

Diplomarbeit

Etablierung von Methoden zur Erhebung von Daten über das Altern
hämatopoetischer Stammzellen in einem Langzeitexpansionsmodell

eingereicht von

Christian Rehnolt

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie

und dem Institut für Pathophysiologie und Immunologie

Erstbetreuer

Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schwinger

Zweitbetreuerin

Univ.-Ass.in Dr.in Ingeborg Stelzer

Graz, am 12.09.2012

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 12.09.2012

Christian Rehnolt

Christian Rehnolt

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt dabei Frau Univ.-Ass. Dr. Ingeborg Stelzer für ihre engagierte Betreuung, aber auch für die persönliche Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Schwinger möchte ich mich ganz herzlich sowohl für die Möglichkeit bei diesem Projekt mitzuarbeiten, als auch für die gewissenhafte Betreuung der Diplomarbeit bedanken.

Bei den BMAs Elvira Kloibhofer, Anita Puregger und Andrea Raicht möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung bei der Kultivierung und Passagierung der Zellen bedanken. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturen stammen ebenfalls von ihnen.

Außerdem möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Dr. Robert Fuchs und Nathalie Allard dafür bedanken, dass sie mir bei allen offenen Fragen und Problemen immer weitergeholfen haben.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Sadjak und den Mitarbeitern des Instituts für Pathophysiologie möchte ich mich für die schöne Zeit am Institut ganz herzlich bedanken.

Vi Huynh danke ich herzlich für die Unterstützung während meiner Zeit in San Francisco.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Wiebke Düttmann, die sich sehr viel Zeit genommen hat, meine Arbeit gründlich Korrektur zu lesen.

Mein größter Dank gebührt jedoch meinen Eltern, Christina und Helmut Rehnolt, die es mir ermöglicht haben dieses Hochschulstudium zu absolvieren und die mich in all meinen Vorhaben immer unterstützen.

Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (HSC)-Transplantationen zeigen heutzutage gute Erfolge. Es bleiben jedoch Fragen offen. So ist noch nicht geklärt, ob ein größerer Altersunterschied zwischen Spender und Empfänger zu einem Erschöpfen der Stammzellfunktion der transplantierten HSC führt.

Es ist bereits bekannt, dass es bei der ex vivo Kultur zu einem vermehrten Ausreifen der Zellen, einer Störung des Homing, häufigerer Apoptose und zu einer Initiierung des Zellzyklus kommt. Das hat zur Folge, dass die Quieszenz gestört wird, sich das blutbildende System schneller erschöpft, und dass eine Alterung der Stammzellen eintritt. Mit anderen Worten – die Zellen zeigen ex vivo eine frühe Seneszenz. Dieser Aspekt wird ausgenutzt, um die Mechanismen, die in vivo Jahrzehnte dauern würden, in vitro in kürzerer Zeit zu untersuchen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen des Alterns bzw. der Vorgänge bei einer 25-wöchigen stromafreien ex vivo Kultur von HSC. Sie hilft bei der Etablierung von Methoden zur weiteren Untersuchung von Alterung bzw. ex vivo Expansion von HSC.

Wöchentlich wurden folgende Parameter untersucht: Die Teilungsfähigkeit und Differenzierung wurde mittels Durchflusszytometrie und CASY bestimmt. Für die Bestimmung des Senescence Evasion Factor, der Telomerlänge und der Cycline C, D1, D3, E, A und B1 wurden qRT-PCRs durchgeführt. DNA-Schäden wurden mittels alkalischem Comet-Assay untersucht. Die Messung des oxidativen Stresses erfolgte durch Bestimmung der carbonylierten Proteine. Rückschlüsse auf ein self-renewal wurden indirekt durch den CFU-GM-replating Assay gezogen und die Telomeraseaktivität wurde mit Hilfe des TRAP-Assay untersucht.

Die Zellkultur zeigte eine Vermehrung der HSC um den Faktor $10^{5,9}$ bei einer Gesamtzellvermehrung von $10^{6,7}$. SNEV zusammen mit den Cyclinen deuten darauf hin, dass es in bestimmten Phasen der Kultur zu einem Arrest des Zellzyklus kam. Aus dem Verlauf des Comet-Scores lässt sich ableiten, dass die HSC in der Lage sind, DNA-Schäden bis zu einem bestimmten Punkt zu reparieren, aber danach die Schäden konstant zunehmen. Die Telomeraseaktivität als auch die Telomerlänge bleiben bis zu einem bestimmten Punkt relativ konstant und fallen anschließend ab.

Interessanterweise kam es bei Passage 17 zu einem starken Anstieg der Telomeraseaktivität, begleitet von einer Verlängerung der Telomere. Zusätzlich finden sich Hinweise, die für einen möglichen Zellzyklusarrest in derselben Passage sprechen könnten.

Abstract

Today hematopoietic stem cell (HSC) transplants show good results. However, questions remain. It is still unclear whether a large difference in age between donors and recipients lead to early exhaustion of the stem cell function in transplanted HSC.

It has been discovered that an ex vivo cell culture of HSC results in an increased maturation of the HSC, decreased homing abilities, more frequent apoptosis and initiation of the cell cycle. Consequences include disruption of the quiescent state of HSC, faster exhaustion of the blood-forming system, and aging of HSC. In other words ex vivo HSC become senescent much faster. This accelerated aging can be used to investigate the mechanisms of aging in a much shorter period of time, which otherwise would last for decades in vivo.

This work focuses on the mechanisms of aging and the processes involved by using a 25-week stroma-free ex vivo cell culture of HSC. It also helps to establish methods for further understanding of senescence and ex vivo expansion of HSC.

On a weekly basis the following parameters have been determined: Maturation, differentiation processes and cell division capabilities have been investigated by flow cytometry and CASY. QRT-PCRs have been performed to assess the expression of senescence evasion factor, telomere length and the expression of the cyclins C, D1, D3, E, A and B1. DNA damage has been analyzed by alkaline comet assay. Measurements of the carbonylation of proteins have been performed to evaluate the level of oxidative stress. Self-renewal has indirectly been assessed by performing the CFU-GM replating assay. Telomerase activity was evaluated using the TRAP assay.

The initial results show an increase in HSC by a factor of $10^{5.9}$ at a total cell expansion by a factor of $10^{6.7}$. SNEV with cyclins indicate an arrest in cell cycle at certain stages of the cell culture. The comet assay reflects that HSC are capable of repairing DNA damage up to a certain point. Following that point DNA damage increases consistently. Telomerase activity and telomere length remain consistently upregulated to a certain point and then decrease.

Interestingly, in passage 17 a sharp increase in telomerase activity which was accompanied by an extension of telomeres was noticed. There is also evidence of a possible cell cycle arrest in the same passage.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	2
Danksagungen.....	3
Zusammenfassung.....	4
Abstract.....	5
Inhaltsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Alterung von Zellen.....	9
1.1.1 Historie.....	9
1.1.2 Ursachen der Zellalterung.....	9
1.1.3 Zellzyklus.....	10
1.1.4 Senescence Evasion Factor.....	12
1.2 Stammzellen.....	13
1.3 Hämatopoetische Stammzellen.....	15
1.3.1 Eigenschaften/Funktionen.....	15
1.3.2 Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen.....	16
1.3.3 Vorkommen.....	18
1.4 Hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	19
1.5 Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Gewinnung und Passagierung der HSC.....	21
2.1.1 Sammeln von Nabelschnurblut.....	21
2.1.2 Isolation von mononukleären Zellen.....	22
2.1.3 Anreicherung von CD34 ⁺ -Zellen.....	23
2.1.4 Primäransatz.....	24
2.1.5 Zellzahl, Durchflusszytometrie und Passagierung.....	24
2.1.6 Gewinnung von Zellmaterial für weitergehende Versuche.....	25
2.1.7 Einfrieren der Zellproben.....	25
2.2 Sekundäre koloniebildende Einheiten (CFUs).....	26
2.2.1 Ansatz der primäre CFUs.....	26
2.2.2 Auszählen der primären CFUs und Ansatz der sekundären CFUs.....	27
2.2.3 Auswertung.....	28
2.3 Alkalischer Comet-Assay.....	29
2.3.1 Vorbereiten der Zellsuspension.....	30
2.3.2 Vorbereiten der Objektträger.....	30

2.3.3	Aufbringen und Versiegeln des Zell-Gel-Gemischs	31
2.3.4	Lyse.....	32
2.3.5	Elektrophorese	32
2.3.6	Färbung.....	32
2.3.7	Auswertung.....	33
2.4	Genexpression von SNEV	34
2.4.1	RNA Isolierung.....	34
2.4.2	cDNA-Synthese (reverse Transkriptase)	35
2.4.3	qRT-PCR	37
2.5	Cyclinbestimmung	44
2.5.1	RNA Isolierung.....	44
2.5.2	cDNA-Synthese (reverse Transkriptase)	44
2.5.3	qRT-PCR	45
2.6	Oxidativer Stress - Carbonylierte Proteine	46
2.7	Telomerlänge	47
2.7.1	DNA Isolierung	47
2.7.2	qRT-PCR	48
2.8	Telomeraseaktivität.....	49
2.8.1	Isolation der Telomerase.....	50
2.8.2	TRAP-Assay und PCR.....	51
2.8.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	52
2.8.4	Auswertung.....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Wachstum der HSC-Kultur 02.....	54
3.1.1	Gesamtleukozytenzahl.....	54
3.1.2	Morphologie der Zellkultur	55
3.1.3	Vermehrung der HSC	56
3.1.4	Anteil der HSC an der Gesamtpopulation	57
3.1.5	Expression der Lineage Marker bezogen auf die Gesamtpopulation.....	58
3.2	Expression von SNEV	60
3.3	Expression der Cycline	61
3.4	Cometscore	63
3.5	Carbonylierte Proteine	64
3.6	Sekundäre koloniebildende-Einheiten-Assay	65
3.7	Telomerlänge und Telomeraseaktivität.....	66

4	Diskussion.....	67
4.1	Teilungsfähigkeit und Differenzierung der HSC.....	68
4.2	SNEV.....	70
4.3	DNA-Schäden.....	71
4.4	Oxidativer Stress.....	73
4.5	Primäre und sekundäre koloniebildende Einheiten.....	74
4.6	Zellzyklus.....	75
4.7	Telomerlänge und Telomeraseaktivität.....	79
5	Schlussfolgerung.....	81
6	Limitationen.....	82
7	Anhang.....	83
7.1	Lösungen, Medien und Puffer.....	83
7.1.1	Calcium und Magnesium freier Phosphatpuffer (CMF-PBS).....	83
7.1.2	Acid Citrate Dextrose solution A.....	83
7.1.3	Stammzellmedium.....	83
7.1.4	Pufferlösungen für den Comet-Assay.....	84
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	85
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	88
7.4	Tabellenverzeichnis.....	89
8	Literaturverzeichnis.....	90

1 Einleitung

1.1 Alterung von Zellen

1.1.1 Historie

„Zellen altern nicht“ – das war lange Zeit die wissenschaftliche Auffassung entsprechend der Theorie des französischen Nobelpreisträgers und Chirurgen Alexis Carrel. Er behauptete, dass Zellen, wenn sie unter optimalen Bedingungen, wie der ausreichenden Zufuhr von Nährstoffen und der Entfernung von Ausscheidungsstoffen kultiviert würden, sie uneingeschränkt und unbegrenzt teilungs- sowie lebensfähig wären.^[1, 2]

Diese Ansicht wurde allerdings von Leonhard Hayflick in den 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts widerlegt, nachdem es ihm nicht gelang, über einen bestimmten Zeitraum hinweg, Zellen zu kultivieren. Es stellte sich heraus, dass Alexis Carrel einen falschen Versuchsablauf verwendete, wobei er immer wieder frische Zellen in seine Kultur einbrachte.

Hayflick zeigte mit einem sehr geschickt gewählten Versuchsaufbau mit unterschiedlich alten Fibroblasten, die jeweils unterschiedliche Gonosomen aufwiesen, dass Zellen nach ca. 40-60 Zellteilungen nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen.^[3, 4] Diese Grenze von Zellteilungen wird heute als „Hayflick-Limit“ bezeichnet.

Allerdings gilt dies natürlich nicht für alle Zellen, da sich Lebewesen durch kontinuierliche Zellteilung vermehren und nicht spontan entwickeln. Als Beispiel sei hier die Eizelle genannt, die aus Zellteilung hervorgeht und wieder Zellteilung durchführt. Als zweites Beispiel gilt dies natürlich auch für Tumorzellen. So sind die Cervixkarzinomzellen, an denen Henrietta Lacks 1951 verstarb, noch heute in vielen Forschungslaboren der Welt eine weitverbreitete Versuchszelllinie (HeLa cells).^[5]

1.1.2 Ursachen der Zellalterung

Derzeit gibt es noch keinen wissenschaftlichen Konsens über die Ursachen des Alterns. Die wichtigsten Theorien lassen sich in Schadenstheorien und Theorien zum programmierten Altern einteilen.

Die Schadenstheorien sind davon gekennzeichnet, dass Schäden an Mitochondrien, Erbgut, Proteinen oder anderen wichtigen Strukturmolekülen, über die Zeit akkumulieren und in Folge dessen die Zelle altern lassen. Die Schäden können dabei durch externe Noxen^[6], endogene freie Radikale^[7], fehlerhaftes Abschreiben bzw. Reparatur^[6] oder zwischen verschiedenen physiologischen Molekülen^[8] entstehen.

Als Theorie zum programmierten Altern lässt sich in erster Linie die Telomer-Hypothese des Alterns anbringen, die an Hayflicks Erkenntnissen anknüpft.^[9] Sie besagt, dass somatische Zellen bei jeder DNA-Replikation einen Teil ihrer Telomere verlieren. Bei Wirbeltieren besteht dieser Teil aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen. Der Verlust der repetitiven TTAGGG-Sequenzen geschieht solange, bis eine kritische Länge erreicht ist und die Zellen dauerhaft in der G₀-Phase des Zellzyklus verbleiben oder in Apoptose geschickt werden. Als Gegenregulationsmechanismus gibt es ein Enzym – die Telomerase, welches die Telomere wieder verlängern kann, indem es die Enden durch den Wiederaufbau der repetitiven TTAGGG-Sequenzen verlängert.^[10] In den meisten Zellen ist die Verkürzung allerdings schneller als die Verlängerung.^[11] Viele Zellen, auch somatische, besitzen Telomeraseaktivität, allerdings in einem sehr eingeschränkten Ausmaß.^[12] Besonders hohe Telomeraseaktivität weisen fetale Zellen bis hin zu den neonatalen Zellen auf, aber auch die Zellen der Keimbahn.^[12] Natürlich wird die Telomerase auch in vielen Tumorzellen verstärkt exprimiert.^[13] Zusätzlich haben Tumore aber auch die Möglichkeit über einen anderen Weg ihre DNA-Enden zu verlängern und somit die Möglichkeit sich unbegrenzt zu reproduzieren. Dieser Weg nennt sich „Alternative Lengthening of Telomeres“ (ALT).^[14] Der genaue Ablauf ist noch ungeklärt, man fand jedoch heraus, dass die Telomere, die mit ALT verlängert wurden, eine stärkere Heterogenität aufweisen, als das normalerweise der Fall ist.^[15] Eine weitere Auffälligkeit, die man vor noch nicht allzu langer Zeit beobachtet hat, ist, dass die Verkürzung der Telomere Auswirkungen auf die Biosynthese von Histonen und damit auch auf deren Menge hat.^[16]

1.1.3 Zellzyklus

Zellen machen im Laufe ihres Lebens verschiedene Phasen durch. Diese Phasen laufen alle nach einem streng geregelten Ablauf ab, der durch ihre Gene kontrolliert wird. Man unterteilt diesen Zyklus grob in drei Teile.

- 1) Mitose
- 2) Zellteilung
- 3) Interphase

Die Mitose und die Zellteilung spielen für die Zellvermehrung eine Rolle, wohingegen die Interphase dafür zuständig ist, die Funktion der Zelle für sich und in Bezug auf den Gesamtorganismus aufrecht zu erhalten. Ein Durchlauf aller dieser Phasen dauert *in vitro* mindestens 24 Stunden, kann jedoch, vor allem *in vivo*, wesentlich länger dauern. Als Beispiel seien hier nur Nervenzellen genannt.^[17]

Des Weiteren unterteilt man die Interphase wiederum in drei Teile. Diese sind die G₁-Phase, die S-Phase und die G₂-Phase. „G“ steht für „gap“ und „S“ für „synthesis“ aufgrund der historischen Namensgebung. Die G₁-Phase ist für den „Alltag“ der Zelle wichtig, hier erfüllt sie Aufgaben im

Sinne des Gesamtorganismus. Am Ende der G_1 -Phase steht der sogenannte G_1/S -Restriktionspunkt. Dieser Kontrollpunkt ist entscheidend für die Zelle, denn wird dieser überschritten, kann die Zelle die Zellteilung initiieren. Damit tritt sie in die S-Phase ein, wo es zu einer Verdoppelung der DNA kommt. Danach folgt die G_2 -Phase und geht darauffolgend in die Mitose und anschließend in die Zellteilung über. Bei manchen Zellen wird der Punkt der Mitose lange nicht oder nie erreicht, so dass sie in der G_1 -Phase verbleiben. Wenn das der Fall ist, wird die Phase auch als G_0 -Phase bezeichnet. In der S-Phase synthetisiert bzw. repliziert die Zelle die DNA für die bevorstehende Zellteilung. In der G_2 -Phase wird die in der S-Phase erzeugte DNA auf Fehler kontrolliert und gegebenenfalls repariert. Zwischen G_2 -Phase und Mitose gibt es einen weiteren Kontrollpunkt – den G_2/M -Restriktionspunkt. Dort wird entschieden, ob die Replikation nach G_2 -Korrektur ausreichend fehlerfrei ist und die Zelle in die Mitose übergehen kann.^[17]

Eine zentrale Rolle im Zellzyklus spielt das Retinoblastom-Protein (Rb-Protein), welches seinen Namen aufgrund seiner Erstentdeckung beim Retinoblastom erhalten hat. Das Rb-Protein hemmt den Transkriptionsfaktor E2F. Dieser aktiviert Gene, die eine Funktion beim Überschreiten des G_1/S -Restriktionspunkt haben. Nun gibt es Enzyme, die das Rb-Protein hemmen, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F aktiviert wird. Dazu gehören die Cyclin abhängigen Kinasen (auch CdK genannt). Cycline sind Moleküle, die in bestimmten Zellzyklusphasen verstärkt exprimiert werden, ihre Funktion erfüllen und dann wieder abgebaut werden. Da die Cycline einen typischen Verlauf zeigen, kann man mit ihnen die Phase des Zellzyklus bestimmen, in welcher sich die Zelle gerade befindet (siehe dazu Abb. 1).^[17]

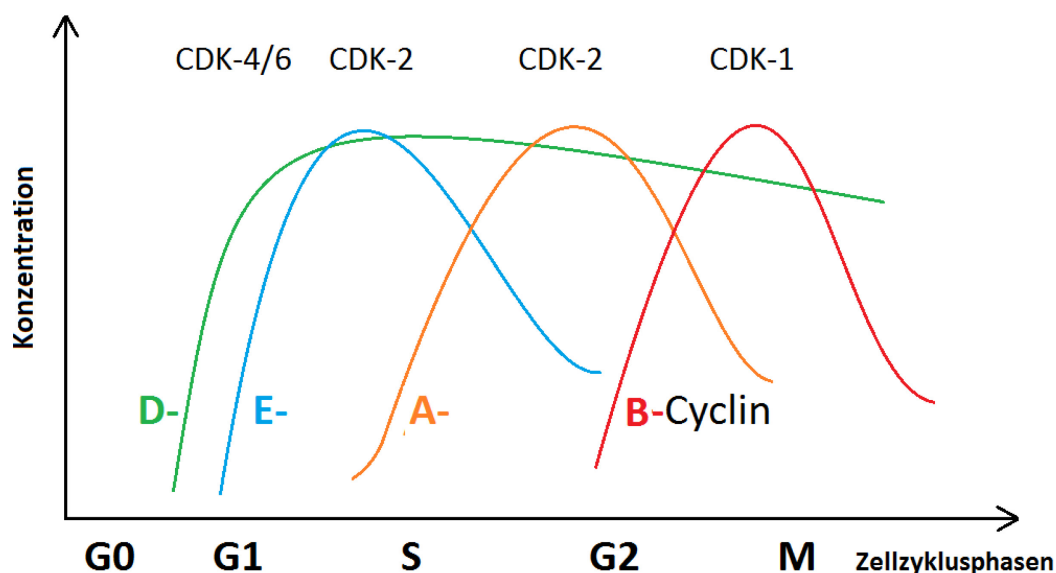


Abb. 1: Verlauf der Cycline im Zellzyklus
(Erläuterung siehe Text)

Die Cycline der Gruppe D sind abhängig von Wachstumsfaktoren und bilden mit Cdk4 und Cdk6 einen Kinasekomplex. Das Cyclin E reagiert mit dem Cdk-2. Beide Kinasekomplexe phosphorylieren das Rb-Protein, welches dadurch E2F aktiviert und somit die Zelle den G₁/S-Restriktionspunkt überschreiten lassen. Cyclin A verbindet sich ebenfalls mit dem Cdk-2. Cyclin B verbindet sich mit Cdk-1. Beide Kinasekomplexe bewirken ein Überschreiten des G₂/M-Restriktionspunkts.

