur zellulären Seneszenz und den Einfluss auf verschiedene Knochenparameter in der Homöostase und Regeneration erwiesen sich als schwierig. Grund hierfür scheinen kompensierende Wirkweisen bei einer vorliegenden $p16^{INK4a}$ - und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ -Defizienz zu sein sowie die Problematik des Nachweises seneszenten Zellen *in vivo*. Insbesondere im Knochen ist die SA- β Gal Aktivität kein verlässlicher Marker, da Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen falsch positive Signale erzeugen. Aus diesem Grund wurde parallel an der Etablierung eines Systems gearbeitet, welches über die gezielte Überexpression der Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ *in vitro* Experimente ermöglicht. Da bereits gezeigt wurde, dass in älteren Patienten seneszente hMSC akkumulieren und hier ein Zusammenhang zu dem altersbedingten osteoporotischen Phänotyp liegen könnte, sollte die Überexpression in hMSC induziert werden. Neben dem Aspekt der Altersakkumulation seneszenten hMSC, waren diese Zellen auch interessante Zielzellen, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass während der erfolgreichen osteogenen Differenzierung von hMSC die relative Expression von $p16^{INK4a}$ erhöht ist (**Abbildung 41**), nicht aber von $p21^{WAF-1/Cip-1}$.

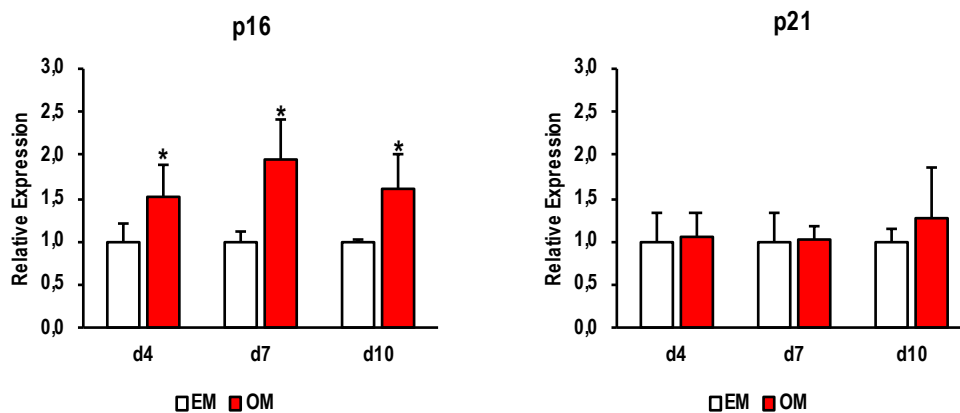


Abbildung 41: Relative $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Expressionslevel während erfolgreicher osteogener Differenzierung von hMSC.

Gezeigt wird die Genexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ von hMSC an Tag 4, 7 und 10 der osteogenen Differenzierung (Zellen wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM; rot)) behandelt. Die Auswertung erfolgte relativ zu der Expression der betrachteten Gene von hMSC, deren Kultivierung in normalem Expansionsmedium (EM; weiß) stattfand. (n=5) * $p < 0,05$

4.3.1 Klonierungsstrategie für die induzierte Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in hMSC

Da eine Überexpression der Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ die Proliferationsrate der Zielzellen negativ beeinflusst, erfolgte diese induzierbar. So konnten zunächst eine Selektion und anschließende Expansion der erfolgreich modifizierten Zellen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck erfolgte die Transfektion der Zielzellen mit einem dualen Tet-On Transposon Vektorsystem. Für die Transfektion wurde das Neon® Transfection System verwendet. Das duale Vektorsystem setzt sich aus einem Transposon kodierenden Vektor (pTOV-11) und einem Transposase-kodierendem Vektor (Sleeping Beauty SB100) zusammen. Mittels der Transposase wird das Transposon stabil in das Genom der Zielzelle integriert. Für eine Gewährleistung der stabilen Integration des *Genes of Interest* in das Genom der Zielzelle erfolgte eine Selektion. Um den geeigneten Selektionsmarker für die hMSC als Zielzellen zu bestimmen, wurden fünf verschiedene Antibiotika hinsichtlich ihres zeitabhängigen apoptotischen Effektes auf hMSC untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich lediglich Zeocin nicht für die Selektion zu eigenen scheint, da nach 4 Tagen noch 40% der Zellen vital waren unabhängig von der verwendeten Antibiotikumkonzentration (**Abbildung 42**). Hygromycin hingegen wies eine besonders starke apoptotische Wirkung auf hMSC auf. Bereits nach 2 Tagen waren keine Zellen mehr vital. Für Blastidicin, G418 und Puromycin zeigte sich eine stetige Abnahme der Zellzahl im Verlauf der Zeit. Nach 4 Tagen waren keine lebenden Zellen mehr detektierbar. Für jedes Antibiotikum wurden jeweils 3 verschiedene Antibiotikumkonzentrationen (1, 5 und 10 µg/ml) getestet. Der einzige konzentrationsabhängige Effekt auf die Zellvitalität konnte für Puromycin beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass die geringste Konzentration von 1 µg/ml ein über die Zeit verlangsamtes Absterben der Zellen auslöst. Nach 4 Tagen sind unter Verwendung dieser Konzentration keine vitalen hMSC mehr nachweisbar. Es scheint sich um die mildeste, aber zeitgleich sehr effektive Variante für eine Selektion transfizierter hMSCs zu handeln.

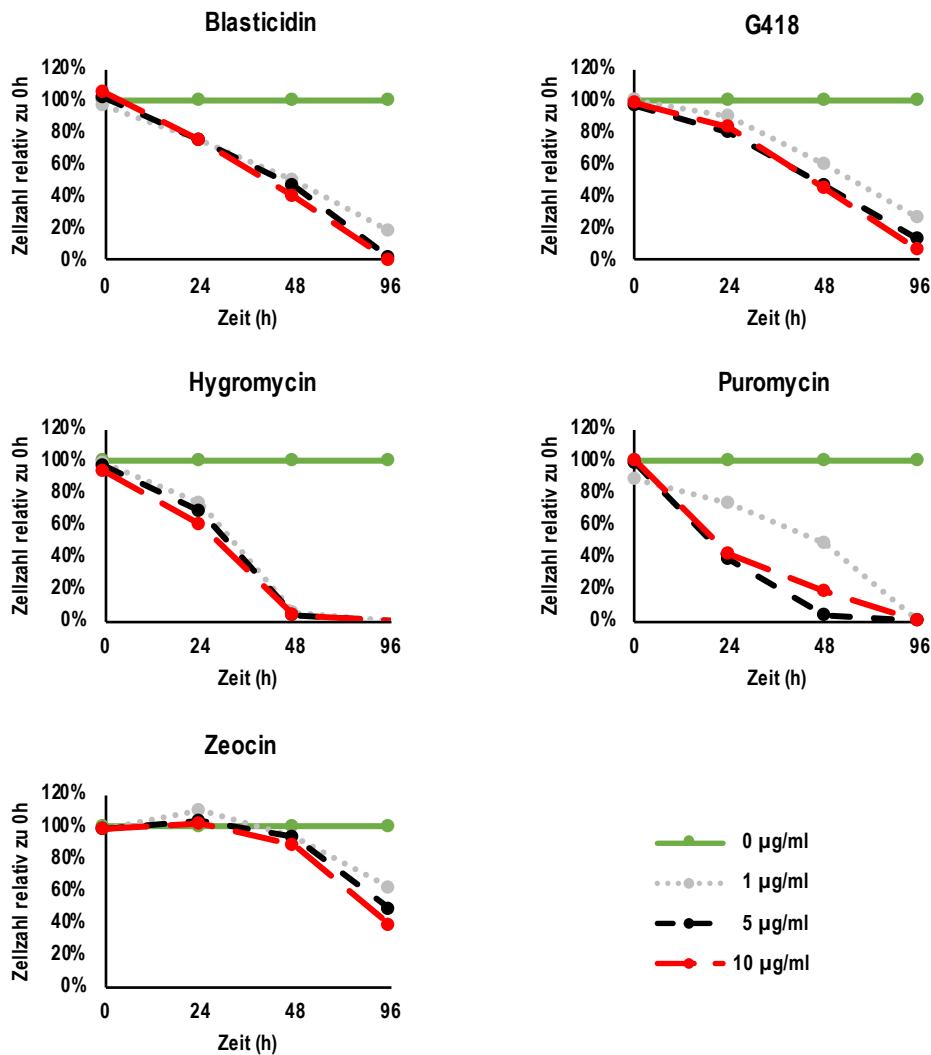


Abbildung 42: Puromycin eignet sich am besten zur Selektion von transfizierten hMSC.

hMSC wurden über den Verlauf von 4 Tagen mit Konzentrationen von 0, 1, 5 und 10 µg/ml Medium verschiedener Antibiotika kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde nach 1, 2 und 4 Tagen mittels PrestoBlue überprüft. (n=3)

In der Folge entschieden wir uns für ein Puromycin-basiertes Selektionsverfahren der transfizierten hMSCs. Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Transfektion mit einer Konzentration von 1µg/ml. Die genauen Schritte der Klonierung der Konstrukte sind dem Abschnitt **3.4** dieser Arbeit zu entnehmen.

Die Puromycin-Resistenz wurde über eine *2A Site* in den Vektor integriert. Das *Img* Reportergen wurde entweder durch *CDKN2a* oder *CDKN1a* cDNA mit Flag-Markierung ersetzt. Die entwickelten Zielkonstrukte sind der **Abbildung 43** zu entnehmen.

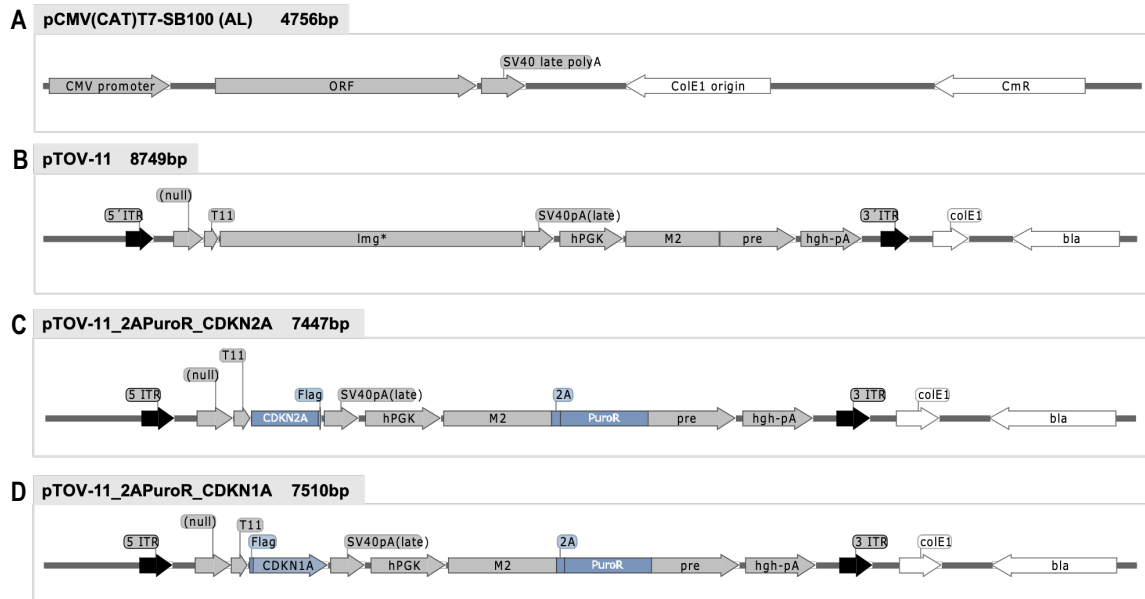


Abbildung 43: Vektorkarten der induzierbaren Transposon-basierten *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpressionssysteme.

Dargestellt sind die linearen Vektorkarten der verwendeten 4 Vektoren im Rahmen dieser Doktorarbeit. Die genauen Basensequenzen sind dem Anhang zu entnehmen. A) pCMV(CAT)T7-SB100(AL) ist der kodierende Vektor für die Sleeping Beauty 100 Transposase. Die Abbildung B) zeigt den Transposonvektor pTOV-11. Über die Restriktionsschnittstellen XmaI und BamHI wurde zuerst über eine 2A Site (2A) ein Puromycinresistenzgen (*PuroR*) in den Vektor integriert. Anschließend wurde entweder die Flag markierte cDNA von *CDKN2A* C) oder *CDKN1A* D) über die Schnittstellen Sall und NotI in den Vektor eingefügt (blau markiert) und das Reportergen *lmg* entfernt.

4.3.2 Doxycyclin induzierte *p16^{INK4a}*/*p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpression

Da die hMSC für die Versuche nur limitiert vorlagen, wurde die Funktionalität der klonierten Konstrukte zunächst in HeLa und anschließend in der immortalisierten humanen Fibroblastenzelllinie LN9SV überprüft. Der Nachweis der Überexpression erfolgte auf mRNA- und Proteinebene. Diese Arbeiten wurden zum Teil von Viktoria Dienst im Rahmen ihrer Projektarbeit in unserer Arbeitsgruppe unter meiner Betreuung durchgeführt.

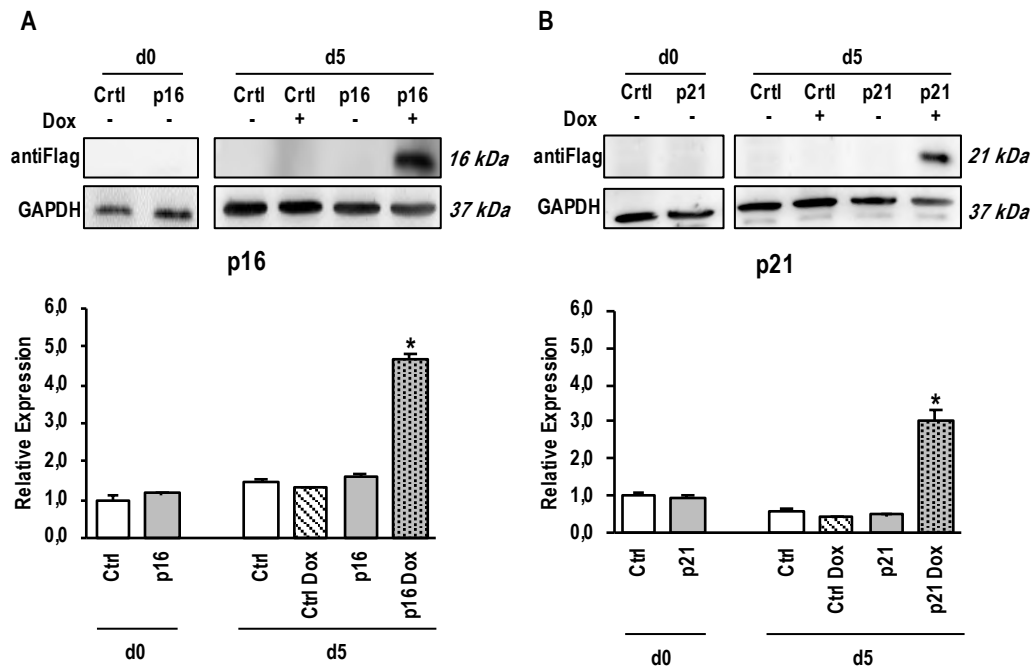


Abbildung 44: Die Überexpression von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* konnte in HeLa Zellen nachgewiesen werden.

HeLa Zellen wurden mit A) *p16^{INK4a}* und B) *p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpressionskonstrukten transfiziert. Der Nachweis der funktionierenden Überexpression erfolgte mittels qRT-PCR Analysen der jeweils überexprimierten Gene sowie mittels Western Blot, um eine erfolgreichen mRNA Translation zu detektieren. Analysiert wurden Proben von untransfizierten (Ctrl) und transfizierten Zellen (p16/p21) vor Beginn der Doxycyclin-Behandlung (d0) zu denen relativ die Ergebnisse mit oder ohne 5-tägiger induzierter Genexpression (d5) betrachtet wurden. * $p < 0,05$

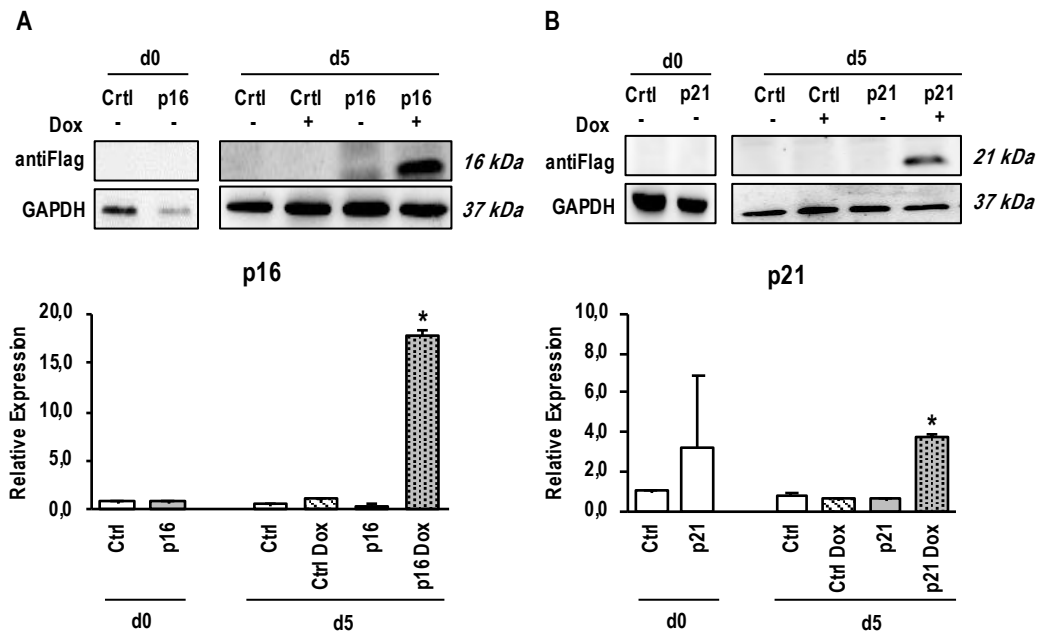


Abbildung 45: Der Nachweis von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ konnte auf mRNA- und Proteinebene in immortalisierten humanen Fibroblasten erbracht werden.

Versuchsdurchführung und Analyse entspricht dem Versuch, der **Abbildung 44** zugrunde liegt, mit dem Unterschied, dass nicht HeLa sondern LN9SV (immortalisierte humane Fibroblasten) Zellen transfiziert wurden. A) Dargestellt ist die relative $p16^{INK4a}$ Expression im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen (Ctrl) an Tag 0 (d0), zu untransfizierten Kontrollzellen ohne Doxycyclinbehandlung (Ctrl) und mit Doxycyclinbehandlung (Ctrl Dox) an Tag5 (d5) sowie zu transfizierten LN9SV Zellen ohne Doxycyclinbehandlung (p16). Der Nachweis des translatierten $p16^{INK4a}$ Proteins erfolgte anhand eines antiFlag Antikörperdetektion eines Western Blotes. B) Auch der Nachweis der $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression erfolgte mittels qRT-PCR und Western Blot. * $p < 0,05$

Am Beispiel der mit dem $p16^{INK4a}$ Transposon transfizierten HeLa Zellen wurde zusätzlich überprüft, mit welcher Doxycyclin-Konzentration die effektivste Überexpression induziert werden kann. Die induzierte Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ konnte bereits nach 5 Tagen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen der relativen $p16^{INK4a}$ Expression bei einer Induktion mit $1\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin, wurde die Induktion der Überexpression im Folgenden mit $0,5\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin durchgeführt.

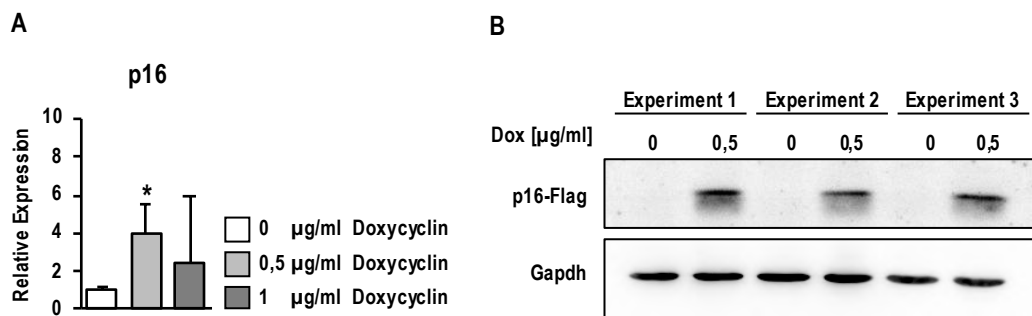


Abbildung 46: Mit 0,5µg/ml Medium Doxy cyclin kann eine signifikante Überexpression des Zielgens unter der Kontrolle des Tet-On Promoters induziert werden.

Relative *p16^{INK4a}* Expression in transfizierten HeLa Zellen mit dem dualen *p16^{INK4a}*-Überexpressionssystem. Durchgeführt wurden drei unabhängige Transfektionen. Nach einer Selektion der positiv transfizierten Zellen wurde die Überexpression von *p16^{INK4a}* mit 0,5 oder 1µg/ml Medium Doxy cyclin induziert. Der Nachweis der Überexpression erfolgte anhand der relativen Genexpression von *p16^{INK4a}* und dem translatierten Protein mittels Western Blot. Für den Nachweis des Proteins wurde ein Flag-Antikörper verwendet. * $p < 0,05$

Abschließend konnte auch für hMSC die Funktionalität des Transposon-Covektorsystem für die Überexpression der Seneszenzmarker nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte repräsentativ für *p16^{INK4}*.

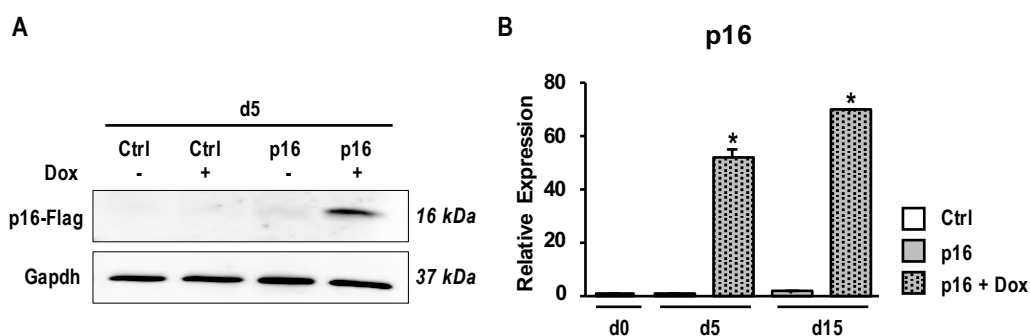


Abbildung 47: Repräsentativer Nachweis der Funktionalität des dualen Transposase/Transposon Vektorsystems in hMSCs anhand der *p16^{INK4a}* Überexpression.

Die Überexpression von *p16^{INK4a}* in hMSC konnte auf Proteinebene mittels Western Blot dargestellt werden (A). Die Detektion des Proteins erfolgte anhand einer Antikörperbindung an den *p16^{INK4a}* Flag an Tag 5 nach Doxy cyclin-induzierter Genexpression. Die Auswertungen der qRT-PCR mit Primern für *p16^{INK4a}* zeigen, dass die relative Expression über einen längeren Kultivierungszeitraum (d15) weiterhin zunimmt. * $p < 0,05$

4.3.3 Induzierte Expression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ verringert die Proliferationskapazität von hMSC

Senescente Zellen werden über einen irreversiblen Proliferationsarrest definiert. Um feststellen zu können, ob die induzierte Überexpression der Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ eine Reduktion der Proliferation bedingt, wurde die Zellproliferation von hMSC untersucht, die mit dem Tet-On induzierbaren $p16^{INK4a}$ Transposon (p16) oder dem $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Transposon (p21) transfiziert wurden. Die Überexpression wurde mit Doxycyclin induziert (p16Dox oder p21 Dox). Zusätzlich wurden hMSC zu Beginn des Versuches mit Mitomycin C (MMC) behandelt. MMC führt zur Schädigung der DNA (siehe 3.5.4). Dies wiederum resultiert in einem seneszenten Phänotyp der Zellen. MMC vermittelte Seneszenz dient im Folgenden als Seneszenz-Kontrolle für die $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression vermittelte Seneszenz.

Die Zellproliferation der unterschiedlich behandelten hMSC wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht, wobei die Zelldichte jeden zweiten Tag mittels CyQuant (siehe 3.5.5) bestimmt wurde. Bereits die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen an Tag 10 zeigen eindeutig eine reduzierte Zellproliferation von MMC behandelten (Ctrl MMC) hMSC. Dieser Effekt konnte auch für hMSC bei denen mit Doxycyclin die Überexpression von $p16^{INK4a}$ (p16 Dox) als auch von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ (p21 Dox) induziert wurde, beobachtet werden.

Die Quantifizierung der Zellproliferation zeigt, dass die MMC Behandlung die Zellproliferation mit einer Reduktion um 80% am stärksten unterbindet. Die gesteigerte Expression von $p16^{INK4a}$ resultiert in einer Reduktion um 70% der Zellproliferation und eine Überexpression von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ bedingt eine 60%ige Reduktion des Proliferationsverhaltens.

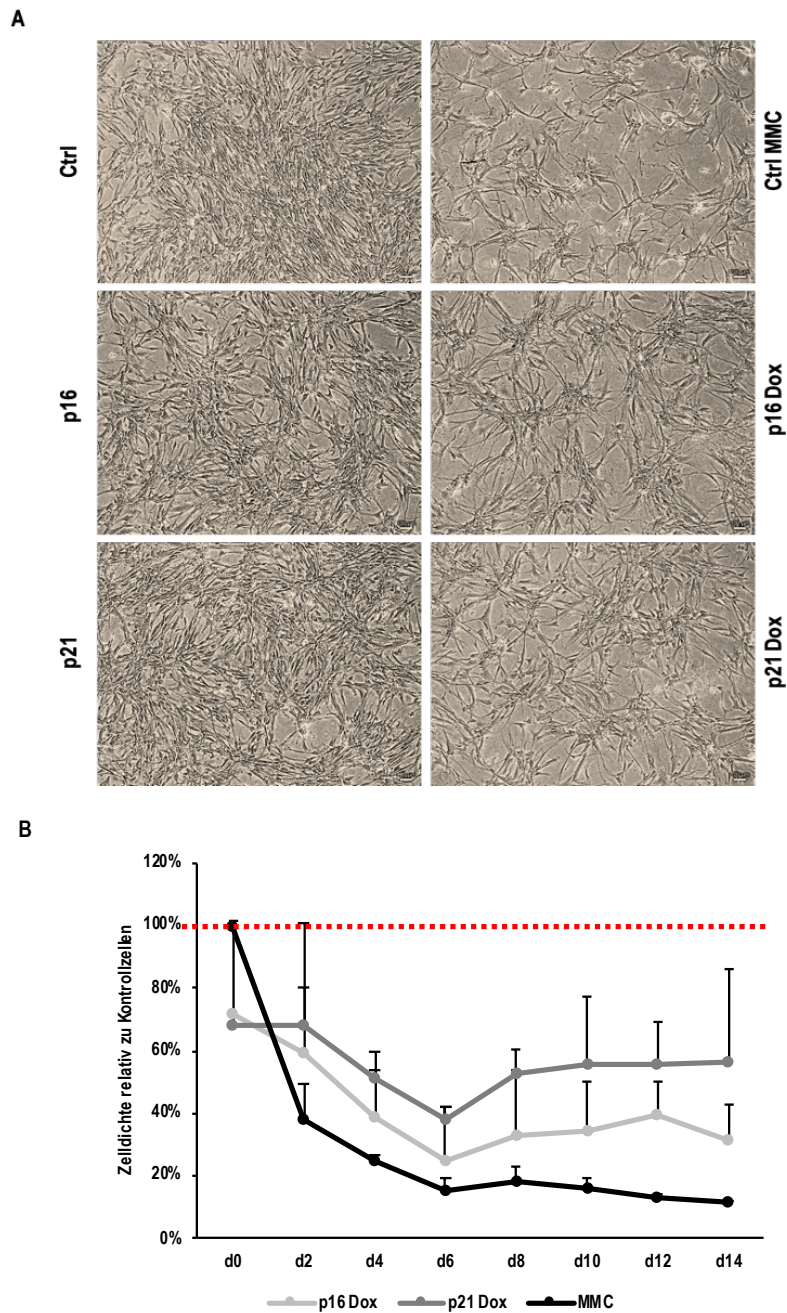


Abbildung 48: Die Zellproliferation von hMSC ist bei erhöhter Akkumulation von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ erniedrigt.