Es gibt einige Proteine, die die CdKs hemmen. Dazu gehören die Proteine P16 und P21, welche den D-Cyclin/Cdk-4/Cdk-6-Kinasekomplex hemmen. Wobei P21 zusätzlich noch Cdk-2 hemmt. Des Weiteren spielt das Protein P27 eine zusätzliche Rolle, da es am Übergang zwischen der G₀- und G₁-Phase steht und die Zelle durch Hemmung der Cycline D und E in der G₀-Phase hält. Der Spiegel von P27 kann durch Interleukin 2 gesenkt werden und so eine mögliche Zellteilung einleiten.^[17] (siehe Abb. 25 (S.77))

1.1.4 Senescence Evasion Factor

Der „senescence evasion factor“ (SNEV) ist ein in der Evolution hochkonserviertes Gen. Auf der Suche in die zelluläre Seneszenz involvierte Faktoren wurde es von der Gruppe um Grillari et al. im Jahr 2005 im Menschen entdeckt. Es wurde zuvor bereits unter der Bezeichnung hPrp19 in Hefen gefunden.^[18, 19] Weitere Bezeichnungen von SNEV sind hPSO4 oder hNMP200.^[20] SNEV spielt eine Rolle beim Spleißen von pre-mRNA, bei der Reparatur von DNA und es weist in vitro E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität auf.^[18, 21-23] Es wurde gezeigt, dass SNEV als Spleißingfaktor zumindest Homodimere formt, die bei induzierter Blockierung der Oligomerisierung eine gestörte Funktion aufweisen.^[18] Zwei- bis dreifache Überexpression von SNEV hingegen, ausgelöst durch Transfektion mit einem retroviralen Vektor, führte in Endothelzellen zu verlängerten Überlebenszeiten.^[24] Dabei kam es außerdem zur verstärkten Expression von p16 und p53 sowie zu weniger DNA-Schäden. Dies wurde vorangehend bereits beschrieben und legte die Vermutung nahe, dass es zu einem transienten Zellzyklusarrest kommt, welcher die nötige Pause für die Reparatur der DNA schafft.^[25-27] p16 hält die Zelle durch Inhibierung von Cyclin abhängigen Kinasen in der G₀- bzw. G₁-Phase (siehe 1.1.3 Zellzyklus (S.10)). p53 induziert als „Wächter des Genoms“ die Zellreparaturkaskade bzw. führt die Zelle bei zu starker Schädigung in Apoptose.^[17]

Im Mausmodell wurde gefunden, dass SNEV-Knockout-Mäuse eine geringere Häufigkeit an HSC aufweisen als Wildtypmäuse, was die Vermutung nahelegt, dass self-renewal weniger stark ausgeprägt ist.^[20]

1.2 Stammzellen

Stammzellen besitzen zwei grundlegende Eigenschaften.^[28, 29] Zum einen können sie sich durch „symmetrische Teilungen“ in zwei identische Tochterzellen aufspalten, welche wiederum die gleichen Eigenschaften besitzen wie die Ursprungszelle. Dieser auch als „self-renewal“ bezeichnete Vorgang ist dazu bestimmt, die Menge an Stammzellen, bei eventuellen Verlusten, konstant zu halten (siehe Abb. 2A). Eine weitere Möglichkeit der symmetrischen Teilung ist, dass sich die Stammzelle in zwei gleiche, höher differenzierte Tochterzellen teilen kann (siehe Abb. 2C). Diese Eigenschaft stellt allerdings keine stammzellspezifische Charakteristik dar. Beide Tochterzellen haben dann die Eigenschaften einer ausdifferenzierteren Zelle.

Zum anderen findet sich bei Stammzellen die Fähigkeit, sich durch „asymmetrische Teilung“ in zwei verschiedene Tochterzellen zu teilen, wobei eine der beiden die Eigenschaften der Mutterzelle behält und die andere stärker ausdifferenziert (siehe Abb. 2B). Durch das Ausdifferenzieren können sie für Nachschub an Zellen im Organismus sorgen, wobei die weiter ausdifferenzierte Zelle noch immer Stammzelleigenschaften besitzen kann, aber nicht mehr das gesamte Spektrum der Ausdifferenzierungsmöglichkeit bzw. Plastizität besitzt. Dabei gibt es verschiedene Ebenen. Eine tiefere Ebene hat immer ein eingeschränkteres Ausdifferenzierungspotenzial (siehe auch Einteilung weiter unten).

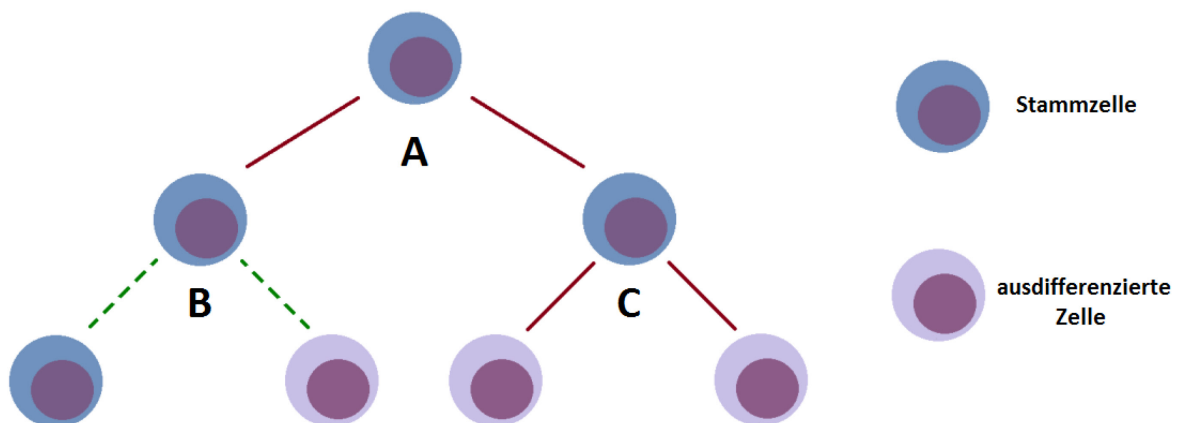


Abb. 2: Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen

Stammzellen haben die Fähigkeit sich symmetrisch (durchgezogene Linie) und asymmetrisch (gestrichelte Linie) zu teilen. Sie können Self-renewal betreiben (A) oder weiter ausdifferenzieren (B und C).

Man unterscheidet nach dem Grad der Ausdifferenzierung folgende Stammzellen:

- 1) Totipotente Stammzellen (fähig in alle Zellen des Körpers zu differenzieren; diese Eigenschaft besitzen alle Zellen von der befruchteten Eizelle bis zum Morula Stadium)^[30, 31]
- 2) Pluripotente Stammzellen (fähig in alle Zellen einer der drei Keimblätter zu differenzieren; dazu gehören alle Zellen des Embryoblasten)^[30, 31]
- 3) Multipotente Stammzellen (fähig in die Zellen einer der drei Keimblätter zu differenzieren; Beispiele für Multipotente Stammzellen sind HSC oder MSC)^[30, 31]
- 4) Oligopotente Stammzellen (fähig in Zellen einer Zelllinie zu differenzieren; Beispiele für oligopotente Stammzellen sind CFU-ME oder CFU-GM)^[30, 31]
- 5) Unipotente Stammzellen (Unterscheiden sich von ausdifferenzierten Zellen durch die Fähigkeit des „self-renewal“; Beispiel für Unipotente Stammzellen CFU-G)^[12, 13]

Die letzten drei werden als adulte Stammzellen bezeichnet und sie stellen vermutlich die größte Gruppe dar.

Adulte Stammzellen wurden bereits in diversen Geweben des menschlichen Körpers gefunden. Dabei spielt es scheinbar keine Rolle, ob das Gewebe eine hohe Zellteilungsrate (wie in Blut^[32]) oder niedrige (wie in Gehirn oder Skelettmuskel^[33, 34]) aufweist.

Lange Zeit wurde die Entwicklung und Ausreifung von Stammzellen als unidirektional angesehen. Im Jahr 2006 jedoch programmierte Shinya Yamanaka ausdifferenzierte Zellen mittels eines retroviralen Vektors so um, dass nun Gene für bestimmte Transkriptionsfaktoren, die normalerweise nur in pluripotenten Stammzellen exprimiert werden, aktiviert wurden. In Folge dessen entwickelte sich die Zelle „zurück“ und besaß dann die Eigenschaften einer pluripotenten Stammzelle. Diese generierten Zellen werden auch „induced pluritotent stem cell“ (iPS) genannt.

Die Identifikation von Stammzellen erfolgt quantitativ über bestimmte Oberflächenmoleküle^[35] oder qualitativ durch den Nachweis der Teilungsfähigkeit bzw. der Fähigkeit in der Zellkultur Kolonien zu bilden, die dann mittels spezieller „Clonogenic Assays“, z. B. CFU Assays, nachgewiesen werden können.^[36]

1.3 Hämatopoetische Stammzellen

1.3.1 Eigenschaften/Funktionen

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind in die Gruppe der multipotenten Stammzellen einzuordnen. Sie sind in der Lage, alle Zellen des Blutes zu bilden. Auf dem Weg zur ausdifferenzierten Zelle werden verschiedenste Zwischenstufen durchlaufen. Dieser Vorgang der Blutbildung ist entsprechend der am Ende stehenden, ausdifferenzierten Zelle in diverse Reihen eingeteilt. Man unterscheidet neun Reihen voneinander. Dazu zählen die Zellen des Immunsystems, bestehend aus B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Weiter gibt es noch die Erythrozyten, die in der Sauerstoffversorgung für den Organismus wichtig sind, und als letzte Reihe bleibt noch das thrombozytäre System zu erwähnen.^[37] Die frühen Zwischenstufen auf dem Weg zur ausdifferenzierten Zelle, ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle, werden auch als Progenitoren bezeichnet. Sie haben die Eigenschaft Kolonien im semiliquiden Agar zu bilden. Deshalb werden sie auch burst forming units (BFUs) oder colony forming units (CFUs) genannt. Für die genaue Einteilung siehe Abb. 3.

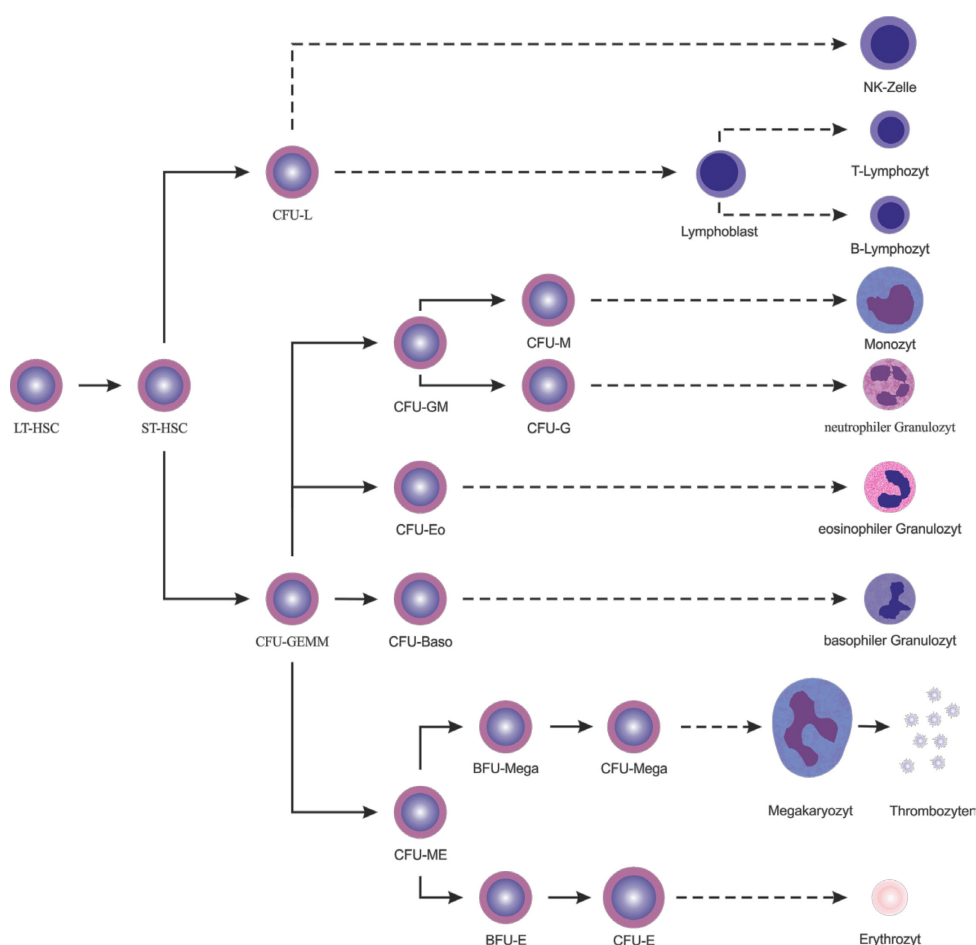


Abb. 3: Schema der frühen Hämatopoese

Durchgezogenen Pfeile symbolisieren unmittelbare Differenzierung.

Gestrichelten Pfeile zeigen an, dass es noch weitere Zwischenstufen gibt.^[37-39]

Im NOD/SCID-Mausmodell wurde gezeigt, dass eine einzige transplantierte frühe HSC ausreicht, um das komplette blutbildende System langfristig wieder aufzubauen, welches zuvor durch Bestrahlung letal geschädigt wurde.^[40]

Es wurde herausgefunden, dass unter den HSC Zellen existieren, die das blutbildende System langfristig wiederaufbauen können, weswegen diese auch als „long-term repopulating cells“ (LTR oder LT-HSC) bezeichnet werden. Im Mausmodell wurde außerdem gezeigt, dass die LTR in der Lage sind, bei 7-fach serieller Transplantation in NOD/SCID Mäusen (Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency), jeweils die komplette Blutbildung zu rekonstituieren.^[41] Allerdings besteht das Problem, wenn sie in hoch reiner Form appliziert werden, d.h., wenn sich keine zusätzlichen, höher differenzierten Progenitoren in der zu transplantierenden Zellsuspension befinden, dass sie nicht in der Lage sind, in der frühen Phase nach Transplantation, genügend ausdifferenzierte Zellen zu produzieren.^[42, 43]

Zusätzlich gibt es noch ST-HSC (short-term), welche nur ein begrenztes Vermögen besitzen, sich selbst zu erneuern (geringeres „self-renewal“). Dafür können sie aber schneller ein voll funktionstüchtiges System ausbilden, was vor allem in den ersten Tagen nach einer Knochenmarkstransplantation erwünscht ist.^[44]

1.3.2 Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen

Die Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen wird in der wissenschaftlichen Welt kontrovers diskutiert und ist immer noch im Wandel. Ursprünglich wurden HSC durch ihre Eigenschaft, in alle Zellen des Blutes differenzieren zu können und ihrer Fähigkeit Kolonien in der Milz eines letal bestrahlten und transplantierten Organismus zu bilden, identifiziert.

Mit der Zeit konnten bestimmte Oberflächenmoleküle (auch „cluster of differentiation“ oder CD-Moleküle genannt), die an der äußeren Zellmembran der HSC exprimiert werden, ausfindig gemacht werden. Des Weiteren fand man die Möglichkeit, die Zellen mit gewissen fluoreszierenden Substanzen^[45] anzufärben, um die HSC von hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) oder höher differenzierten Zellen zu unterscheiden, denen sie u. U. morphologisch ähneln. Dadurch konnten die HSC in verschiedene Subgruppen unterteilt werden.^[37] Es ist jedoch zu beachten, dass einige Oberflächenantigene in verschiedenen Spezies unterschiedlich ausgeprägt sind.

Maus	Mensch
Lin ⁻ *	Lin ⁻ *
SCA-1 ⁺	CD34 ⁺
C-kit ⁺	C-kit ⁻ /low
CD38 ⁺	CD38low/ ⁻
CD34 ⁻ /low	CD133 ⁺

Tab. 1: Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen von humanen und murinen HSC

* Lin⁻ Zellen fehlen 13 bis 14 verschiedenen Lineage Marker ausgereifter Zelltypen.^[46, 47]

Über Separierungsschritte und durchflusszytometrische Analysen konnten folgende CD-Moleküle identifiziert werden, die auf der Zelloberfläche von HSC vorhanden sind (siehe Tab. 1).

Man fand heraus, dass HSC keine Linien spezifischen Oberflächenantigene wie CD3, CD19, CD56, CD14 oder CD15 exprimieren, weshalb sie auch als lineage-negative (Lin⁻) bezeichnet werden (siehe Tab. 10 (S.69)).^[17, 48, 49]

Beim Menschen zeigte sich das Oberflächenmolekül CD34 als sehr potent, um HSC zu isolieren.^[46-48] Allerdings ist CD34 auf frühen HSC, wozu auch die LT-HSC zählen, nicht oder nur gering ausgeprägt.^[48] CD133 ist auf einem Teil der CD34⁺ Zellen vorhanden, dort vor allem auf den unreifen Zellen.^[48]

Alternativ werden HSC auch über „signaling lymphocyte activation molecules“ (SLAM) identifiziert, wozu auch das Oberflächenmolekül CD150 zählt.^[44]

Eine weitere Möglichkeit HSC als solche zu erkennen ist ihre Eigenschaft nicht toxische fluoreszierende Farbstoffe, wie Rhodamine 123 (Rh-123^{-low}) und Hoechst 33342 (SP⁺, side population cells), aus dem Zytosol zu entfernen. Dadurch sind sie unter Fluoreszenz induzierendem Licht leichter von den anderen Zellen zu identifizieren, weil sie weniger stark leuchten.^[50, 51] Da Rh-123^{-low} HSC eine geringere Anfärbbarkeit aufweisen, gelten sie als ruhende Zellen. Es wird vermutet, dass sie eine schwächere Mitochondrienaktivität aufweisen, denn Rhodamine 123 lagert sich proportional an aktivierte Mitochondrien an.^[52]

Diesen gesteigerten Efflux macht man sich auch bei der Isolation von HSC mittels Zytostatika wie 5-Fluoruracil (5-FU) zunutze.^[48]

Des Weiteren kann man HSC auch dadurch von anderen Zellen unterscheiden, da sie im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen, eine Aldehyddehydrogenase-Aktivität (ALDH⁺) aufweisen.^[53]

1.3.3 Vorkommen

Es wird angenommen, dass es spezialisierte Nischen für Stammzellen gibt. Diese Nischen dienen primär der Aufrechterhaltung des Stammzellpools, indem sie bessere Bedingungen für das „self-renewal“ bieten. Die meiste Zeit ruhen die Zellen in der Nische in der G₀-Phase des Zellzyklus.^[54, 55] Der Grund dafür ist vermutlich, dass sie in der Nische eine höhere Abschirmung gegen äußere Einflüsse, im Besonderen auf das Erbgut der Zellen, erhalten.^[56] Es wird angenommen, dass es Übergangszonen gibt, die den Übergangsbereich zwischen außerhalb und innerhalb der Nische darstellen. HSC, die sich dort befinden, weisen eine höhere Zellteilungsrate auf als im Zentrum der Nische und produzieren in Folge dessen auch mehr ausdifferenzierte Zellen.^[57, 58]

Eine Besonderheit aller Nischen ist der Einfluss von nischenbildenden Zellen, wie z.B. Stromazellen auf die Stammzellen.^[57] Zwei dieser im Knochenmark zu findenden Nischen werden in weiterer Folge vorgestellt.

Zum einen gibt es dort die endostale Nische, worin sich die Stammzellen befinden, die u.a. durch N-Cadherin positive spindelzellartige Osteoblasten stimuliert werden.^[44, 55, 57, 58]

Zum anderen wird noch ein weiterer, im Knochenmark befindlicher, Stammzell-affiner Raum beschrieben – die vaskuläre Nische. Sie befindet sich unmittelbar um die Endothelien der fenestrierten Sinusoiden.^[44]

Eine enge Beziehung und Interaktion zwischen Stamm- und Endothelzelle ist allein schon deshalb wahrscheinlich, da sie von derselben embryonalen Vorläuferzelle, dem Hämangioblast, abstammen.^[59] Die sinusoidalen Endothelzellen des Knochenmarks (bone marrow sinusoidal endothelial-cells, BMEC) unterscheiden sich funktionell und phänotypisch von den Endothelzellen anderer Organe^[60]. Sie üben auf die HSC mittels des CXC-chemokine ligand 12 (CXCL 12) und Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin Einfluss auf Mobilisierung, Homing und Engraftment aus.^[61-63]

Es wird vermutet, dass sich die oben genannten Nischen während der extramedullären Hämatopoese auch in Milz und Leber finden. Ein Hinweis darauf sind immunhistochemische Untersuchungen, bei denen man in zwei Drittel der Fälle CD150⁺ HSC in der Nähe von extramedullären Endothelzellen gefunden hat.^[57]

Unter normalen Bedingungen werden konstant HSC bzw. HPC in die Blutzirkulation entlassen^[64], wobei deren Funktion im Blut und Gewebe noch nicht genau geklärt ist. Man nimmt aber an, dass sie eine Rolle bei der Regeneration von Gewebe spielen.^[65, 66] So wird postuliert, dass sie bei der Rekonstitution einer geschädigten Leber von Bedeutung sind.^[67, 68]

Es gibt verschiedene Substanzen, die die Ausschwemmung von HSC in den Blutkreislauf fördern. Dazu zählen G-CSF oder Cyclophosphamid.^[69]

1.4 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation, früher auch Knochenmarktransplantation genannt, ist heute ein häufig angewandtes Verfahren und dient als Therapie verschiedenster Erkrankungen. Dazu gehören u.a. hämatologische Erkrankungen, wie akute Leukämien, aber auch andere, wie Melanome oder die Speicherkrankheit Morbus Gaucher.^[70]

Man unterscheidet autologe (von sich selbst), allogene (von Fremden/Verwandten) und syngene (von eineiigen Zwillingen) Stammzelltransplantationen. Allogene Stammzelltransplantationen erfordern eine gewisse Mindest-HLA-Gleichheit zwischen Spender und Empfänger, dabei entscheidend sind die Antigene HLA-A, -B, -C und -DR. Wobei nicht verwandte Spender mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 : 100.000 und Familienangehörige 1 : 4 HLA ident sind.^[70]

Die Stammzellen für die Transplantation können aus dem Knochenmark mittels Punktion, aus der Nabelschnur direkt oder, wie heutzutage am häufigsten, mittels Apherese aus dem peripheren Blut nach entsprechender Stimulation durch Wachstums-/ Mobilisierungsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) gewonnen werden.^[70]

Nachdem ein geeigneter Spender gefunden wurde, gestaltet sich das Verfahren folgendermaßen:^[70]

- 1) Vorbehandlung: Es wird eine myeloablative Therapie mittels hochdosierter Zytostatikagabe und evtl. Bestrahlung beim Empfänger durchgeführt.
- 2) Übertragung von Stammzellen: Sie ähnelt einer Bluttransfusion. Benötigt werden in etwa 2×10^6 CD34⁺ Zellen pro kg-Körpergewicht.
- 3) Nachbehandlung: Mit Substitutionstherapie und antiinfektiöse Therapie während der aplastischen Phase.

1.5 Fragestellung

Das Verfahren der Stammzelltransplantation wurde vor 40 Jahren zum ersten Mal durchgeführt. Heute gibt es noch keine wirklichen Langzeiterfahrungen zu hämatopoetischen Stammzelltransplantationen. Unter anderem stellen wir uns die Frage, ob Stammzellen eines älteren Spenders funktionell ausreichend sind, um einem jungen Empfänger ein normales Menschenleben lang ein hämatopoetisches System zu gewährleisten.

Wie bereits weiter oben erwähnt haben Mausversuche gezeigt, dass HSC mitunter mehrere Mausebenen lang Blutzellen bilden können.^[40] Allerdings ist die Lebensspanne von Menschen und Mäusen nicht vergleichbar.

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich in erster Linie mit der Etablierung von Methoden zur Gewinnung von Daten über eventuelle Alterungsparameter von hämatopoetischen Stammzellen in einem in vitro Langzeitexpansionsmodell. Des Weiteren werden auch Parameter, die einen Gegenregulationsmechanismus zum Altern der Zellen darstellen, wie z.B. die Telomeraseaktivität, untersucht. Dazu wurden folgende Verfahren angewendet:

- 1) Teilungs- und Differenzierungsverhalten mittels Durchflusszytometrie und CASY Zellzähler
- 2) Fähigkeit zur Bildung von primären und sekundären Kolonien in Methylcellulose
- 3) Alkalischer Comet-Assay zur Veranschaulichung der DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche.
- 4) Genexpression von SNEV, einem relativ neu entdecktem Gen bezüglich Alterungsprozessen.
- 5) Genexpression von Cyclinen zur Bestimmung des Zellzyklus.
- 6) Bestimmung von carbonylierten Proteinen zur Evaluierung des Oxidativen Stress
- 7) Bestimmung von Telomerlängen und Telomeraseaktivität

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung und Passagierung der HSC

2.1.1 Sammeln von Nabelschnurblut

Das Nabelschnurblut (UCB) und die darin enthaltenen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurden von der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LKH Graz bezogen (Ethikkommissionsvotum EK-Nummer: 21-197 ex 09/10).

Die Abnahme des Nabelschnurblutes erfolgte durch die Study-Nurse der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LKH Graz. Die Zustimmung zur Abnahme wurde von der Mutter nach der Geburt eingeholt (Informed Consent Nabelschnurblut). Es wurde ausschließlich Nabelschnurblut gesunder Mütter mit normaler Schwangerschaftsdauer, aus Spontangeburt oder Kaiserschnitt verarbeitet. Andere Parameter – wie z.B. das Geschlecht des Kindes – wurden nicht als Kriterium herangezogen.

Das Blut wurde in 50 ml Falcons gesammelt, in denen 5 ml ACDA-Lösung (Acid Citrate Dextrose solution A, Zusammensetzung siehe Anhang (S.83)) vorgelegt worden waren. Die Abnahme des Blutes aus der Nabelschnur bzw. der Plazenta erfolgte direkt nach der Geburt des Kindes unter semisterilen Bedingungen.

Die Probe wurde dann unmittelbar nach der Abnahme in das Labor der Kinderklinik gebracht und dort durch die Biomedizinischen Analytikerinnen (BMAs) Anita Puregger und Elvira Kloibhofer weiterverarbeitet. Für die genaue Bestimmung der Menge der im UCB enthaltenen Zellen und Zellzahlen wurden zuerst 0,5 ml UCB separiert und dann damit eine Messung im Durchflusszytometer Cytomics FC 500 (Beckman & Coulter, Brea (CA), USA) und im CASY Zellzähler (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) durchgeführt. Für die Durchführung siehe 2.1.5 Zellzahl, Durchflusszytometrie und Passagierung (S.24). Die weiteren Verarbeitungsschritte bezüglich der Kultur der Zellen wurden im Reinraum unter besonders sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.1.2 Isolation von mononukleären Zellen

Um aus der Vollblutprobe einen möglichst hohen Anteil an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu isolieren, wurden als erstes mittels Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen (MNC) von den restlichen Zellen getrennt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation, bei der man sich zu Nutze macht, dass die Zellen des Blutes unterschiedliche Dichtegrade aufweisen und sich bei Zentrifugation in den ihrer Dichte unterschiedlichen Schichten anreichern. Um diesen Effekt zu verstärken und die einzelnen Schichten besser voneinander trennen zu können, wird die Ficollsubstanz mit der spezifischen Dichte von 1,077 g/ml eingebracht, die sich zwischen die Fraktion aus MNC und Thrombozyten sowie der Fraktion der übrigen Zellen ablagert. Da das Blutplasma eine geringere Dichte aufweist, befindet es sich nach der Zentrifugation oben.

Nach diesem Prinzip wurden folgende Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen mit der gesamten Menge an UCB durchgeführt (siehe Abb. 4):

- 1) 9ml UCB mit 21 ml CMF-PBS /2mM NaEDTA (Calcium/Magnesium-freiem Phosphatpuffer, Zusammensetzung siehe Anhang (S.83)) verdünnen
- 2) vorsichtig auf 15 ml Ficoll Lösung (Histopaque 1077 (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO/USA)) in einem 50 ml Falcon überschichten
- 3) 30 min bei 20 °C bei 400 g ohne Bremse zentrifugieren
- 4) Abheben der Intermediärschicht mit einer Plastikpasteurpipette in ein neues Gefäß
- 5) Diese Zellsuspension mit CMF-PBS auf 50 ml auffüllen
- 6) 10 min bei 300 g und 10 °C zentrifugieren
- 7) Abheben des Überstands
- 8) Resuspendieren in MACS-Puffer

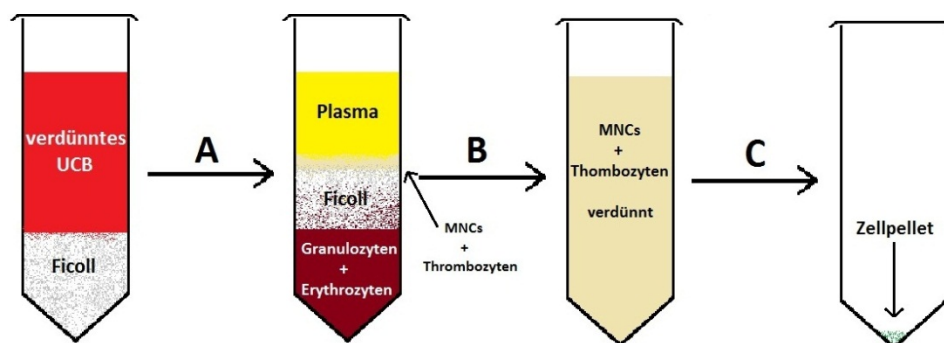


Abb. 4: Ablauf des Ficoll

A: Zentrifugieren für 30 min bei 20 °C bei 400 g ohne Bremse; **B:** Überführen der Intermediärschicht (gebildet aus mononukleären Zellen und Thrombozyten) in ein Eppendorfgefäß und auffüllen mit 50 ml CMF-PBS; **C:** Zentrifugieren mit 450 g und bei 10 °C für 10 min

Nun sollten in dem Zellpellet neben Lymphozyten und Monozyten die Stamm- und Progenitorzellen angereichert vorliegen.

2.1.3 Anreicherung von CD34⁺-Zellen

Um einen möglichst hohen Anteil an CD34⁺-Zellen aus den MNC zu isolieren, wird eine Anfang der 1990er Jahre entwickelte Methode namens MACS (Magnetic-activated cell sorting) angewendet.^[71] Diese Methode beruht auf der spezifischen Markierung der CD34-Moleküle mit Antikörpern, die mit Polysaccharid umhüllten Eisenoxidmolekülen (MicroBeads) magnetisch gemacht wurden. Nachfolgend werden die markierten Zellen in einer magnetisierten Säule von den nicht-markierten getrennt. Um eine unspezifische Bindung der CD34-Antikörper zu vermeiden, wurde auf Eis und mit gekühlten Lösungen gearbeitet.

Dieser Prozess wurde entsprechend der Arbeitsanweisung des Hersteller (Miltenyi) durchgeführt (mit einer Zellsuspension von einer Gesamtzellzahl bis zu 1×10^8 Zellen) und lautet wie folgt:

Labeling

- 1) Hinzugeben von 100 μ l FcR Blocking Reagent und 100 μ l CD34 MicroBeads je 1×10^8 totale Zellen
- 2) Sanft Vortexen und für 30 min bei 4 bis 8 °C inkubieren
- 3) Hinzugeben von 5–10 ml MACS Puffer je 1×10^8 totale Zellen, bei 300 g für 10 min zentrifugieren und Entfernen des Überstands
- 4) Resuspendieren des Zellpellets in 500 μ l MACS Puffer je 1×10^8 totale Zellen

Magnetic separation

- 1) Einbringen der MACS Säule (LS) in das magnetische Feld des entsprechenden MACSSeparators
- 2) Vorbereiten der Säule durch Durchspülen mit 3 ml MACS Puffer
- 3) Auftragen der Zellsuspension auf den oberen Teil der Säule und Auffangen des Durchflusses
- 4) Nach Durchfluss der Zellsuspension Waschen der Säule mit dreimal 3 ml MACS Puffer und Wiederauffangen der Durchflusses
- 5) Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und platzieren derselben auf ein entsprechendes Auffanggefäß
- 6) Hinaufpipettieren von 5 ml MACS-Puffer auf die Säule und mittels Durchdrücken des beiliegenden Stempels die gelabelten Zellen aus der Säule auspressen
- 7) Für eine höhere Reinheit werden die Schritte 1) bis 6) noch einmal wiederholt

Anschließend wurde erneut mit 20 μ l der Zellsuspension eine durchflusszytometrische Analyse bezüglich der in der Probe enthaltenen Zellen durchgeführt und mithilfe einer Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt.

2.1.4 Primäransatz

Nach der Anreicherung der CD34⁺-Zellen durch MACS wurden die HSC in Kultur gebracht. Es wurden handelsübliche Einweg-Zellkulturflaschen (75 cm² und 225 cm²) verwendet. Die Zellzahl wurde mithilfe des Stammzellmediums (Zusammensetzung siehe Anhang (S.83)) auf 5 x 10⁴ CD34⁺-Zellen/ml eingestellt. Danach wurden die Flaschen für 7 Tage bei 37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.1.5 Zellzahl, Durchflusszytometrie und Passagierung

Die Passagierung erfolgte wöchentlich, wobei die Zellen immer mikroskopiert und fotografiert wurden. Danach wurde jedes Mal eine kleine Menge, 400 µl bis 1.000 µl – je nach Passage, für die durchflusszytometrische Analyse und die Zellzählung mittels Zählkammer und CASY verwendet, um die Zellzahl und die Zellsubtypen zu bestimmen. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit folgendem Protokoll durchgeführt:

- 1) Vorlegen und Beschriften der Antikörpermixes in Micronic-Tubes nach folgendem Pipettierschema (siehe Tab. 2).

	Tube	FITC		PE		ECD		PE-Cy5		PE-Cy7	
Negativkontrolle	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
unspez. Bindungen	2	IgG1	5 µl	IgG2a	2 µl	IgG1	2 µl	IgG1	2 µl	IgG1	2 µl
CD-Marker Teil 1	3	CD14	1 µl	CD34	5 µl	CD45	2 µl	CD19	2 µl	CD3	2 µl
CD-Marker Teil 2	4	CD15	5 µl	CD133	5 µl	CD45	2 µl	CD56	2 µl	CD3	2 µl

Tab. 2: Pipettierschema für die Durchflusszytometrie
CMF-PBS ad 20 µl je Tube ergänzen.

- 2) Hinzugeben von 50 µl Zellsuspension 1 x 10⁶ Zellen/ml in jedes Tube
- 3) Inkubation für 20 min bei 4 bis 8 °C
- 4) Waschen mit je 1 ml HUGO (CMF-PBS, 0,1% NaN₃, 0,5% BSA) und Zentrifugieren bei 300 g für 30 s
- 5) Abheben des Überstands
- 6) Hinzugabe von 50 µl HUGO
- 7) Bis zur Messung am Durchflusszytometer Lagerung auf Eis und kurz vorher gut vortexen

Es erfolgte immer ein Teilmediumwechsel, wobei mindestens die Hälfte des Stammzellmediums durch frisches ersetzt wurde. Aufgrund des zu erwartenden erhöhten Teilungspotenzials in den ersten Passagen wurde die Zelldichte in jenen Passagen auf 0,4 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und langsam gesteigert. In späteren Passagen wurde die Zelldichte dann auf bis zu 3 x 10⁶ Zellen/ml erhöht. Insgesamt wurden maximal 300 ml Zellsuspension kultiviert.

Für die statistische Auswertung der Zellzahl und der durchflusszytometrischen Analysen wurde das Programm Microsoft Excel 2010 verwendet.

2.1.6 Gewinnung von Zellmaterial für weitergehende Versuche

Nach der Gewinnung des Ausgangsmaterials und ab Passage 3 war genug Zellmaterial für den Ansatz bzw. die Passage vorhanden, so dass der Rest für alle im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet werden konnte. Für einen hohen Anteil HSC wurde dieser Rest erneut mit MACS separiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.1.7 Einfrieren der Zellproben

Für die Genexpressionsuntersuchungen von SNEV und den Cyclinen sowie der Bestimmung der Telomerlänge und Telomeraseaktivität wurden HSC (aufgereinigte CD34⁺-Zellen) in Schraubepipetten gegeben zu je 1×10^6 Zellen pro Gefäß, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Aufbereitung bei -80 °C gelagert.