(A) Mikroskopische Aufnahmen von untransfizierten hMSC (Ctrl) und transfizierten hMSC (p16/p21) an Tag 10 in Kultur. Sowie die entsprechenden Aufnahmen von hMSC, welche zu Beginn des Versuches mit MMC behandelt wurden (Ctrl MMC) und von transfizierten hMSC, die mit Doxycyclin kultiviert wurden (p16 Dox, p21 Dox). Unter (B) ist die Quantifizierung der jeweiligen Proliferationsverhalten über einen Zeitraum von 2 Wochen zusammengefasst. Der hemmende Effekt auf die Zellteilung ist am größten, wenn die DNA der Zellen mittels MMC geschädigt wurde. Die Überexpression von $p16^{INK4a}$ hat den zweit stärksten Effekt und am wenigsten beeinträchtigt ist die Proliferation von hMSC mit zeitgleicher $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression. Der Versuch wurde mit biologischen Duplikaten durchgeführt (n=2).

4.3.4 Erhöhte $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Genexpression fördert die Wirkung von Senolytika auf hMSC

Da die Ergebnisse der Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase-Färbung (SA- β Gal) für die unterschiedlich behandelten hMSCs keine deutlichen Unterschiede zeigten, wurde als weiterer Nachweis eines seneszenten Phänotyps eine Senolytika Behandlung der Zellen durchgeführt. Senolytika vermitteln Apoptose ausschließlich in seneszenten Zellen, indem diese Substanzen Moleküle der aktiven *senescent cell anti-apoptotic pathways* (SCAPs) targetieren (siehe 1.1.4). MMC behandelte, $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierende Zellen sowie Kontrollzellen wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen einer Kombination der Senolytika Dasatinib und Quercetin behandelt. Die Zellzahl der Kontrollzellen verringerte sich unabhängig von der D+Q Konzentration um 20%. Für hMSC die mit MMC inkubiert wurden, zeigt sich ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt. Die D+Q Konzentration von $1\mu\text{M}$ Dasatinib/ $1\mu\text{M}$ Quercetin führt zu einer 30%igen Reduktion. Eine 10-fache D+Q Konzentration hingegen führt zu einer Reduktion der Zellezahl um 60%. Liegt eine erhöhte $p16^{INK4a}$ Expression der hMSC vor, so tritt bei einer hohen D+Q Konzentration ebenfalls eine um 60% reduzierte Zellzahl auf. Die geringere D+Q Konzentration hat einen stärkeren Effekt auf die $p16^{INK4a}$ überexprimierenden Zellen als auf die MMC behandelten hMSC und vermindert die Zellzahl um 40%. Die $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden hMSC scheinen resistenter gegenüber der D+Q vermittelten Apoptose zu sein. Es wurde hier nur eine maximale Reduktion der Zellzahl um 50% erreicht mit einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ Dasatinib/ $10\mu\text{M}$ Quercetin. Die geringere Dosis wies einen vergleichbaren Einfluss zu den anderen Proben Gruppen auf und gipfelte in einer Verringerung der Zellzahl um 30%.

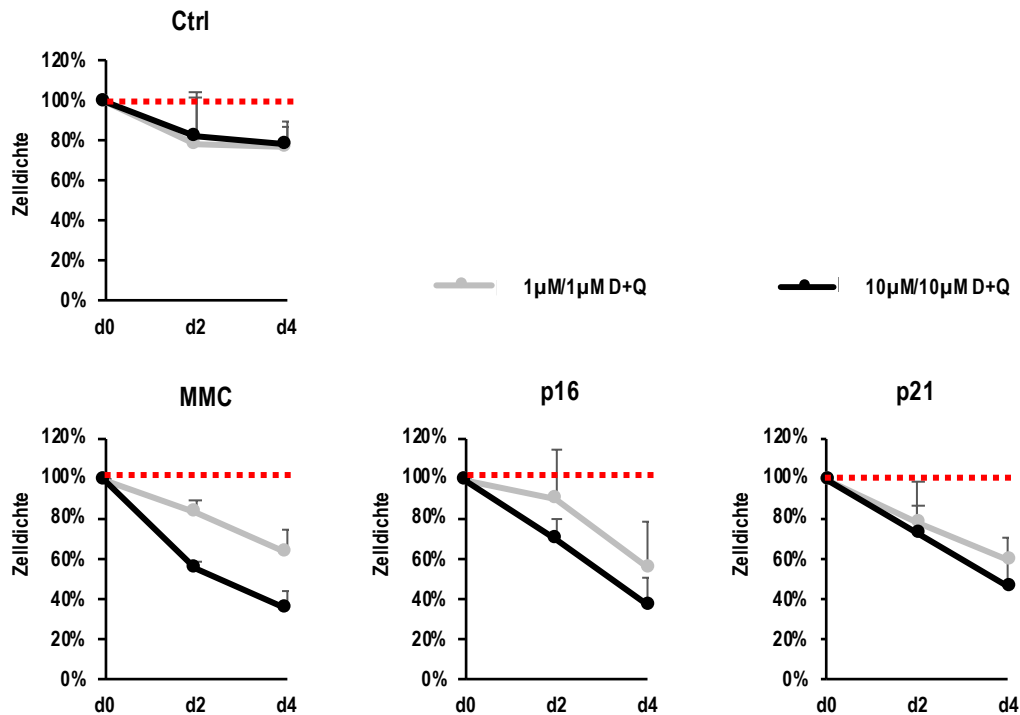


Abbildung 49: Dasatinib und Quercetin (D+Q) induzieren bei erhöhter Expression der Seneszenzmarker verstärkt Zellaoptose.

Zunächst wurden hMSC mit MMC behandelt oder es wurde die Überexpression von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* induziert. 10 Tage später wurden die Zellen mit oder ohne D+Q mit einer Konzentration von 1µM/1µM oder 10µM/10µM kultiviert. Die über D+Q vermittelte Apoptoserate ist am geringsten bei der hMSC Kontrollgruppe. Am stärksten ausgeprägt ist der Einfluss von D+Q auf die Zellzahl bei vorliegender *p16^{INK4a}* Überexpression oder MMC Behandlung der Zellen. (n=2)

4.3.5 Eine Überexpression von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* reduziert das Differenzierungspotenzial von hMSC

Das Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stromazellen ist wichtig für regenerative Prozesse und somit auch für die Frakturheilung. In diesem Kontext wurde sowohl die osteogene als auch die adipogene Differenzierung von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* überexprimierenden hMSC untersucht, da gezeigt werden konnte, dass im Verlauf der osteogenen Differenzierung eine erhöhte Expression von *p16^{INK4a}* vorlag (**Abbildung 50**).

Die Ergebnisse zeigen eine unterbundene osteogene und adipogene Differenzierung bei vorliegender *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpression. Hingegen beeinträchtigt eine Überexpression von GFP als Kontrolle die Differenzierungsprozesse nicht.

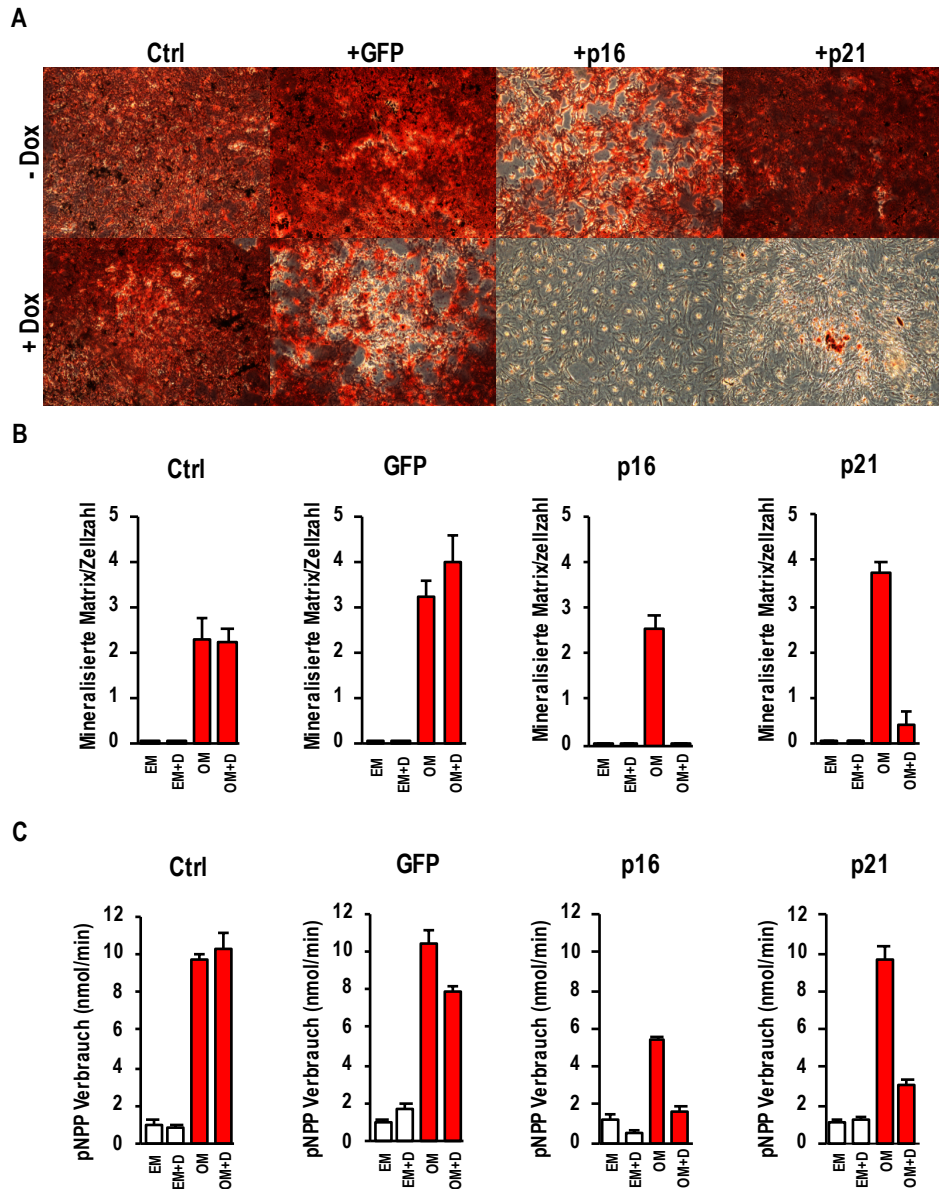


Abbildung 50: Osteogene Differenzierung von hMSC durch $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression unterbunden.

A) Mikroskopische Aufnahmen der hMSC nach Stimulation der osteogenen Differenzierung mit L-Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat und Dexamethason für 18 Tage. Durchgeführt wurde eine Alizarinrot-Färbung zur B) Quantifizierung der mineralisierten Matrix. Die Zellen wurden entweder in normalem Expansionsmedium (EM) kultiviert oder zusätzlich mit L-Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat und Dexamethason (OM) die osteogene Differenzierung induziert. Zudem wurden die Zellen sowohl mit als auch ohne osteogenen Differenzierungsstimulus zeitgleich mit oder ohne Doxycyclin (EM+D; OM+D) über den gesamten Zeitraum des Experimentes kultiviert. C) An Tag 5 wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase quantifiziert. Das Experiment erfolgte in technischen Triplikaten unter der Verwendung der Zellen eines Spenders.

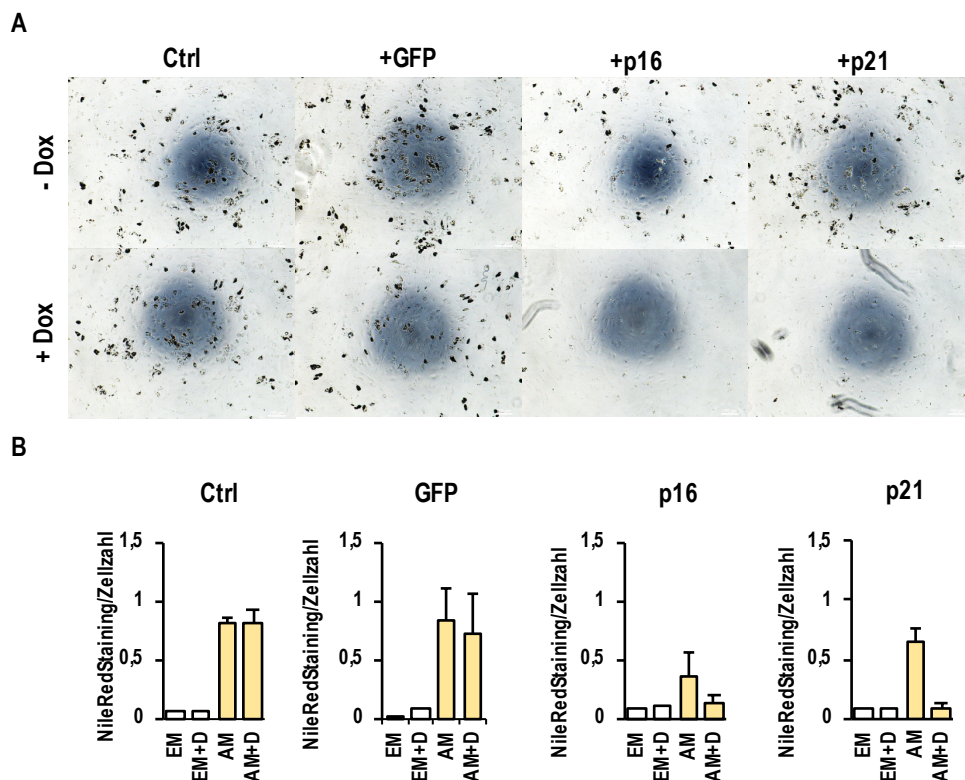


Abbildung 51: Inhibierende Wirkung der $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression auf die adipogene Differenzierung von hMSC.

A) Mikroskopische Aufnahmen der hMSC nach Stimulation der adipogenen Differenzierung mit Insulin, IBMX, Indomethacin und Dexamethason für 18 Tage. B) Quantitative Auswertung der Färbung von Adipozyten mittels NileRed-Färbung. Die Zellen wurden entweder in normalem Expansionsmedium (EM) kultiviert oder zusätzlich mit Insulin, IBMX, Indomethacin und Dexamethason (AM) die adipogene Differenzierung induziert. Zudem wurden die Zellen sowohl mit also auch ohne adipogenen Differenzierungsstimulus zeitgleich mit oder ohne Doxycyclin (EM+D; AM+D) über den gesamten Zeitraum des Experimentes kultiviert. Das Experiment erfolgte in technischen Triplikaten unter der Verwendung der Zellen eines Spenders.

4.3.6 Die Genexpressionsprofile von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden und MMC behandelten hMSC differieren

Neben der erhöhten Expression der Zellzyklusinhibitoren $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ ist auch die erhöhte Expression von $p53$ eng mit der zellulären Seneszenz assoziiert. Ferner ist eine Reduktion der Expressionslevel von $LaminB1$ für seneszente Zellen beschrieben. Aufgrund der immer deutlicher werdenden Variabilität des Zusammenspiels der Seneszenzmarker in Abhängigkeit vom betroffenen Zelltyp und Auslöser für die Seneszenz, wurde von Hernandez-Segura et al. versucht die *senescence core signature* auf mRNA Ebene zu definieren. Die Auswertung basierte auf verschiedenen RNA-Sequenzierungs-Datensets von Fibroblasten, die durch unterschiedliche Seneszenz-Stimuli in den Zellzyklusarrest getrieben wurden. Die Gene, deren Expression übereinstimmend für alle Datensets durch die Seneszenz reguliert wurde, wurden mit den RNA-

Profilen von induzierten seneszenten Melanozyten, Keratinozyten und Astrozyten verglichen. Im letzten Schritt wurde analysiert, wie sich die Genexpression zeitlich nach der Seneszenzinduktion verändert. Durch die sukzessive Integration der Variablen Seneszenz-Stimulus, Zelltyp und Zeitpunkt der Analyse nach Seneszenz-Induktion, wurden 13 Gene detektiert, die einheitlich in ihrer Expression bei vorliegender Seneszenz beeinflusst wurden. Zu dieser *senescence core signature* zählen auch *PLXNA3* und *GDNF*, die in ihrer Expression signifikant erhöht waren. *PLXNA3* kodiert für einen Rezeptor der Klasse III Semaphorine; Plexin-A3. Die Signaltransduktion über die Semaphorine vermittelt den Umbau des Zytoskeletts. *GDNF* (*glial cell derived factor*) gehört zu der TGF- β Superfamilie und bindet an verschiedene TGF- β Rezeptoren. Nachfolgend wird über die Aktivierung des SMAD-Signalweges die Genexpression verschiedener Gene initiiert. Die Auswertung der Genexpressionslevel von *p16^{INK4a}*, *p21^{WAF-1/Cip-1}*, *p53*, *LaminB1*, *PLXNA3* der hMSC mit MMC Behandlung, *p16^{INK4a}* oder *p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Es zeigte sich, dass die MMC Stimulation eine unmittelbare Erhöhung der *p21^{WAF-1/Cip-1}* Genexpression zur Folge hat. Die Expression von *p16^{INK4a}* nahm über den zeitlichen Verlauf zu. Auch in unbehandelten hMSC Kontrollzellen konnte eine zunehmende Expression der Seneszenzmarker über die Zeit detektiert werden. Die mittels Doxycyclin induzierte Überexpression der Seneszenzmarker war unmittelbar detektierbar und blieb über den zeitlichen Verlauf des Versuches signifikant erhöht.

Interessanterweise zeichneten sich keine Veränderungen für die *p53* Expressionslevel, nach Seneszenzinduktion oder Überexpression ab. Lediglich die unbehandelten Kontrollzellen spiegeln eine Zunahme der *p53* Expression über die Zeit wider.

Die relativen Expressionslevel von *LaminB1* (*LMNB1*) nahmen im zeitlichen Verlauf des Experimentes bei allen untersuchten Zellgruppen ab. Jedoch zeigte sich dieser Effekt in unterschiedlicher Ausprägung. Die geringsten Mengen an *LaminB1* mRNA ließen sich für die MMC behandelten Zellen nachweisen. Von *p16^{INK4a}* über *p21^{WAF-1/Cip-1}* überexprimierende Zellen bis hin zu den Kontrollzellen nahm der reduktive Einfluss auf die *LMNB1* Transkription ab.

Die Ergebnisse für die *PLXNA3* Expression sind heterogen. 4 Tage nach Seneszenzinduktion ist die Expression für die MMC behandelten und *p21^{WAF-1/Cip-1}* überexprimierenden Zellen deutlich erhöht, die *p16^{INK4a}* Überexpression hingegen geht mit einer zu großen Standardabweichung einher. Dieser Effekt nimmt über Tag 10 bis zu Tag 20 nach Seneszenzinduktion ab.

Die Ergebnisse der relativen *GDNF* Expressionsanalyse weisen einen deutlichen Unterschied zwischen den MMC behandelten Zellen und der gezielten Überexpression der Zellzyklusinhibitoren auf. Während die Schädigung der DNA zu einer gesteigerten *GDNF* Expression führt, ist die *GDNF* Expression bei zeitgleich induzierter Expression von *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* gegensätzlich beeinflusst.

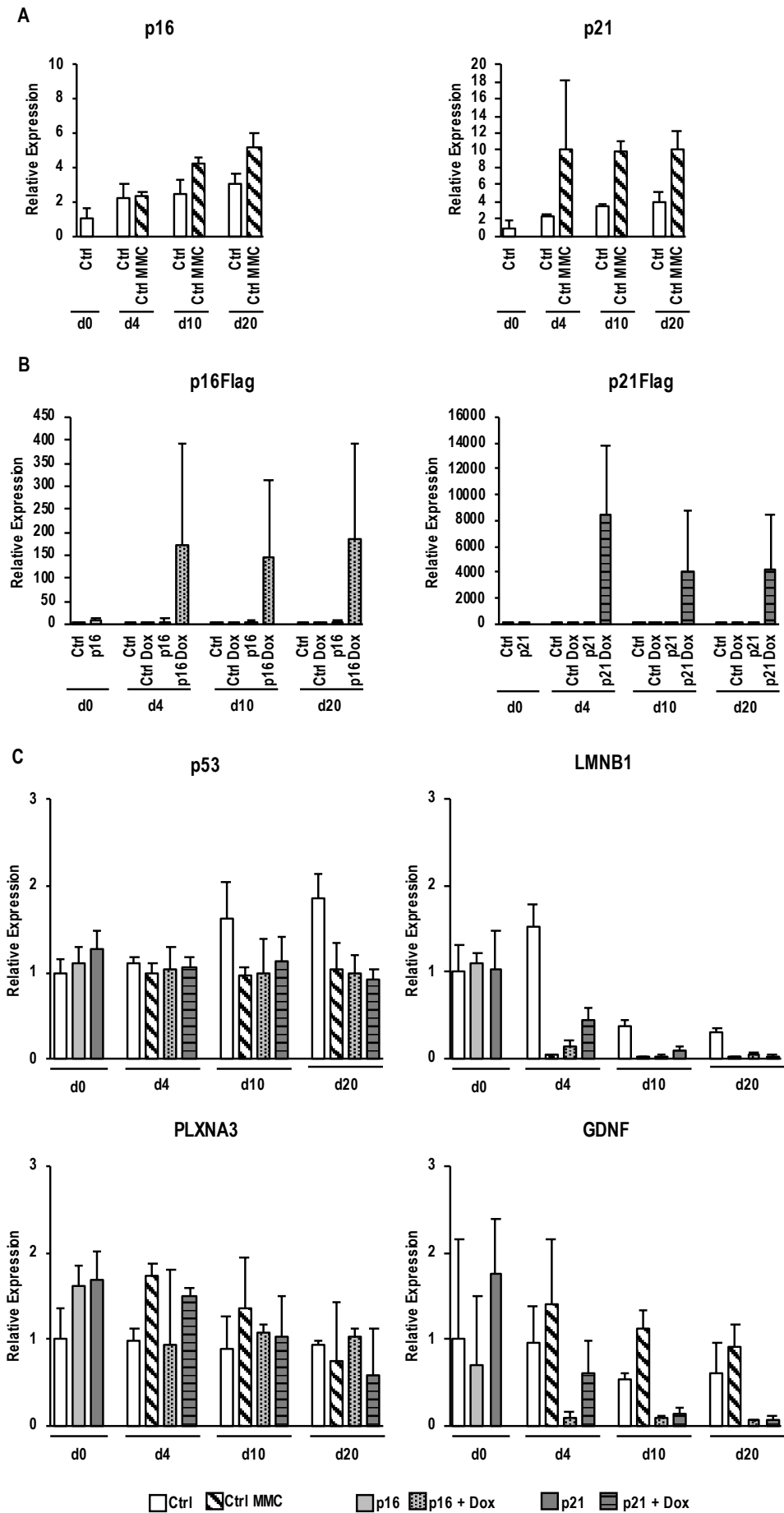


Abbildung 52: Relative Genexpressionslevel von Seneszenzmarkern in Zellzyklus-arretierten hMSC.

Untersucht wurden hMSC nach einer vorangegangenen MMC Behandlung (Ctrl MMC) sowie hMSC, die mit *p16^{INK4a}* oder *p21^{WAF-1/Cip-1}* Transposon transfiziert wurden (p16, p21). Die Überexpression wurde mittels Doxycyclin induziert (p16 + Dox, p21 + Dox). Die Probenentnahme erfolgte vor MMC/Doxycyclinbehandlung (d0) sowie an Tag 4 (d4), Tag 10 (d10) und an Tag 20 (d20) nach MMC Inkubation oder beginnender Doxycyclinstimulation. Analysiert wurden die Expressionslevel von A) *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* sowie der B) Flag-markierten *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpressionskonstrukte (p16Flag, p21Flag) und den C) Seneszenzmarkern *p53*, LaminB1 (*LMNB1*), Plexin-A3 (*PLXNA3*) und dem *glial cell derived factor (GDNF)*. (n=2)

Um die genetisch modifizierten hMSC weiter charakterisieren zu können wurden Transkriptomdaten der *p16^{INK4a}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* überexprimierenden hMSC durchgeführt, um diese mit den bereits in der Literatur beschriebenen Expressionsprofilen von seneszenten Zellen zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden die RNA Proben zusätzlich mittels RNA Sequenzierung untersucht. Aufgrund finanzieller Limitierungen wurden jedoch nur die im Folgenden gelisteten 21 Proben verwendet:

Tabelle 31: Verwendete Proben für die RNA-Sequenzierungsanalyse

Spender	Behandlung der Zellen	Zeitpunkt der Probenisolation
P546	Ctrl	d20
P546	Ctrl + Dox	d20
P546	Ctrl + MMC	d20
P546	p16	d20
P546	p16 + Dox	d20
P546	p21	d20
P546	p21 + Dox	d20
P785	Ctrl	d10 und d20
P785	Ctrl + Dox	d10 und d20
P785	Ctrl + MMC	d10 und d20
P785	p16	d10 und d20
P785	p16 + Dox	d10 und d20
P785	p21	d10 und d20
P785	p21 + Dox	d10 und d20

Die Expressionsprofile der RNA-Sequenzierung wurden zunächst in einer Hierarchischen-Clusteringanalyse zusammengefasst. Bei diesem Verfahren wurden die 500 Gene, deren Expression am stärksten variiert mittels des Euklidischen Abstandes dargestellt. Der visuelle Abstand der aufgetragenen Proben und Gene zueinander spiegelt die Ähnlichkeit bzw. den Unterschied wider. So unterschieden sich die Expressionsprofile der Proben 546d20-Mit_1 und 785d10-Mit_1 am stärksten. Zusätzlich fällt ein deutliches spenderspezifisches Clustering auf, welches die zugrundeliegende Spendervariabilität der Expressionsprofile verdeutlicht (**Abbildung 53**).

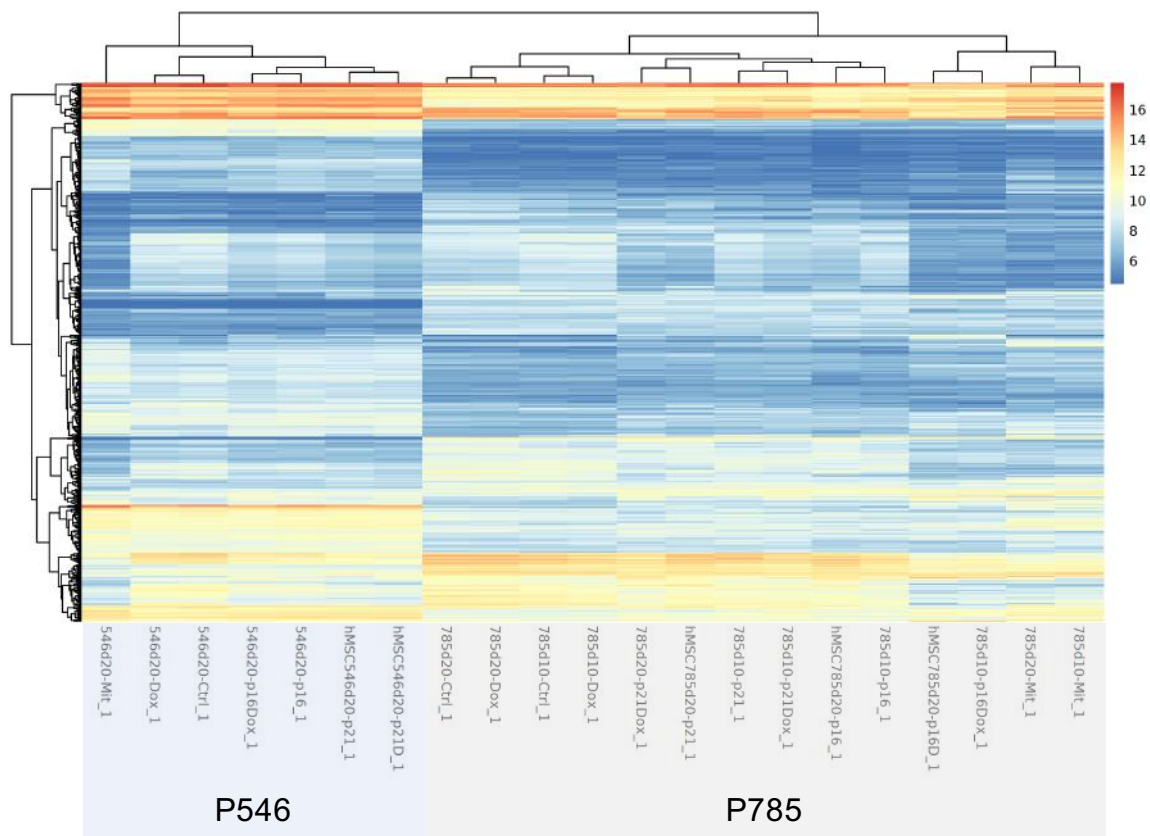


Abbildung 53: Hierarchische Clustering-Analyse der Expressionsprofile von den RNA-Proben der Spender P546 und P785 visualisiert die zugrundeliegende Spendervariabilität.

Die Hierarchische Clusteringanalyse veranschaulicht die Ähnlichkeiten bzw. den Unterschied der Expressionsprofile der untersuchten 21 Proben (siehe **Tabelle 31**). Dargestellt sind die 500 Gene, deren Expression sich in allen Proben am stärksten unterscheidet. Die Expressionswerte wurden mit der „vst“ Methode generiert. Das Clustering basiert auf der Darstellung des Euklidischen Abstandes sowohl für die in der jeweiligen Spalte abgebildeten Gene als auch für die in der Zeile dargestellten Proben. Je größer der räumliche Abstand der Datenpunkte zueinander umso größer ist der Unterschied dieser zueinander.

Um den Einfluss der Spendervariabilität auszublenden, wurde zusätzlich eine Hierarchische Clusteringanalyse nur von den Proben des Spenders P785 durchgeführt. Hier zeigt sich ein deutliches Clustering der Proben die an unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 10 und Tag 20) nach Mitomycin C Behandlung oder Doxycyclin induzierter Überexpression von *p16^{INK4a}* isoliert wurden. Des Weiteren wird ersichtlich, dass es zu einem Clustering der Kontrollzellen sowohl mit als auch ohne Doxycyclinbehandlung kommt. Ferner kann beobachtet werden, dass auch die Zellen, welche mit dem *p21^{WAF-1/Cip-1}* Überexpressionstransposon transfiziert wurden ein ähnliches Expressionsprofil sowohl mit als auch ohne Doxycyclinbehandlung aufweisen.

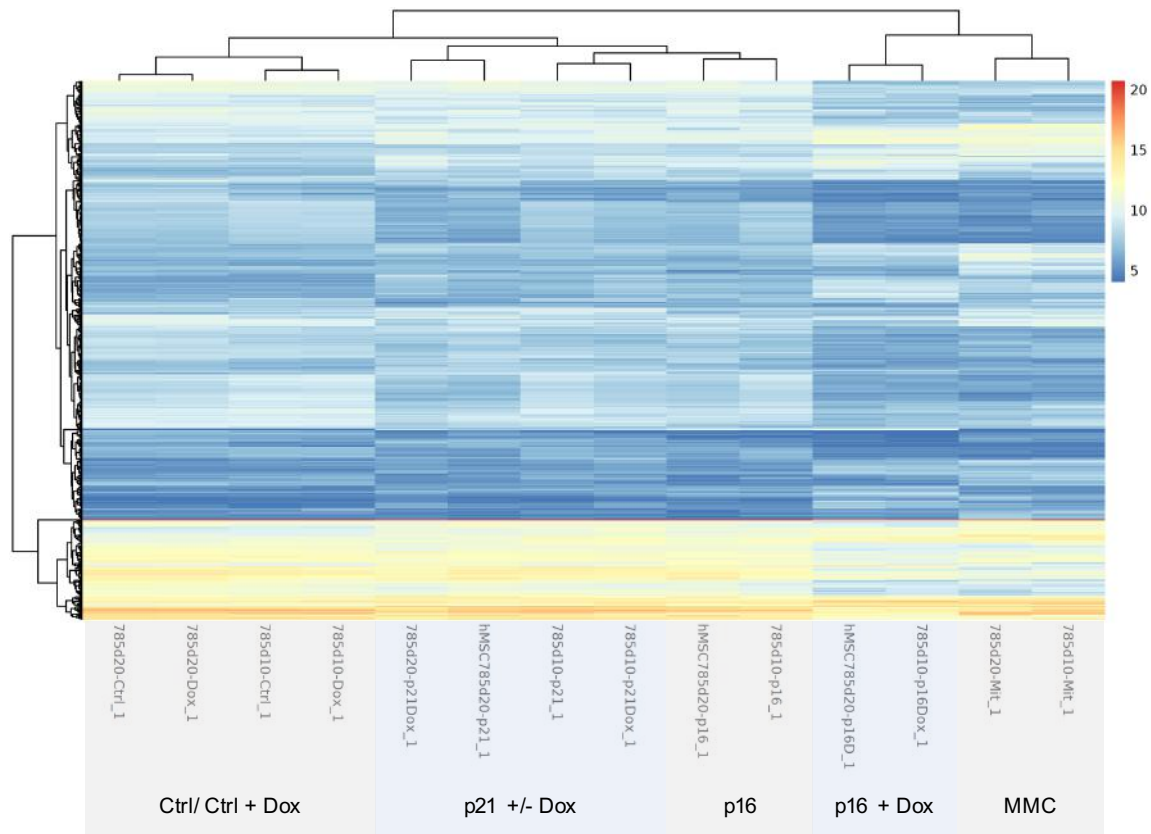


Abbildung 54: Hierarchische Clustering-Analyse der Expressionsprofile von den RNA Proben des Spenders P785.

Diese Abbildung stellt das Hierarchische Clustering der sequenzierten RNA Proben der hMSC des Patienten P785 dar (14 Proben). Die Kontrollzellen (Ctrl) wurden entweder mit Doxycylin (Ctrl + Dox) oder MMC (MMC) behandelt. Des Weiteren wurde die RNA von hMSC nach erfolgter Transfektion mit einem Transposon für die Überexpression von *p16^{INK4a}* (p16) und *p21^{WAF-1/Cip-1}* (p21) isoliert sowie auch 10 oder 20 Tage nach zusätzlich erfolgter Doxycylin vermittelter Überexpression (p16 + Dox, p21 + Dox). Dargestellt sind die 500 Gene, deren Expression sich in allen Proben am stärksten unterscheidet mittels des Euklidischen Abstandes. Der räumliche Abstand der Datenpunkte zueinander repräsentiert die Größe des Unterschiedes in der jeweiligen Genexpression.

Aufgrund der limitierten Probenzahl und der zeitgleich großen Spendervariabilität der Proben, wurde eine vom Zeitpunkt (Tag 10 oder 20) unabhängige Analyse der Proben durchgeführt, da sich die Expressionsprofile der RNA Proben der hMSC des Spenders P785 an Tag 10 und 20 nicht stark unterschieden. Für diese Analyse wurden vier Datensets generiert. So wurde das Expressionsprofil der unbehandelten Kontrollzellen zunächst mit dem Expressionsprofil der mit Doxycylin-behandelten Kontrollzellen verglichen (Ctrl vs. Ctrl + Dox). Der MA-Plot der zwei Proben visualisiert keine Unterschiede (**Abbildung 54**). Anders verhält es sich bei der Behandlung der hMSC mit Mitomycin C. Das Zytostatikum bedingt eine deutliche Veränderung des Expressionsprofils von 2579 Genen. Auch ein Vergleich der Transkriptomiksdaten der transfizierten hMSC mit dem *p16^{INK4a}* Transposon mit und ohne Doxycylin-Stimulation resultiert in einem veränderten Expressionsmuster (p16 vs. p16 + Dox). In diesem Fall ist die Expression von 806 Genen durch die Stimulation beeinflusst. Hingegen bedingt die Stimulation der mit dem

p21^{WAF-1/Cip-1} Überexpressionskonstrukt transfizierten hMSC (p21 vs. p21 + Dox) keine deutliche Veränderung des Expressionsprofils, wie der MA-Plot verdeutlicht.

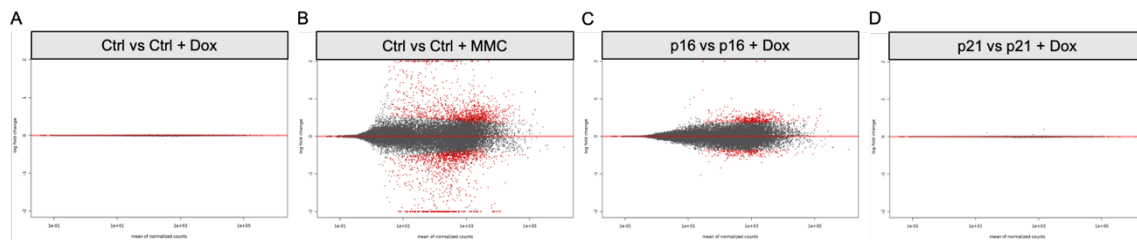


Abbildung 55: MA Plots der untersuchten Kontraste Ctrl vs. Ctrl Dox, Ctrl vs. Ctrl MMC, p16 vs. p16 Dox und p21 vs. p21 Dox.

Visualisierung der vier differenziellen Genexpressionsuntersuchungen. Analysiert wurden die Unterschiede zwischen A) hMSC mit erfolgter Doxycyclinstimulation zu Kontroll hMSC ohne Behandlung (Ctrl vs Ctrl + Dox) B) MMC behandelte hMSC zu Kontroll hMSC (Ctrl vs. Ctrl + MMC) C) *p16^{INK4a}* überexprimierende hMSC zu *p16^{INK4a}* transfizierten hMSC ohne Doxycyclinstimulation (p16 vs. p16 + Dox) D) *p21^{WAF-1/Cip-1}* überexprimierende hMSC zu *p21^{WAF-1/Cip-1}* transfizierten hMSC ohne Doxycyclinstimulation (p21 vs. p21 + Dox).

Vergleicht man die veränderten Expressionsprofile bedingt durch eine MMC Behandlung mit der differenziellen Expression resultierend nach einer *p16^{INK4a}* Überexpression, kommt es zu einer Übereinstimmung von 399 regulierten Genen. Das entspricht der Hälfte der Gene deren Expression durch eine *p16^{INK4}* Überexpression beeinflusst ist (**Abbildung 56**).

Des Weiteren wurden die, durch die MMC Behandlung und *p16^{INK4a}* Überexpression veränderten, Genexpressionsprofile der hMSC im Folgenden mit publizierten Expressionsprofilen seneszenten Zellen verglichen. In der Arbeit von Wagner et al. wurde das Genexpressionsprofil von seneszenten hMSC untersucht. Dabei wurde die replikative Seneszenz der hMSC durch eine Zellexpansion bis zum Eintritt des Proliferationsarrestes in Zellkultur induziert (Wagner et al., 2009). Eine Analyse der RNA Sequenzierung brachte eine, durch die replikative Seneszenz bedingte, Veränderung der Expression von 1955 Genen hervor. Ein Vergleich der Daten von Wagner et al. mit unseren Daten zeigt eine Gemeinsamkeit von 41 Genen deren Expression durch den auf unterschiedliche Weise induzierten Zellzyklusarrest beeinflusst wird (**Abbildung 56**). Von diesen ist bei 25 Genen die Expression erhöht, bei 4 Genen erniedrigt und bei 12 Genen gegensätzlich reguliert. So ist in einem Datenset die Genexpression erhöht, während sie im anderen Datenset erniedrigt ist. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 32** und **33** zusammengefasst.

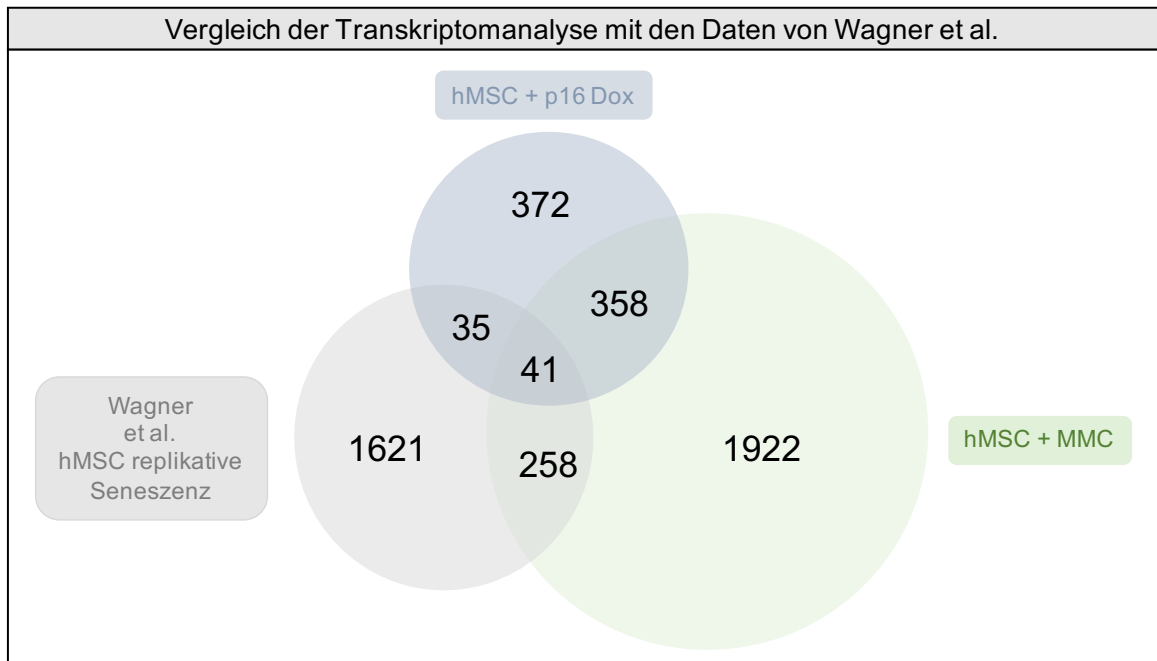


Abbildung 56: Das gemeinsame Expressionsprofil von hMSC, deren Zellzyklusarrest auf unterschiedliche Weise induziert wurde, umfasst 41 Gene.

Die Abbildung zeigt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Form einer Metaanalyse der veränderten Genexpressionsprofile von replikativ seneszenten hMSC (Daten von Wagner et al. in grau), mit MMC behandelten hMSC (grün) und *p16^{INK4a}* überexprimierenden hMSC (blau) anhand absoluter Werte der beeinflussten Gene.

Tabelle 32: Erhöhte und erniedrigte Genexpression von humanen MSC induziert durch MMC Behandlung, p16^{INK4} Überexpression und replikative Seneszenz

Erhöhte Expression		
ENSEMBL ID	Gen	Beschreibung
ENSG00000100997	ABHD12	abhydrolase domain containing 12, lysophospholipase
ENSG00000182718	ANXA2	annexin A2
ENSG00000144746	ARL6IP5	ADP ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 5
ENSG00000113732	ATP6V0E1	ATPase H+ transporting V0 subunit E1
ENSG00000131100	ATP6V1E1	ATPase H+ transporting V1 subunit E1
ENSG00000015475	BID	BH3 interacting domain death agonist
ENSG00000108691	CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
ENSG00000170791	CHCHD7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7
ENSG00000102805	CLN5	CLN5 intracellular trafficking protein
ENSG00000159348	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1
ENSG00000157379	DHRS1	dehydrogenase/reductase 1
ENSG00000204381	LAYN	layilin
ENSG00000151366	NDUFC2	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit C2
ENSG00000162734	PEA15	proliferation and apoptosis adaptor protein 15
ENSG00000177700	POLR2L	RNA polymerase II, I and III subunit L
ENSG00000115685	PPP1R7	protein phosphatase 1 regulatory subunit 7
ENSG00000103769	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family
ENSG00000129625	REEP5	receptor accessory protein 5
ENSG00000157916	RER1	retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1
ENSG00000150459	SAP18	Sin3A associated protein 18
ENSG00000117758	STX12	syntaxin 12
ENSG00000175348	TMEM9B	TMEM9 domain family member B
ENSG00000177889	UBE2N	ubiquitin conjugating enzyme E2 N
ENSG00000131015	ULBP2	UL16 binding protein 2
ENSG00000049245	VAMP3	vesicle associated membrane protein 3
Erniedrigte Expression		
ENSG00000143578	CREB3L4	cAMP responsive element binding protein 3 like 4
ENSG00000106462	EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
ENSG00000164604	GPR85	G protein-coupled receptor 85
ENSG00000176890	TYMS	thymidylate synthetase

Tabelle 33: Gegenteilig regulierte Genexpression in hMSC durch unterschiedlich induzierten Zellzyklusarrest

Ungleich regulierte Expression		
ENSEMBL ID	Gen	Beschreibung
ENSG00000147202	DIAPH2	diaphanous related formin 2
ENSG00000135842	FAM129A	niban apoptosis regulator 1
ENSG00000183098	GPC6	glypican 6
ENSG00000118898	PPL	periplakin
ENSG00000152377	SPOCK1	SPARC (osteonectin), cwcv and kazal like domains proteoglycan 1
ENSG00000048707	VPS13D	vacuolar protein sorting 13 homolog D
ENSG00000138663	COPS4	COP9 signalosome subunit 4
ENSG00000072506	HSD17B10	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 10
ENSG00000161920	MED11	mediator complex subunit 11
ENSG00000184983	NDUFA6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A6
ENSG00000240065	PSMB9	proteasome 20S subunit beta 9
ENSG00000100911	PSME2	proteasome activator subunit 2

Des Weiteren erfolgte ein Abgleich der Daten mit den Ergebnissen von Hernandez-Segura et al.. In diesem Fall handelt es sich bereits um eine Metaanalyse von sieben verschiedenen Expressionsprofilen von humanen Fibroblasten. Die Seneszenz der untersuchten Fibroblasten wurde auf unterschiedliche Weise induziert. Fünf der sieben Experimente basieren auf der Untersuchung des Transkriptom von replikativ seneszenten humanen Fibroblasten. Ein weiteres Datenset beschreibt das Expressionsprofil von durch Onkogenaktivität induziertem seneszenten Phänotyp humaner Fibroblasten. Das siebte Datenset ist auf das Transkriptom von humanen Fibroblasten zurückzuführen, die mit ionisierender Strahlung behandelt wurden. In der Summe ergibt die Metaanalyse eine differenzielle Genexpression von 2330 Genen, welche unabhängig ist von der Art der Seneszenzinduktion. Der zusätzliche Vergleich dieses Seneszenz-abhängigen Genexpressionsprofils mit der veränderten Genexpression von quieszenten Zellen reduziert die Anzahl der Gene, deren Expression durch zelluläre Seneszenz beeinflusst wird auf 1311. In diesem Fall ist eine Schnittmenge von 46 Genen zu verzeichnen, die in **Tabelle 34** zusammengefasst sind.

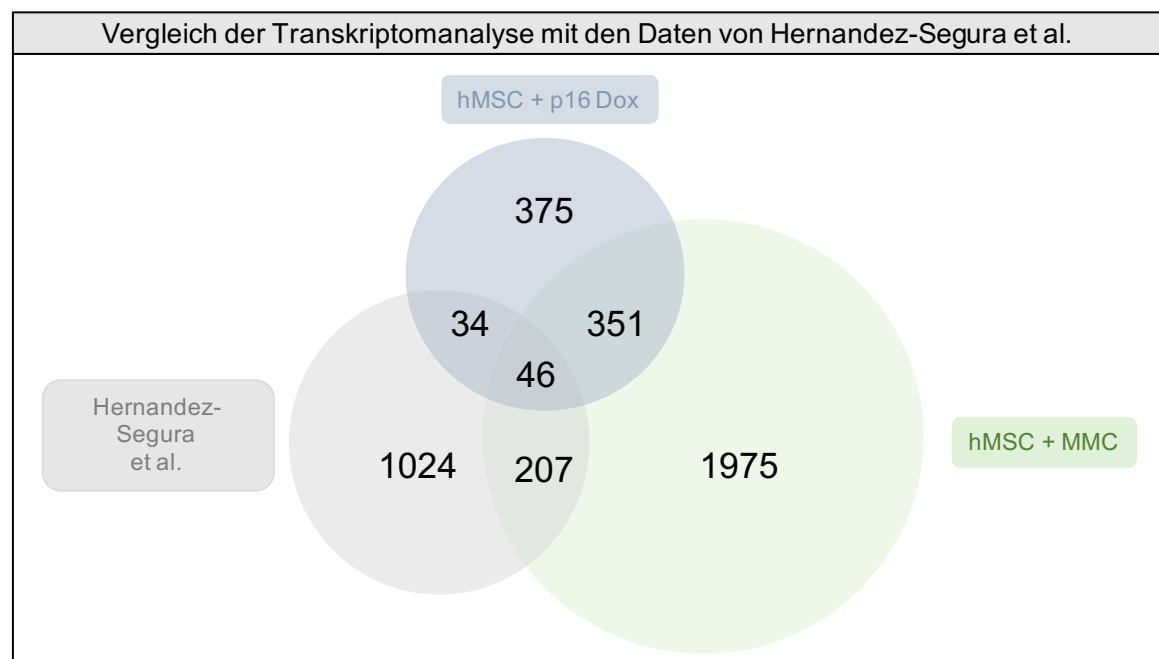


Abbildung 57: Das gemeinsame Expressionsprofil von humanen MSC und Fibroblasten, die in ihrem Zellzyklus arretiert wurden, zeigt 46 übereinstimmend regulierte Gene.

Die Abbildung zeigt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Form einer Metaanalyse der veränderten Genexpressionsprofile von seneszenten Fibroblasten (Hernandez-Segura et al. in grau), mit MMC behandelten hMSC (grün) und *p16^{INK4a}* überexprimierenden hMSC (blau) anhand absoluter Werte der beeinflussten Gene. Für die Untersuchung des Transkriptoms der seneszenten Fibroblasten wurden die replikativ-induzierte, von ionisierender Strahlung ausgelöste sowie durch Onkogenaktivität induzierte zelluläre Seneszenz betrachtet.

Tabelle 34: Erhöhte und erniedrigte Genexpression von humanen MSC und Fibroblasten induziert durch MMC Behandlung, p16^{INK4} Überexpression, replikative Seneszenz, ionisierende Strahlung und Onkogenaktivität

Erhöhte Expression		
ENSEMBL ID	Gen	Beschreibung
ENSG00000159346	ADIPOR1	Adiponectin Rezeptor
ENSG00000106367	AP1S1	adaptor related protein complex 1 subunit sigma 1
ENSG00000177556	ATOX1	antioxidant 1 copper chaperone
ENSG00000117410	ATP6V0B	ATPase H+ transporting V0 subunit b
ENSG00000131100	ATP6V1E1	ATPase H+ transporting V1 subunit E1
ENSG00000128524	ATP6V1F	ATPase H+ transporting V1 subunit F
ENSG00000027847	B4GALT7	beta-1,4-galactosyltransferase 7
ENSG00000254999	BRK1	BRICK1 subunit of SCAR/WAVE actin nucleating complex
ENSG00000105173	CCNE1 (CCND1)	cyclin E1
ENSG00000178449	COX14	cytochrome c oxidase assembly factor COX14
ENSG00000107175	CREB3 (CREBBP erniedrigt)	cAMP responsive element binding protein 3
ENSG00000129562	DAD1	defender against cell death 1
ENSG00000130311	DDA1	DET1 and DDB1 associated 1
ENSG00000134153	EMC7	ER membrane protein complex subunit 7
ENSG00000135414	GDF11	growth differentiation factor 11
ENSG00000255823	MTRNR2L8	MT-RNR2 like 8
ENSG00000102030	NAA10	N-alpha-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit
ENSG00000125356	NDUFA1	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A1
ENSG00000089818	NECAP1	NECAP endocytosis associated 1
ENSG00000228474	OST4	oligosaccharyltransferase complex subunit 4, non-catalytic
ENSG00000085998	POMGNT1	protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1 (beta 1,2-)
ENSG00000103769	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family
ENSG00000183155	RABIF	RAB interacting factor
ENSG00000157916	RER1	retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1
ENSG00000130066	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
ENSG00000132581	SDF2	stromal cell derived factor 2
ENSG00000113558	SKP1	S-phase kinase associated protein 1
ENSG00000140319	SRP14	signal recognition particle 14
ENSG00000143183	TMCO1	transmembrane and coiled-coil domains 1
ENSG00000054116	TRAPPC3	trafficking protein particle complex 3
ENSG00000106400	ZNHIT1	zinc finger HIT-type containing 1
Erniedrigte Expression		
ENSEMBL ID	Gen	Beschreibung
ENSG00000020181	ADGRA2	adhesion G protein-coupled receptor A2
ENSG00000204172	AGAP9	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 9
ENSG00000134909	ARHGAP32 (ARHGAP35)	Rho GTPase activating protein 32
ENSG00000049618	ARID1B (ARID2)	AT-rich interaction domain 1B
ENSG00000173068	BNC2	basonuclin 2
ENSG00000021826	CPS1	carbamoyl-phosphate synthase 1
ENSG00000143578	CREB3L4 (CREBBP)	cAMP responsive element binding protein 3 like 4
ENSG00000082458	DLG3	discs large MAGUK scaffold protein 3
ENSG00000068024	HDAC4	histone deacetylase 4
ENSG00000136636	KCTD3	potassium channel tetramerization domain containing 3
ENSG00000165671	NSD1	nuclear receptor binding SET domain protein 1
ENSG00000169071	ROR2	receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2
ENSG00000185591	SP1	Sp1 transcription factor
ENSG00000253304	TMEM200B (TMEM87B erhöht)	transmembrane protein 200B
ENSG00000179981	TSHZ1	teashirt zinc finger homeobox 1

Der Vergleich von Tabelle 29 und 31 zeigt eine Übereinstimmung der veränderten Genexpression von vier Genen in allen Datensets unabhängig vom Zelltyp und der Art der Seneszenzinduktion. Bei diesen betroffenen vier Genen handelt es sich um: *ATP6V1E1*, *CREB3L4*, *RAB11A* und *RER1*.