2.2 Sekundäre koloniebildende Einheiten (CFUs)

Zur Einschätzung der Teilungsfähigkeit und der Fähigkeit der Stammzellen Kolonien zu bilden wurde ein funktioneller clonogener myeloischer CFU-Assay („secondary CFU-GM assay“ bzw. sekundäre Granulozyten/Makrophagen Kolonie-bildende Einheiten Assay) verwendet. Dazu wurden die Zellen im semiliquiden Medium (Methocult® H4534, StemCell Technologies, Vancouver/Canada), welches Methylcellulose und weitere Wachstumsfaktoren enthält (genaue Zusammensetzung findet sich im Anhang), unter sterilen Bedingungen angesetzt, passagiert und inkubiert.

2.2.1 Ansatz der primäre CFUs

Für den Ansatz der primären CFUs am ersten Tag wurden zuerst die Zellzahl und das entsprechende Volumen an $CD34^+$ -Zellen bestimmt, um sie dann auf einer 12-Well-Platte in den inneren sechs Wells anzusetzen (siehe Abb. 5). Bei Bedarf wurde die Konzentration durch Abzentrifugieren erhöht oder durch Hinzugabe von RPMI 1640-Medium (Lonza, Verviers/Belgien) verringert. Zwei Wells wurden dazu mit einer $CD34^+$ -Zelldichte von 250 $CD34^+$ -Zellen pro ml Methocult versehen, zwei mit einer von 500 $CD34^+$ -Zellen pro ml Methocult und zwei mit 1.000 $CD34^+$ -Zellen pro ml Methocult.

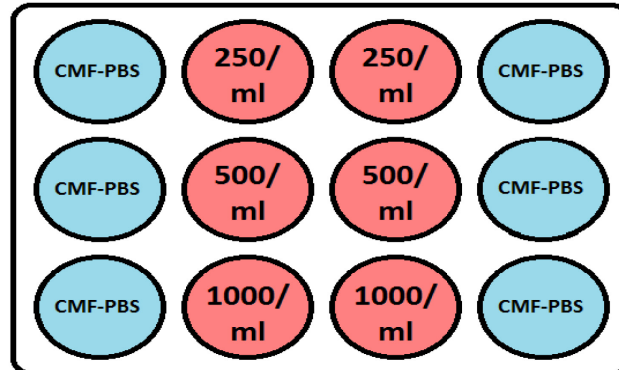


Abb. 5: Versuchsanordnung primäre CFUs

Die roten Wells enthalten $CD34^+$ -Zellen gelöst in RPMI-Medium in entsprechender Zellzahl bezogen auf 1ml und 500 μ l Methocult. Die blauen Wells enthalten CMF-PBS.

Für die optimale Viskosität des Mediums musste jeweils zu 500 μ l Methocult 50 μ l Zellsuspension zusammengesetzt aus Zellen und RPMI 1640-Medium (Lonza, Verviers/Belgien) zugesetzt werden. Es ergibt sich damit folgendes Volumen in jedem kultivierten Well (x steht in diesem Fall für die jeweils gewünschte Menge der Zellsuspension):

$$500 \mu\text{l Methocult} + x \mu\text{l Zellsuspension} + (50-x) \mu\text{l RPMI} = 550 \mu\text{l}$$

Aufgrund der zähen Konsistenz des Methocults, musste bei dessen Umgang mit einer 1ml Spritze und einer 20 G-Kanüle gearbeitet werden. Um eine gute Durchmischung von Medium Zellen zu

erhalten, wurde die Platte zuerst kurz für etwa 20 s gevortext und anschließend jedes einzelne Well jeweils mit einer sterilen 1ml-Pipettenspitze durchgerührt.

Die übrigen äußeren sechs Wells wurden mit sterilem CMF-PBS (siehe Abb. 5; bzgl. Zusammensetzung siehe Anhang (S.83)) gefüllt. Im Anschluss daran kamen die Zellen in den Brutschrank und wurden bei 37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.2 Auszählen der primären CFUs und Ansatz der sekundären CFUs

Am achten Tag wurde die Anzahl der Kolonien als primäre CFUs bestimmt und in Microsoft Excel 2010 dokumentiert. Dabei wurden nur Kolonien berücksichtigt, die eine Zellzahl von mehr oder gleich 40 Zellen aufwiesen. Wenn zu viele Kolonien beieinander waren, d.h. die genaue Anzahl von einzelnen Kolonien nicht mehr differenziert werden konnte, wurde das Well als „overplated“ dokumentiert und die Kolonienzahl als 100 betrachtet.

Um die Teilungsfähigkeit der CFU-Zellen und deren Fähigkeit sekundäre Kolonien zu bilden zu beurteilen, wurden bis zu 96 Kolonien einzeln unter mikroskopischer Sicht mit einer 10µl-Pipette jeweils in ein separates Well erneut angesetzt. Dazu wurden sukzessive je die inneren Wells von vier 48-Well-Platten mit 10 µl RPMI-Medium versehen, in die dann die Kolonien resuspendiert wurden (siehe Abb. 6). Die Kolonien wurden zuerst aus den Wells mit den niedrigsten Ansatzzellzahlen entnommen und erst, wenn alle aus jenen Wells verwendet wurden, wurde zur nächst höheren übergegangen. Es wurde streng darauf geachtet, nur eine Kolonie pro Well neu anzusetzen.

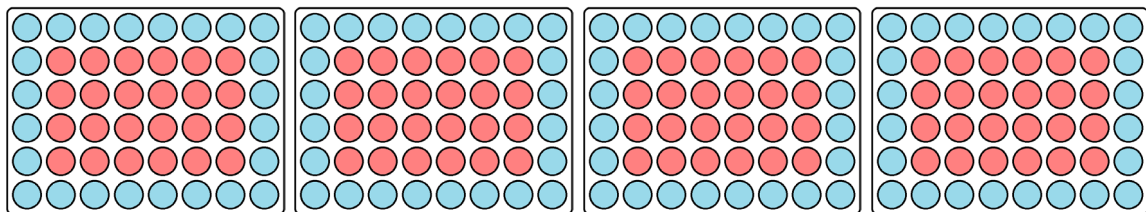


Abb. 6: Versuchsanordnung sekundäre CFUs

Die roten Wells enthalten jeweils eine Kolonie gelöst in 10 µl RPMI-Medium und 100 µl Methocult. Die blauen Wells enthalten CMF-PBS.

Anschließend wurden dann mit einer 1 ml Spritze und einer 20G-Kanüle in jedes jeweils eine Kolonie enthaltende Well 100 µl Methocult gegeben. Danach wurden die Platten für ca. 30 s gevortext. Außerdem wurde in alle Wells, die keine Kolonien enthielten, CMF-PBS gefüllt, um die Kultur feucht zu halten (siehe Abb. 6) und dann im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.3 Auswertung

Erst ab 40 Zellen wurde ein Zellhaufen als Kolonie gewertet, da dann davon auszugehen war, dass die Ursprungszelle eine koloniebildende Einheit gewesen sein musste, denn andere Zellen haben nicht das Potenzial, sich in mehr als 40 Zellen zu teilen. Wenn nun eine Kolonie mitsamt der CFU isoliert und neuangesetzt wird, dann müssten folglich alle Kolonien von der Ursprungszelle („Ursprungs-CFU“) abstammen und jede koloniebildende Tochterzelle müsste ebenfalls eine CFUs sein. Das ist allerdings nur durch self-renewal möglich. Da sich Zellen immer in genau zwei Tochterzellen teilen und dies auch für CFUs gilt, musste sich die „Ursprungs-CFU“ mindestens einmal teilen, um zwei neue CFUs bzw. zwei Kolonien zu bilden. Zweimal muss sie sich dann für vier Kolonien geteilt haben und so weiter. Das bedeutet:

$$\text{Anzahl der Kolonien} + 1 = 2^{(\text{Anzahl der Teilungen})}$$

$$\leftrightarrow \text{Anzahl der Teilungen} = \log_2(\text{Anzahl der Kolonien} + 1)$$

Zur Anzahl der Kolonien muss eins addiert werden, da die CFU schon eine Kolonie gebildet hat (die Kolonie, die umgesetzt wurde). Zusammenfassend gilt also, je höher die Anzahl der sekundären Kolonien, desto mehr self-renewal Potenzial besitzt die CFU. Das Abhängigkeitsverhältnis ist dabei der Logarithmus zur Basis zwei.

Die Auszählung der sekundären CFUs erfolgte am 13. Tag nach dessen Ansatz bzw. am 21. Tag nach dem Ansatz der primären CFUs. Die sekundären CFU haben sich in den jeweiligen Wells aus nur einer Ausgangskolonie entwickelt. Für die Auswertung wurde die Anzahl der Kolonien in einem Well gezählt, eins addiert und der Logarithmus zur Basis zwei errechnet. Danach wurde das arithmetische Mittel aus den Ergebnissen gebildet. Zusammenfassend bestimmt man damit die durchschnittliche Anzahl der Teilungen der CFUs oder deren Vorläufer. Für die statistische Auswertung und die Verarbeitung der Messdaten wurde das Programm Microsoft Excel 2010 verwendet.

2.3 Alkalischer Comet-Assay

Der alkalische Comet-Assay ist eine Methode zur Bestimmung und Quantifizierung von DNA Schäden in Eukaryontenzellen.

Der Comet-Assay wurde 1988 von Singh et al. zum ersten Mal beschrieben.^[72] Im Gegensatz zur gewöhnlichen Gelelektrophorese werden hier die Zellen erst nach Einbettung in das Agarosegel lysiert. Das ermöglicht die Beurteilung von DNA-Schäden auf der Einzelzellebene. Im elektrischen Feld wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung Richtung Anode. Entsprechend der Größe der einzelnen Fragmente trennt sich die DNA über eine kürzere oder längere Strecke auf. Durch Färbung mit fluoreszierenden und DNA-affinen Farbstoffen wie 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) oder Ethidiumbromid lässt sich die DNA unter UV-Licht sichtbar machen. Die schlussendliche DNA-Verteilung bietet das Bild eines Kometen, weshalb diese Art der Gelelektrophorese Comet-Assay genannt wird. Der Kopf des Kometen stellt die weniger fragmentierte noch im Zellkern verbliebene DNA dar, wohingegen der Schweif aus deren Bruchstücken gebildet wird (siehe Abb. 7).

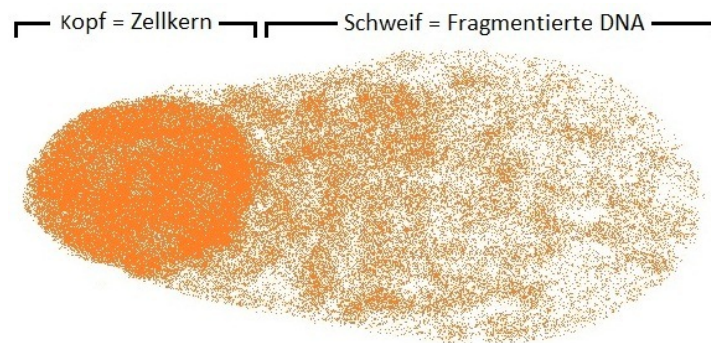


Abb. 7: Schema eines Comet

Unter alkalischen Bedingungen während der Elektrophorese zeichnen sich auch Einzelstrangbrüche ab, da dann die DNA-Doppelhelix dissoziiert und im Folgenden die zwei einzelnen komplementären DNA-Stränge vorliegen. Bei einem pH von 7 hingegen sind nur Doppelstrangbrüche detektierbar.^[73]

Es wurde ein Standardprotokoll zur Durchführung des Comet-Assay verwendet. Allerdings wurden durch zwei zusätzliche Arbeitsschritte Verbesserungen eingeführt, die bereits in einem separaten wissenschaftlichen Artikel von unserer Arbeitsgruppe publiziert wurden.^[74] Es wurde zum einen der Arbeitsschritt des „Precoating“ eingeführt. Dabei wird zum Zweck der besseren Haftung zwischen Agarosegel und Objektträger eine zusätzliche Schicht 1%iger „normal melting Agarose“ (NMA) (Zusammensetzung siehe Anhang (S.84)) auf den Objektträger gegeben, die auf einer Heizplatte komplett dehydriert wird. Zum anderen wurde durch das Einfügen eines Deckglases

während des Aushärtens der NMA-Gelschicht eine Vertiefung geschaffen, in die die Zellen zusammen mit der 1%igen „low melting Agarose“ (LMA) (Zusammensetzung siehe Anhang (S.84)) eingebracht werden. Durch die in der Vertiefung befindliche höhere Dichte an Zellen werden insgesamt weniger Zellen benötigt und somit kann die Auszählung schneller erfolgen.

Es wurden immer mindestens zwei Objektträger für den Comet-Assay erstellt, je nachdem wie viel Material zur Verfügung stand. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Comet-Assays genauer erläutert.

2.3.1 Vorbereiten der Zellsuspension

Unter sterilen Bedingungen wurde ein 5×10^4 Zellen entsprechendes Volumen, bestehend aus in Medium gelösten HSC, entnommen. Dieses Volumen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde so viel Medium entfernt, dass das Zellpellet in 5 μ l Medium übrig blieb.

2.3.2 Vorbereiten der Objektträger

Vorbereitend wurden die LMA und NMA verflüssigt. Das Falcon mit der LMA wurde dazu in ein Becherglas mit Wasser gestellt und auf einer Heizplatte bei 100 °C langsam erwärmt. Sobald die LMA flüssig war, wurde sie aus dem Becherglas genommen und in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt, damit sich die Temperatur stabilisierte. Die NMA konnte direkt auf der Heizplatte bei 100 °C verflüssigt werden.

Nun erfolgte der oben schon grob beschriebene Schritt des Precoating. Dazu wurde ein frischer Objektträger in die NMA zu 2/3 eingetaucht, dann die Unterseite mit einem Zellstoff abgewischt und bei 150 °C auf der Heizplatte getrocknet (siehe Abb. 8A).

Als nächstes erfolgte das Coating. Hier wurde 1 ml der NMA auf den Objektträger aufgebracht (siehe Abb. 8B). Um eine homogene, ebene Fläche zu schaffen, wurde ein 24×60 mm großes Deckglas auf die Agarose gelegt. Allerdings wurde vorher noch ein kleineres, rundes, 12 mm durchmessendes Deckglas in die Mitte der Agarose aufgebracht, um eine kleine Vertiefung zu schaffen (siehe Abb. 8C), in die später die Zellen eingebracht werden konnten. Dies stellte die zweite Modifikation dar. Das Ganze härtete dann unter Raumtemperatur für 15 min aus. Danach wurden mit einem spitzen, scharfen Gegenstand (z.B. einer Skalpellklinge) beide Deckgläser entfernt (siehe Abb. 8D).

2.3.3 Aufbringen und Versiegeln des Zell-Gel-Gemischs

Sobald die Vorbereitung des Slides abgeschlossen war, wurden 35 μl LMA entnommen und mit der 5 μl Zellsuspension vermischt. Dieses Zell-LMA-Gemisch wurde in die nach Entfernung der Deckgläser entstandene Vertiefung (siehe Abb. 8E) in der NMA pipettiert und wieder mit dem kleinen, runden, 12 mm durchmessenden Deckglas abgedeckt (siehe Abb. 8F). Anschließend härte-te der Objektträger bei 4 °C im Kühlschrank für 10 min aus. Danach wurde das Deckglas entfernt und durch Hinaufpipettieren von 90 μl LMA bedeckt (siehe Abb. 8G). Anschließend wurde das Ganze mit einem 24 \times 60 mm großen Deckglas abgedeckt (siehe Abb. 8H) und erneut für 10 min bei 4 °C in den Kühlschrank gelegt.

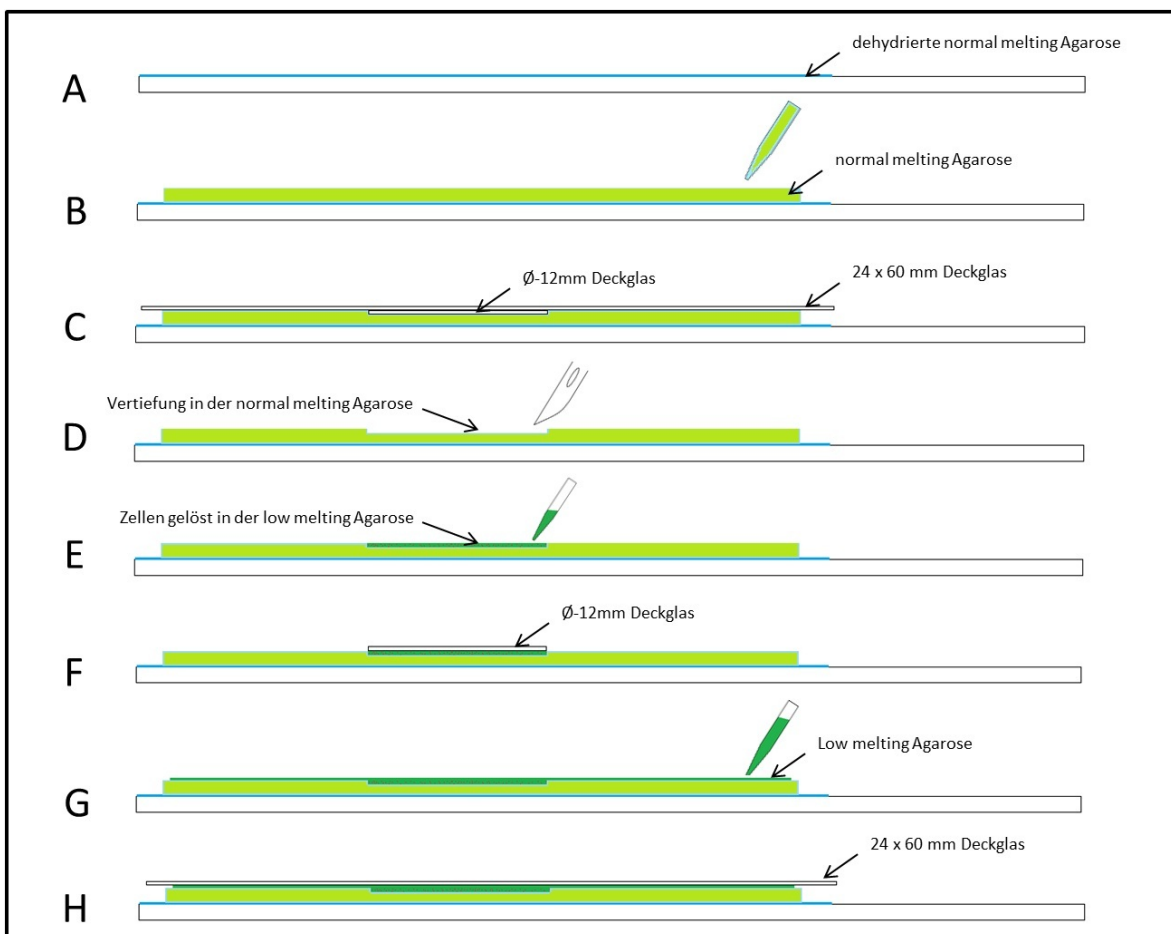


Abb. 8: Arbeitsschritte zur Herstellung eines Comet-Assay-Objektträgers.

A: Precoating; B: Aufbringen der NMA (1 ml); C: Erstellen einer Kammer durch Auflegen eines zweiten kleinen Deckglases; D: Entfernen der Deckgläser mit einer Klinge; E: Einfüllen des Zellsuspensions(5 μl)-LMA(35 μl)-Gemischs in die Vertiefung; F: Hinaufgeben eines kleinen Deckglases; G: Aufbringen einer zusätzlichen Schicht (90 μl); H: Hinaufgeben eines großen Deckglases

2.3.4 Lyse

Um die Zellen zu lysieren, wurden die Objektträger in eine lichtundurchlässige Box gegeben und anschließend der Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang (S.84)) hinzugefügt. Nachdem der Lysepuffer mit den Zellen in Kontakt gekommen war, galt es möglichst zu vermeiden, unnötiges Licht auf die Zellen treffen zu lassen, bis die Elektrophorese vollständig durchgeführt war, damit nicht zusätzliche DNA-Schäden hervorgerufen werden konnten. Die Lyse erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C über eine Stunde.

2.3.5 Elektrophorese

Nach Abschluss der Lyse wurden die Objektträger unter Rotlicht in die komplett abgedunkelte Comet-Elektrophoresekammer gelegt. Dann wurden 950 µl des Elektrophoresepuffers (Zusammensetzung siehe Anhang (S.84)) hinzugegeben. Das Ganze wurde anschließend für 20min inkubiert, wodurch sich die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der DNA Doppelstrangs auflösten und sich die DNA entwinden konnte, so dass später auch Einzelstrangbrüche sichtbar wurden. Im Anschluss daran wurde eine Spannung von 20 V angelegt und über die Hinzugabe von Elektrophoresepuffer die Stromstärke von 290 mA eingestellt. Dabei war zu beachten, dass nach Zugabe des Elektrophoresepuffers und anschließendem Erreichen der Zielstromstärke, die Spannung unter 20 V fallen konnte. Dies war durch das Entfernen von Elektrophoresepuffer mit einer Pasteurpipette zu vermeiden. Die Elektrophorese lief über 20 min.

Bei den sich jetzt anschließenden Schritten war eine erhöhte Vorsicht im Umgang mit den Objektträgern geboten, da es leicht passieren konnte, dass sich die Agarose vom Objektträger löste.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer genommen, sie wurden kurz abgetropft und dann für 10 min in eine mit Neutralisationspuffer (Zusammensetzung siehe Anhang (S.84)) gefüllte Wanne gelegt, um den pH-Wert zu neutralisieren. Danach wurden sie wiederum abgetropft und auf der Unterseite mit Zellstoff abgewischt.

2.3.6 Färbung

Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Objektträger unter einem Abzug mit 70 µl einer 2%igen Ethidiumbromidlösung beträufelt. Nach 15 minütiger Einwirkzeit wurden die Objektträger mehrere Male in Aqua bidest. getaucht, um überschüssiges Ethidiumbromid abzuspülen und somit die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

2.3.7 Auswertung

Für die Auswertung wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Zellen in fünf Kategorien entsprechend der Länge ihres Kometenschweifens eingeteilt (siehe Abb. 9). Diesen fünf Kategorien wurden entsprechende Zahlenwerte zwischen null und 4 zugewiesen. Dabei bekamen die längeren Kometenschweife höhere Zahlenwerte als die kürzeren Kometenschweife. Es wurden jeweils 100 Zellen je Objektträger ausgezählt.

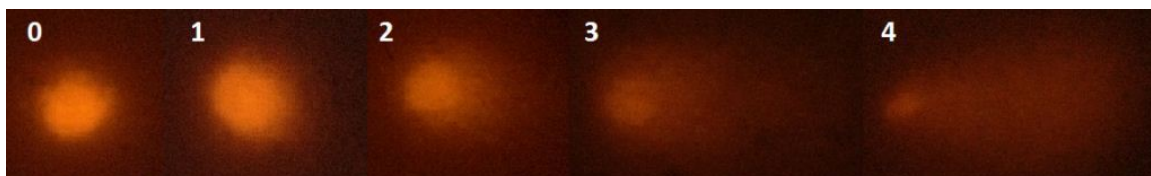


Abb. 9: Einteilung der Comets

Die Beschriftung entspricht der dazugehörigen Cometscorekategorie.

Der Cometscore ergibt sich aus der Summe der Produkte vom Zahlenwert der Kategorien und der entsprechenden Anzahl von Zellen, die in diese Kategorie eingeteilt wurden. Ein Beispiel zeigt sich in Tab. 3.

Cometkategorie	Anzahl der Zellen	Cometkategorie x Anzahl der Zellen
0	35	0
1	30	30
2	20	40
3	10	30
4	5	20
Summe	100	120 (Cometscore)

Tab. 3: Berechnung des Cometscore

Der Cometscore ergibt sich aus der Summe der Produkte aus dem Zahlenwert der Cometkategorie und der Anzahl von Zellen der entsprechenden Cometkategorie.

Um den zufälligen Fehler möglichst gering zu halten, wurde der Cometscore in drei verschiedenen Blickfeldern auf allen vorhandenen Objektträgern ermittelt und anschließend das arithmetische Mittel gebildet.

Für die statistische Auswertung und die Verarbeitung der Messdaten wurde das Programm Microsoft Excel 2010 verwendet.

2.4 Genexpression von SNEV

Um exprimiert zu werden, muss ein Gen erst abgelesen und dann mittels Transskription in mRNA umgeschrieben werden. D.h., die Menge an mRNA entspricht indirekt der Aktivität des Gens, denn je mehr mRNA entsteht, desto stärker wird das Gen exprimiert. Die Methode der Messung der Genexpression beruht nun auf dem Prinzip der Quantifizierung der mRNA des interessierenden Gens. Dazu sind die im Folgenden beschriebenen Schritte notwendig.

2.4.1 RNA Isolierung

Durchführung der RNA Isolierung

Die RNA Isolierung wurde im Labor der Kinderklinik durch die Biomedizinischen Analytikerin Andrea Raicht durchgeführt. Es wurde ein RNA-Extraktions-Kit von Qiagen (RNEASY PROTECT MINI KIT, CAT. NO. 74124) verwendet.

Das Prinzip beruht auf der Methode von Chomczynski et al.^[75] und besteht aus zwei Schritten. Als erstes werden die Zellmembranen lysiert und danach wird die RNA von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.

Die RNA muss zuvor mittels β -Mercaptoethanol (β -ME) als Zusatz im Lysepuffer (RLT) vor dem Abbau durch RNA-abbauende Enzyme (RNAsen) geschützt werden. β -ME denaturiert RNAsen.

Die RNA lagert sich bei Zugabe von Ethanol an eine Silicagel-Membran an. Dann werden die Kontaminationen, unter sukzessiver Zugabe von verschiedenen Puffern und jeweils anschließender Zentrifugation, entfernt. Abschließend wird die RNA wieder mittels Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem Aqua bidest. aus der Membran eluiert.

Das genaue Procedere für 1×10^6 Zellen ist dann wie folgt:

- 1) Zellen für 5 min bei 20 °C mit 1400 rpm zentrifugieren und den entstandenen Überstand werfen
- 2) Zellpellet mit 350 μ l des mit 10 μ l β -ME /1ml versetzten Lysepuffer (RLT) Überstand resuspendieren
- 3) Suspension in die QIAshredder Column pipettieren, 2 min bei Raumtemperatur und 20.000 g zentrifugieren und anschließend die Säule werfen
- 4) 350 μ l 70%-igen Ethanol hinzugeben, durch Auf- und Abpipettieren vermischen und in die RNeasy Spin Column pipettieren
- 5) 15 s mit 8.000 g zentrifugieren und den Durchfluss werfen
- 6) 700 μ l des RW1 Puffers hinzugeben

- 7) 15 s mit 8.000 g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
- 8) 500 µl des RPE Puffers hinzugeben
- 9) 15 s mit 8.000 g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
- 10) 500 µl des RPE Puffers hinzugeben
- 11) 2 min mit 8.000 g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
- 12) 15 s mit 20.000 g zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
- 13) 30 µl RNase Free Water
- 14) 1 min mit 20.000 g zentrifugieren, Flow-through verwerfen
- 15) +30 µl RNase Free Water hinzugeben
- 16) 1 min mit 8.000 g zentrifugieren

Die RNA befand sich nun im Durchfluss, also im Diethylpyrocarbonat versetztem Aqua bidest.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Im nächsten Schritt wurde die RNA Konzentration und Reinheit durch das Bestimmen der optischen Dichte bei Bestrahlung mit UV-Licht gemessen. Die optische Dichte wurde bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) gemessen. Die OD_{260} ist dabei ein Marker für die Menge an RNA und die OD_{280} für die Menge an Verunreinigungen (Proteine). Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} gibt Aufschluss über die Reinheit und sollte bei größer 1,8 liegen. Es lässt sich mit folgender Formel die Menge an RNA ausrechnen.

$$40 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$$

Zuerst wurden 100 µl reinen Aqua bidest. in einer Messkuvette vermessen, um das Eppendorf Bio-photometer plus zu kalibrieren. Danach wurden in einer Messkuvette 10 µl RNA gelöst in DEPC Aqua bidest. mit 90 µl Aqua bidest. verdünnt und im Photometer vermessen. Die Konzentration an RNA kann nun mit der obigen Gleichung und dem im Photometer bestimmten Wert errechnet werden.

2.4.2 cDNA-Synthese (reverse Transkriptase)

Um die quantitative Real-Time PCR nutzen zu können, muss die RNA noch in cDNA umgeschrieben werden, da sie mit DNA-abhängigen DNA-Polymerasen arbeitet und diese die RNA nicht ablesen können. Das Umschreiben geschieht mit einem ursprünglich aus Viren gewonnenen Enzym – der reversen Transkriptase. Sie funktioniert als RNA-abhängige DNA-Polymerase. Unabhängig davon kann sie aber auch als DNA-abhängige DNA-Polymerase wirken.

Zur cDNA-Synthese wurde das “High capacity RNA to cDNA Kit” von Applied Biosystems verwendet. Dabei wurden Random Primer (Primermix mit vielen verschiedenen Startsequenzen) zur Synthese der cDNA verwendet. Diese gewährleisten eine hoch effiziente Synthese von allen vor-

handenen RNA-Molekülen – der gewünschten mRNA, aber auch aller anderen RNA-Formen, wie zum Beispiel der ribosomalen RNA.

Die reverse Transkriptionsreaktion setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

- 1) Aufbrechen der Sekundärstruktur der RNA
- 2) Anlagerung der Random Primer
- 3) Synthese der cDNA
- 4) Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase

Der genaue Ablauf entsprach dem Herstellerprotokoll und war wie folgt. Um die Enzymaktivität niedrig zu halten, wurde auf Eis gearbeitet:

- 1) Herstellung des Mastermix für alle Proben und eine Negativkontrolle (siehe Tab. 4) in einem frischen Eppendorfgefäß.

µl	Substanz
2	10x RT Puffer
0,8	25x dNTP Mix
2	10x Random Primer
1 (0)	reverse Transkriptase
4,2 (5,2)	dH ₂ O

Tab. 4: Volumina des Mastermix für die cDNA-Synthese je Probe

Die Werte in den Klammern gelten für die Negativkontrolle.

- 2) Entnahme von 250 ng RNA (gelöst in Diethylpyrocarbonat versetztem Aqua bidest.) je Probe, Überführen in ein frisches Eppendorfgefäß und Auffüllen mit Aqua bidest. auf 10 µl. Das Volumen, in dem die 250 ng RNA primär gelöst war, sollte 10 µl jedoch nicht überschreiten. Für die Negativkontrolle wurde die RNA aus allen Proben gepoolt. Es wurde dazu gleich viel RNA aus allen Proben entnommen, so dass in Summe 250 ng RNA im Tube waren. Anschließend wurden die Tubes kurz abzentrifugiert, um eventuelle Tropfen von der Gefäßwand nach unten zu bringen.
- 3) Die Lösungen aus 1) wurden zu denen aus 2) pipettiert und miteinander vermischt, so dass sich ein Volumen aus 20 µl ergab. Anschließend wurden die Tubes kurz abzentrifugiert.
- 4) Hineingeben der Röhrchen in den Thermocycler und Start des Thermocyclers mit folgendem Programm:
 - a. 10 min bei 25 °C
 - b. 120 min bei 37 °C
 - c. 5 s bei 85 °C
 - d. Herunterkühlen auf 4 °C

2.4.3 qRT-PCR

Die cDNA Proben können nun mittels quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) vervielfältigt und mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in Echtzeit gemessen werden.

Prinzip

Das Prinzip der qRT-PCR ist dasselbe wie das aller Polymerase Chain Reactions (PCR). An einem DNA-Strang lagert ein Primer an („annealing“). Dieser Primer muss für das gesuchte Gen spezifisch sein, damit genau das gewünschte Gen später gezielt amplifiziert wird. Nach dem der Primer gebunden hat, bindet eine DNA-abhängige DNA-Polymerase an den Strang („annealing“) und das Kopieren der DNA beginnt („elongation“). Am Ende der Elongation liegt die DNA als Doppelstrang vor. Im Anschluss daran trennen sich alle Teile wieder voneinander („denaturation“) und das Ganze beginnt von vorn. Die Phasen Annealing, Elongation und Denaturation laufen jeweils bei bestimmten Temperaturoptima ab und dauern unterschiedlich lang. Die Annealing Temperatur ist von der Länge und Beschaffenheit des Primers abhängig. Bei einem hohen Anteil von Guanin und Cytosin ist die benötigte Energie höher, da aufgrund ihrer drei Wasserstoffbrückenbindungen die Bindungstendenz höher ist, im Vergleich zu Adenin und Thymin. Die optimale Temperatur kann durch Ausprobieren von verschiedenen Temperaturen gefunden werden (Gradienten PCR). Die Elongation hängt vom Optimum der verwendeten Polymerase ab, ist aber auch häufig gleich der Annealing Temperatur. Für die Aufspaltung aller Verbindungen (Denaturation) wird eine hohe Temperatur von etwa 95 °C benötigt.

Da die Polymerase nur in eine Richtung ablesen kann und auch der Primer nur in einer Richtung funktioniert, könnte man immer nur einen Strang kopieren. – entweder den 3'→5'-Strang oder den 5'→3'-Strang. Dadurch würde sich bei jedem Zyklus die Menge der DNA-Stränge nur um eins erhöhen. Aus diesem Grund werden immer mindestens zwei Primer verwendet – ein forward und ein reverse Primer. So erhält man bei jedem Zyklus eine Verdoppelung.

SYBR-Green

Der Unterschied der qRT-PCR mit SYBR-Green im Vergleich zur normalen PCR ist nun, dass sich im Reaktionsgemisch zusätzlich (SYBR-Green) befindet, der sich spezifisch an Doppelstrang-DNA (dsDNA) anlagert. Bei der Bindung von SYBR-Green an dsDNA erhöht sich dessen Fluoreszenz bei der Bestrahlung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge um den Faktor 1.000. Wenn nun während der PCR die Menge an dsDNA zunimmt, kann sich auch mehr SYBR-Green anlagern (siehe Abb. 10 (S.38)). Das geschieht vor allem am Ende der Elongation. Deshalb wird bei jedem Zyklus am Ende der Elongation die Intensität des Fluoreszenzlichts gemessen. Da sich die Intensi-

tät des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge der dsDNA erhöht, lässt sich die Menge an dsDNA direkt proportional ablesen.

Ein Vorteil des SYBR-Green-Assays ist die Möglichkeit der Erzeugung einer Schmelzkurve zur Qualitätskontrolle. Dabei wird am Ende der PCR die Temperatur, beginnend bei 55 °C, langsam erhöht. Mit steigender Temperatur lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Stränge, die dsDNA teilt sich in ihre Einzelstränge und SYBR-Green löst sich. Deswegen verliert SYBR-Green einen Großteil seiner Fluoreszenz, was sich durch eine Abnahme der Intensität bemerkbar macht. Da die erzeugten DNA-Abschnitte dieselbe Länge und Struktur aufweisen, ist auch die gleiche Energie nötig, um alle Bindungen aufzuspalten. Deshalb sollte die Fluoreszenz mehr oder weniger abrupt bei einer bestimmten Temperatur nachlassen. Wenn man die Änderung der Fluoreszenz gegen die Änderung der Temperatur in einem Diagramm aufträgt, sollte bei dieser Temperatur genau ein Peak erscheinen. Wenn ein zweiter Peak auftritt, unter der Voraussetzung, dass man nur ein Primerpaar verwendet hat, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass der Primer nicht spezifisch für den gewünschten DNA-Abschnitt ist. Allerdings kann sich hinter einem Peak trotzdem noch ein zweites Produkt verstecken, weshalb eine Gelelektrophorese als zweite Qualitätskontrolle zur Spezifität der Primer notwendig ist. In der Gelelektrophorese kann man aufgrund der Eigenschaften des Gels, das wie ein Schwamm aufgebaut ist, die Auftrennung der PCR-Produkte im elektrischen Feld nach Größe und Ladung erreichen und so eine mögliche Diversität erkennen.

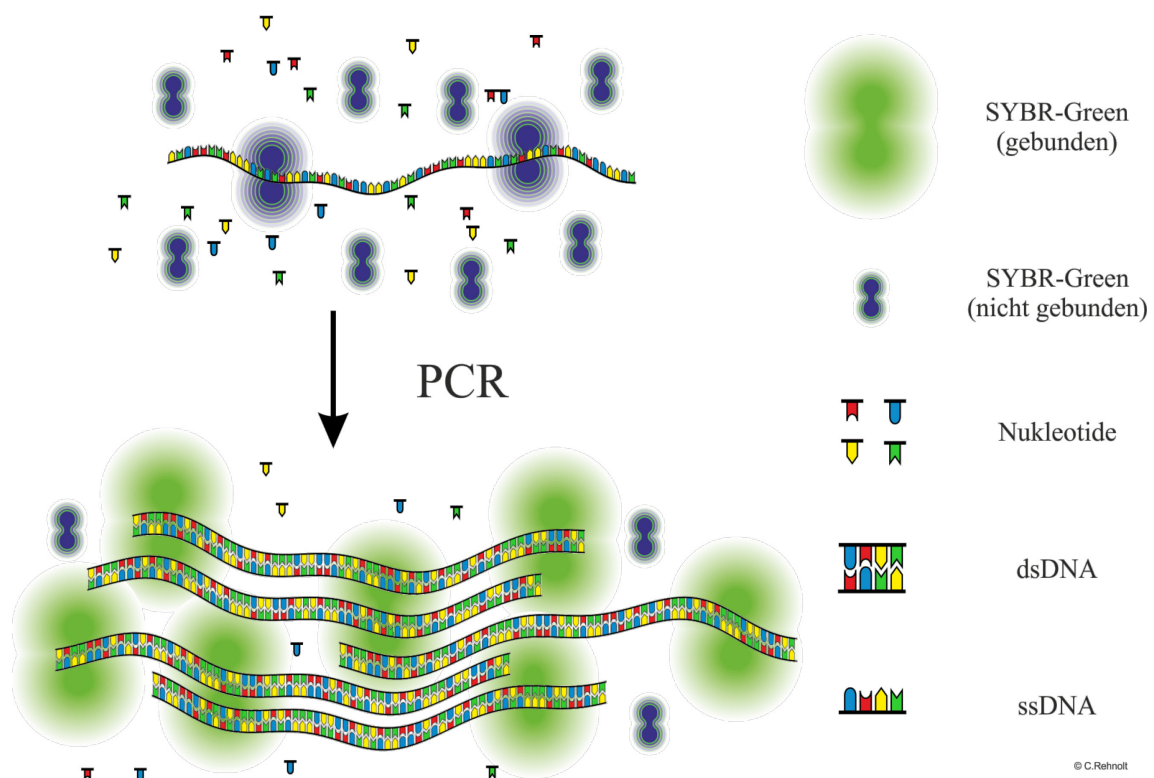


Abb. 10: Prinzip der qRT-PCR mit Sybr-Green

Sybr-Green hat die Eigenschaft bei Bindung an Doppelstrang-DNA (dsDNA) stärker zu fluoreszieren als bei Bindung an Einzelstrang-DNA (ssDNA). Bei der PCR wird der Anteil an dsDNA erhöht, was zu einer verstärkten Fluoreszenz führt. Bei der PCR werden einzelne Nukleotide verbraucht und zu DNA verbunden.