5 Diskussion

Die Thematik der zellulären Seneszenz darf sich aktuell eines großen wissenschaftlichen Interesses erfreuen. Bahnbrechend für diesen Aufschwung der zellulären Seneszenz waren die Entdeckungen, dass es sich bei dem Zellstadium der Seneszenz nicht ausschließlich um einen Schutzmechanismus vor entarteter Zellproliferation und einem Alterungsprozess der Zellen und dem Organismus in seiner Gesamtheit handelt. Seneszenten Zellen scheinen an weitaus mehr Prozessen beteiligt zu sein als bisher bekannt ist. Neben der Embryogenese konnte für verschiedene Regenerationsprozesse eine Beteiligung von seneszenten Zellen nachgewiesen werden. Die Rolle der zellulären Seneszenz für die Knochenhomöostase und Knochenregeneration blieb bislang noch unerforscht und sollte im Zuge dieser Arbeit näher betrachtet werden.

Für die Beurteilung des Einflusses der zellulären Seneszenz auf die Knochenhomöostase wurden Mausmodelle mit einer jeweiligen Defizienz für die Seneszenzmarker $p21^{WAF-1/Cip-1}$ und $p16^{INK4a}$ verwendet. Die Auswertung der Knochendichte mittels μ CT Analyse zeigte keine signifikanten Veränderungen der kortikalen und trabekulären Knochenparameter von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ oder $p16^{INK4a}$ -defizienten Mäusen. Bei einem zeitgleichen *Knockout* von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ und $p16^{INK4a}$ konnte hingegen eine Reduktion der trabekulären Knochendichte, aufgrund einer verringerten Trabekelanzahl beobachtet werden.

Eine gesteigerte Expression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in den frühen Phasen der Knochenregeneration deuten auf einen Einfluss dieser Faktoren auf diesen Prozess hin.

Bei der Betrachtung des standardisierten Knochenregenerationsmodelles konnte kein Einfluss einer $p16^{INK4a}$ -Defizienz auf das Ergebnis des Regenerationsprozesses festgestellt werden. Weder der globale *Knockout* noch eine zeitlich auf den Regenerationsprozess limitierte $p16^{INK4a}$ -Defizienz führt zu einer Beeinträchtigung der Knochenregeneration.

Untersuchungen der osteogenen Differenzierung von $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Calvaria Osteoblasten *in vitro*, zeigen hingegen ein gesteigertes Differenzierungspotenzial der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen.

Die im Folgenden entworfene Klonierungsstrategie für die induzierte Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ in hMSC konnte erfolgreich umgesetzt werden. Diese führt zur verringerten Zellproliferationskapazität der Zellen sowie einer gesteigerten Wirkung von Senolytika auf die Zellen. Auch die Genexpressionsprofile von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden Zellen weisen Merkmale von seneszenten Zellen auf, differieren jedoch zu den Genexpressionsprofilen von MMC behandelten hMSC.

5.1 Charakterisierung des Cdkn2a^{tm1b} Mausmodells

Im Jahr 2013 erfuhr die Forschung der zellulären Seneszenz neuen Aufschwung. Storer et al. und Muñoz-Espin et al. revolutionierten die Sicht auf das seneszente Zellstadium anhand ihrer unabhängigen Publikationen, die ein temporäres Vorkommen von seneszenten Zellen im Verlauf der Embryogenese zeigten. Basierend auf diesen beiden Veröffentlichungen erfolgte eine erste Evaluierung des Cdkn2a^{tm1b} Mausmodells, welches im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurde.

Storer et al. nutzten die SA-βGal Färbung als Nachweis für seneszente Zellen während unterschiedlicher muriner embryogener Entwicklungsschritte. Anhand dieser Methode konnten SA-βGal positive Zellen im Bereich des apikalen ektodermalen Kammes (*engl. apical ectodermal ridge* =AER) zu den Zeitpunkten E11,5-E14,5 nachgewiesen werden. Des Weiteren erfolgte ein Nachweis SA-βGal positiver Zellen für die Ohrenanlage (E10,5), den Schwanz (E14,5), das Hinterhirn (E11,5) und das Neuralrohr (E11,5). Eine vergleichende Analyse des Transkriptom des AER an Tag E11,5 der Embryogenese (546 Gene) und dem Transkriptom von OIS Markern (4937 Gene) weist eine Übereinstimmung von 271 regulierten Genen auf. Unter diesen befinden sich auch die Seneszenzmarker p21^{WAF-1/Cip-1} und TGFβ. Hingegen konnte p16^{INK4a} im AER nicht nachgewiesen werden. Auch Marker für DNA-Schädigung konnten im Zusammenhang mit der Seneszenz, die im Zuge der Embryogenese beobachtet wurde, nicht detektiert werden.

Muñoz-Espin et al. konnten im Verlauf der murinen Embryogenese (E11,5-E15,5) SA-βGal positive Zellen im Mesonephrischen Tubulus und im Endolymphatischen Sack nachweisen. Im Einklang mit den Ergebnissen von Storer et al., konnte im Zuge der embryonalen Seneszenz auch p21^{WAF-1/Cip-1} und TGFβ detektiert werden, nicht aber p16^{INK4a} oder Marker für DNA-Schädigung. Die Annahme, dass p16^{INK4a} keinen Einfluss auf die zelluläre Seneszenz im Zuge der Embryogenese hat, konnte mit unseren Ergebnissen bestätigt werden. So konnte die *Cdkn2a* Genexpression während der murinen Embryogenese nicht indirekt über den β-Galactosidasereporter im Cdkn2a^{tm1b} Mausmodell nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 21**).

Der p16^{INK4a} *Knockout* konnte zuvor auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden (**Abbildung 18**). Zudem zeigten isolierte MEFs von Ckn2a^{tm1b/tm1b} Embryonen eine gesteigerte Proliferationsrate, welches auf eine p16^{INK4a}-Defizienz schließen lässt (**Abbildung 19**). Um die Integrität des β-Galactosidasereporters unter der Kontrolle des Cdkn2a Promotors im Cdkn2a^{tm1b} Mausmodell bestätigen zu können, wurde die zelluläre Seneszenz in MEFs von Cdkn2a^{+/+}, Cdkn2a^{+ /tm1b} und Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tieren mittels ionisierender Strahlung induziert (**Abbildung 20**). Es zeigte sich eine positive X-Gal Färbung für Cdkn2a^{+ /tm1b} in Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Zellen. Interessanterweise reagieren auch die Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Zellen auf die ionisierende Strahlung, sodass die Zellzahl bestrahlter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant reduziert ist. Allerdings ist der Effekt der ionisierenden Strahlung auf die Cdkn2a^{+/+} Zellen am

stärksten. Hier ist auch die charakteristische morphologische Zellvergrößerung zu erkennen. Dies ist bei den $Cdkn2a^{tm1/tm1b}$ Zellen wiederum nicht möglich. Lediglich für die $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Zellen kann dieser Effekt nach Bestrahlung beobachtet werden, wenngleich er sich nicht so ausgeprägt zeigt wie für die $Cdkn2a^{+/+}$ Zellen.

5.2 $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Mäuse weisen einen unveränderten Knochenphänotyp auf

Die Auswirkungen einer Unterbindung der zellulären Seneszenz auf die Knochenmorphologie im Alter wurden bereits mit verschiedenen Mausmodellen adressiert und untersucht. Unter Verwendung des INK-ATTAC Mausmodells konnten Farr et al. eindrucksvoll demonstrieren, dass eine Depletierung der $p16^{INK4a}$ positiven seneszenten Zellen den Effekt der altersbedingten Knochendegeneration aufhebt. Die Autoren untermauerten den Zusammenhang zur zellulären Seneszenz, indem sie denselben Effekt mit zwei weiteren Modellen nachwiesen. Zunächst behandelten sie Wildtypiere mit einer Kombination aus Dasatinib und Quercetin. Der Tyrosinkinase-Inhibitor und das Flavonol gehören zu der Gruppe der Senolytika, Stoffe welche die anti-apoptischen Signalkaskaden von seneszenten Zellen unterbinden. Jedoch lassen die Autoren den Nachweis der Depletierung von seneszenten Zellen im Knochengewebe nach D+Q Behandlung vermissen. Dieser erfolgte nur indirekt über eine SA- β Gal Färbung des perigonadalen Fettgewebes, der $p16^{INK4a}$ Genexpression der Osteozyten-angereicherten Zellpopulation und einer Färbung für SADS (*senescence-associated distension of satellites*) des kortikalen Knochens der Diaphyse.

Die Ergebnissen von Farr et al. werden jedoch durch Publikationen in Frage gestellt, die unabhängig der Betrachtung von zellulärer Seneszenz, der alleinigen Gabe von Dasatinib und Quercetin einen osteoanabolen Effekt zuschreiben (Garcia-Gomez et al., 2012) (Siddiqui et al., 2011) (Forte et al., 2016) (Y. Zhou et al., 2015).

Ferner beschreiben Farr et al., einen osteoanabolen Effekt des JAK Inhibitors Ruxolitinib im Rahmen der altersbedingten Knochendegeneration im murinen Organismus. Doch auch in diesem Fall ist der Bezug zur zellulären Seneszenz mit Vorsicht zu genießen. So begründen aktuelle Publikationen die zunehmende Knochendichte bei einer JAK Inhibierung mit einem stimulierenden Effekt auf die Osteoblastenfunktion (Adam et al., 2020) (J. Clarke, 2020). Dieser Effekt konnte in jungen gesunden Mäusen beobachtet werden. Dies spricht für eine positive osteoanabole Wirkung der JAK Inhibitoren, der nicht ausschließlich in einer Reduktion der SASP Antwort von seneszenten Zellen begründet liegen kann. Die Population von seneszenten Zellen im Knochengewebe von jungen gesunden Tieren ist mutmaßlich verschwindend gering. Genau wurde dies bislang jedoch nicht untersucht. So wurde auch der Einfluss der zellulären Seneszenz auf die Knochenhomöostase in jungen adulten Mäusen bislang in keiner Veröffentlichung

beschrieben und diskutiert und war Fokus dieser Arbeit unter Verwendung des *Cdkn2a^{tm1b} Gene Trap* Mausmodells.

Da *p16^{INK4a}*-defiziente Mäuse zur Bildung von Osteosarcomen tendieren, könnte bereits in jungen Tieren eine veränderte Knochenmorphologie vorliegen. Um dies zu untersuchen, haben wir den Knochenphänotyp von weiblichen und männlichen *Cdkn2a^{tm1b/tm1b}* Tieren im Alter von 12 Wochen untersucht (**4.1.4**). Überraschenderweise zeigte sich im Vergleich zu *Cdkn2a^{+/+}* Tieren ein unbeeinträchtigter Knochenphänotyp der *Cdkn2a^{tm1b/tm1b}* Tiere.

Diese Beobachtungen sind auch deshalb erstaunlich, da isolierte Osteoblastenvorläuferzellen und MEFs von *Cdkn2a^{tm1b/tm1b}* Tieren eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen (**4.1.1**). Des Weiteren verläuft auch die Differenzierung der Osteoblastenvorläuferzellen zu Osteoblasten *in vitro* rascher ab (**Abbildung 39**). Es stellt sich also die Frage, welche Mechanismen *in vivo* greifen, sodass ein Einfluss auf den Knochenphänotyp ausbleibt. Eine mögliche Erklärung könnte in einer zeitgleich gesteigerten Osteoklastogenese und somit einem erhöhten *Boneremodeling* begründet liegen. Mit zunehmendem Alter gerät das empfindliche Gleichgewicht der murinen Knochenhomöostase aus dem Gleichgewicht und die Tiere entwickeln ab einem Alter von etwa 6 Monaten verstärkt Osteosarcome und Lymphome (Nielsen, Burns, Rosenberg, & Louis, 1998) (Song et al., 2014) (Sharpless et al., 2001).

Interessanterweise konnten wir auf Genexpressionsebene eine erhöhte Expression von *p21^{WAF-1/Cip-1}* im Knochengewebe von *Cdkn2a^{tm1b/tm1b}* Tieren nachweisen (**Abbildung 18**). Dies deutet auf einen kompensatorischen Effekt hin, um die unterbundene *p16^{INK4a}* Expression auszugleichen.

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen untersuchten wir auch den Knochenphänotyp von *p21^{WAF-1/Cip-1}KO* Mäusen. Auch hier zeigte sich eine unbeeinträchtigte Knochendichte der langen Röhrenknochen, veranschaulicht an der Tibia (**Abbildung 25**). Zeitgleich sind die Genexpressionslevel von *p16^{INK4a}* erhöht (**Abbildung 27**). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass bei einer Dysfunktion des *p16^{INK4a}* vermittelten Zellzyklusarrestes, der Zellzyklusarrest verstärkt über die *p21^{WAF-1/Cip-1}* Signalkaskade initiiert wird und umgekehrt.

Zusätzlich konnte bei vorliegender Defizienz für *p21^{WAF-1/Cip-1}* eine Akkumulation der Adipozyten im Knochenmark festgestellt werden (**Abbildung 26**). Dies deutet auf eine entscheidende Rolle von *p21^{WAF-1/Cip-1}* für die Adipogenese hin. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Angaben in der Literatur. So wurde bereits 2004 von Naaz et al. beschrieben, dass die Defizienz von *p21^{WAF-1/Cip-1}* im Mausmodell zur Hyperplasie von Adipozyten führt (Naaz et al., 2004) (Inoue et al., 2008).

Um den Einfluss der zellulären Seneszenz auf den Knochenphänotyp untersuchen zu können, wurde im Folgenden ein Mausmodell verwendet, welches eine Defizienz sowohl für *p16^{INK4a}* als auch für *p21^{WAF-1/Cip-1}* aufweist. Folglich kann weder über *p16^{INK4a}* noch über *p21^{WAF-1/Cip-1}* der Seneszenz-abhängige vorzeitige Zellzyklusarrest vermittelt werden. In der Tat wies der Knochenphänotyp der DKO Mäuse eine reduzierte trabekuläre Knochendichte basierend auf einer

reduzierten Trabekelanzahl auf. Die weitere Analyse der Genexpression verschiedener Knochenmarker zeigt, dass der allgemeine *Bone Turnover* erniedrigt scheint und ursächlich für die geringe trabekuläre Knochendichte ist. Unklar bleibt, ob der beobachtete Effekt eines *p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}*-DKO auf den Knochenphänotyp ursächlich mit einer unterbundenen zellulären Seneszenz in Verbindung gebracht werden kann. Eventuell handelt es sich um eine negative Auswirkung des verhinderten temporären und reversiblen Zellzyklusarrest, der für Zelldifferenzierungsprozesse notwendig ist.

Die Ergebnisse der untersuchten Knochenmorphologie während der Knochenhomöostase in jungen adulten Tieren deutet darauf hin, dass der Einfluss von *p16^{INK4}* positiven seneszenten Zellen zu vernachlässigen ist. Mit zunehmendem Alter gerät dieses Gleichgewicht jedoch immer weiter aus den Fugen und eine *p16^{INK4a}*-Defizienz zeigt Auswirkungen auf den Knochenphänotyp, die eventuell auf die zusätzliche Abwesenheit/Reduktion von seneszenten Zellen im Knochen zurückzuführen sind, wie bereits von Farr et al. beschrieben wurde. Doch auch in jungen Tieren kann dieses feine Gleichgewicht der Knochenhomöostase durch Krankheit oder Verletzung gestört werden und spiegelt sich in negativen Auswirkungen auf den Knochenphänotyp wider. Da bereits Demaria et al. in ihrer Publikation seneszenten Zellen einen signifikanten Einfluss auf regenerative Prozesse der Haut unter Verwendung eines Mausmodells mit induzierter temporärer Depletierung von *p16^{INK4a}* positiven Zellen zuschreiben konnten, sollte neben der Knochenhomöostase auch die Knochenregeneration mit dem *Cdkn2a^{tm1b}* Mausmodell weiter untersucht werden (Demaria et al., 2014).

5.3 Die Qualität der Knochenregeneration ist unabhängig von einer *p16^{INK4a}*-Defizienz

Für Wildtypmäuse konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *p16^{INK4a}*, *p19^{Arf}* und *p21^{WAF-1/Cip-1}* in den Kallusproben der frühen Knochenregenerationsphasen erhöht ist (**Abbildung 31**). Dies deutet auf eine durch die Verletzung des Knochens initiierte Expression der Zellzyklusinhibitoren hin. Um im Folgenden zu untersuchen, ob eine veränderte Expression der Seneszenzmarker die Knochenheilung positiv oder negativ beeinflusst, wurden standardisierte Osteotomien mit dem *Cdkn2a^{tm1b}* Mausmodell durchgeführt. Die μ CT-Auswertungen 21 Tage nach induzierter Fraktur zeigen eine vollständige Überbrückung des Frakturspalt durch neu gebildetes Knochengewebe der *Cdkn2a^{tm1b/tm1b}* Tiere (**Abbildung 33**). Im Vergleich zu Wildtyptieren konnte in dieser abschließenden Phase des Knochenregenerationsprozesses kein Unterschied festgestellt werden. Erweitert man die Auswertung und schließt zusätzlich noch *Cdkn2a^{+ /tm1b}* Tiere mit ein, wird eine überschießende Knochenformation im Frakturspalt deutlich (**Abbildung 34**). Es handelt sich in diesem Fall jedoch um noch vorläufige Ergebnisse, mit denen sich lediglich eine Tendenz beschreiben lässt, da nur vier *Cdkn2a^{+ /tm1b}* Tiere untersucht wurden.

Diese Beobachtung konnte auch zu einem früheren Analyszeitpunkt, 14 Tage nach Osteotomie, bestätigt werden (**Abbildung 35**). Die Synthese von neuem Knochengewebe findet bei $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Tieren im Vergleich zu $Cdkn2a^{+/+}$ Tieren verstärkt statt. Allerdings sei auch in diesem Fall auf die geringe Probenanzahl ($n=3$) der $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Tiere hingewiesen.

Die überschießende Knochenregeneration der $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Tiere scheint im Einklang mit der verstärkten Proliferation und osteogenen Differenzierung von murinen $Cdkn2a^{+/tm1b}$ und $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Osteoblastenvorläuferzellen zu stehen. Dieser Effekt sollte in Anbetracht der *in vitro* Ergebnisse für $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Tiere sogar deutlich stärker ausgeprägt sein. Jedoch konnte mittels der standardisierten Osteotomieversuche kein direkter Einfluss des globalen $p16^{INK4a}$ Knockouts auf den Prozess der Knochenregeneration nachgewiesen werden.

Dieser Dosis-abhängige Effekt der $p16^{INK4a}$ -Defizienz auf die Knochenregeneration sollte im Folgenden weiter untersucht werden. Zudem ist im $Cdkn2a^{tm1b}$ Mausmodell neben der $p16^{INK4a}$ Genexpression zeitgleich auch die Expression von $p19^{Arf}$ in hetero- und homozygoten Tieren negativ beeinflusst (**Abbildung 18**). Dies erschien auf den ersten Blick kein Nachteil dieses Mausmodells zu sein, da sowohl die Expression von $p16^{INK4a}$ und $p19^{Arf}$ in den initialen Phasen der Knochenregeneration induziert wird. Um nun gezielt den Einfluss einer reduzierten $p16^{INK4a}$ Expression auf die Knochenregeneration untersuchen zu können, wurde in weiteren Versuchen das p16-3MR Mausmodell verwendet (siehe **3.1.2**). Die Versuche mit dem $Cdkn2a^{tm1b}$ Mausmodell zeigten den größten Effekt 14 Tage nach Osteotomie. Demzufolge wurde in weiteren Experimenten der Fokus auf die Dynamik des Regenerationsprozesses gelegt. So konnte bereits für die Wundheilung beschrieben werden, dass sich der positive Effekt seneszenten Zellen auf die Regenerationskinetik, nicht aber auf das Regenerationsresultat, auswirkt (Demaria et al., 2014).

5.4 Die temporäre Depletierung von $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellen zeigt keinen positiven Einfluss auf die Knochenregenerationskinetik

Die Auswertung der Knochenregeneration von transgenen p16-3MR Mäusen, die während der Regenerationsphase mit GCV behandelt wurden, zeigte keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den mit GCV behandelten WT Tieren. Um die Wirkung von GCV nachzuweisen, wurde die RNA der linken Tibia isoliert und mittels qRT-PCR die relative Genexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ untersucht. Die GCV Behandlung der Tiere dieser Arbeit erfolgte nach den Angaben von (Demaria et al., 2014). Bereits Kim et al. veröffentlichten Daten, die deutlich machen, dass die GCV vermittelte Eliminierung von $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellen gewebespezifisch ist (Kim et al., 2019). Kim et al. konnten bei einer Langzeitbehandlung der p16-3MR Tiere von 12 Monaten eine Reduktion der $p16^{INK4a}$ Expression nach GCV Behandlung auf Proteinebene nachweisen. Jedoch konnte dieser Nachweis nur für Gehirn- und Lebergewebe nicht aber für die Osteozyten reiche Diaphyse erfolgen. Eine Begründung für diese selektive Wirkweise der GCV-vermittelten Depletierung von $p16^{INK4a}$ positiven Zellen lassen die Autoren an dieser Stelle vermissen. Joshua

N. Farr und Sundeep Kohsla geben als mögliche Ursache in ihrem Review die molekulare Größe von GCV an, welche einem Eindringen des Moleküls in die kompakten Knochenstrukturen entgegenwirkt (Farr & Khosla, 2019). Wahrscheinlicher ist hier jedoch die Annahme, dass Osteozyten terminal differenzierte Zellen sind und folglich keine Zellteilung der Osteozyten mehr stattfindet. Einer GCV vermittelten Depletierung von p16^{INK4a} exprimierenden Osteozyten im p16-3MR Mausmodell widersprechen so zwei wichtige Argumente. Auf der einen Seite können Osteozyten per Definition nicht seneszent werden, da der Zustand der zellulären Seneszenz lediglich vorliegt, wenn der ursprüngliche Zustand der seneszenten Zelle ein mitotisch aktiver Zustand wäre. Terminal differenzierte Osteozyten hingegen sind nicht mehr mitotisch aktiv. Zum anderen kann eine GCV vermittelte Zellapoptose nur ausgelöst werden, wenn es zur DNA-Replikation im Zuge der Zellteilung kommt (Matic et al., 2016). Entsprechend kann in Osteozyten keine GCV vermittelte Apoptose stattfinden.

Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die Reduktion der p16^{INK4a} positiven Zellen in Gehirn und Leber bei einer Therapie mit GCV über einen Zeitraum von 12 Monaten erfolgt, diese aber nicht einer vollständigen Depletierung der entsprechenden Zellen entspricht. Im Einklang mit den Ergebnissen von Kim et al. konnte auch in unseren Analysen nur eine geringfügige und keine vollständige Reduktion der p16^{INK4a} Expression im Knochengewebe beobachtet werden. Eine Analyse der p16^{INK4a} Genexpression ist den Daten der Publikation von Kim et al. nicht zu entnehmen. Der Nachweis erfolgte in diesem Fall nur auf Proteinebene mittels Western Blot. Ein ungewöhnliches Vorgehen, da in Fachkreisen bekannt ist, dass die Antikörper zur Detektion von murinem p16^{INK4a} schlecht zu funktionieren scheinen und eine Analyse auf RNA Ebene als deutlich verlässlicher gilt (Patil et al., 2019).

Des Weiteren zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die geringfügige GCV vermittelte Reduktion der p16^{INK4a} Expression im p16-3MR Mausmodell die Knochenregeneration nicht zu beeinträchtigen scheint. So sind 14 Tage nach Induktion der Fraktur mittels μ CT Untersuchungen keine Unterschiede der Knochendichte des neu gebildeten Knochengewebes im Vergleich zu Wildtyp Tieren, die ebenfalls mit GCV behandelt wurden, zu erkennen. Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, da eine unvollständige p16^{INK4a} Depletierung im Cdkn2a^{tm1b} Mausmodell mit einer überschießenden Kallusproduktion in der Frakturheilung einhergeht. Möglicherweise liegt dieser Unterschied in der zeitgleichen Beeinträchtigung der p19^{Arf} Expression im Cdkn2a^{tm1b} Mausmodell begründet. Eine weitere Erklärung könnte die geringe Wirkung der GCV vermittelten Depletierung von p16^{INK4a} exprimierenden Zellen im Knochengewebe liefern. So konnten Kim et al. überraschenderweise in ihren Untersuchungen ebenfalls keinen Einfluss einer GCV Behandlung der p16-3MR Tiere auf eine altersbedingte Knochendegeneration feststellen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit den Ergebnissen von Farr et al., die unter Verwendung des INK-ATTAC Mausmodelles genau diesen positiven Effekt auf den altersbedingten osteoporotischen Knochenphänotyp feststellen konnten (Farr et al., 2017). Bei dem INK-ATTAC Mausmodell handelt es sich um ein *Suicide* Transgen, welches für Caspase 8 unter der Regulation

des $p16^{INK4a}$ Promotors kodiert. Die Apoptose von $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellen wird im INK-ATTAC-Mausmodell unter der Gabe von AP20187 induziert. Das Prinzip, welches den beiden Mausmodellen $p16$ -3MR und INK-ATTAC zugrunde liegt ist gleich: die Expression des Transgens unterliegt dem $p16^{INK4a}$ Promotor. Wird dieses exprimiert und zeitgleich GCV oder AP20187 appliziert, werden die Zellen, die das Transgen exprimieren, depletiert. Der Unterschied der beiden Mausmodelle liegt im Wirkmechanismus der induzierten Zelldepletierung. Die Depletierung der $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellen ist unter Verwendung des INK-ATTAC Mausmodells nicht abhängig von Zellproliferationsprozessen. Dieser Unterschied könnte eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen.

5.5 $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierende hMSC als Modell zur Untersuchung der Eigenschaften von seneszenten Zellen

Parallel zu den Untersuchungen im murinen Mausmodell wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Modell entwickelt, um gezielt den Einfluss der Zellzyklusinhibitoren $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ auf die Etablierung der zellulären Seneszenz im humanen System zu untersuchen. Zeitgleich soll eine Charakterisierung der Zellen, insbesondere im direkten Vergleich mit anderen Seneszenz-Induktionsmethoden, einen Beitrag zur Beschreibung und Vereinheitlichung der zellulären Seneszenz leisten.