Threshold

Bis zu einem gewissen Punkt verhält sich die Vermehrung der DNA exponentiell. Wenn dieser Punkt überschritten wird, flacht die Kurve ab. Gründe dafür können zum Beispiel die Abnahme der Konzentration an Nukleotiden für den Anbau weiterer DNA-Stücke oder der Verbrauch an Primer für die Anlagerung der Polymerase sowie die Konzentration von SYBR-Green sein. Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an mRNA lassen sich deshalb nur während des exponentiellen Wachstums stellen. Ein geeigneter Punkt findet sich meist am Beginn der detektierbaren, exponentiellen Vermehrung. Dieses Fluoreszenzsignal wird auch als „threshold“ bezeichnet.

Effizienz und Qualitätskriterien

Im Optimalfall verdoppelt sich die DNA bei jedem Zyklus. Dass der Optimalfall natürlich nicht eintritt, liegt unter anderem an dem Bindungsverhalten zwischen Primer und DNA. Diejenige Menge, um die sich die DNA vermehrt, wird als Effizienz (E) bezeichnet. Bei jedem Zyklus vermehrt sich deshalb die DNA um den Faktor (1+E). Die Anzahl der Zyklen, die nötig sind bis der „threshold“ (T) erreicht ist, wird „quantification Cycle“ (Cq) genannt und wird mittels folgender Gleichung errechnet (x_0 steht für die Menge an Ausgangs-RNA und n für die Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um Cq zu erreichen):

$$T = x_0 * (1 + E)^{Cq} \quad (1)$$

Wenn nun diese Gleichung (1) für zwei beliebige Werte x_0 gleichgesetzt wird, erhält man folgende Gleichung:

$$x_{01} * (1 + E)^{Cq_1} = x_{02} * (1 + E)^{Cq_2} \quad (2)$$

Durch Termumformung (u.a. bei Anwendung des Logarithmus der Basis 10) erhält man die folgende Gleichung:

$$\lg(1 + E) = (-1) * \left(\frac{\lg(x_{02}) - \lg(x_{01})}{Cq_2 - Cq_1} \right) \quad (3)$$

Und durch weitere Termumformung erhält man Gleichung (4):

$$E = 10^{(-1) * \left(\frac{\lg(x_{02}) - \lg(x_{01})}{Cq_2 - Cq_1} \right)} - 1 \quad (4)$$

Zur Ermittlung der Effizienz (E) muss nun eine Standardverdünnungsreihe angelegt werden, bei der die Verdünnungen der DNA bekannt sind. Wenn nun zum Beispiel eine Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 10 erzeugt wird, sollte man eine lineare Kurve erhalten, die bei Regression folgende Geradengleichung erfüllt:

$$Cq = \frac{1}{\lg(1 + E)} * \lg(x_0) + \frac{\lg(T)}{\lg(1 + E)} \quad (5)$$

Es ist erkennbar, dass bei logarithmiertem x_0 der Geraden die Gleichung (5) einer Geradengleichung entspricht, bei der die Steigung m gleich $\frac{1}{\lg(1+E)}$ ist. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Steigung m genau dem Reziproken des linken Terms der Gleichung (3) entspricht. Das bedeutet:

$$\frac{1}{m} = (-1) * \left(\frac{\lg(x_{02}) - \lg(x_{01})}{Cq_2 - Cq_1} \right) \quad (6)$$

Wenn nun die Gleichung (6) in die Gleichung (4) eingesetzt wird, erhält man:

$$E = 10^{\frac{1}{m}} - 1 \quad (7)$$

Das wiederum bedeutet, dass die Effizienz bei Regression der Standardkurve und folglich der Kenntnis deren Steigung mithilfe der Gleichung (7) erchenbar ist.

Es ist allerdings zu beachten, dass die Herleitung nur bei annähernder Linearität der Standardkurve gilt. Um dies sicherzustellen, muss das Bestimmtheitsmaß R^2 für die logarithmierte Standardkurve errechnet werden. R^2 sollte dabei größer als 0,98 sein.

Als weiteres Qualitätskriterium sollte die Effizienz in einem Bereich zwischen 90–105% liegen.

Referenzen

Um im Endeffekt eine Aussage treffen zu können und mögliche Mengenunterschiede an mRNA ausgleichen zu können, benötigt man noch ein Referenzgen. Das Referenzgen sollte eine homogene Expression über den Zeitverlauf haben, unabhängig vom intrazellulären Geschehen. Das im Interesse stehende Gen sollte ähnlichen Expressionsschwankungen unterliegen wie das Referenzgen, damit sich die Expressionsschwankungen gegeneinander ausgleichen. Ansonsten erhielte man ein falsch negatives Ergebnis.

Durchführung

Bei unserer Bestimmung der Genexpression von SNEV wurde als Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) verwendet.

Für GAPDH wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: ACA TGT TCC AAT ATG ATT CCA

reverse: TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG

Für SNEV wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: ATG TCC CTA ATC TGC TCC ATC T

reverse: ATT CTC CGC AAT GTA CTT CTC G

Für unseren Versuch wurde zuerst, um die optimale Annealing Temperatur zu finden, eine Gradient PCR durchgeführt. Dazu wurde ein Teil aller Proben gepoolt, um bei kleinstmöglichem Materialverbrauch alle Proben austesten zu können. Der Pool aus acht Proben wurde auf jeder Zeile (A-H) mit einer anderen Temperatur laufen gelassen. Zusätzlich wurde eine DNA-Negativ-Kontrolle (no template control, NTC) und eine Reverse-Transkriptase-Negativ-Kontrolle (RT⁻) mit getestet. Der Versuchsablauf war der folgende:

- 1) Pipettieren der für die PCR nötigen Substanzen (siehe Tab. 5) inklusive der cDNA-Proben (8x) sowie einer RT⁻-Probe und einer NTC in 10 Wells einer PCR 96-Well-Platte (hard-shell).

µl	Substanz
10	iQ Sybr-Green Supermix
0,4	forward Primer (0,2 µM)
0,4	reverse Primer (0,2 µM)
4	gepoolte cDNA 1:10 (5 ng/µl)
5,2	dH ₂ O

Tab. 5: Substanzzusammensetzung Gradient PCR

Bei der NTC wurde die cDNA durch dH₂O und bei der RT⁻ durch nicht transkribierte RNA ersetzt.

- 2) Einstellen der Platte in das Bio-RAD CFX96 PCR-Gerät und Starten des Programms mit den folgenden Einstellungen.
 - a. „Hot Start“ für 5 min bei 95 °C (zur Aufspaltung aller zufälligen Wasserstoffbrückenbindungen)
 - b. Danach ein zweistufiger Zyklus mit zuerst 95 °C für 10 s und anschließend für jede Probe eine unterschiedliche Temperatur zwischen 54 °C und 63 °C für 30 s. NTC und RT⁻ 61 °C für 30 s. Dieser Zyklus wurde 39 Mal wiederholt
 - c. Dann 95 °C für 30 s und anschließend 55 °C für 30 s

- d. Erzeugung einer Schmelzkurve mit den Temperaturen zwischen 55 °C und 95 °C bei einem Anstieg von 0,5 °C pro 5 s

Nach Abschluss der Gradienten PCR konnte die eigentliche Mess-PCR gestartet werden. Es wurde für jede Probe ein Dreifachansatz mit den SNEV-Primern und ein Dreifachansatz mit den GAPDH-Primern durchgeführt. Zusätzlich wurde für die Bestimmung einer Standardkurve eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 5 (50, 10, 2, 0,4 ng/μl) mitamplifiziert. Jede Verdünnungsstufe und jede Probe wurden jeweils im Dreifachansatz durchgeführt. Des Weiteren wurde wieder eine DNA-Negativ-Kontrolle (no template control, NTC) sowie eine Reverse-Transkriptase-Negativ-Kontrolle (RT⁻) angesetzt. Es wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

- 1) Pipettieren der für die PCR nötigen Substanzen (siehe Tab. 6) inklusive der cDNA-Proben (jeweils 3x), der vier Verdünnungsstufen (jeweils dreimal) sowie einer RT⁻-Probe und einer NTC in eine PCR 96-Well-Platte (hard-shell).

μl	Substanz
10	iQ Sybr Green Supermix
0,4	forward Primer (0,2 μM)
0,4	reverse Primer (0,2 μM)
1	cDNA 50 (bzw. 10, 2, 0.4) ng/μl
8,2	dH ₂ O

Tab. 6: Substanzzusammensetzung Mess-PCR

Für die Standardkurve wurden die in der Klammer befindlichen Konzentrationen gewählt. Bei der NTC wurde die cDNA durch dH₂O und bei der RT⁻ durch nicht transkribierte RNA ersetzt.

- 2) Einstellen der Platte in das Bio-RAD XFC PCR-Gerät und Starten des Programms mit den folgenden Einstellungen.
- „Hot Start“ für 5 min bei 95 °C (zur Aufspaltung aller zufälligen Wasserstoffbrückenbindungen)
 - Danach ein zweistufiger Zyklus mit zuerst 95 °C für 10 s und anschließend 60 °C für 30 s. Dieser Zyklus wurde 39 Mal wiederholt
 - Dann 95 °C für 30 s und anschließend 55 °C für 30 s
 - Erzeugung einer Schmelzkurve mit den Temperaturen zwischen 55 °C und 95 °C bei einem Anstieg von 0,5 °C pro 5 s

Als Qualitätskontrolle wurde im Anschluss eine Standard- und Schmelzkurvenbestimmung der amplifizierten DNA sowie eine klassischen Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben in ein 2%iges Agarose-Gel zusammen mit Ethidiumbromid sowie sechsmal Loading Dyes pipettiert und dann bei einer Spannung von 70 V Richtung Anode laufen gelassen. Nach zwei Stunden wurden die Gele jeweils unter UV-Licht fotografiert.

Für die Analyse wurde die Software von Bio-Rad (Bio-Rad CFX Software 2.0) verwendet. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel 2010 anhand der $\Delta\Delta Cq$ -Methode. Bei dieser Methode bezieht man die Cq -Werte von SNEV der einzelnen Passagen auf die Cq -Werte von GAPDH derselben Passagen. Da es sich bei Cq um einen Exponenten handelt, wird Cq_{GAPDH} von Cq_{SNEV} subtrahiert und nicht dividiert (Potenzgesetz), obwohl deren Genexpression relativ zueinander ist. Als Ergebnis erhält man ΔCq . Als nächsten Schritt subtrahiert man von ΔCq Cq_{SNEV} der ersten Passage, da man die Genexpression zur ersten Passage in Beziehung setzt. Das Ergebnis ist nun $\Delta\Delta Cq$. Allerdings muss dieser Wert negativiert werden, weil man auf den Ausgangswert zurück schließt. Da es sich, wie schon erwähnt, bei den Cq 's um Exponenten handelt, muss man diesen noch anwenden. Bei der PCR verdoppelt sich die DNA annähernd, weshalb als Basis zwei verwendet wird. Das Ergebnis ist dann $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Wert. Zusammenfassend bedeutet dies also die relative Expression von SNEV der jeweiligen Passage bezogen auf die Expression der ersten Passage und relativiert durch die Expression von GAPDH.

2.5 Cyclinbestimmung

Es wurde die Expression der Cycline A, B1, C, D1, D3 und E bestimmt. Der praktische Teil wurde von Andrea Raicht durchgeführt.

2.5.1 RNA Isolierung

Siehe Abschnitt 2.4.1 RNA Isolierung (S.34).

2.5.2 cDNA-Synthese (reverse Transkriptase)

Für die Synthese der cDNA wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Roche verwendet. Der genaue Ablauf entsprach dem Herstellerprotokoll und war wie folgt. Um die Enzymaktivität niedrig zu halten, wurde auf Eis gearbeitet:

- 1) Herstellung des Mastermix für alle Proben und eine Negativkontrolle (siehe Tab. 7) in einem frischen Eppendorfgefäß

μl	Substanz
4	10x RT Puffer
2	dNTP-Mix (4 x 1mM)
1,6	Oligo-(dT) ₁₅ -Primer (50 pmol/ μl)
1 (0)	AMV Reverse Transkriptase(20 U/ μl)
1	RNase Inhibitor (50 U/ μl)

Tab. 7: Volumina des Mastermix für die cDNA-Synthese je Probe
Die Werte in den Klammern gelten für die Negativkontrolle.

- 2) Entnahme von 1 μg RNA (gelöst in Diethylpyrocarbonat versetztem Aqua bidest.) je Probe, Überführen in eine frisches Eppendorfgefäß und Hinzugabe des Mastermix aus 1). Anschließend wird die Lösung auf 20 μl mit Aqua bidest. aufgefüllt
Für die Negativkontrolle wurde die RNA aus allen Proben gemittelt. Es wurde dazu gleich viel RNA aus allen Proben entnommen, so dass in Summe 1 μg RNA im Tube waren. Anschließend wurden die Tubes kurz abzentrifugiert, um eventuelle Tropfen von der Gefäßwand nach unten zu bringen
- 3) Die Proben aus 2) wurden in das Thermocycler Well pipettiert, anschließend versiegelt und wiederum kurz abzentrifugiert
- 4) Hineingeben des Wells und Start Thermocycler mit folgendem Programm:
 - a. 10 min bei 25 °C
 - b. 60 min bei 42 °C
 - c. 5 min bei 99 °C
 - d. Herunterkühlen auf 4 °C

2.5.3 qRT-PCR

Siehe Abschnitt 2.4.3 qRT-PCR Durchführung (S.41). Es wurden die Primer verwendet, die auch von Bondi et al.^[76] zur Bestimmung des Zellzyklus benutzt wurde.

Für GAPDH wurden folgende Primer verwendet (in 5'→3'-Richtung):

forward: ACA TGT TCC AAT ATG ATT CCA

reverse: TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG

Für Cyclin A wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: AAG AAG CCA GCT GAA TCT CAA A

reverse: GGT CCA GGT AAA CTA ATG GCT GAA

Für Cyclin B1 wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: CCC TGC TGC AAC CTC CAA

reverse: TGT TCA CTG ACT TTG TTA CCA ATG TC

Für Cyclin C wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: GCC GGC TGG TGC TTT TTT A

reverse: TGG GAG CTC TGC CAA AAG TT

Für Cyclin D1 wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: CCG TCC ATG CGG AAG ATC

reverse: AAC AAG TTG CAG GGA AGT CTT AAG A

Für Cyclin D3 wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: CTG TCT CTC CCC GCC AGT T

reverse: CTG ATA TCT CAA GCT TTC CTT TTC CT

Für Cyclin D3 wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: CCC CGC TGC CTG TAC TGA

reverse: AGC ATG GAG TAA GAG ACC TGG AA

2.6 Oxidativer Stress - Carbonylierte Proteine

Zur Bestimmung des oxidativen Stresses wurde die Menge an carbonylierten Proteinen bestimmt. Dazu wurde eine Zellmenge von 1×10^4 Zellen genommen und in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden die Zellen für 5 min und 1400 rpm abzentrifugiert und das überschüssige Medium entfernt. Um an die Proteine zu gelangen mussten die Zellmembranen lysiert werden. Hierzu wurden die Zellen zuerst in 50 μ l steriles Aqua bidest. resuspendiert und mit dem Eppendorfgefäß in ein Eiswasser gefülltes Ultraschallbad getaucht. Anschließend wurde das Ganze mit Alufolie fixiert (siehe Abb. 11).

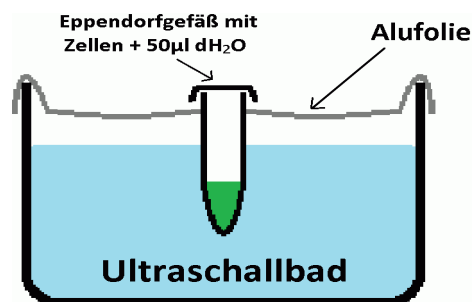


Abb. 11: Lyse der Zellen für die Bestimmung der carbonylierten Proteine

Dann wurde die Probe für zweimal 3 min im eingeschalteten Ultraschallbad inkubiert. Da durch das Ultraschallbad Wärme entsteht und sich dadurch die Moleküle verändern könnten, wurde dazwischen eine Pause von etwa 3 min eingelegt, um die überschüssige Wärme an das Wasser abzugeben. Danach wurde die Probe in einer auf 4 °C-gekühlten Zentrifuge bei 14.000 g für 20 min zentrifugiert. Abschließend wurde der die Proteine enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C im Gefrierschrank eingelagert, solange bis die Probe von Prof. Greilberger am Institut für physiologische Chemie weiterverarbeitet werden konnte. Er bestimmte die Menge an carbonylierten Proteinen nach einer Methode von Buss et al.^[77], welche er mit gewissen Änderungen^[78] verwendete. Für die statistische Auswertung und die Verarbeitung der Messdaten wurde das Programm Microsoft Excel 2010 verwendet.

2.7 Telomerlänge

Die relative Länge der Telomere der durch MACS angereicherten CD34 positiven Zellen wurde nach der Methode von Cawthon et al. mit Hilfe der qRT-PCR und Sybr-Green bestimmt.^[79] Dabei werden die repetitiven Sequenzen der DNA (T) und parallel ein „single-copy gene“ (S) mittels PCR amplifiziert. Das „single-copy gene“ ist das Referenzgen, welches nur einmal in einer einzigen Kopie im gesamten Genom vorkommt. T und S liefern beide bei Anwendung der qRT-PCR mit Sybr-Green Assay einen $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Wert, der der Menge an Ausgangsmaterial und dessen Länge der DNA-Produkte entspricht. Beide werden miteinander in Verhältnis gesetzt und ergeben die T/S-Ratio. Dieser T/S-Ratio ändert sich in Abhängigkeit der Telomerlänge, indem er bei häufigeren Wiederholungen von TTAGGG-Sequenzen größer wird. Folglich entspricht der T/S-Ratio der relativen Länge der Telomere. Über die Länge des „single-copy gene“ lässt sich dann in etwa die absolute Länge der Telomere errechnen. Der praktische Teil wurde von Andrea Raicht durchgeführt.

2.7.1 DNA Isolierung

Durchführung der DNA Isolierung

Der erste Schritt zur Bestimmung der Telomerlänge ist das Isolieren der DNA nach dem Protokoll von QIAamp „DNA Blood Mini Kit“. Es wurden 2×10^5 Zellen gelöst in 200 μ l CMF-PBS verwendet. Der Versuchsablauf war wie folgt:

- 1) Pipettieren von 20 μ l Qiagen Protease in ein 1,5 ml-Röhrchen
- 2) Hinzugeben der 200 μ l Zellsuspension
- 3) Hinzugeben von 200 μ l Lysepuffer Puffer (AL)
- 4) Inkubieren des Gemisches bei 56 °C für 10 min
- 5) sanftes Zentrifugieren des Röhrchens
- 6) Hinzugeben von 200 μ l Ethanol (96-100%) und sanftes Vortexen für 15 s
- 7) erneut sanftes Zentrifugieren des Röhrchens
- 8) Hineingeben der QIAamp Spin Column in ein 2 ml-Röhrchen
- 9) vorsichtiges Hinaufgeben der Probe auf die QIAamp Spin Column
- 10) Zentrifugieren bei 6.000 g für 1 min
- 11) Hineingeben der QIAamp Spin Column in ein neues 2 ml-Röhrchen
- 12) Hinzugeben von 500 μ l Waschpuffer AW1
- 13) Zentrifugieren bei 6.000 g für 1 min
- 14) Hineingeben der QIAamp Spin Column in ein neues 2 ml-Röhrchen
- 15) Hinzugeben von 500 μ l Waschpuffer AW2
- 16) Zentrifugieren bei 2.0000 g für 3 min

- 17) Hineingeben der QIAamp Spin Column in ein neues 1,5 ml-Röhrchen und wegwerfen aller Durchfluss Röhrchen
- 18) Hinzugeben von 200 µl Aqua bidest. und Inkubieren bei Raumtemperatur für 3 min
- 19) Zentrifugieren bei 6.000 g für 1 min

DNA-Konzentration

Für Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das gleiche Prinzip wie für die Bestimmung der RNA-Konzentration angewendet. Siehe dazu 2.4.1 Abschnitt Bestimmung der RNA-Konzentration (S.35). Im Unterschied zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde für die DNA-Konzentration folgende Formel verwendet:

$$50 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g dsDNA/ml}$$

Im Anschluss wurde die Konzentration der DNA auf ca. 1,75 ng/µl eingestellt.

2.7.2 qRT-PCR

Siehe Abschnitt 2.4.3 qRT-PCR Durchführung (S.41)

Als single-copy gene wurde das Acidic ribosomal phosphoprotein P0 (36B4) verwendet, welches auf Chromosom 12 lokalisiert ist und eine Produktlänge von 74 Basenpaaren aufweist.

Für den Telomer-Primer (T) wurden folgende Primer verwendet(in 5'→3'-Richtung):

forward: CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT

reverse: GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT

Für das single-copy gene wurden folgende Primer verwendet (in 5'→3'-Richtung):

forward: CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A

reverse: CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC

2.8 Telomeraseaktivität

Der bei uns verwendete Nachweis der Telomeraseaktivität beruht auf dem von Kim et al. entwickelten TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol“-Assay).^[80] Der Versuch unterteilt sich in folgende vier Schritte:

- 1) Isolation der Telomerase
- 2) Synthese der Telomere (TRAP-Assay)
- 3) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
- 4) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zunächst wird die Telomerase aus den Zellen isoliert (1). Im Anschluss daran lässt man die Telomerase in einer Reaktionslösung arbeiten, die u.a. aus TS-Primern (P1-TS), welche ein künstliches Telomere darstellen, Nukleotiden und Telomerase besteht (2). Die Telomerase synthetisiert an den TS-Primer neue Telomeresequenzen, die jeweils sechs Basenpaare (bp) lang sind und die Basenabfolge TTAGGG aufweisen. Nun kann man schlussfolgern, je länger die künstlichen Telomere sind, desto stärker ist die Telomeraseaktivität in vivo. Um die Telomere messbar zu machen, müssen sie in einer PCR mittels Taq-Polymerase vervielfältigt werden (3). Der komplementäre Strang wird dabei an einen zweiten Primer (P2) synthetisiert. Danach erfolgt der ELISA (4). Die beiden Primer haben an ihrem einen Ende, welches nicht der Verlängerung der Telomere dient, ein Biotinmolekül gebunden. Die Biotinmoleküle wiederum werden an Streptavidin beschichteten Platten gebunden, sodass die an ihnen hängenden Telomere fixiert sind. Bei Zugabe von an komplementären Telomeresequenzen gebundenem Digoxigenin (DIG) und anschließender Inkubation, lagern sich die komplementären Telomeresequenzen an die Telomere an. Nun gibt man Peroxidase gekoppelte Antikörper gegen Digoxigenin hinzu. Diese binden an das Digoxigenin. Als nächstes fügt man Tetramethylbenzidin (TMB) hinzu, welches von der Peroxidase umgesetzt wird und zu einem Farbumschlag führt. Diesen Farbumschlag kann man fotometrisch messen und damit die Länge der Telomere bestimmen. Die Länge der Telomere wiederum lässt den Rückschluss auf die Telomeraseaktivität zu.

Um den eben beschriebenen Assay noch zu verbessern, ist in der Lösung von Schritt (2) ein weiteres DNA-Molekül, der Interne Standard (IS), enthalten. Es gibt verschiedene DNA-Moleküle, die als IS verwendet werden können. Dieser IS hat eine bestimmte Länge von zum Beispiel 216 bp und hat genau die gleichen Primeranlagerungssequenzen wie der Telomere Strang, so dass sich während der PCR die Primer P1-TS und P2 daran anlagern können und dadurch eine Vervielfältigung, gleich wie bei den Telomeresträngen, ermöglichen. Im Unterschied zum Primer P1-TS bzw. Telomerestrang wird der IS nicht durch die Telomerase verlängert. In einer nach der PCR durchgeführten Gelkontrolle erzeugen die Telomerestränge, in Abhängigkeit von ihrer Länge, ein „Leiter“-

artiges Bild, wobei die einzelnen Sprossen 6 bp voneinander getrennt sind. Der IS hingegen lagert sich genau an der entsprechenden Stelle von beispielsweise 216 bp ab. Der Vorteil, den man durch das Mitführen eines IS erhält, ist, dass das Vorhandensein von Taq-Polymerase Inhibitoren angezeigt wird. Die Taq-Polymerase Inhibitoren könnten unter Umständen bei der Isolierung der Telomerase nicht vollständig entfernt worden sein und würden in diesem Fall die Aktivität der Taq-Polymerase einschränken. Die Taq-Polymerase würde dann beide PCR-Substrate, sowohl die Telomerstränge als auch der IS, weniger häufig amplifizieren. Hätte man den IS in diesem Fall nicht mitgeführt, könnte man nicht unterscheiden, ob wenig Telomerase vorhanden ist oder die PCR, aufgrund der inhibierten Taq-Polymerase, schlecht gelaufen ist.^[81]

Der Versuchsablauf entsprach dem des Herstellerprotokolls „TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}“ (Cat. 12013789001, Roche, Mannheim/Germany), wurde mit 2×10^5 durch MACS angereicherte Zellen durchgeführt und gestaltete sich wie folgt. Der praktische Teil erfolgte durch Andrea Raicht. Sofern nicht anders angemerkt, wurden die Proben immer auf Eis gelagert verarbeitet.

2.8.1 Isolation der Telomerase

- 1) Erzeugen eines Zellpellets durch Zentrifugieren bei 3.000 g sowie 4 °C für 5 min und anschließendes Abheben des Überstands
- 2) Resuspendieren in 200 µl CMF-PBS und Wiederholung des Schritt 1)
- 3) Resuspendieren in 200 µl auf Eis vorgekühlten Lysepuffer (Sol. 1) durch 3maliges Auf- und Abpipettieren
- 4) 30 min auf Eis inkubieren
- 5) Zentrifugieren der Suspension bei 16.000 g und 4 °C für 20 min
- 6) Vorsichtiges Abheben von 175 µl des Überstands (Zellextrakt) und Überführen in ein neues Röhrchen

Der TRAP-Assay schloss sich direkt an.

2.8.2 TRAP-Assay und PCR

Die Vorbereitung der Negativkontrolle 1 erfolgte durch Vorbehandlung der Proben mit RNase:

- 1) Hinzugabe von 1 μl DNase freie RNase zu 5 μl Zellextrakt in einem frischen Röhrchen
- 2) Inkubation bei 37 °C für 20 min

Der Ansatz erfolgte in einer Thermocyclerplatte mit folgenden Reagenzien und Mengen (siehe Tab. 8). Es wurde auf Eis pipettiert:

Reagenz	Probe (SX)	negative Kontrolle 1 (SX,0)	positive Kontrolle (TS8)	negative Kontrolle 2 (TS8,0)
Aqua bidest	ad 50 μl	ad 50 μl	ad 50 μl	ad 50 μl
Reaction Mix (Sol. 2)	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl
Interner Standard (Sol. 3)	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
Probe (Zellextrakt)	1 μl	/	/	/
Negativkontrolle 1	/	1 μl	/	/
Positiv Kontrolle (Sol. 4)	/	/	1 μl	/
Lysepuffer (Sol. 1)	/	/	/	1 μl

Tab. 8: Substanzzusammensetzung des TRAP-Assay

Die negative Kontrolle 1 enthält die RNase behandelte Probe, die negative Kontrolle 2 enthält nur den Lysepuffer und die positiv Kontrolle enthält eine repetitive Telomersequenz (TTAGGG)₈ in einer Konzentration von 10^{-12} nmol/ μl . TS8 und TS8,0 wurde nur einmal durchgeführt. Allerdings wurde für jede Probe (SX) eine negative Kontrolle (SX,0) mitgeführt, wobei x für die beliebige Probennummer steht.

Einstellen der Platte in den Thermocycler und Starten des Programms mit den folgenden Einstellungen:

- 1) Primer Elongation für 20 min bei 25 °C
- 2) Telomerase Inaktivierung für 5min bei 94 °C
- 3) Denaturierung bei 94 °C für 30 s
- 4) Annealing bei 50 °C für 30 s
- 5) Elongation bei 72 °C für 90 s
- 6) 29 Wiederholungen der Schritte 3), 4), 5)
- 7) Weitere 10 min bei 72 °C
- 8) Abkühlen auf 4 °C

2.8.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- 1) Vorbereiten einer leeren Mikrotiterplatte (MP) durch Hineinpipettieren von 10 µl Denaturierungslösung (Sol.7) in je zwei Wells pro Probe (SX)
- 2) Hinzugeben von 2,5 µl Amplifikationsprodukt in jedes Well der entsprechenden Probe
- 3) Hineinpipettieren der Kontrollen SX,0 in leere Wells der Mikrotiterplatte (MP)
- 4) Inkubieren der Mikrotiterplatte (MP) bei Raumtemperatur für 10 min
- 5) Hinzugeben von 100 µl Hybridisierungslösungen (Sol.8 = T, Telomerase spezifischer Bindungspuffer) in eins der beiden Wells mit der Probe SX und 100 µl Hybridisierungslösungen (Sol.9 = IS, Interner Standard spezifischer Bindungspuffer) in das andere Well mit der Probe (SX)
- 6) Hinzugeben von 100 µl Hybridisierungslösungen (Sol.8 = T) zur negativ Kontrolle 1 (SX,0) und anschließend kurz vortexen der Mikrotiterplatte (MP)
- 7) Pipettieren von je 100 µl je Well aus der MP in jeweils ein neues Well der Mikrotiterplatte (MPK), welche mit dem Kit mitgeliefert wurde, und anschließend Zukleben mit einer Folie als Verdunstungsschutz

Das Pipettierschema von Schritt 7 gestaltete sich folgendermaßen (siehe Tab. 9):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS8,0	TS8	TS8,IS									
B	S1,0	S1	S1,IS									
C	S2,0	S2	S2,IS									
D									
E												
F												
G												
H												

Tab. 9: Pipettierschema des TRAP-Assay

TS8 enthält die Positivkontrolle und Telomerase spezifischen Bindungspuffer;

TS8,0 enthält Lysepuffer und Telomerase spezifischen Bindungspuffer;

TS8,IS enthält die Positivkontrolle und Interner Standard spezifischen Bindungspuffer;

SX enthält die Probe (SX) und Telomerase spezifischen Bindungspuffer;

SX,0 enthält die Negativkontrolle 1, welche der RNase behandelten Probe (SX) entspricht, und Telomerase spezifischen Bindungspuffer;

SX,IS enthält die Probe (SX) und Interner Standard spezifischen Bindungspuffer

X steht für eine beliebige Probennummer

- 8) Zentrifugieren der MP bei 37 °C und 300 rpm für 2 h
- 9) Komplettes Entfernen der Hybridisierungslösungen
- 10) Hinzufügen von 250 µl Waschpuffer (Sol. 10) in jedes Well
- 11) Inkubation des Waschpuffers für mind. 30 s
- 12) Sorgfältiges Entfernen des Waschpuffers aus allen Wells
- 13) Zweimaliges Wiederholen der Schritte 9), 10), 11)
- 14) Hinzufügen von 100 µl Anti-DIG-HRP Lösung (Sol. 11) in jedes Well und Zukleben der Platte

- 15) Zentrifugieren der MP für 30 min bei Raumtemperatur und 300 rpm
- 16) Entfernen der Lösung
- 17) Hinzufügen von 100 µl Tetramethylbenzidin (Sol. 13)
- 18) Zentrifugieren für 15 min bei Raumtemperatur und 300 rpm
- 19) Hinzufügen von 100 µl Stopplösung (Sol. 14)
- 20) Auslesen der Mikrotiterplatte im Mikrotiterplattenleser bei 450 nm gegen 690 nm

2.8.4 Auswertung

Damit die Messung als verwertbar betrachtet werden kann, müssen bestimmte Qualitätskriterien eingehalten werden. So darf die Extinktion der probenspezifischen Negativkontrolle ($A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$) nicht größer als 0,1 sein. Die Extinktion der Positivkontrolle sollte in einem Bereich zwischen 0,2 und 0,5 liegen.

Um die Aktivität der Telomerase zu quantifizieren, wurde die relative Telomerase Aktivität (RTA) bestimmt. Es wurde die Extinktion Probe mit der Extinktion der Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Mit der Extinktion des Internen Standards lässt sich ein eventuell vorhandener Mengenumterschied zwischen Probe und Positivkontrolle ausgleichen. Die Formel lautet wie folgt:

$$RTA = \frac{\left(\frac{A_S - A_{S0}}{A_{S,IS}}\right)}{\left(\frac{A_{TS8} - A_{TS8,0}}{A_{TS8,IS}}\right)}$$

A_S :	Absorption der Probe
A_{S0} :	Absorption der Negativkontrolle
$A_{S,IS}$:	Absorption des Internen Standards der Probe
A_{TS8} :	Absorption der Positivkontrolle
$A_{TS8,0}$:	Absorption des Lysepuffers
$A_{TS8,IS}$:	Absorption des Internen Standards der Positivkontrolle

Über die Konzentration der Positivkontrolle lässt sich dann ein absolutes Ergebnis errechnen, welches in der Einheit [amol/ml] vorliegt. Für die statistische Auswertung und die Verarbeitung der Messdaten wurde das Programm Microsoft Excel 2010 verwendet.

3 Ergebnisse

Es wurden Rahmen meiner Diplomarbeit die hämatopoetischen Stammzellkulturen 02, 03, 04, 05, 06 und 07 (HSC02, HSC03, HSC04, HSC05, HSC06, HSC07) begonnen. Allerdings musste bei HSC03 die Kultur beendet werden, weil die Patientin, deren Nabelschnurblut verwendet wurde, ihre Zustimmung zur Kultur der Zellen widerrufen hatte. Bei HSC04, HSC05 und HSC06 gab es Schwierigkeiten beim Anwachsen bzw. konsekutiv bei der Vermehrung der Zellkultur, so dass diese Kulturen nach Passage 3-4 beendet wurden. Die Kultur HSC07 wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit begonnen und von Lukas Schinagl, dem mir nachfolgenden Diplomanden, fortgeführt. Die Ergebnisse der HSC07 werden anschließend in seiner Diplomarbeit publiziert und diskutiert. Es sei aber soweit erwähnt, dass sich HSC07 bis zum jetzigen Zeitpunkt bei Passage 21 gut entwickelt hat.

3.1 Wachstum der HSC-Kultur 02

3.1.1 Gesamtleukozytenzahl

Die Graphen in Abb. 12 geben die Gesamtleukozytenzahl und deren Wachstum (1. Ableitung nach der Zeit) über die einzelnen Passagen wieder. Es ist zu beachten, dass die Gesamtleukozytenzahl ein fiktiver Wert ist, da nach jeder Passage nur ein Teil der Zellen weiterkultiviert wurde. Die Gesamtleukozytenzahl ergibt sich also aus dem Wachstum der Teilmengen je Passage bezogen auf die Gesamtheit der Zellen.

Es ist zu erkennen, dass das Wachstum in den ersten Passagen mit einem Wachstumsfaktor von 12 und 7 am größten war und bis zur Passage 3 konstant abfiel, um sich danach bei einem Wachstumsfaktor zwischen 1 und 2,1 einzupendeln. In der Passage 21 kam es nochmalig, mit einem Wachstumsfaktor von 2,36, zu einem stärkeren Wachstum. Danach nahm die Teilungsfähigkeit beständig ab. In den beiden letzten Passagen der Kultur war der Wachstumsfaktor sogar kleiner als 1, was einer Abnahme der Gesamtleukozytenzahl entsprach.

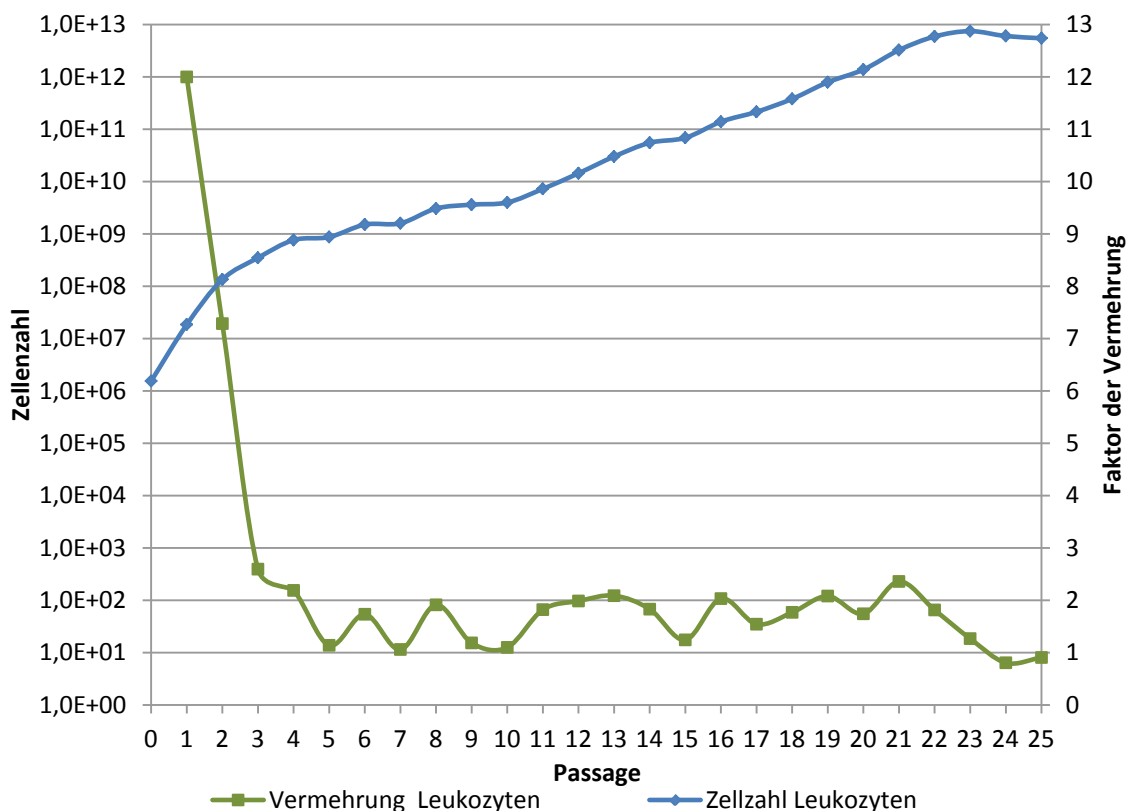


Abb. 12: Gesamtleukozytenzahl im Zeitverlauf

3.1.2 Morphologie der Zellkultur

Nicht nur die Anzahl der Zellen veränderte sich über die Zeit, sondern auch ihre Morphologie. Um diesen Aspekt zu verdeutlichen, wurde die Kultur nach jeder Passage fotografiert. Beispielhaft finden sich in Abb. 13 zwei dieser Fotografien, welche bei Passage 1 und Passage 24 aufgenommen wurden. Man erkennt auf dem Foto der Passage 1 viele gleichartige, runde Zellen, die sehr dicht beieinander liegen. Das Foto der Passage 24 zeigt im Gegensatz dazu weniger dicht liegende Zellen, wobei viele eine unterschiedliche Größe aufweisen und zum Teil auch nicht mehr so homogen rund sind. Zusätzlich finden sich mehr Zellaggregate.