Die Klonierung von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Konstrukten konnte erfolgreich im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt werden. Zum Nachweis wurden die Konstrukte sequenziert (Daten nicht gezeigt) und die Expression auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen (**4.3.2**). Die Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ führt in hMSC zur Ausprägung seneszenten Merkmale. So weisen die Zellen eine vergrößerte Morphologie und eine reduzierte Proliferationskapazität auf (**4.3.3**). Auch die Verwendung von Senolytika initiiert verstärkt die Apoptose in $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden Zellen. Als Kontrollreferenz wurde in den Experimenten die MMC Behandlung von hMSC verwendet. Die Stimulation von hMSC mit dem Zytostatikum ist eine etablierte Methode der Seneszenzinduktion. Die Beeinträchtigung der Proliferationskapazität der hMSC war bei einer MMC Behandlung am größten und bei induzierter Expression von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ am schwächsten. Die Überexpression von $p16^{INK4a}$ bedingt eine Reduktion der Zellproliferation, die sich in ihrer Ausprägung zwischen dem Effekt der MMC Behandlung und einer gesteigerten $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Expression einordnen lässt. Dieses Ergebnis lässt sich auf die Gesamtheit der untersuchten Seneszenzmerkmale übertragen. Eine mögliche Begründung für die unterschiedliche Ausprägung der Effekte einer $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression auf die Zelle kann durch die unterschiedlichen Integrationsstellen der Transposon-DNA erfolgen (G. Liu et al., 2005) (Yant et al., 2005).

5.6 Primäre Daten zur Untersuchung des Differenzierungspotenzials von hMSC mit erhöhten $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Expressionsleveln deuten auf einen inhibierenden Effekt hin

Neben der Zellproliferation ist auch die Zelldifferenzierung ein wichtiger Bestandteil von regenerativen Prozessen. Damit sich eine Zelle teilen und somit Zellproliferation ermöglicht werden kann, muss der Zellzyklus vollständig durchlaufen werden. Hingegen ist für eine weitere Spezialisierung einer Zelle in ihrer Funktion ein temporärer Zellzyklusarrest notwendig (V. C. Li & Kirschner, 2014). So konnte auch für die Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ eine Beteiligung an Zelldifferenzierungsprozessen beschrieben werden (Stein, Drullinger, Soulard, & Dulic, 1999) (Kreis, Louwen, & Yuan, 2019).

Die Untersuchung der Genexpression während der erfolgreichen osteogenen Differenzierung von hMSC konnte zeigen, dass es zu einer gesteigerten Expression von $p16^{INK4a}$ nicht aber von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ im Verlauf von diesem Prozess kommt. Diese, durch den Differenzierungsprozess induzierte, Expression von $p16^{INK4a}$ wurde bislang in wissenschaftlicher Literatur noch nicht beschrieben.

Mittels der induzierbaren Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ konnte die Wirkung dieser beiden Zellzyklusinhibitoren auf humane Differenzierungsprozesse weiter untersucht werden. Analysiert wurde sowohl die osteogene als auch die adipogene Differenzierung. Die chondrogene Differenzierung wurde, aufgrund der für diesen Versuch notwendigen hohen Zellzahl, nicht adressiert. Für diese Versuche wurden *GFP* überexprimierende Zellen als Kontrollen mitgeführt. Mittels dieser Kontrollen soll ausgeschlossen werden, dass durch die alleinige Überexpression eines Proteins Zelldifferenzierungsprozesse beeinflusst werden.

Überraschenderweise zeigte sich sowohl für die osteogene als auch die adipogene Differenzierung eine inhibierende Wirkung vermittelt durch eine induzierte $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression der hMSC. Zusammenfassend konnte für die osteogene Differenzierung ein positiver Effekt eines globalen $p16^{INK4a}$ Knockouts im Mausmodell beobachtet werden, während die anhaltend gesteigerte Expression von $p16^{INK4a}$ in hMSC die osteogene Differenzierung unterbindet. Zeitgleich ist jedoch eine geringe Zunahme der $p16^{INK4a}$ Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSC zu verzeichnen. Möglicherweise differenzieren $p16^{INK4a}$ -defiziente Zellen unter einer temporär gesteigerten Expression anderer Zellzyklusinhibitoren wie $p21^{WAF-1/Cip-1}$. Ist der Zellzyklusarrest jedoch irreversibel, durch eine dauerhafte Expression von $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ unterbunden, ist eine erfolgreiche Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten nicht möglich. So handelt es sich bei der gesteigerten Expression von $p16^{INK4a}$ während des osteogenen Differenzierungsprozesses von hMSC wahrscheinlich um einen zeitlich limitierten Effekt.

5.7 Die Genexpressionsprofile von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ positiven und mit MMC behandelten hMSCs differieren

Für seneszente Zellen gibt es diverse Marker, die in der Literatur beschrieben werden. Es gibt keinen alleinigen Marker für Seneszenz. Aus diesem Grund lässt sich der Zellstatus einer Zelle nur anhand des Zusammenspiels von mehreren verschiedenen Markern als seneszent bestimmen. Da die Eigenschaften von zellulärer Seneszenz jedoch stark variieren, je nach betroffener Zellart und auslösendem Seneszenzstimulus, herrscht aktuell kein allgemeiner Konsens darüber anhand welcher Kriterien sich Seneszenz feststellen lässt. Im Gegenteil, für nahezu jede wissenschaftliche Fragestellung wird sich auf eine Zusammensetzung unterschiedlicher Marker für den Nachweis seneszenten Zellen berufen. Um dieses Problem zu adressieren und die zelluläre Seneszenz anhand einheitlicher Merkmale, unabhängig von Zellart und Seneszenzstimulus, definieren zu können, wurden verschiedene Transkriptomanalysen verglichen. In der Arbeit von Hernandez-Segura et al. wurde eine *senescence core signature* beschrieben, die sich aus 13 Genen zusammensetzt, deren Expression durch das Stadium der Seneszenz gesteigert oder reduziert wird. Besonders interessant an den Ergebnissen ist, dass sich unter den 13 Genen weder $p16^{INK4a}$ noch $p21^{WAF-1/Cip-1}$ befinden. Zwar war die Expression von $p21^{WAF-1/Cip-1}$ jeweils erhöht, jedoch ist dies auch der Fall für quieszente Zellen, sodass $p21^{WAF-1/Cip-1}$ als eindeutiger Marker für Seneszenz ausgeschlossen wurde. Ein Einfluss auf die $p16^{INK4a}$ Expression konnte hingegen nicht für alle untersuchten Datensets nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind überaus interessant, da für die systematische Untersuchung von seneszenten Fragestellungen *in vivo* primär $p16^{INK4a}$ Mausmodelle verwendet werden. Die $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden hMSC bieten nun die Möglichkeit diese Ergebnisse von Hernandez-Segura et al. weiter zu untersuchen. So sollte eine Transkriptomanalyse der hMSC zeigen, inwiefern diese Zellen ein übereinstimmendes Expressionsprofil zu bereits publizierten Daten von seneszenten Zellen zeigen. Es handelt sich jedoch um vorläufige Daten, da sich diese auf die Untersuchung von biologischen Duplikaten beziehen, also den transfizierten und stimulierten Zellen von zwei verschiedenen Spendern. Die Analyse des Triplikates steht noch aus. Als Seneszenzreferenz wurde auf mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelte hMSC zurückgegriffen. Die Evaluierung ausgewählter Zielgene von MMC behandelten Zellen zeigt eine erhöhte Expression von $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF-1/Cip-1}$ und $p53$ sowie eine Reduktion von $LMNB1$. Es handelt sich um ein zu erwartendes Expressionsprofil. Die induzierte Überexpression von $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ beeinträchtigt die $p53$ Expression hingegen nicht. Allerdings zeigt sich auch für $LMNB1$ eine deutliche Reduktion der Expression. Zusätzlich wurde auch die Expression zweier Gene untersucht, $PLXNA3$ und $GDNF$, die der *senescence core signature* zugeordnet wurden. Die Expression von $PLXNA3$ ist weder von der MMC Behandlung noch von einer $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Überexpression beeinflusst. Die gesteigerten Expressionslevel von $GDNF$ hingegen entsprechen der beschriebenen *senescence core signature*. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden, wenn die Zellen durch eine induzierte $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF-1/Cip-1}$

Expression in den Zellzyklusarrest getrieben wurden. Alleine die Stichprobe der beiden Marker der *senescence core signature* zeigt, dass die Allgemeingültigkeit dieser fragwürdig bleibt. So scheint eine Übertragung der Seneszenzmarker auf hMSC, die mit MMC stimuliert wurden, nicht möglich. Zeitgleich wird die Varianz der Transkriptomdaten der unterschiedlich induzierten Zellzyklusarreste deutlich.

Um dies genauer zu untersuchen wurden die RNA-Proben der hMSC mittels RNA-Sequenzierung weiter untersucht. Es zeigte sich eindeutig eine große Variabilität der Daten, die auf die unterschiedlichen Spender zurückzuführen ist. Da zu diesem Zeitpunkt nur biologische Duplikate vorlagen, zeitgleich aber die Daten der unterschiedlichen Zeitpunkte (10 Tage und 20 Tage nach MMC Behandlung oder beginnender Doxycyclin-Stimulation) clustern, wurde eine Auswertung in Unabhängigkeit des Zeitpunktes durchgeführt. Hier zeigten sich in den MA Plots keine signifikant veränderten Genexpressionen für die induziert überexprimierenden *p21^{WAF-1/Cip-1}* Zellen im Vergleich zu transfizierten unstimulierten hMSC. Eine mögliche Ursache kann entweder in einer hohen *leakiness*, das bedeutet einer bereits erhöhten Expression des Transgens ohne einer Doxycyclin-Stimulation, begründet liegen oder in der Integration des Transgens in einen schlecht transkribierbaren Bereich.

Die größte Varianz der Genexpression zeigte sich im Vergleich zwischen den Kontrollzellen und den MMC-behandelten hMSC. Die Expression von 2579 Genen ist durch die Anwendung des Zytostatikums verändert. Der Vergleich der Genexpression von *p16^{INK4a}* transfizierten hMSC ohne und mit Doxycyclin Stimulation resultiert in einer beeinflussten Expression von 806 Genen. Es zeigte sich in beiden Fällen keine Übereinstimmung zu der von Hernandez-Segura et al. beschriebenen *senescence core signature*. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Vergleich der RNA-Sequenzierungsdaten der MMC behandelten und der *p16^{INK4a}* überexprimierenden hMSC mit bereits publizierten Daten zum Genexpressionsprofil von replikativ seneszenten hMSC (1955 vorgenommen (Wagner et al., 2009). Eine Metaanalyse der Daten von MMC-behandelten hMSC, *p16^{INK4a}* überexprimierenden hMSC und der Daten von Wagner et al. zeigt eine Übereinstimmung der veränderten Genexpression von 29 Genen. Weitere 12 Gene weisen zwischen den Gruppen eine gegensätzliche Regulation der Expression auf. In einem weiteren Schritt wurden die Daten mit den Expressionsprofilen von Fibroblasten nach unterschiedlichen Seneszenzinduktionen verglichen (Hernandez-Segura et al., 2017). Die Metaanalyse zeigt eine Übereinstimmung der differentiellen Genexpression von 46 Genen. Für 31 Gene konnte eine erhöhte Genexpression festgestellt werden und für 15 eine erniedrigte. Abschließend wurden alle Datensets miteinander verglichen, sodass eine *senescence signature* sowohl für hMSC als auch Fibroblasten nach unterschiedlicher Seneszenzstimulation beschrieben werden kann. Der kleinste gemeinsame Nenner aller Datensets beläuft sich auf vier Gene, deren Expression in Folge der Seneszenzinduktion beeinflusst ist. Für *ATP6V1E1*, *RAB11A* und *RER1* ist die Expression erhöht und für *CREB3L4* erniedrigt.

Das Gen *ATP6V1E1* kodiert für eine Untereinheit (*ATPase H⁺ Transporting V1 Subunit E1*) der vakuolären ATPase (V-ATPase). Mittels V-ATPasen erfolgt die Ansäuerung von verschiedenen Zellorganellen. Die cytosolische Untereinheit V1 enthält die katalytische Seite für den ATP Stoffwechsel und setzt sich wiederum aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die erhöhte Expression von *ATP6V1E1* im Zuge der zellulären Seneszenz kann auf *Ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) Kinase vermittelte Inhibierung der Dimerisierung der Untereinheiten ATP6V1G1 und ATP6V1E1 zurückgeführt werden. Die Dimerisierung wird über eine Phosphorylierung der ATPV1G1 Untereinheit unterbunden (H. T. Kang et al., 2017). Bei der ATM Kinase handelt es sich um eine wesentliche Komponente der *DNA damage response* Signalkaskade (Zhao et al., 2020).

CREB3L4 kodiert für das Protein *CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 4*. Es handelt sich um einen Transkriptionsaktivator, welcher in der Membran des Endoplasmatischen Restikulums (ER) lokalisiert ist. Ein *Knockdown* von *CREB3L4* in *in vitro* Versuchen ist assoziiert mit einer Initiierung des Zellzyklusarrestes (Pu et al., 2020).

Für die erhöhten Expressionslevel von *RER1* und *RAB11A* ist bislang noch kein direkter Bezug zur zellulären Seneszenz in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden. *RER1* kodiert für das *retention in endoplasmic reticulum 1* (RER1) Protein und *RAB11A* für die kleine GTPase *Ras-related protein Rab-11A*. Das Protein RER1 ist in der Membran des Golgi-Apparates lokalisiert und ist in Prozessen zum Einbau/Erhalt von ER Membranproteinen involviert (Park, Ryu, Parmar, Giasson, & McFarland, 2017). Die kleinen Rab GTPasen sind Schlüsselregulatoren von intrazellulären Membrantransportprozessen (S. Takahashi et al., 2012).

ATP6V1E1, *CREB3L4*, *RER1* und *RAB11A* stellen vier Gene dar, die im Kontext der zellulären Seneszenz bislang nur geringfügig beschrieben und untersucht wurden. Die Daten dieser Arbeit zeigen jedoch, dass es sich in diesem Fall um vier durchaus sehr verlässliche Marker der zellulären Seneszenz handeln könnte, deren weitere Untersuchung erstrebenswert scheint.

5.8 Seneszenz bedeutet nicht immer gleich Seneszenz – ein Ausblick

Ein Problem, welches sich immer deutlicher in aktuellen Publikationen abzeichnet, sind die heterogenen Eigenschaften und Charakteristika von seneszenten Zellen. Es scheint ganz so, als wäre je nach Art der Seneszenzinduktion und der jeweiligen Zellart eine andere Form der zellulären Seneszenz zu beobachten. Eine wichtige Arbeit in diesem Kontext wurde 2017 von Hernandez-Segura et al. vorgestellt. Die Daten zeigen eindeutig, dass p16^{INK4a} kein verlässlicher Marker für Seneszenz ist. Der wissenschaftliche Konsens legt dar, dass sich Seneszenz nur sicher nachweisen lässt, wenn mehrere Marker betrachtet werden. Jedoch erfolgt die Zusammenstellung der Marker derzeit individuell für jedes Projekt. Die einzige unumstrittene Eigenschaft von

seneszenten Zellen, die unabhängig von der betroffenen Zellart und der Art der Seneszenzinduktion festgehalten werden kann, ist der Verlust der Zellproliferationskapazität.

Jedoch wird auch dieses solide charakteristische Fundament der zellulären Seneszenz durch die zunehmende Anzahl von wissenschaftlichen Artikeln, in denen von terminal differenzierten und zeitgleich seneszenten Zellen, wie Osteozyten, Neuronen oder Adipozyten die Rede ist, in Frage gestellt (Farr et al., 2016) (Moreno-Blas et al., 2019) (C. Kang et al., 2015) (Z. Liu, Wu, Jiang, Xu, & Cheng, 2020). Zudem ist die Abgrenzung zu einem vorübergehenden Zellzyklusarrest schwierig.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Fokus auf p16^{INK4a} als Seneszenzmarker gelegt, insbesondere mit der Verwendung der Cdkn2a^{tm1b} und p16-3MR Mausmodelle für die Untersuchung des Einflusses der zellulären Seneszenz auf die Knochenhomöostase und Knochenregeneration. Entsprechend der zunehmenden wissenschaftlichen Ungenauigkeiten bezüglich der charakteristischen Marker von zellulärer Seneszenz, welche sich in den letzten Jahren immer deutlicher abzeichnet, ist auch die Verwendung von p16^{INK4a} Mausmodellen zur Untersuchung von seneszenten Fragestellungen kritisch zu hinterfragen.

Die parallele Entwicklung der Transposon basierenden induzierbaren Überexpression von p16^{INK4a} oder p21^{WAF-1/Cip-1} in hMSC, stellt ein Modell dar, um die Differenzen und Gemeinsamkeiten zwischen den etablierten Seneszenzmarkern weiter zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Knochenphänotyp von jungen adulten Cdkn2a^{tm1b} Mäusen keine Auffälligkeiten aufweist. Weitere Untersuchungen von p21^{WAF-1/Cip-1}-defizienten Tieren und p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}-DKO Tieren legen dar, dass auch der Knochenphänotyp bei vorliegender globaler p21^{WAF-1/Cip-1}-Defizienz unbeeinträchtigt scheint. Hingegen führt die zeitgleiche Defizienz von p16^{INK4a} und p21^{WAF-1/Cip-1} zu einer Reduktion der trabekulären Knochendichte. Erste Untersuchungen der Knochenparameter deuten auf einen allgemein reduziertes Knochenremodelling hin. Dies bedarf jedoch weiterer Aufklärung. So sollten weitere Untersuchungen der dynamischen Histomorphometrie, welche die Erhebung der *mineral aposition rate* (MAR) oder der *bone formation rate per bone surface* (BFR/BS) umfasst, erfolgen, um den Knochenphänotyp genauer zu beschreiben. Eine ursächliche Imbalance des Knochenauf- und -abbaus kann anhand der Untersuchung von murinen Serumproben erfolgen. Interessant wäre die Bestimmung der Werte für *Bone Specific Alkaline Phosphatase* sowie *amino pro-peptide of type 1 collagen* (P1NP) als Marker für den Knochenaufbau. Zusätzlich sollten die Werte für Crosslaps, ein Marker des Knochenabbaus, erhoben werden. Sollten die Werte auf einen gesteigerten Knochenabbau oder einen reduzierten Knochenaufbau, als Ursache für die reduzierte Knochendichte hindeuten, können weitere Untersuchungen in Zellkulturexperimenten erfolgen. Analysiert werden könnten sowohl die osteogene Differenzierung als auch die Osteoklastogenese.

Wenngleich die Cdkn2a^{tm1b/tm1b} Tiere keinen aberranten Knochenphänotyp aufweisen, zeigen die Osteoblastenvorläuferzellen ein gesteigertes Differenzierungspotenzial. Aufschluss über die

Ursache dieser Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen könnte die Verwendung eines konditionellen $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ Mausmodells liefern.

Neben dem überraschenden erhöhten Differenzierungspotenzial von $Cdkn2a^{tm1b/tm1b}$ osteogenen Vorläuferzellen, ist die verstärkte Kallusbildung von $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Tieren auffällig. Da die $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Mäuse nur zu Kontrollzwecken für die Knochenregenerationsversuche eingeplant waren, ist die Anzahl der untersuchten Tiere und somit die statistische Aussagekraft reduziert. Weitere Osteotomien von $Cdkn2a^{+/tm1b}$ Tieren könnten die vorläufigen Daten bekräftigen. Anschließend sollte die Kallusbeschaffenheit durch weitere histologische Verfahren untersucht werden. Ferner wäre auch die Evaluierung des Knochenregenerationsprozesses in älteren $p16^{INK4a}$ -defiziente Tieren interessant. Für diesen Zweck würden sich zum Beispiel die transgenen $p16$ -3MR oder das INK-ATTAC Mausmodell eignen. Auch die Verwendung von anderen Mausmodellen, für die Untersuchung der Knochenregeneration sollte in Betracht gezogen werden. So wäre die Verwendung des $p21^{WAF-1/Cip-1}$ Knockout Modells oder des $p16^{INK4a}/p21^{WAF-1/Cip-1}$ DKO Mausmodells interessant.

Zusätzlich wurde bereits geplant mittels *Single Cell Sequencing* die $p16^{INK4a}$ exprimierenden Zellpopulation des Kallus von Wildtyp Tieren genauer zu charakterisieren. Sollte es sich um Mesenchymale Stromazellen handeln, kann für die Übertragung der Analysen vom murinen auf den humanen Organismus das etablierte, induzierbare $p16^{INK4a}$ Überexpressionssystem verwendet werden. Die gewonnenen Daten zur Charakterisierung der $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden hMSC müssen durch die Analyse weiterer biologischer Replikate bekräftigt werden. Zusätzlich zum Transkriptom der Zellen, soll auch das Proteom und Sekretom untersucht werden. Dies ermöglicht eine umfassende Charakterisierung der $p16^{INK4a}$ und $p21^{WAF-1/Cip-1}$ überexprimierenden hMSC. Für die Auswertung wäre auch der Einschluss einer weiteren Seneszenz-Kontrollgruppe, neben der MMC-Behandlung, sehr aufschlussreich. So könnte zum Beispiel ein Modell verwendet werden, welches die gezielte DNA-Schädigung oder Telomerverkürzung in hMSC ermöglicht. Diese Experimente könnten einen großen Beitrag leisten, um die Definition und einhergehende Charakterisierung von seneszenten hMSC weiter zu präzisieren.

6 Literaturverzeichnis

- . (2012). In *Aging and the Macroeconomy: Long-Term Implications of an Older Population*. Washington (DC).
- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., . . . Serrano, M. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*, *502*(7471), 340-345. doi:10.1038/nature12586
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., . . . Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, *15*(8), 978-990. doi:10.1038/ncb2784
- Adam, S., Simon, N., Steffen, U., Andes, F. T., Scholtysek, C., Muller, D. I. H., . . . Hueber, A. J. (2020). JAK inhibition increases bone mass in steady-state conditions and ameliorates pathological bone loss by stimulating osteoblast function. *Sci Transl Med*, *12*(530). doi:10.1126/scitranslmed.aay4447
- Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*, *87*(2), 107-118. doi:10.1177/154405910808700215
- Aird, K. M., Iwasaki, O., Kossenkov, A. V., Tanizawa, H., Fatkhutdinov, N., Bitler, B. G., . . . Zhang, R. (2016). HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *J Cell Biol*, *215*(3), 325-334. doi:10.1083/jcb.201608026
- Albrecht, A. N., Kornak, U., Boddlich, A., Suring, K., Robinson, P. N., Stiege, A. C., . . . Mundlos, S. (2004). A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet*, *13*(20), 2351-2359. doi:10.1093/hmg/ddh277
- Alessio, N., Aprile, D., Squillaro, T., Di Bernardo, G., Finicelli, M., Melone, M. A., . . . Galderisi, U. (2019). The senescence-associated secretory phenotype (SASP) from mesenchymal stromal cells impairs growth of immortalized prostate cells but has no effect on metastatic prostatic cancer cells. *Aging (Albany NY)*, *11*(15), 5817-5828. doi:10.18632/aging.102172
- Alimbetov, D., Davis, T., Brook, A. J., Cox, L. S., Faragher, R. G., Nurgozhin, T., . . . Kipling, D. (2016). Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology*, *17*(2), 305-315. doi:10.1007/s10522-015-9610-z
- Allsopp, R. C., Chang, E., Kashefi-Azham, M., Rogaev, E. I., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., & Harley, C. B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*, *220*(1), 194-200. doi:10.1006/excr.1995.1306
- Allsopp, R. C., & Harley, C. B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res*, *219*(1), 130-136. doi:10.1006/excr.1995.1213
- Aoshiba, K., Tsuji, T., Kameyama, S., Itoh, M., Semba, S., Yamaguchi, K., & Nakamura, H. (2013). Senescence-associated secretory phenotype in a mouse model of bleomycin-induced lung injury. *Exp Toxicol Pathol*, *65*(7-8), 1053-1062. doi:10.1016/j.etp.2013.04.001
- Aoshiba, K., Tsuji, T., & Nagai, A. (2003). Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells. *Eur Respir J*, *22*(3), 436-443. doi:10.1183/09031936.03.00011903
- Aubin, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*, *2*(1), 81-94. doi:10.1023/a:1010011209064

- Ayrapetov, M. K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., & Price, B. D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(25), 9169-9174. doi:10.1073/pnas.1403565111
- Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., . . . de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, *169*(1), 132-147 e116. doi:10.1016/j.cell.2017.02.031
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., . . . van Deursen, J. M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet*, *36*(7), 744-749. doi:10.1038/ng1382
- Baker, D. J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K. S., Niederlander, N. J., Jeganathan, K., . . . van Deursen, J. M. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol*, *10*(7), 825-836. doi:10.1038/ncb1744
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., . . . van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, *479*(7372), 232-236. doi:10.1038/nature10600
- Berndt, T., & Kumar, R. (2007). Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol*, *69*, 341-359. doi:10.1146/annurev.physiol.69.040705.141729
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & de Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(8), 518-528. doi:10.1038/nrm3629
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*, *14*(2), 159-169. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.013
- Biran, A., Perelmutter, M., Gal, H., Burton, D. G., Ovadya, Y., Vadai, E., . . . Krizhanovsky, V. (2015). Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev*, *29*(8), 791-802. doi:10.1101/gad.259341.115
- Blagosklonny, M. V. (2011). Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY)*, *3*(2), 94-101. doi:10.18632/aging.100281
- Blasco, M. A. (2002). Immunosenescence phenotypes in the telomerase knockout mouse. *Springer Semin Immunopathol*, *24*(1), 75-85. doi:10.1007/s00281-001-0096-1
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, *26*(2), 229-238. doi:10.1002/jbmr.320
- Bonewald, L. F., & Wacker, M. J. (2013). FGF23 production by osteocytes. *Pediatr Nephrol*, *28*(4), 563-568. doi:10.1007/s00467-012-2309-3
- Bonnarens, F., & Einhorn, T. A. (1984). Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, *2*(1), 97-101. doi:10.1002/jor.1100020115
- Boskey, A. L., & Coleman, R. (2010). Aging and bone. *J Dent Res*, *89*(12), 1333-1348. doi:10.1177/0022034510377791
- Briggs, T. A., Rice, G. I., Daly, S., Urquhart, J., Gornall, H., Bader-Meunier, B., . . . Crow, Y. J. (2011). Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nat Genet*, *43*(2), 127-131. doi:10.1038/ng.748
- Burton, D. G., & Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*, *71*(22), 4373-4386. doi:10.1007/s00018-014-1691-3

- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, *562*(7728), 578-582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y
- Campisi, J. (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell*, *84*(4), 497-500. doi:10.1016/s0092-8674(00)81023-5
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*, *11*(11), S27-31. doi:10.1016/s0962-8924(01)02151-1
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, *75*, 685-705. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653
- Campisi, J., & Robert, L. (2014). Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdiscip Top Gerontol*, *39*, 45-61. doi:10.1159/000358899
- Canepa, E. T., Scassa, M. E., Ceruti, J. M., Marazita, M. C., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F., & Ogara, M. F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*, *59*(7), 419-426. doi:10.1080/15216540701488358
- Cao, X. (2018). RANKL-RANK signaling regulates osteoblast differentiation and bone formation. *Bone Res*, *6*, 35. doi:10.1038/s41413-018-0040-9
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., . . . Nussenzweig, A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, *296*(5569), 922-927. doi:10.1126/science.1069398
- Cerqueira, A., Martin, A., Symonds, C. E., Odajima, J., Dubus, P., Barbacid, M., & Santamaria, D. (2014). Genetic characterization of the role of the Cip/Kip family of proteins as cyclin-dependent kinase inhibitors and assembly factors. *Mol Cell Biol*, *34*(8), 1452-1459. doi:10.1128/MCB.01163-13
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., . . . Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*, *22*(1), 78-83. doi:10.1038/nm.4010
- Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguin, S. B., Cazin, C., . . . Li, H. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell*, *20*(3), 407-414 e404. doi:10.1016/j.stem.2016.11.020
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., . . . Lowe, S. W. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev*, *25*(20), 2125-2136. doi:10.1101/gad.17276711
- Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, *354*(6311), 472-477. doi:10.1126/science.aaf6659
- Chinta, S. J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., . . . Andersen, J. K. (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep*, *22*(4), 930-940. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.092
- Choudhery, M. S., Khan, M., Mahmood, R., Mehmood, A., Khan, S. N., & Riazuddin, S. (2012). Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. *Cell Biol Int*, *36*(8), 747-753. doi:10.1042/CBI20110183
- Christophorou, M. A., Ringshausen, I., Finch, A. J., Swigart, L. B., & Evan, G. I. (2006). The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature*, *443*(7108), 214-217. doi:10.1038/nature05077

- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-139. doi:10.2215/CJN.04151206
- Clarke, J. (2020). JAK inhibitors boost bone formation. *Nat Rev Rheumatol*, 16(5), 249. doi:10.1038/s41584-020-0406-4
- Clurman, B. E., & Groudine, M. (1998). The CDKN2A tumor-suppressor locus--a tale of two proteins. *N Engl J Med*, 338(13), 910-912. doi:10.1056/NEJM199803263381312
- Cohen, M. M., Jr. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A*, 140(23), 2646-2706. doi:10.1002/ajmg.a.31368
- Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144
- Couffignal, T., Kearney, M., Sullivan, A., Silver, M., Tsurumi, Y., & Isner, J. M. (1997). Histochemical staining following LacZ gene transfer underestimates transfection efficiency. *Hum Gene Ther*, 8(8), 929-934. doi:10.1089/hum.1997.8.8-929
- Crouch, M. L., Knowels, G., Stuppard, R., Ericson, N. G., Bielas, J. H., Marcinek, D. J., & Syrjala, K. L. (2017). Cyclophosphamide leads to persistent deficits in physical performance and in vivo mitochondria function in a mouse model of chemotherapy late effects. *PLoS One*, 12(7), e0181086. doi:10.1371/journal.pone.0181086
- Da Silva-Alvarez, S., Guerra-Varela, J., Sobrido-Camean, D., Quelle, A., Barreiro-Iglesias, A., Sanchez, L., & Collado, M. (2020). Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. *Aging Cell*, 19(1), e13052. doi:10.1111/acel.13052
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*, 34(5), 658-690. doi:10.1210/er.2012-1026
- Davalos, A. R., Kawahara, M., Malhotra, G. K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., . . . Campisi, J. (2013). p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol*, 201(4), 613-629. doi:10.1083/jcb.201206006
- De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., . . . Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene*, 27(31), 4261-4268. doi:10.1038/onc.2008.74
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4(12), 1798-1806. doi:10.1038/nprot.2009.191
- Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., . . . Campisi, J. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*, 7(2), 165-176. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., . . . Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, 31(6), 722-733. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012
- Demidenko, Z. N., Zubova, S. G., Bukreeva, E. I., Pospelov, V. A., Pospelova, T. V., & Blagosklonny, M. V. (2009). Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*, 8(12), 1888-1895. doi:10.4161/cc.8.12.8606
- Dempster, D. W., Compston, J. E., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., . . . Parfitt, A. M. (2013). Standardized nomenclature, symbols, and

- units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 28(1), 2-17. doi:10.1002/jbmr.1805
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., & Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 82(4), 675-684. doi:10.1016/0092-8674(95)90039-x
- Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T. M., Fullen, D. R., . . . Soengas, M. S. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, 8(10), 1053-1063. doi:10.1038/ncb1471
- DiLoreto, R., & Murphy, C. T. (2015). The cell biology of aging. *Mol Biol Cell*, 26(25), 4524-4531. doi:10.1091/mbc.E14-06-1084
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., . . . et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367. doi:10.1073/pnas.92.20.9363
- Dolle, M. E., Kuiper, R. V., Roodbergen, M., Robinson, J., de Vlugt, S., Wijnhoven, S. W., . . . van Steeg, H. (2011). Broad segmental progeroid changes in short-lived *Erccl(-/Delta7)* mice. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 1. doi:10.3402/pba.v1i0.7219
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangensteen, K. J., . . . Berger, S. L. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, 550(7676), 402-406. doi:10.1038/nature24050
- Effenberger, T., von der Heyde, J., Bartsch, K., Garbers, C., Schulze-Osthoff, K., Chalaris, A., . . . Rabe, B. (2014). Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding. *FASEB J*, 28(11), 4847-4856. doi:10.1096/fj.14-254565
- Elefteriou, F., & Yang, X. (2011). Genetic mouse models for bone studies--strengths and limitations. *Bone*, 49(6), 1242-1254. doi:10.1016/j.bone.2011.08.021
- Ensrud, K. E. (2013). Epidemiology of fracture risk with advancing age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(10), 1236-1242. doi:10.1093/gerona/glt092
- Farr, J. N., Fraser, D. G., Wang, H., Jaehn, K., Ogrodnik, M. B., Weivoda, M. M., . . . Khosla, S. (2016). Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *J Bone Miner Res*, 31(11), 1920-1929. doi:10.1002/jbmr.2892
- Farr, J. N., & Khosla, S. (2019). Cellular senescence in bone. *Bone*, 121, 121-133. doi:10.1016/j.bone.2019.01.015
- Farr, J. N., Xu, M., Weivoda, M. M., Monroe, D. G., Fraser, D. G., Onken, J. L., . . . Khosla, S. (2017). Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med*, 23(9), 1072-1079. doi:10.1038/nm.4385
- Forte, L., Torricelli, P., Boanini, E., Gazzano, M., Rubini, K., Fini, M., & Bigi, A. (2016). Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast-osteoclast-endothelial cell co-culture study. *Acta Biomater*, 32, 298-308. doi:10.1016/j.actbio.2015.12.013
- Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*, 23(11), 2066-2075. doi:10.1091/mbc.E11-10-0884

- Freund, A., Patil, C. K., & Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*, *30*(8), 1536-1548. doi:10.1038/emboj.2011.69
- Furuno, N., den Elzen, N., & Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol*, *147*(2), 295-306. doi:10.1083/jcb.147.2.295
- Futami, K., Maita, M., & Katagiri, T. (2019). DNA demethylation with 5-aza-2'-deoxycytidine induces the senescence-associated secretory phenotype in the immortal fish cell line, EPC. *Gene*, *697*, 194-200. doi:10.1016/j.gene.2019.02.048
- Galatz, L. M., Gerstenfeld, L., Heber-Katz, E., & Rodeo, S. A. (2015). Tendon regeneration and scar formation: The concept of scarless healing. *J Orthop Res*, *33*(6), 823-831. doi:10.1002/jor.22853
- Galliot, B., Crescenzi, M., Jacinto, A., & Tajbakhsh, S. (2017). Trends in tissue repair and regeneration. *Development*, *144*(3), 357-364. doi:10.1242/dev.144279
- Garcia-Gomez, A., Ocio, E. M., Crusoe, E., Santamaria, C., Hernandez-Campo, P., Blanco, J. F., . . . Garayoa, M. (2012). Dasatinib as a bone-modifying agent: anabolic and anti-resorptive effects. *PLoS One*, *7*(4), e34914. doi:10.1371/journal.pone.0034914
- Gavet, O., & Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell*, *18*(4), 533-543. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.013
- Georgakopoulou, E. A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez Marcos, P. J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I. P., . . . Gorgoulis, V. G. (2013). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)*, *5*(1), 37-50. doi:10.18632/aging.100527
- Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, *25*(38), 5220-5227. doi:10.1038/sj.onc.1209615
- Gire, V., & Dulic, V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*, *14*(3), 297-304. doi:10.1080/15384101.2014.1000134
- Gluck, S., Guey, B., Gulen, M. F., Wolter, K., Kang, T. W., Schmacke, N. A., . . . Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol*, *19*(9), 1061-1070. doi:10.1038/ncb3586
- Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (2007). Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, *41*(3), 462-473. doi:10.1016/j.bone.2007.04.191
- Grassel, S., Stockl, S., & Jenei-Lanzl, Z. (2012). Isolation, culture, and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, *879*, 203-267. doi:10.1007/978-1-61779-815-3_14
- Guo, Y., Kim, C., Ahmad, S., Zhang, J., & Mao, Y. (2012). CENP-E--dependent BubR1 autophosphorylation enhances chromosome alignment and the mitotic checkpoint. *J Cell Biol*, *198*(2), 205-217. doi:10.1083/jcb.201202152
- H.F. Newton-John, D. B. M. (1968). OSTEOPOROSIS : DISEASE OR SENESCENCE ? *The Lancet*, *291*(7536), 232-233. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)90853-2.
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, II. (2006). Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, *1092*, 385-396. doi:10.1196/annals.1365.035
- Han, W., He, W., Yang, W., Li, J., Yang, Z., Lu, X., . . . Qian, Y. (2016). The osteogenic potential of human bone callus. *Sci Rep*, *6*, 36330. doi:10.1038/srep36330

- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, *345*(6274), 458-460. doi:10.1038/345458a0
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, *11*(3), 298-300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
- Hartman, T. K., Wengenack, T. M., Poduslo, J. F., & van Deursen, J. M. (2007). Mutant mice with small amounts of BubR1 display accelerated age-related gliosis. *Neurobiol Aging*, *28*(6), 921-927. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.012
- Harvey, N., Dennison, E., & Cooper, C. (2010). Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol*, *6*(2), 99-105. doi:10.1038/nrrheum.2009.260
- Hayakawa, T., Iwai, M., Aoki, S., Takimoto, K., Maruyama, M., Maruyama, W., & Motoyama, N. (2015). SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One*, *10*(1), e0116480. doi:10.1371/journal.pone.0116480
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, *37*, 614-636. doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*, 585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
- Heinz, N., Schambach, A., Galla, M., Maetzig, T., Baum, C., Loew, R., & Schiedlmeier, B. (2011). Retroviral and transposon-based tet-regulated all-in-one vectors with reduced background expression and improved dynamic range. *Hum Gene Ther*, *22*(2), 166-176. doi:10.1089/hum.2010.099
- Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., & Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol*, *27*(17), 2652-2660 e2654. doi:10.1016/j.cub.2017.07.033
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, *28*(6), 436-453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001
- Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C. J., . . . Gil, J. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol*, *17*(9), 1205-1217. doi:10.1038/ncb3225
- Hickson, L. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N., Hashmi, S. K., . . . Kirkland, J. L. (2019). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*, *47*, 446-456. doi:10.1016/j.ebiom.2019.08.069
- Hoare, M., Ito, Y., Kang, T. W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., . . . Narita, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol*, *18*(9), 979-992. doi:10.1038/ncb3397
- Hornsby, P. J. (2002). Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *57*(7), B251-256. doi:10.1093/gerona/57.7.b251
- Hsu, B., Visich, J., Lane, N. E., Li, L., Mittal, J., An, M., . . . Dananberg, J. (2020). Safety, tolerability, pharmacokinetics, and clinical outcomes following treatment of painful knee osteoarthritis with senolytic molecule UBX0101. *Osteoarthritis and Cartilage*, *28*, 479-480. doi:https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.02.752
- Idda, M. L., McClusky, W. G., Lodde, V., Munk, R., Abdelmohsen, K., Rossi, M., & Gorospe, M. (2020). Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging (Albany NY)*, *12*(5), 4052-4066. doi:10.18632/aging.102903
- Inoue, N., Yahagi, N., Yamamoto, T., Ishikawa, M., Watanabe, K., Matsuzaka, T., . . . Shimano, H. (2008). Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and

- insulin resistance. *J Biol Chem*, 283(30), 21220-21229.
doi:10.1074/jbc.M801824200
- J. Gordon Betts, K. A. Y., James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix. (2013). *Anatomy and Physiology*. Retrieved from <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/6-3-bone-structure>
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64(2), 295-312. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027589>
- James, E. L., Michalek, R. D., Pitiyage, G. N., de Castro, A. M., Vignola, K. S., Jones, J., . . . Parkinson, E. K. (2015). Senescent human fibroblasts show increased glycolysis and redox homeostasis with extracellular metabolomes that overlap with those of irreparable DNA damage, aging, and disease. *J Proteome Res*, 14(4), 1854-1871. doi:10.1021/pr501221g
- Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R. M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., . . . Elisseff, J. H. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med*, 23(6), 775-781. doi:10.1038/nm.4324
- Jeon, O. H., Wilson, D. R., Clement, C. C., Rathod, S., Cherry, C., Powell, B., . . . Elisseff, J. H. (2019). Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers. *JCI Insight*, 4(7). doi:10.1172/jci.insight.125019
- Jeyapalan, J. C., Ferreira, M., Sedivy, J. M., & Herbig, U. (2007). Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev*, 128(1), 36-44. doi:10.1016/j.mad.2006.11.008
- Ji, M. X., & Yu, Q. (2015). Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis Transl Med*, 1(1), 9-13. doi:10.1016/j.cdtm.2015.02.006
- Jiang, Y., Zhao, J., Qi, H. J., Li, X. L., Zhang, S. R., Song, D. W., . . . Gao, J. G. (2013). Accelerated ovarian aging in mice by treatment of busulfan and cyclophosphamide. *J Zhejiang Univ Sci B*, 14(4), 318-324. doi:10.1631/jzus.B1200181
- Johnson, D. G., & Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci*, 3, d447-448. doi:10.2741/a291
- Jun, J. I., & Lau, L. F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol*, 12(7), 676-685. doi:10.1038/ncb2070
- Justice, J. N., Nambiar, A. M., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Pascual, R., Hashmi, S. K., . . . Kirkland, J. L. (2019). Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 40, 554-563. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.052
- Kaji, K., Factor, V. M., Andersen, J. B., Durkin, M. E., Tomokuni, A., Marquardt, J. U., . . . Thorgeirsson, S. S. (2016). DNMT1 is a required genomic regulator for murine liver histogenesis and regeneration. *Hepatology*, 64(2), 582-598. doi:10.1002/hep.28563
- Kang, C. (2019). Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Mol Cells*, 42(12), 821-827. doi:10.14348/molcells.2019.0298
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., . . . Elledge, S. J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by

- inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349(6255), aaa5612.
doi:10.1126/science.aaa5612
- Kang, H. T., Park, J. T., Choi, K., Kim, Y., Choi, H. J. C., Jung, C. W., . . . Park, S. C. (2017). Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat Chem Biol*, 13(6), 616-623. doi:10.1038/nchembio.2342
- Kawane, T., Qin, X., Jiang, Q., Miyazaki, T., Komori, H., Yoshida, C. A., . . . Komori, T. (2018). Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep*, 8(1), 13551. doi:10.1038/s41598-018-31853-0
- Kim, H. N., Chang, J., Iyer, S., Han, L., Campisi, J., Manolagas, S. C., . . . Almeida, M. (2019). Elimination of senescent osteoclast progenitors has no effect on the age-associated loss of bone mass in mice. *Aging Cell*, 18(3), e12923. doi:10.1111/accel.12923
- Kim, H. N., Chang, J., Shao, L., Han, L., Iyer, S., Manolagas, S. C., . . . Almeida, M. (2017). DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing Osx1 may cause their decrease with age. *Aging Cell*, 16(4), 693-703. doi:10.1111/accel.12597
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36(17), 5678-5694. doi:10.1093/nar/gkn550
- Koebele, S. V., & Bimonte-Nelson, H. A. (2016). Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, 87, 5-17. doi:10.1016/j.maturitas.2016.01.015
- Kolb, B., Pedersen, B., Ballermann, M., Gibb, R., & Wishaw, I. Q. (1999). Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. *J Neurosci*, 19(6), 2337-2346. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066283>
- Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., . . . Jentsch, T. J. (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104(2), 205-215. doi:10.1016/s0092-8674(01)00206-9
- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., Sensebe, L., & Therapy, M. S. C. C. o. t. I. S. f. C. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 15(9), 1054-1061. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.010
- Krause, U., Seckinger, A., & Gregory, C. A. (2011). Assays of osteogenic differentiation by cultured human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 698, 215-230. doi:10.1007/978-1-60761-999-4_17
- Kreis, N. N., Louwen, F., & Yuan, J. (2019). The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*, 11(9). doi:10.3390/cancers11091220
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., . . . Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), 657-667. doi:10.1016/j.cell.2008.06.049
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., . . . Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019-1031. doi:10.1016/j.cell.2008.03.039
- Kulukian, A., Han, J. S., & Cleveland, D. W. (2009). Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev Cell*, 16(1), 105-117. doi:10.1016/j.devcel.2008.11.005

- Laberge, R. M., Adler, D., DeMaria, M., Mechtouf, N., Teachenor, R., Cardin, G. B., . . . Rodier, F. (2013). Mitochondrial DNA damage induces apoptosis in senescent cells. *Cell Death Dis*, *4*, e727. doi:10.1038/cddis.2013.199
- Laberge, R. M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., . . . Campisi, J. (2015). mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*, *17*(8), 1049-1061. doi:10.1038/ncb3195
- Lausch, E., Janecke, A., Bros, M., Trojandt, S., Alanay, Y., De Laet, C., . . . Superti-Furga, A. (2011). Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity. *Nat Genet*, *43*(2), 132-137. doi:10.1038/ng.749
- Le, O. N., Rodier, F., Fontaine, F., Coppe, J. P., Campisi, J., DeGregori, J., . . . Beausejour, C. M. (2010). Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell*, *9*(3), 398-409. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., . . . Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, *5*(2), 187-195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
- Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., & Terrian, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res*, *68*(19), 7864-7871. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6538
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, *69*(6), 915-926. doi:10.1016/0092-8674(92)90611-f
- Li, V. C., & Kirschner, M. W. (2014). Molecular ties between the cell cycle and differentiation in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(26), 9503-9508. doi:10.1073/pnas.1408638111
- Liang, W., & Chikritzhs, T. (2016). The Effect of Age on Fracture Risk: A Population-Based Cohort Study. *J Aging Res*, *2016*, 5071438. doi:10.1155/2016/5071438
- Lindsay M. Biga, S. D., Amy Harwell, Robin Hopkins, Joel Kaufmann, Mike LeMaster, Philip Matern, Katie Morrison-Graham, Devon Quick, and Jon Runyeon. *Anatomy & Physiology*. Retrieved from <https://open.oregonstate.edu>
- Liu, G., Geurts, A. M., Yae, K., Srinivasan, A. R., Fahrenkrug, S. C., Largaespada, D. A., . . . Hackett, P. B. (2005). Target-site preferences of Sleeping Beauty transposons. *J Mol Biol*, *346*(1), 161-173. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.086
- Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A., & Sicinski, P. (2019). The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol*, *21*(9), 1060-1067. doi:10.1038/s41556-019-0384-4
- Liu, L., van Groen, T., Kadish, I., Li, Y., Wang, D., James, S. R., . . . Tollefsbol, T. O. (2011). Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems. *Clin Epigenetics*, *2*(2), 349-360. doi:10.1007/s13148-011-0042-6
- Liu, Z., Wu, K. K. L., Jiang, X., Xu, A., & Cheng, K. K. Y. (2020). The role of adipose tissue senescence in obesity- and ageing-related metabolic disorders. *Clin Sci (Lond)*, *134*(2), 315-330. doi:10.1042/CS20190966
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*(1), 46-62. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009

- Malaval, L., Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., . . . Aubin, J. E. (2008). Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*, *205*(5), 1145-1153. doi:10.1084/jem.20071294
- Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J., & van Deursen, J. M. (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. *Dev Cell*, *16*(1), 118-131. doi:10.1016/j.devcel.2008.11.004
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, *21*(2), 115-137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, *42*(6), 551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
- Maruyama, M., Rhee, C., Utsunomiya, T., Zhang, N., Ueno, M., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2020). Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *11*, 386. doi:10.3389/fendo.2020.00386
- Mates, L., Chuah, M. K., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., . . . Izsvak, Z. (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*, *41*(6), 753-761. doi:10.1038/ng.343
- Matic, I., Matthews, B. G., Wang, X., Dymont, N. A., Worthley, D. L., Rowe, D. W., . . . Kalajzic, I. (2016). Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*, *34*(12), 2930-2942. doi:10.1002/stem.2474
- Matsumoto, T., Baker, D. J., d'Uscio, L. V., Mozammel, G., Katusic, Z. S., & van Deursen, J. M. (2007). Aging-associated vascular phenotype in mutant mice with low levels of BubR1. *Stroke*, *38*(3), 1050-1056. doi:10.1161/01.STR.0000257967.86132.01
- McCormack, A. L., & Di Monte, D. A. (2003). Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. *J Neurochem*, *85*(1), 82-86. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01621.x
- McKenna, E., Traganos, F., Zhao, H., & Darzynkiewicz, Z. (2012). Persistent DNA damage caused by low levels of mitomycin C induces irreversible cell senescence. *Cell Cycle*, *11*(16), 3132-3140. doi:10.4161/cc.21506
- Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A. E., . . . Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging Cell*, *12*(3), 489-498. doi:10.1111/accel.12075
- Morancho, B., Martinez-Barriocanal, A., Villanueva, J., & Arribas, J. (2015). Role of ADAM17 in the non-cell autonomous effects of oncogene-induced senescence. *Breast Cancer Res*, *17*, 106. doi:10.1186/s13058-015-0619-7
- Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Mucino-Hernandez, G., Geronimo-Olvera, C., Maciel-Baron, L. A., . . . Castro-Obregon, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging (Albany NY)*, *11*(16), 6175-6198. doi:10.18632/aging.102181
- Morgan, D. B., & Newton-John, H. F. (1969). Bone loss and senescence. *Gerontologia*, *15*(2), 140-154. doi:10.1159/000211682
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marion, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., . . . Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*, *354*(6315). doi:10.1126/science.aaf4445

- Mullard, A. (2019). FDA approves first-in-class osteoporosis drug. *Nat Rev Drug Discov*, 18(6), 411. doi:10.1038/d41573-019-00083-y
- Munoz-Espin, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 482-496. doi:10.1038/nrm3823
- Munro, J., Barr, N. I., Ireland, H., Morrison, V., & Parkinson, E. K. (2004). Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res*, 295(2), 525-538. doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.017
- Muruganandan, S., Govindarajan, R., & Sinal, C. J. (2018). Bone Marrow Adipose Tissue and Skeletal Health. *Curr Osteoporos Rep*, 16(4), 434-442. doi:10.1007/s11914-018-0451-y
- Naaz, A., Holsberger, D. R., Iwamoto, G. A., Nelson, A., Kiyokawa, H., & Cooke, P. S. (2004). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitors produces adipocyte hyperplasia and obesity. *FASEB J*, 18(15), 1925-1927. doi:10.1096/fj.04-2631fje
- Nacarelli, T., & Sell, C. (2017). Targeting metabolism in cellular senescence, a role for intervention. *Mol Cell Endocrinol*, 455, 83-92. doi:10.1016/j.mce.2016.08.049
- Nagano, T., Nakano, M., Nakashima, A., Onishi, K., Yamao, S., Enari, M., . . . Kamada, S. (2016). Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci Rep*, 6, 31758. doi:10.1038/srep31758
- Nakagawa, H., Sasagawa, S., & Itoh, K. (2018). Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells. *Oncol Lett*, 15(2), 1495-1502. doi:10.3892/ol.2017.7518
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., . . . Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703-716. doi:10.1016/s0092-8674(03)00401-x
- Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., & von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell*, 11(2), 345-349. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x
- Nielsen, G. P., Burns, K. L., Rosenberg, A. E., & Louis, D. N. (1998). CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol*, 153(1), 159-163. doi:10.1016/S0002-9440(10)65556-3
- Oh, J., Lee, Y. D., & Wagers, A. J. (2014). Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*, 20(8), 870-880. doi:10.1038/nm.3651
- Opal, S. M. (2000). Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*, 28(9 Suppl), S77-80. doi:10.1097/00003246-200009001-00017
- Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, 77(1), 4-12. doi:10.1272/jnms.77.4
- Paccou, J., Penel, G., Chauveau, C., Cortet, B., & Hardouin, P. (2019). Marrow adiposity and bone: Review of clinical implications. *Bone*, 118, 8-15. doi:10.1016/j.bone.2018.02.008
- Parfitt, A. M. (1982). The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res*, 4(1), 1-6. doi:10.1016/0221-8747(82)90002-9
- Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., . . . Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2(6), 595-610. doi:10.1002/jbmr.5650020617

- Park, H. J., Ryu, D., Parmar, M., Giasson, B. I., & McFarland, N. R. (2017). The ER retention protein RER1 promotes alpha-synuclein degradation via the proteasome. *PLoS One*, *12*(9), e0184262. doi:10.1371/journal.pone.0184262
- Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., . . . von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol*, *5*(5), e110. doi:10.1371/journal.pbio.0050110
- Patil, P., Dong, Q., Wang, D., Chang, J., Wiley, C., Demaria, M., . . . Vo, N. (2019). Systemic clearance of p16(INK4a) -positive senescent cells mitigates age-associated intervertebral disc degeneration. *Aging Cell*, *18*(3), e12927. doi:10.1111/acel.12927
- Perez, V. I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta*, *1790*(10), 1005-1014. doi:10.1016/j.bbagen.2009.06.003
- Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, *15*(6), 999-1017. doi:10.1111/acel.12518
- Pezzoli, G., & Cereda, E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology*, *80*(22), 2035-2041. doi:10.1212/WNL.0b013e318294b3c8
- Piemontese, M., Almeida, M., Robling, A. G., Kim, H. N., Xiong, J., Thostenson, J. D., . . . Jilka, R. L. (2017). Old age causes de novo intracortical bone remodeling and porosity in mice. *JCI Insight*, *2*(17). doi:10.1172/jci.insight.93771
- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Peault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med*, *4*, 22. doi:10.1038/s41536-019-0083-6
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Pospelova, T. V., Leontieva, O. V., Bykova, T. V., Zubova, S. G., Pospelov, V. A., & Blagosklonny, M. V. (2012). Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. *Cell Cycle*, *11*(12), 2402-2407. doi:10.4161/cc.20882
- Pu, Q., Lu, L., Dong, K., Geng, W. W., Lv, Y. R., & Gao, H. D. (2020). The Novel Transcription Factor CREB3L4 Contributes to the Progression of Human Breast Carcinoma. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *25*(1), 37-50. doi:10.1007/s10911-020-09443-6
- Qin, L., Liu, W., Cao, H., & Xiao, G. (2020). Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res*, *8*, 23. doi:10.1038/s41413-020-0099-y
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, *8*(11), 2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ray, P., De, A., Min, J. J., Tsien, R. Y., & Gambhir, S. S. (2004). Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res*, *64*(4), 1323-1330. doi:10.1158/0008-5472.can-03-1816
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., . . . Keyes, W. M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev*, *31*(2), 172-183. doi:10.1101/gad.290635.116
- Robles, S. J., & Adami, G. R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, *16*(9), 1113-1123. doi:10.1038/sj.onc.1201862

- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, *192*(4), 547-556. doi:10.1083/jcb.201009094
- Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., . . . Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, *11*(8), 973-979. doi:10.1038/ncb1909
- Romero-Pozuelo, J., Figlia, G., Kaya, O., Martin-Villalba, A., & Teleman, A. A. (2020). Cdk4 and Cdk6 Couple the Cell-Cycle Machinery to Cell Growth via mTORC1. *Cell Rep*, *31*(2), 107504. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.068
- Ross, H. H., Levkoff, L. H., Marshall, G. P., 2nd, Caldeira, M., Steindler, D. A., Reynolds, B. A., & Laywell, E. D. (2008). Bromodeoxyuridine induces senescence in neural stem and progenitor cells. *Stem Cells*, *26*(12), 3218-3227. doi:10.1634/stemcells.2008-0299
- Safadi, F. F. B., M. F.; Abdelmagid, S. M.; Rico, M. C; Aswad, R. A.; Litvin, J.; Popoff, S. N. . (2009). *Bone Pathology*(Vol. 2).
- Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal*, *24*(4), 835-845. doi:10.1016/j.cellsig.2011.12.006
- Salmonowicz, H., & Passos, J. F. (2017). Detecting senescence: a new method for an old pigment. *Aging Cell*, *16*(3), 432-434. doi:10.1111/ace1.12580
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, *28*(33), 2925-2939. doi:10.1038/onc.2009.170
- Schell, H., Duda, G. N., Peters, A., Tsitsilonis, S., Johnson, K. A., & Schmidt-Bleek, K. (2017). The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop*, *4*(1), 5. doi:10.1186/s40634-017-0079-3
- Schlundt, C., Schell, H., Goodman, S. B., Vunjak-Novakovic, G., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2015). Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *J Exp Orthop*, *2*(1), 1. doi:10.1186/s40634-014-0017-6
- Schmidt-Bleek, K., Petersen, A., Dienelt, A., Schwarz, C., & Duda, G. N. (2014). Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, *14*(2), 247-259. doi:10.1517/14712598.2014.857653
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., & Lowe, S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, *109*(3), 335-346. doi:10.1016/s0092-8674(02)00734-1
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, *6*(2), 168-170. doi:10.1038/ncb1095
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., & Paules, R. S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect*, *107 Suppl 1*, 5-24. doi:10.1289/ehp.99107s15
- Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Lee, K. H., Carrasco, D., Castrillon, D. H., Aguirre, A. J., . . . DePinho, R. A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*, *413*(6851), 86-91. doi:10.1038/35092592

- Sheen, J. R., & Garla, V. V. (2020). Fracture Healing Overview. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., . . . Yamashita, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*, *19*(3), 429-435. doi:10.1359/JBMR.0301264
- Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., . . . Yamashita, T. (2004). Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*, *113*(4), 561-568. doi:10.1172/JCI19081
- Siddiqui, J. A., Swarnkar, G., Sharan, K., Chakravarti, B., Gautam, A. K., Rawat, P., . . . Chattopadhyay, N. (2011). A naturally occurring rare analog of quercetin promotes peak bone mass achievement and exerts anabolic effect on osteoporotic bone. *Osteoporos Int*, *22*(12), 3013-3027. doi:10.1007/s00198-010-1519-4
- Song, W., Liu, Y., Liu, Y., Zhang, C., Yuan, B., Zhang, L., & Sun, S. (2014). Increased p16 DNA methylation in mouse thymic lymphoma induced by irradiation. *PLoS One*, *9*(4), e93850. doi:10.1371/journal.pone.0093850
- Standring, S. (Ed.) (2004). *Musculoskeletal system* (Vol. 39th Ed.). New York: Elsevier.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A., & Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, *19*(3), 2109-2117. doi:10.1128/mcb.19.3.2109
- Stow, J. L., & Murray, R. Z. (2013). Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, *24*(3), 227-239. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.04.001
- Suen, P. K., & Qin, L. (2016). Sclerostin, an emerging therapeutic target for treating osteoporosis and osteoporotic fracture: A general review. *J Orthop Translat*, *4*, 1-13. doi:10.1016/j.jot.2015.08.004
- Swanson, E. C., Manning, B., Zhang, H., & Lawrence, J. B. (2013). Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J Cell Biol*, *203*(6), 929-942. doi:10.1083/jcb.201306073
- Tai, H., Wang, Z., Gong, H., Han, X., Zhou, J., Wang, X., . . . Xiao, H. (2017). Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. *Autophagy*, *13*(1), 99-113. doi:10.1080/15548627.2016.1247143
- Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., . . . Hara, E. (2012). DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell*, *45*(1), 123-131. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.018
- Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H. W., Katoh, Y., & Nakayama, K. (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci*, *125*(Pt 17), 4049-4057. doi:10.1242/jcs.102913
- Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., & Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun*, *8*, 15729. doi:10.1038/ncomms15728
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., . . . Langston, J. W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, *119*(6), 866-872. doi:10.1289/ehp.1002839

- Tasdemir, N., Banito, A., Roe, J. S., Alonso-Curbelo, D., Camiolo, M., Tschaharganeh, D. F., . . . Lowe, S. W. (2016). BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance. *Cancer Discov*, *6*(6), 612-629. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0217
- Terzi, M. Y., Izmirlı, M., & Gogebakan, B. (2016). The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep*, *43*(11), 1213-1220. doi:10.1007/s11033-016-4065-0
- Tiedje, C., Ronkina, N., Tehrani, M., Dhamija, S., Laass, K., Holtmann, H., . . . Gaestel, M. (2012). The p38/MK2-driven exchange between tristetraprolin and HuR regulates AU-rich element-dependent translation. *PLoS Genet*, *8*(9), e1002977. doi:10.1371/journal.pgen.1002977
- Tomicic, M. T., Thust, R., & Kaina, B. (2002). Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation. *Oncogene*, *21*(14), 2141-2153. doi:10.1038/sj.onc.1205280
- Troen, B. R. (2004). The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News Perspect*, *17*(1), 19-28. doi:10.1358/dnp.2004.17.1.829022
- Tsao, Y. T., Huang, Y. J., Wu, H. H., Liu, Y. A., Liu, Y. S., & Lee, O. K. (2017). Osteocalcin Mediates Biom mineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci*, *18*(1). doi:10.3390/ijms18010159
- Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., . . . Suda, T. (2000). Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, *141*(9), 3478-3484. doi:10.1210/endo.141.9.7634
- Ullah, Z., Lee, C. Y., & Depamphilis, M. L. (2009). Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Div*, *4*, 10. doi:10.1186/1747-1028-4-10
- Valentijn, F. A., Falke, L. L., Nguyen, T. Q., & Goldschmeding, R. (2018). Cellular senescence in the aging and diseased kidney. *J Cell Commun Signal*, *12*(1), 69-82. doi:10.1007/s12079-017-0434-2
- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, *509*(7501), 439-446. doi:10.1038/nature13193
- Villiard, E., Denis, J. F., Hashemi, F. S., Igelmann, S., Ferbeyre, G., & Roy, S. (2017). Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of amniotes. *Biol Open*, *6*(6), 891-896. doi:10.1242/bio.025809
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., . . . Ho, A. D. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, *4*(6), e5846. doi:10.1371/journal.pone.0005846
- Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S., . . . Perez, V. I. (2017). Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell*, *16*(3), 564-574. doi:10.1111/ace1.12587
- Wang, Y., Schulte, B. A., LaRue, A. C., Ogawa, M., & Zhou, D. (2006). Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*, *107*(1), 358-366. doi:10.1182/blood-2005-04-1418
- Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C. J., . . . Hoeijmakers, J. H. (1997). Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr Biol*, *7*(6), 427-439. doi:10.1016/s0960-9822(06)00190-4
- White, R. R., Milholland, B., de Bruin, A., Curran, S., Laberge, R. M., van Steeg, H., . . . Vijg, J. (2015). Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing. *Nat Commun*, *6*, 6790. doi:10.1038/ncomms7790

- Wiedemeyer, R., Brennan, C., Heffernan, T. P., Xiao, Y., Mahoney, J., Protopopov, A., . . . Chin, L. (2008). Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell*, *13*(4), 355-364. doi:10.1016/j.ccr.2008.02.010
- Wiley, C. D., Flynn, J. M., Morrissey, C., Lebofsky, R., Shuga, J., Dong, X., . . . Campisi, J. (2017). Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence. *Aging Cell*, *16*(5), 1043-1050. doi:10.1111/accel.12632
- Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., . . . Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab*, *23*(2), 303-314. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.011
- Wilson, S. R., Peters, C., Saftig, P., & Bromme, D. (2009). Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem*, *284*(4), 2584-2592. doi:10.1074/jbc.M805280200
- Xu, M., Palmer, A. K., Ding, H., Weivoda, M. M., Pirtskhalava, T., White, T. A., . . . Kirkland, J. L. (2015). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife*, *4*, e12997. doi:10.7554/eLife.12997
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., . . . Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, *24*(8), 1246-1256. doi:10.1038/s41591-018-0092-9
- Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., . . . Kirkland, J. L. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(46), E6301-6310. doi:10.1073/pnas.1515386112
- Yan, G., Eller, M. S., Elm, C., Larocca, C. A., Ryu, B., Panova, I. P., . . . Alani, R. M. (2013). Selective inhibition of p300 HAT blocks cell cycle progression, induces cellular senescence, and inhibits the DNA damage response in melanoma cells. *J Invest Dermatol*, *133*(10), 2444-2452. doi:10.1038/jid.2013.187
- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., & Chen, Z. J. (2017). cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(23), E4612-E4620. doi:10.1073/pnas.1705499114
- Yant, S. R., Wu, X., Huang, Y., Garrison, B., Burgess, S. M., & Kay, M. A. (2005). High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol*, *25*(6), 2085-2094. doi:10.1128/MCB.25.6.2085-2094.2005
- Yavropoulou, M. P., & Yovos, J. G. (2016). The molecular basis of bone mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, *16*(3), 221-236. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27609037>
- Yeo, E. J., Hwang, Y. C., Kang, C. M., Kim, I. H., Kim, D. I., Parka, J. S., . . . Park, S. C. (2000). Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol*, *35*(5), 553-571. doi:10.1016/s0531-5565(00)00108-x
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., . . . Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*, *7*, 11190. doi:10.1038/ncomms11190
- Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., . . . Niedernhofer, L. J. (2018). Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, *36*, 18-28. doi:10.1016/j.ebiom.2018.09.015
- Yuan, Y., Wang, Q., Paulk, J., Kubicek, S., Kemp, M. M., Adams, D. J., . . . Schreiber, S. L. (2012). A small-molecule probe of the histone methyltransferase G9a induces cellular senescence in pancreatic adenocarcinoma. *ACS Chem Biol*, *7*(7), 1152-1157. doi:10.1021/cb300139y

- Yun, M. H., Davaapil, H., & Brockes, J. P. (2015). Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife*, 4. doi:10.7554/eLife.05505
- Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med*, 13(7), 791-801. doi:10.1038/nm1593
- Zeng, J. P., Bi, B., Chen, L., Yang, P., Guo, Y., Zhou, Y. Q., & Liu, T. Y. (2014). Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: a robust model of cellular photoaging. *J Dermatol Sci*, 73(1), 49-56. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.08.013
- Zhang, Y., Gundelach, J., Lindquist, L. D., Baker, D. J., van Deursen, J., & Bram, R. J. (2019). Chemotherapy-induced cellular senescence suppresses progression of Notch-driven T-ALL. *PLoS One*, 14(10), e0224172. doi:10.1371/journal.pone.0224172
- Zhang, Y., Ikeno, Y., Bokov, A., Gelfond, J., Jaramillo, C., Zhang, H. M., . . . Van Remmen, H. (2013). Dietary restriction attenuates the accelerated aging phenotype of Sod1(-/-) mice. *Free Radic Biol Med*, 60, 300-306. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.026
- Zhang, Y., Unnikrishnan, A., Deepa, S. S., Liu, Y., Li, Y., Ikeno, Y., . . . Richardson, A. (2017). A new role for oxidative stress in aging: The accelerated aging phenotype in Sod1(-/-) mice is correlated to increased cellular senescence. *Redox Biol*, 11, 30-37. doi:10.1016/j.redox.2016.10.014
- Zhao, J., Zhang, L., Lu, A., Han, Y., Colangelo, D., Bukata, C., . . . Robbins, P. D. (2020). ATM is a key driver of NF-kappaB-dependent DNA-damage-induced senescence, stem cell dysfunction and aging. *Aging (Albany NY)*, 12(6), 4688-4710. doi:10.18632/aging.102863
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., & Hung, M. C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, 3(3), 245-252. doi:10.1038/35060032
- Zhou, Y., Wu, Y., Jiang, X., Zhang, X., Xia, L., Lin, K., & Xu, Y. (2015). The Effect of Quercetin on the Osteogenic Differentiation and Angiogenic Factor Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, 10(6), e0129605. doi:10.1371/journal.pone.0129605
- Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., . . . Kirkland, J. L. (2017). New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)*, 9(3), 955-963. doi:10.18632/aging.101202
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., . . . Kirkland, J. L. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*, 15(3), 428-435. doi:10.1111/ace.12445
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., . . . Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644-658. doi:10.1111/ace.12344

7 Anhang

7.1 Materialien

Tabelle 35: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Combitips advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryo tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fixateur MouseExFix	RISystem, Davos, Switzerland
Handbandsäge	RISystem, Davos, Switzerland
Nitrilhandschuhe	Braun, Melsungen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	BioRad, Hercules, USA
Parafilm®	Bemis, Neenah, USA
Pinzetten und Scheren	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
qPCR Platten	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Falcon, Becton Dickinson, New York, USA
RNase Zap™	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Serologische Pipetten	Falcon, Corning Inc., New York, USA
Spritze	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Filter	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, New York, USA
Zellkulturplatten	Falcon, Corning Inc., New York, USA
Zellschaber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb	Falcon, Becton Dickinson, New York, USA

Tabelle 36: Geräte

Geräte	Hersteller
Bakterieninkubator	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
CasyTT cell counter	Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland
Cell culture safety hood - Herasafe™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Centromat R (Schüttler)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Chemi-Smart System	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Dometic, Solna, Schweden
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Bulle, Deutschland

Leica RM2255 Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Megafuge 2R	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Mikroskop (Histologie)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	Leica, Bernsheim, Deutschland
Mini-Protean 3 System	BioRad, Hercules, USA
Multipette®M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neon® Transfection System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Perfect Blue Semi-Dry Elektrobloetter	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Perfect Spin 24R Refrigerated Centrifuge	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plate reader infinite M200 pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
QuantStudio® 3 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sicherheitswerkbank KS12 Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SKYSCAN 1172	Bruker, Billerica, USA
TB1 Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermocycler 9700 PCR Systems	Applied Biosystems, Foster City, USA
Viva40 µCT	Scanco Medical AG, Wangen-Brüttisellen, Schweiz
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zellkulturinkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 37: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
alpha-MEM	Lonza, Basel, Schweiz
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Alizarin Red S	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ascorbat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Benzoylperoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5 x BigDye Terminator Reaktionspuffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
BigDye Terminator Version 3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Clindamycin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Collagenase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dasatinib	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTPs	Bioline, London, UK
Doxycyclin Hyclat	ARCOS Organics, Fair Lawn, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium – low glucose D6646-500ml	Gibco, Grand Island, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose	Gibco, Grand Island, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline	Gibco, Grand Island, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FastAP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5x FIREPol Master Mix	Solis Biotyne, Tartu, Estland
FCS	Gibco, Grand Island, USA
Ganciclovir	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
van Gieson Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutamax	Gibco, Grand Island, USA

Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Heparin	Biochrom, Berlin, Deutschland
5x Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Hoechst	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrogenchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
IBMX	Merck, Darmstadt, Deutschland
Indomethacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
6x Ladepuffer (Agarosegel)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methylmethacrylat (MMA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mytomycin C	Roche, Basel, Schweiz
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nile Red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
N,N-Dimethyl-p-toluidin	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyde 20% Solution, EM Grade 15713	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PFA	Merck, Darmstadt, Deutschland
pHPL Lot: pHPL mBG 135	Uniklinikum Salzburg
Phusion DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglycol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Quercetin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

Salpetersäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
TBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x T4-Ligasepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq DNA-Polymerase	Stratec, Birkenfeld, Deutschland
Temgesic®	Indivior Europe Limited, Dublin, Irland
Toluidinblau O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tramal®	Grünenthal GmbH, Aachen, Germany
TRI Reagent®	Zymo Research, Orange, USA
TritonX-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Gibco, Grand Island, USA
Ultra-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
XGal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, USA

Tabelle 38: Kits

Kit	Hersteller
BCA assay kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CyQuant™ Cell Proliferation Assay	Life Technologies, Carlsbad, USA
Direct-zol™ RNA Mini-Prep KIT	Zymo Research, Orange, USA
DNA Purification Kits µSB Spin PCRapace C250	Invitek Molecular GmbH, Berlin, Deutschland
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit C250	Stratec, Birkenfeld, Deutschland
Neon® Transfection System Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PrestoBlue™ Cell Viability Reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Western Lightning Plus-ECL System	PerkinElmer Thermo, Waltham, USA

Tabelle 39: Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti Flag	Kaninchen	1:1000	Molecular Probes/ Invitrogen
Anti GAPDH	Maus	1:1000	Molecular Probes/ Invitrogen
Anti Kaninchen HRP	Ziege	1:1000	Molecular Probes/ Invitrogen
Anti Maus HRP	Ziege	1:1000	Molecular Probes/ Invitrogen

Tabelle 40: Software

Software	Hersteller
CTAn(v.1.16)	Bruker, Billerica, USA
Fiji	
Geneious	Biomatters, Auckland, Neuseeland
NRecon	Micro Photonics Inc., Allentown, USA
Osteomeasure	OSTEOMETRICS INC., Atlanta, USA
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Scanco Software	Scanco Medical AG, Brüttsellen, Switzerland

Tabelle 41: Vektoren

Vektor	Hersteller	Beschreibung
pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0	Addgene #62987	Cas9 Nuclease und Puromycinresistenz (Ran et al., 2013)
pTOV-11	Zur Verfügung gestellt von Dr. Manfred Gossen (Charité- Universitätsmedizin Berlin Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapie)	TetOn induzierbares Transposon Element (Heinz et al., 2011)
pCMV(CAT)T7-SB100(AL)	Zur Verfügung gestellt von Dr. Manfred Gossen (Charité- Universitätsmedizin Berlin Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapie)	Sleeping Beauty Transposase SB100 (Mates et al., 2009)
pBabepuro3-p16Flag	Addgene #24934	human p16 Flag (C terminal) (Wiedemeyer et al., 2008)
Flag p21 WT	Addgene #16240	human Cip1/WAF1 Flag (N terminal) (B. P. Zhou et al., 2001)

Tabelle 42: Primersequenzen für die Genexpressionsanalyse humaner Proben

Gen	Bezeichnung	Sequenz
GAPDH	qh_GAPDH_F	5'- CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG -3'
	qh_GAPDH_R	5'- ACA GTC TTC TGG GTG GCA GT -3'
p16 ^{INK4a}	qh_p16/Ink4a_F	5'- CAA CGC ACC GAA TAG TTA CG -3'
	qh_p16/Ink4a_R	5'- ACC AGC GTG TCC AGG AAG -3'
p21 ^{WAF/Cip-1}	qh p21 MB for	5'- CCC AAG CTC TAC CTT CCC AC -3'
	qh p21 MB rev	5'- CTG AGA GTC TCC AGG TCC AC -3'
p16 ^{INK4a} Flag	qh_p16Flag_for	5'- TCG TCA TCG TCT TTG TAG TCC A -3'
	qh_p16Flag_rev	5'- GCA CCA GAG GCA GTA ACC A -3'
p21 ^{WAF-1/Cip-1} Flag	qh_p21Flag_for	5'- TGG ACT ACA AAG ACG ATG ACG A -3'
	qh_p21Flag_rev	5'- GTT CTG ACG GAC ATC CCC AG -3'
LMNB1	qh_laminb1_for	5'- AGA TCG AGC TGG GCA AGT G -3'
	qh_laminb1_rev	5'- TGG GCG CCA TTA AGA TCA GA -3'
p53	P53_hum_for	5'- TCA ACA AGA TGT TTT GCC AAC TG -3'
	P53_hum_rev	5'- ATG TGC TCT GAC TGC TTG TAG ATG -3'
GDNF	for	5'- GTT ATG GGA TGT CGT GGC TG -3'
	rev	5'- TCC TCT GGC ATA TTT GAG TCA C -3'
PLXNA3	for	5'- TTG AAG AAG GTG CGG GTC G -3'
	rev	5'- CAG GAG ATA GAT GTG CCG GTG -3'

Tabelle 43: Primersequenzen für die Genexpressionsanalyse muriner Proben

Gen	Bezeichnung	Sequenz
p16 ^{INK4a}	qm_Ink4a_Li09_f	5'- CGT ACC CCG ATT CAG GTG AT -3'
	qm_Ink4a_Li09_r	5'- TTG AGC AGA AGA GCT GCT ACG T -3'
p19 ^{Arf}	qmp16/ln4v_F	5'- CGC AGG TTC TTG GTC ACT G -3'
	qmp16/ln4v_R	5'- TCT GCA CCG TAG TTG AGC AG -3'
p21 ^{WAF-1/Cip-1}	qmCDKN1A_F	5'- TGA CAG ATT TCT ATC ACT CCA AGC G -3'
	qmCDKN1A_R	5'- CAC ACA GAG TGA GGG CTA AGG C -3'
Opg	qm_Opg_neu1_F	5'- GAG TGT GAG GAA GGG CGT TA -3'
	qm_Opg_neu1_R	5'- CAA ACT GTG TTT CGC TCT GG -3'
Rankl	qm_Rankl_F	5'- GTA CGC CAA CAT TTG CTT TCG -3'
	rankl_R	5'- GTA GGT ACG CTT CCC GAT GTT -3'
Bglap	Bglap_F	5'- CCT GGC TGC GCT CTG TCT -3'
	Bglap_R	5'- TGC TTG GAC ATG AAG GCT TTG -3'
Alp	qm_Alpl_F	5'- GCA CCT GCC TTA CCA ACT CT -3'
	qm_Alpl_R	5'- TTT CGA GTT TCA GGG CAT TT -3'
Runx2	Runx2_F	5'- GTG GCC ACT TAC CAC AGA GC -3'
	Runx2_R	5'- TGA GGC GAT CAG AGA ACA AA -3'
Sost	qm_Sost_neu2_F	5'- CCT CCT CCT GAG AAC AAC CA -3'
	qm_Sost_neu2_R	5'- CTC GCG GCA GCT GTA CTC -3'
Ibsp	Ibsp_F	5'- CCA CAC CCC AAG CAC AGA CT -3'
	Ibsp_R	5'- CTT TCT GCA TCT CCA GCC TTC T -3'
Acp5	qm_Acp5_F	5'- GGT ATG TGC TGG CTG GAA AC -3'
	qm_Acp5_R	5'- ATT TTG AAG CGC AAA CGG TA -3'

Calcr	qm_Calcr_neu2_F	5'- TGG GTC ACT CCT TGT CGA TT -3'
	qm_Calcr_neu2_R	5'- CTT GTG CAA GGT CAC CCT CT -3'
Ctsk	Ctsk_F	5'- GTC GTG GAG GCG GCT ATA TG-3'
	Ctsk_R	5'- AGA GTC AAT GCC TCC GTT CTG -3'
Fgf23	qm_Fgf23_neu2_F	5'- TTT GGA TCG CTT CAC TTC AG -3'
	qm_Fgf23_neu2_R	5'- GTG ATG CTT CTG CGA CAA GT -3'
Gapdh	qmGAPDH_F	5'- GGG AAG CCC ATC ACC ATC TT -3'
	qmGAPDH_R	5'- CGG CCT CAC CCC ATT TG -3'
Pparg	qm_ppargneu1_F	5'- AGC TCA AGC TGA ATC ACC CA -3'
	qm_ppargneu1_R	5'- CAC GTG CTC TGT GAC GAT CT -3'
Adipoq	adipoq forward	5'- CTCCATCTGGAGGTGGGAGA -3'
	adipoq reverse	5'- TGGGCTATGGGTAGTTGCAG -3'
Ob	Ob_F	5'- TCT GAA AGA TCC CAC GTG CC- 3'
	Ob_R	5'- AAG GCT CAG GAC ATT CCA GC -3'
Thy1	qm_CD90(Thy1)_F	5'- GGG GAG TCC AGA ATC CAA GTC -3'
	qm_CD90(Thy1)_R	5'- AGT CCA GGC GAA GGT TTT GG -3'

2701 cagggggatc atcgaattca ccatgtctag actggacaag agcaaagtca taaacggcgc
 2761 tctggaatta ctcaatggag tctggtatcga aggcctgacg acaaggaaac tctgctcaaaa
 2821 gctgggagtt gagcagccta cctgtactg gcacgtgaag aacaagcggg ccctgctcga
 2881 tgccctgcca atcgagatgc tggacaggca tcataccac ttctgcccc tggaaggcga
 2941 gtcattggcaa gactttctgc ggaacaacgc caagtcatc cgctgtgctc tcctctcaca
 3001 tgcgcagcggg gctaaagtgc atctcggcac ccgccaaca gagaaacagt acgaaaccct
 3061 ggaaaatcag ctgcgcgttcc tgtgtcagca aggtctctcc ctggagaacg cactgtacgc
 3121 tctgtccgcc gtgggccact ttacactggg ctgctgattg gaggaacagg agcatcaagt
 3181 agcaaaagag gaaagagaga cacctaccac cgattctatg cccccacttc tgagacaagc
 3241 aattgagctg ttcgaccggc agggagccga acctgccttc cttttcggcc tggaaactaat
 3301 catatgtggc ctggagaaaac agctaaagtg cgaaaagcggc gggccggcc acgcccttga
 3361 cgattttgac ttagacatgc tcccagccga tccccttgac gactttgacc **TTGATATGCT**
3421 GCCTGCTGAC gctccttgacg attttgacct tgacatgctc cccgg**ggagg** **cgagaggaag**
3481 tctgctaaca tgcggtgacg tgcgagagaa tcttggccca atgaccgagt acaagcccac
3541 ggtgcgcctc gccaccgcg acgacgtccc caggggcgta cgcaccctcg ccgccgcgtt
3601 cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt cgatccggac cgccacatcg agcgggtcac
3661 cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt cgggctcgac atcggcaagg tgtgggtcgc
3721 ggacgacggc gccgcggtgg cgtctcggac cacgcccggag agcgtcgaag cgggggcggt
3781 gttcgcgag atcggcccgc gcattggcga gttgagcggg tcccggctgg ccgcgcAGCA****
3841 ACAGATGGAA GGCCTcctgg cgccgcaccg gcccaaggag cccgcgtggg tccctggccac
3901 cgtcggagtc tgcgccgacc accagggcaa gggctctgggc agcgcctcgc tgctccccgg
3961 agtggaggcg gccgagcgcg ccgggggtgcc cgccttctcg gagacctccg cgccccgcaa
4021 cctccccctc tacgagcggc tccgcttcaac cgtcaccgcc gacgtcaggg tgccccgaagg
4081 accgcgcacc tgggtgatga cccgcaagcc cgggtgcctga ggatccgagc aTCTTACCGC****
 4141 **CATTTATACC** CAatatttgt ctgtttttct tgatttgggt atacatttaa atgttaataa
 4201 aacaaaatgg tggggcaatc atttacatct ttagggatat gtaattacta gttcagggtg
 4261 attgccacaa gacaaacatg ttaagaaact ttcccgttat ttacgctctg ttctgttaa
 4321 tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactgat attcttaact atgttgcctc
 4381 ttttactcgt tgtggatatg ctgctttaa gctctgtat catgctatg ctccccgtac
 4441 ggctttcgtt ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagtgtg
 4501 gcccgttgct cgtcaacgtg cgtggtgtg ctctgtgtt gctgacgcaa cccccactgg
 4561 ctggggcatt gccaccacct gtcaactcct ttctgggact ttctgttcc cctccccgat
 4621 cgccacggca gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgcctg tggacagggg ctaggttgct
 4681 gggcactgat aattccgtgg tgttgcggg gaagctgacg tcgagatctt cctgcggaga
 4741 ttggccgctc tagctagaat taattcgatg gtggcatccc tgtgaccctt ccccagtgcc
 4801 tctcctggcc ctggaagtgg ccaactccagt gccaccagc cttgtcctaa taaaattaag
 4861 ttgcatcatt ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atgggggtgga ggggggtggt
 4921 atggagcaag gggcaagtgg ggaagacaac ctgtagggcc tgcggggctt attggaacc
 4981 aagctggagt gcagtgccac aatcttggct cactgcaatc tccgcctcct gggttcaagc
 5041 gattctcctg cttcagcctc ccgagttgtt gggattccag gcatgcatga ccaggctcag
 5101 ctaatttttg tttttttggg agagacgggg tttcaccata ttggccaggc tggctccaa
 5161 ctccctaatc caggtgatct acccacttg gctcccaaa ttgctgggat tacaggcgtg
 5221 aaccactgct cccttccctg tcttctgat tttgagctca agatatccat cacaaagctc
 5281 tgacctcaat cctatagaaa ggaggaatga gccaaaattc acccaactta ttgtgggaag
 5341 cttgtggaag gctactcga atgtttgacc caagttaaac aatttaaagg caatgctacc
 5401 aaataactaat tgagtgtatg ttaacttctg acccactggg aatgtgatga aagaaataa
 5461 agctgaaatg aatcattctc tctactatta ttctgatatt tcacattctt aaaataaagt
 5521 ggtgatccta actgacctta agacagggaa tcttactcg gattaaatgt caggaattgt
 5581 gaaaaagtga gtttaaagt atttggctaa ggtgtatgta aacttccgac ttcaactgac
 5641 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgtt
 5701 ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg
 5761 cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc
 5821 tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttccgggaagc
 5881 gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc
 5941 aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagc gctgcgcctt atccggtaac
 6001 tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt
 6061 aacaggatta gcagagcggg gtatgtaggc ggtgctacag agttcctgaa gtgggtggcct
 6121 aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgct ctctgctgaa gccagttacc
 6181 ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt
 6241 ttttttgtt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg
 6301 atcttttcta cgggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc