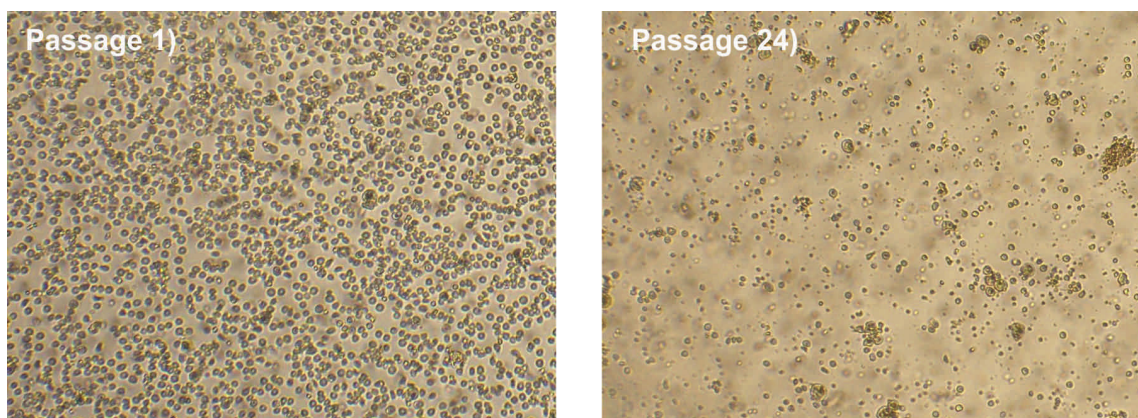


Abb. 13: Morphologie der Zellkultur (lichtmikroskopische Fotografie; 200-fache Vergrößerung)

3.1.3 Vermehrung der HSC

Die Abb. 14 zeigt die Wachstumskurven von CD34⁺/CD45^{dim}-Zellen als auch die Wachstumskurven von CD133⁺-Zellen. Da hämatopoetische Stammzellen hauptsächlich den Oberflächenmarker CD34 tragen, symbolisiert der Graph in Abb. 14 in erster Linie das Wachstum der hämatopoetischen Stammzellen.^[46-48] Der Oberflächenmarker CD133 befindet sich hauptsächlich auf frühen CD34⁺-Zellen aber auch auf Zellen bei denen CD34 noch negativ ist.^[48]

Ähnlich der Entwicklung der Gesamtleukozyten proliferierten die CD34⁺-Zellen in den ersten Passagen am stärksten. Die Wachstumsrate fiel dabei kontinuierlich ab und bei Passage 3 kam es zu einem Stagnieren des Wachstums. In den folgenden Passagen zeigten die CD34⁺/CD45^{dim}-Zellen ein undulierendes Wachstum mit Wachstumsfaktoren zwischen 1 und 3. Ab Passage 21 blieb die Population an CD34⁺-Zellen bis zum Ende der Kultur in etwa konstant. Die CD133 positiven Zellen wiesen ein ähnliches Wachstumsmuster wie die CD34⁺/CD45^{dim}-Zellen auf. Allerdings kam es bei bestimmten Passagen (4 und 6) zu einem fast doppelt so starken Wachstum verglichen zu den CD34⁺/CD45^{dim}-Zellen. Ab Passage 20 trennten sich jedoch beide Verläufe und die Population der CD133⁺-Zellen nahm stark ab. Innerhalb der letzten vier Passagen schrumpfte die Population der CD133⁺-Zellen auf ca. 1,6% zusammen (Passage 25 bezogen auf Passage 21).

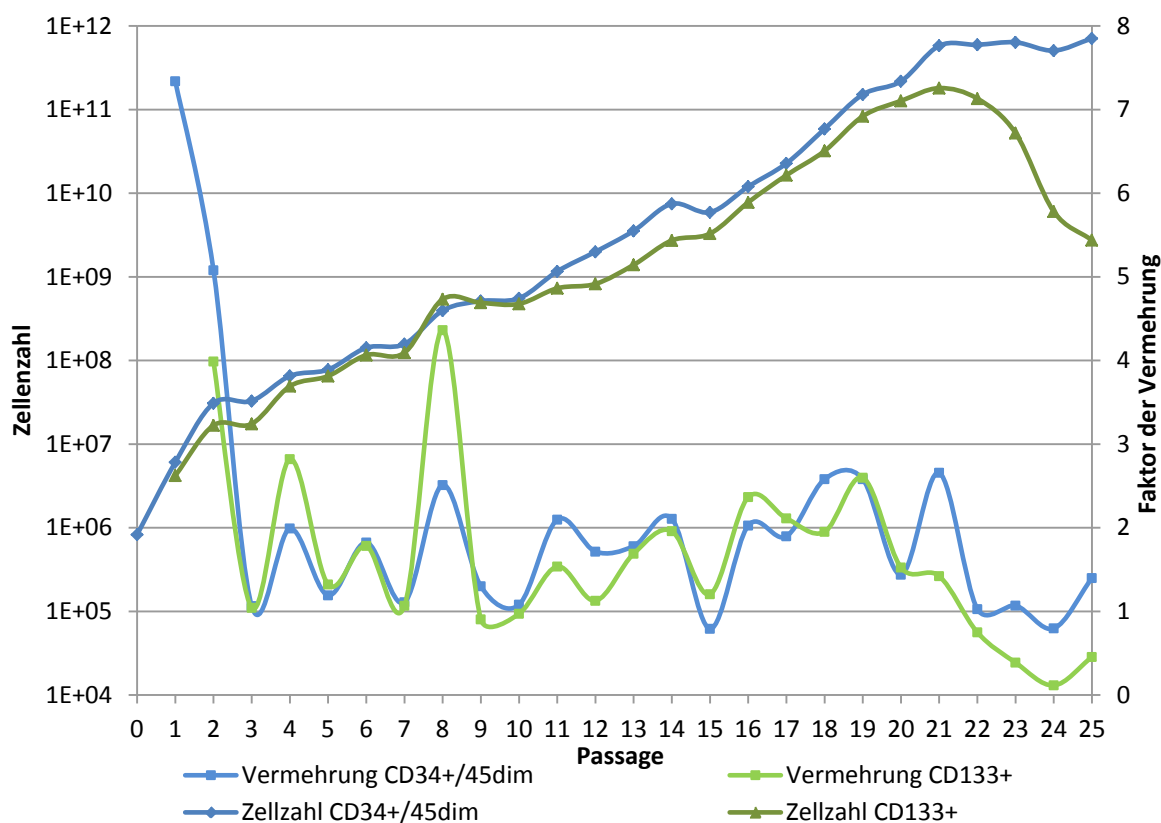


Abb. 14: Zellzahl von CD34⁺/CD34^{dim}-Zellen und CD133⁺-Zellen im Zeitverlauf

3.1.4 Anteil der HSC an der Gesamtpopulation

Abb. 15 zeigt den Verlauf der Stammzellmarker über die Zeit. Während der ersten drei Passagen nahm ihr Anteil, sowohl CD34⁺ (von 53,8% auf 9,4%) als auch CD133⁺ (von 22,8% auf 5,0%), deutlich ab. Der Anteil an Zellen mit CD34 positivem Oberflächenmarker stieg in weiterer Folge kontinuierlich bis Passage 10 auf 16% an, um dann wieder auf 8,6% bei Passage 15 und 16, mit einer kurzen Zwischenanstieg bei Passage 14, abzufallen. Danach erhöhte sich der Anteil bis Passage 19 deutlich auf 19,2%, stagnierte dann für zwei weitere Passagen mit 15,8% und 17,8% auf hohem Niveau und fiel dann jedoch bis Passage 24 auf 8,4% ab. Am Ende der Kultur stieg er dann noch einmal auf 13%. Die Zellen mit dem Oberflächenmarker CD133 hatten tendenziell einen ähnlichen Verlauf wie der der CD34⁺-Zellen. Allerdings lag ihr Anteil fast immer unter dem der CD34⁺-Zellen. Bis zur Passage 7 kam es zu einem kleinen Anstieg auf 7,8%. Bei Passage 8 besaßen dann plötzlich 17,7% der Zellen CD133. Allerdings fiel ihr Anteil danach bis Passage 12 wieder auf 5,7% ab. In weiterer Folge (bis zur Passage 17) blieb CD133 um 5% relativ konstant (-0,5; +0,6) exprimiert. Danach stieg der Anteil wieder auf 10,5% an, um dann bis zum Ende der Kultur auf 0% abzufallen.

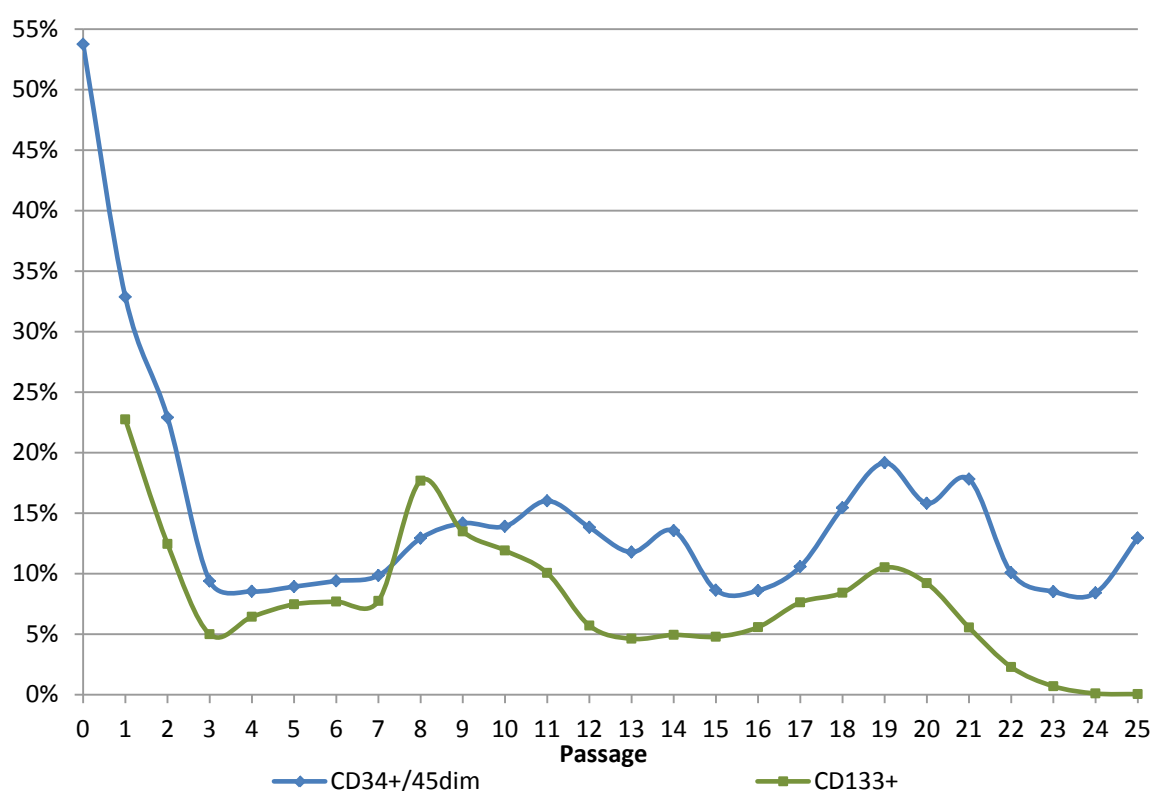


Abb. 15: Expression der Stammzellmarker im Zeitverlauf

Die Abb. 16 gibt das Verhältnis von CD34⁺-Zellen zu CD133⁺-Zellen wieder. Während der ersten drei Passagen nahm der Anteil der CD34⁺-Zellen stärker zu, was sich im Quotienten widerspiegelte. Dieser stieg von 1,44 bei Passage 1 auf 1,88 bei Passage 3. In den folgenden vier Passagen lag das Verhältnis zwischen 1,2 und 1,33. Bei Passage 8 kam es wegen des sprunghaften Anstiegens

des Anteils an CD133⁺-Zellen zu einer Umkehr des Verhältnisses (0,73). Danach glied sich dieses jedoch wieder aus beziehungsweise kehrte sich um (1,05). Anschließend setzte sich dieser Trend bis zur Passage 14 und einem Verhältnis von 2,74 fort. Im weiteren Verlauf kam es zu einem kleinen Einbruch der CD34⁺-Zellen und somit auch des CD34⁺-CD133⁺-Quotienten auf 1,39 bei Passage 17. Bis Passage 20 blieb er dann zwischen 1,83 und 1,72, um sich dann bis zum Schluss deutlich zu Gunsten der CD34⁺-Zellen zu verändern (Passage 25: 259,0)

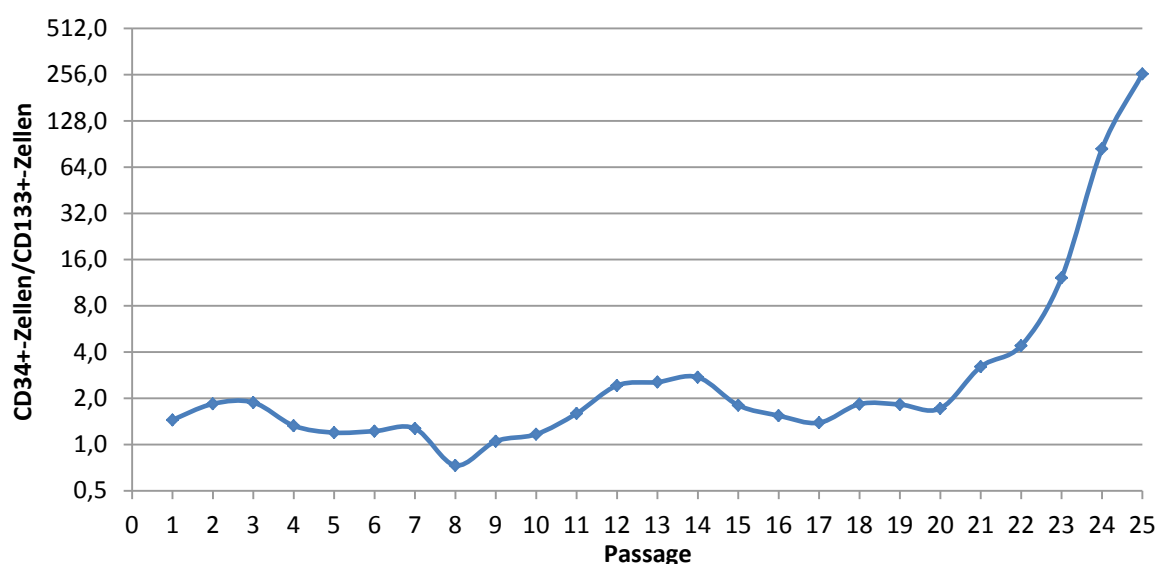


Abb. 16: Verhältnis von CD34⁺-Zellen zu CD133⁺-Zellen
(Für die Ordinate wurde eine logarithmische Skalierung (Basis 2) gewählt.)

3.1.5 Expression der Lineage Marker bezogen auf die Gesamtpopulation

Die Abb. 17 stellt die Ausprägung der Lineage Marker auf allen Zellen über den Zeitverlauf dar. Da die Zellen beim Primäransatz (Passage 0) durch MACS für CD34 selektiert wurden, wurde eine durchflusszytometrische Analyse für die Oberflächenmoleküle erst bei Passage 1 begonnen. Oberflächlich betrachtet gilt für die meisten linienspezifischen Oberflächenmoleküle, dass deren Vorhandensein über die Zeit eher zunahm. Das CD-Molekül 15 unterlag dabei der größten Steigerung. Bei Passage 1 war CD15 auf 14,5% der Zellen vorhanden und stieg dann undulierend auf 73,2% bis zur Passage 24 an. Die größten Ausprägungszuwächse ergaben sich zwischen Passage 1 und 3 sowie zwischen Passage 18 und 24. Die Ausprägung von CD14 war, pauschalisiert betrachtet, mit einigen Schwankungen über die Zeit der Kultur relativ konstant und lag in etwa bei 18%. In den früheren Passagen lag der Anteil der CD14⁺-Zellen etwas höher und in den späten Passagen eher etwas niedriger. CD3 stieg relativ kontinuierlich von 0,8% bis auf 12,3% bei Passage 24. Der Anteil der Zellen, die CD19 auf ihrer Oberfläche tragen, betrug anfänglich 5,5%, steigerte sich bis Passage 3 auf 24%, um danach bis Passage 11 wieder abzufallen. Bis Passage 21 schwankte der Anteil dann zwischen 5% und 10%. Bis zum Schluss stieg er jedoch wieder auf 18,5%. Unter den CD56⁺-Zellen wurde zwischen CD3-postiven und CD3-negativen Zellen unterschieden. Der Verlauf der CD56⁺/CD3⁺-Zellen glied sich bis zur Passage 9 dem Verlauf der CD19⁺-Zellen. Danach wuchs

ihr Anteil jedoch im Gegensatz zu den CD19⁺-Zellen an. Ihr Anteil stieg dabei bis zur Passage 20 auf 31%. Im Anschluss fiel er für die nächsten Passagen bis auf 22,2%, um in der letzten Passage wieder auf 27,8% zu steigen. Insgesamt fanden sich CD56⁺/CD3⁻-Zellen nur relativ selten und kamen bis zur Passage 13 auf einen schwankenden Anteil zwischen 0,1% und 0,3%. Bis zur Passage 18 lag er dann zwischen 0,3% und 0,5%. In den Passagen 19 bis 22 fiel er dann wieder auf unter 0,3%. Anschließend wuchs der Anteil jedoch sprunghaft bis auf 1,5% an.