6361 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa
6421 tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag
6481 gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgacctgact ccccgctcgtg
6541 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca
6601 gaccacgct caccggctcc agatztatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag
6661 cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa
6721 gctagagtaa gtagttcgcc agttaaatag ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc
6781 atcggtggtg cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca
6841 aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctccg
6901 atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat
6961 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggta gtaactcaac
7021 aagtcattct gagaatagtg tatgcgcgca ccgagttgct cttgccggcg gtcaatacgg
7081 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca cttatggaaa acgttcttcg
7141 gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt
7201 gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa
7261 ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata
7321 ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac
7381 atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa
7441 gtgccac
//

7.2.2 pTOV-11_2ApuroR_CDKN1A

1 ctaaattgta agcgttaata ttttggtaaa attcgcgtta aatttttght aatcagctc
61 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga
121 gatagggttg agtggtgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc
241 ctaatcaagt tttttggggg cgaggtgccc taaagcacta aatcgggaacc ctaaaggag
301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggaagaa
361 agcgaagga gcggcgctg gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
421 cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctcgc
481 caactggttg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg
541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg tttcccagt cacgacgtg
601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccct
661 acagttgaag tcggaagttt acatacactt aagttggagt cattaact cgtttttcaa
721 ctacaccaca aatttcttgt taacaaacia tagtttggtc aagtcagtta ggacatctac
781 tttgtgcatg acacaagtca tttttccaac aattgtttac agacagatta tttcacttat
841 aattcactgt atcacaattc cagtgggtca gaagtttaca tacactaagt tgactgtgcc
901 tttaaacagc ttggaaaatt ccagaaaagt atgtcatggc tttagaagct tctgatagac
961 taattgacat catttgagtc aattggaggt gtacctgtgg atgtatttca agcggctccg
1021 tagcttaccg gtaactcgag tttactccct atcagtgata gagaacgtat gaagagttta
1081 ctccctatca gtgatagaga acgtatgcag actttactcc ctatcagtga tagagaacgt
1141 ataaggagtt tactccctat cagtgataga gaacgtatga ccagtttact ccctatcagt
1201 gatagagaac gtatctacag tttactccct atcagtgata gagaacgtat atccagttta
1261 ctccctatca gtgatagaga acgtataagc tttgcttatg **TAAACCAGGG CGCCTATAAA**
1321 agagtgctga tttttgagt aaacttcaat tccacaacac ttttgtctta **taccaactTT**
1381 CCGTACCACT TCCTACCCtc gtaaagtcga catg**gactac** **aaagacgatg** **acgataaagc**
1441 aagaagagca tctgtgcata tgtcagaacc ggctggggat gtccgtcaga acccatgccc
1501 cagcaaggcc tgccgccgcc tcttcggccc agtggacagc gagcagctga gccgcgactg
1561 tgatgcgcta atggcgggct gcatccagga ggcccgtgag cgatggaaact tcgactttgt
1621 caccgagaca ccaactggagg gtgacttcgc ctgggagcgt gtgcggggcc ttggcctgcc
1681 caagctctac cttcccacgg ggccccggcg aggcgggat gaggttggag gaggcaggcg
1741 gcctggcacc tcacctgctc tgetgcaggg gacagcagag gaagaccatg tggacctgtc
1801 actgtcttgt acccttgtc ctcgctcagg ggagcaggct gaagggctcc caggtggacc
1861 tggagactct cagggctgaa aacggcggca gaccagcatg acagatttct accactcaa
1921 agcgcggtc atcttctcca agaggaagcc ctaagcggcc gctaagatcc agacatgata
1981 agataca**TTG ATGAGTTTG ACAACCA**aa actagaatgc agtgaaaaaa atgccttatt
2041 tgtgaaatth gtgatgctat tgccttattt gtaaccatta taagctgcaa taacaagtt
2101 aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt

2161 taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt atggctgatt atgatcagat ccttcgccgg
2221 cgattacgta cagtcgagga gcttgataat tccacggggg tgggggttgcg ccttttccaa
2281 ggcagccctg ggtttgcgca gggacgcggc tgctctgggc gtggttccgg gaaacgcagc
2341 ggcgccgacc ctgggtctcg cacattcttc acgtccgttc gcagcgtcac ccgatcttc
2401 gccgctaccc ttgtgggccc cccggcgacg ctccctgctc cgcccctaag tcgggaaggt
2461 tccttgccgt tgcggcgctg ccggacgtga caaacggaag ccgcacgtct cactagtacc
2521 ctgcgagacg gacagcgcca gggagcaatg gcagcgcgcc gaccgcgatg ggctgtggcc
2581 aatagcggct gctcagcagg gcgcgccgag agcagcggcc ggggaagggg gggtcggggg
2641 gcgggggtgt gggcggtagt gtggggcctg ttcctgcccc cgcggtgttc cgcattctgc
2701 aagcctccgg agcgcacgtc ggcagtcggc tccctcgttg accgaatcac cgacctctct
2761 ccccaggggg atcatcgaat tcaccatgtc tagactggac aagagcaaag tcataaacgg
2821 cgctctggaa ttactcaatg gattgagcag ctaccctgta ctggcacgtg aagaacaagg aactcgtca
2881 aaagctggga gttgagcaga tgctggacag gcatcatacc cacttctgcc ccctggaagg
2941 cgatgccctg ccaatcgaga tgctggacag gcatcatacc cacttctgcc ccctggaagg
3001 cgagtcatgg caagactttc tgccggaacaa cgccaagtca ttccgctgtg ctctcctctc
3061 acatcgcgac ggggctaaag tgcatctcgg caccgcccc acagagaaac agtacgaaac
3121 cctggaaaat cagctcgcgt tcctgtgtca gcaaggcttc tcctgggaga acgcactgta
3181 cgctctgtcc gccgtgggcc actttacact gggctgcgta ttggaggaa acgagcatca
3241 agtagcaaaa gaggaaagag agacacctac caccgattct atgccccac ttctgagaca
3301 agcaattgag ctgttcgacc ggcagggagc cgaacctgcc ttccttttcg gcctggaact
3361 aatcatatgt ggcctggaga aacagctaaa gtgcgaaagc ggcgggccgg ccgacgcctt
3421 tgacgatttt gacttagaca tgctcccagc cgatgccctt gacgactttg acc**TTGATAT**
3481 GCTGCCTGCT GACgctcctt acgattttga ccttgacatg ctccccggg **agggcagagg**
3541 aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctggc ccaatgaccg agtacaagcc
3601 cacggtgcgc ctgcgccacc gcgacgacgt ccccagggcc gtacgcaccc tcgccgccgc
3661 gttcgcgcac taccccgcc cgcgccacac cgtcgcaccc gaccgccaca tcgagcgggt
3721 caccgagctg caagaactct tcctcacgcg cgtcgggctc gacatcggca aggtgtgggt
3781 cgcggacgac ggcgcgcgcg ttggcgtctg gaccacgccg gagagcgtcg aagcgggggc
3841 ggtgttcgcc gagatggccc cgcgcactgg cgagttgagc ggttcccggc tggccgcgcA****
3901 GCAACAGATG GAAGGCCTcc tggcgcgca cccgcccagg gagcccgcgt ggttccctggc
3961 caccgtcggg gtctcgcgcc accaccaggg caagggctctg ggcagcgcgg tcgtgctccc
4021 cggagtggag gcggccgagc gcgcccgggt gcccgccttc ctggagacct ccgcgccccg
4081 caacctcccc ttctacgagc ggctcggctt caccgtcacc gccgacgtcg aggtgcccga
4141 aggaccgcgc acctggtgca tgaccgcgaa gcccgtgccc tgaggatccg agcaTCTTAC****
4201 CGCCATTTAT ACCCAtat tttctgtttt tcttgatttg ggtatacatt taaatgtaa
4261 taaaacaaaa ttgtggggca atcatttaca tttttaggga tatgtaatta ctagtccagg
4321 tgtattgcca caagacaaac atgttaagaa actttcccgt tatttacgct ctgttccctg
4381 taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact gatattctta actatgttgc
4441 tccttttacg ctgtgtggat atgctgcttt aatgcctctg tatcatgcta ttgcttccc
4501 tacggctttc gttttctcct ccttgataaa atcctggttg ctgtctcttt atgaggagtt
4561 gtggcccgtt gtccgtcaac gtggcgtggt gtgctctgtg ttgctgacg caacccccac
4621 tggctggggc attgccacca cctgtcaact ccttctggtg actttcgtt tccccctcc
4681 gatcgccacg gcagaactca tcgccgcctg ccttgcccgc tgcgtggacag gggctaggtt
4741 gctgggcact gataattccg ttgtgttgtc ggggaagctg acgtcgagat cttcctgcgg
4801 agattggccg ctctagctag aattaattcg atggtggcat cctgtgacc cctcccagt
4861 gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc acttataat attatggggg ggaggggggt
4921 aagttgcatc atttgtctg actaggtgct cttctataat attatggggg gctatggggg
4981 ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgtagg gcctgcgggg tctattggga
5041 accaagctgg agtgcagtg cacaatcttg gctcactgca atctccgct cctgggttca
5101 agcgattctc ctgcttcagc ctcccaggtt gttgggattc caggcatgca tgaccaggct
5161 cagctaattt ttgtttttt ggtagagacg ggtttcacc atattggcca ggctggtctc
5221 caactcctaa tctcaggtga tctaccacc ttggcctccc aaattgctgg gattacaggc
5281 gtgaaccact gctcccctcc ctgtccttct gatthttgagc tcaagatac catcaciaag
5341 ctctgacctc aatcctatag aaaggaggaa tgagccaaaa ttcacccaac ttattgtggg
5401 aagcttgtgg aaggctactc gaaatgtttg acccaagtta aacaatttaa aggcaatgct
5461 accaaatact aattgagtgt atgttaactt ctgaccact gggaatgtga tgaagaaat
5521 aaaagctgaa atgaatcatt ctctacta taattctgat atttcacatt cttaaaataa
5581 agtggtgatc ctaactgacc ttaagacagg gaatctttac tcggattaaa tgtcaggaat
5641 tgtgaaaaag tgagtttaaa tgtatthttg taaggtgtat gtaaacttcc gacttcaact
5701 gacatgtgag caaaaaggcca gcaaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
5761 tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcaciaaaa atcgacgctc aagtacaggg

5821 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgTG
 5881 cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga
 5941 agcgtggcgc tttctcatag ctacagctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc
 6001 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt
 6061 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact
 6121 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttcct gaagtggTg
 6181 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt
 6241 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggT
 6301 ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
 6361 ttgatctttt ctacggggTc tgacgctcag tggAACgaaa actcacgTta agggattttg
 6421 gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt
 6481 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggTctgaca gttaccaatg cttaatcagT
 6541 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatTT cgttcatcca tagttgcctg actccccgTc
 6601 gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcTgc aatgataccg
 6661 cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggagggcc
 6721 gagcgcagaa gtggTcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccg
 6781 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgTtgTgc cattgctaca
 6841 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgTttggt atggcttcat tcagctccgg tcccaacga
 6901 tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgTtg tgcaaaaaag cggTtagctc cttcggTcct
 6961 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggTtat ggcagcactg
 7021 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca
 7081 accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctctgccc ggcgTcaata
 7141 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgTtct
 7201 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagTtcgat gtaaccact
 7261 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttacca gcgTttctgg gtgagcaaaa
 7321 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc
 7381 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga
 7441 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga
 7501 aaagtgccac

7.2.3 pTOV-11_2APuroR

1 ctaaattgta agcgttaata ttttgTtaaa attcgcgTta aatTTTTgtt aaatcagctc
 61 atTTTTtaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga
 121 gatagggttg agtgttgTtc cagtttgGaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
 181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aacctacc
 241 ctaatcaagt tttttggggT cgaggtgccc taaagcacta aatcggaaacc ctaaaggag
 301 cccccattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggaagaa
 361 agcgaaaagg gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgTgc gcgtaacc
 421 cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcc cttcgcctc cattcggTgc
 481 caactgttgG gaagggcgat cggtgcggc ctcttcgcta ttacgcagc tggcgaaagg
 541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtTgggt aacgccaggg ttttccagT cacgagTtg
 601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccct
 661 acagTtgaag tcggaagTtt acatacactt aagTtgagT cattaaaaact cgTTTTtcaa
 721 ctacaccaca aatTtctTgt taacaaacaa tagTtttgGc aagTcagTta ggacatctac
 781 tttgtgcatg acacaagtca tttttccaac aatTgtttac agacagatta tttcacttat
 841 aattcactgt atcacaattc cagTgggtca gaagTttaca taccataagt tgactgtgcc
 901 tttaaacagc ttggaaaatt ccagaaaatg atgtcatggc tttagaagct tctgatagac
 961 taattgacat catttgagTc aatTggagT gtacctgtgg atgtattTca agcggTccgc
 1021 tagcttaccg gtaactcgag tttactccct atcagTgata gagaacgtat gaagagTtta
 1081 ctccctatca gtgatagaga acgtatgcag actttactcc ctatcagTga tagagaacgt
 1141 ataaggagTt tactccctat cagTgataga gaacgtatga ccagTttact ccctatcagT
 1201 gatagagaa gTatctacag tttactccct atcagTgata gagaacgtat atccagTtta
 1261 ctccctatca gtgatagaga acgtataagc tttgcttatg taaaccaggg cgcctataaa
 1321 agagtgtgta tttttgagT aaacttcaat tccacaacac tttgtctta taccacttt
1381 cggTaccact tcctaccctc gTaaagTcga cacc**atggaa gacgcaaaa acataaaggaa**
1441 **aggccccggc ccattctatc cgctggaaga tggaaaccgct ggagagcaac tgcataaggc**

1501 tatgaagaga tacgccctgg ttcttgaac aattgctttt acagatgcac atatcgaggt
 1561 ggacatcact tacgctgagt acttcgaaat gtccgttcgg ttggcagaag ctatgaaacg
 1621 atatgggctg aatacaaatc acagaatcgt cgtatgcagt gaaaactctc ttcaattctt
 1681 tatgccgggtg ttgggcgctg tatttatcgg agttgcagtt gcgcccgcga acgacattta
 1741 taatgaacgt gaattgctca acagtatggg catttcgcag cctaccgtgg tgttcgtttc
 1801 caaaaagggg ttgcaaaaaa ttttgaacgt gcaaaaaaag ctcccaatca tccaaaaaat
 1861 tattatcatg gattctaaaa cggattacca gggatttcag tcgatgtaca cgttcgtcac
 1921 atctcatcta cctcccggtt ttaatgaata cgattttgtg ccagagtcct tcgatagggg
 1981 caagacaatt gcaactgatca tgaactcctc tggatctact ggtctgccta aagggtgcgc
 2041 tctgcctcat agaactgcct gcgtgagatt ctgcgatgcc agagatccta tttttggcaa
 2101 tcaaatcatt ccggatactg cgattttaag tgttgttcca ttccatcacg gttttggaat
 2161 gtttactaca ctcggatatt tgatatgtgg atttcagatc gtcttaatgt atagatttga
 2221 agaagagctg tttctgagga gccttcagga ttacaagatt caaagtgcgc tgcgtgggcc
 2281 aacctattc tccttcttcg ccaaaagcac tctgattgac aaatacgatt tatctaattt
 2341 acacgaaatt gcttctgggtg gcgctcccct ctctaaggaa gtcggggaag cggttgccaa
 2401 gaggttccat ctgccaggta tcaggcaagg atatgggctc actgagacta catcagctat
 2461 tctgattaca cccgaggggg atgataaacc gggcgcggtc ggtaaagttg ttccattttt
 2521 tgaagcgaag gttgtggatc tggataccgg gaaaacgctg ggcgttaatc aaagaggcga
 2581 actgtgtgtg agaggtccta tgattatgtc cggttatgta aacaatccgg aagcgaccaa
 2641 cgccttgatt gacaaggatg gatggctaca ttctggagac atagcttact gggacgaaga
 2701 cgaacacttc ttcacgtttg accgcctgaa gtctctgatt aagtacaaag gctatcaggt
 2761 ggctcccgtc gaattggaat ccatcttgc tcaaaccccc aacatcttcg acgcaggtgt
 2821 cgcaggtctt cccgacgatg acgcccgtga acttcccgcc gccgttgttg ttttgagca
 2881 cggaaagacg atgacggaaa aagagatcgt ggattacgtc gccagtcaag taacaaccgc
 2941 gaaaaagttg cgcggaggag ttgtgtttgt ggacgaagta ccgaaaggtc ttaccggaaa
 3001 actcgacgca agaaaaatca gagagatcct cataaaggcc aagaagggcg gaaagatcgc
 3061 cgtggccaag ggcaagtctg aggaggagct ggccaactgc ttccgcctcc ctcccttggg
 3121 gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccatc ctggctgagc tggacggcga
 3181 cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa
 3241 gctgacctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt
 3301 gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca
 3361 cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa
 3421 ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagtcc gagggcgaca ccctggtgaa
 3481 ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct
 3541 ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat
 3601 caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca
 3661 ctaccagcag aacaccccc atcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca accactacct
 3721 gagcaccag tccgccctga gcaaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct
 3781 ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaaagcgg
 3841 ccgctaagat ccagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca aaactagaat
 3901 gcagtgaaaa aaatgcctta tttgtgaaat ttgtgatgct attgccttat ttgtaacat
 3961 tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca
 4021 gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gtatggctga
 4081 ttatgatcag atccttcgcc ggcgattacg tacagtcgag gagcttgata attccacggg
 4141 gttgggggtg cgccttttcc aaggcagccc tgggtttgcg cagggacgcg gctgctctgg
 4201 gcgtggttcc gggaaacgca gcggcgccga ccctgggtct cgcacattct tcacgtccgt
 4261 tcgcagcgtc acccggatct tcgccgctac cttgtgggc cccccggcg cgcttctgc
 4321 tccgcccta agtcgggaag gttccttgcg gttcgcggcg tgccggacgt gacaaacgga
 4381 agccgcacgt ctcaactagta ccctcgcaga cggacagcgc cagggagcaa tggcagcgcg
 4441 ccgaccgcga tgggctgtgg ccaatagcgg ctgctcagca gggcgcgccg agagcagcgg
 4501 ccgggaaggg gcggtgcggg aggcgggggtg tggggcggta gtgtgggccc tgttctgccc
 4561 cgcgcggtgt tccgcattct gcaagcctcc ggagcgcacg tcggcagtcg gctccctcgt
 4621 tgaccgaatc accgacctct ctcccaggg ggatcatcga attcaccatg tctagactgg
 4681 acaagagcaa agtcataaac ggcgctctgg aattactcaa tggagtcggt atcgaaggcc
 4741 tgacgacaag gaaactcgtc caaaagctgg gagttgagca gcctaccctg tactggcacg
 4801 tgaagaacaa gcgggccctg ctcgatgcc tgccaatcga gatgctggac aggcatacata
 4861 cccacttctg cccctgggaa ggcgagtcac ggcaagactt tctgcggaac aacgccaagt
 4921 cattccgctg tgctctcctc tcacatcgcg acggggctaa agtgcattct gccaccgcc
 4981 caacagagaa acagtacgaa accctggaaa atcagctcgc gttcctgtgt cagcaaggct
 5041 tctccctgga gaacgcactg tacgctctgt ccgcccgtgg ccactttaca ctgggctgcg
 5101 tattggagga acaggagcat caagtagcaa aagaggaaag agagacacct accaccgatt

5161 ctatgcccc acttctgaga caagcaattg agctgttcga ccggcagggg gccgaacctg
 5221 ccttcctttt cggcctggaa ctaatcatat gtggcctgga gaaacagcta aagtgcgaaa
 5281 gggcgggg ccggcgacgcc cttgacgatt ttgacttaga catgctccca gccgatgcc
 5341 ttgacgactt tgacc**TTGAT ATGCTGCCTG CTGAC**gctct tgacgatttt gaccttgaca
 5401 tgctccccgg **ggagggcaga ggaagtctgc taacatgocg tgacgtcgag gagaatcctg**
 5461 **gccc**aatgac **cgagtacaag cccacgggtgc gcctcgccac ccgcgacgac gtccccaggg**
 5521 **ccgtacgcac cctcgccgcc gcgttcgcc actacccgc cacgcgccac accgtcgatc**
 5581 **cggaccgcca catcgagcgg gtcaccgagc tgcaagaact ctctctcacg cgcgtcgggc**
 5641 **tcgacatcgg caaggtgtgg gtcgcggacg acggcgccgc ggtggcggtc tggaccacgc**
 5701 **cggagagcgt cgaagcgggg gcggtgttcg ccgagatcgg cccgcgcacg gccgagttga**
 5761 **gcggttcccg gctggcccg cAGCAACAGA TGGAAGCCT** cctggcgcgg caccggccca
 5821 **aggagcccgc gtggttccct gccaccgtcg gagtctcgcc cgaccaccag ggcaagggtc**
 5881 **tgggcagcgc cgtcgtgctc cccggagtgg aggcggccga gcgcgcggg gtgccccct**
 5941 **tcctggagac ctccgcgccc cgcaacctcc ccttctacga gcggctcggc ttcaccgtca**
 6001 **ccgccgacgt cgaggtgccc gaaggaccgc gcacctggtg catgaccgcg aagcccggtg**
 6061 **cctgag**gatc cgagca**TCTT ACCGCCATTT ATACCCA**at ttgttctggt tttcttgatt
 6121 tgggtataca tttaaatggt aataaaaaca aatggtggg caatcattta catttttagg
 6181 gatatgtaat tactagtcca ggtgtattgc cacaagaca acatgttaag aaactttccc
 6241 gttatttacg ctctgttcc gttaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga
 6301 ctgatattct taactatggt gtcctttta cgctgtgtgg atatgctgct ttaatgcctc
 6361 tgtatcatgc tattgcttcc cgtacggctt tcgttttctc ctctctgat aaatcctggt
 6421 tgctgtctct ttatgaggag ttgtggccc ttgtccgca acgtggcgtg gtgtgctctg
 6481 tgtttgctga cgcaaccccc actggctggg gcattgccac cacctgtcaa ctctttctg
 6541 ggactttcgc tttccccctc ccgatcgcca cggcagaact catcgccgc tgccttgccc
 6601 gctgctggac aggggctagg ttgctgggca ctgataattc cgtggtggtg tcggggaagc
 6661 tgacgtcgag atcttccctgc ggagattggc cgctctagct agaattaatt cgatggtggc
 6721 atccctgtga cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact ccagtgccta
 6781 ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactaggag tccttctata
 6841 atattatcgg gtggaggggg gtggtattga gcaaggggca agttgggaag acaacctgta
 6901 gggcctgccc ggtctattgg gaaccaagct ggagtgacgt ggcacaatc tggctcactg
 6961 caatctccgc ctccctgggt caagcgattc tctgcttca gcctcccag ttggtgggat
 7021 tccaggcatg catgaccagg ctacagtaat ttttgtttt ttggtagaga cggggttca
 7081 ccatattggc caggctggtc tccaactcct aatctcaggt gatctacca ccttgccctc
 7141 ccaaattgct gggattacag gcgtgaacca ctgctccct cctgtcctt ctgattttga
 7201 gctcaagata tccatcaca agctctgacc tcaatcctat agaaaggagg aatgagcaa
 7261 aattcaccca acttattgtg ggaagcttgt ggaaggctac tcgaaatgt tgaccaagt
 7321 taaacaattt aaaggcaatg ctaccaata ctaattgagt gtatgttaac ttctgacca
 7381 ctgggaatgt gatgaaagaa ataaaagctg aatgatca ttctctctac tattattctg
 7441 atatttcaca ttcttaaaat aaagtgggta tcctaactga cctaagaca gggaatctt
 7501 actcggatta aatgtcagga attgtgaaaa agtgagtta aatgtattg gctaagggtg
 7561 atgtaaactt ccgacttcaa ctgacatgtg agcaaaaagg cagcaaaaagg ccaggaaccg
 7621 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca
 7681 aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt
 7741 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct
 7801 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct
 7861 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc
 7921 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacagcatt
 7981 atcgccactg gcagcagcca ctgtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtg
 8041 tacagagttc ttgaagtgg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat
 8101 ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa
 8161 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa
 8221 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaacga
 8281 aaactcacgt taagggattt tggatcatg attatcaaaa aggatcttca cctagatcct
 8341 tttaaattaa aatgaagtt ttaaataca ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga
 8401 cagttaccaa tgcttaata gtgaggcacc tatctcagc atctgtctat ttcgttcac
 8461 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg
 8521 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcacc gctccagatt tatcagcaat
 8581 aaaccagcca gccggaagg cggagcgag aagtggctct gcaactttat ccgctccat
 8641 ccagtctatt aattggtgcc gggaaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg
 8701 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc
 8761 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa

Anhang

8821 agcggtttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc
8881 actcatgggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt
8941 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag
9001 ttgctccttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt
9061 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctggttag
9121 atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac
9181 cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc
9241 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca
9301 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg
9361 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac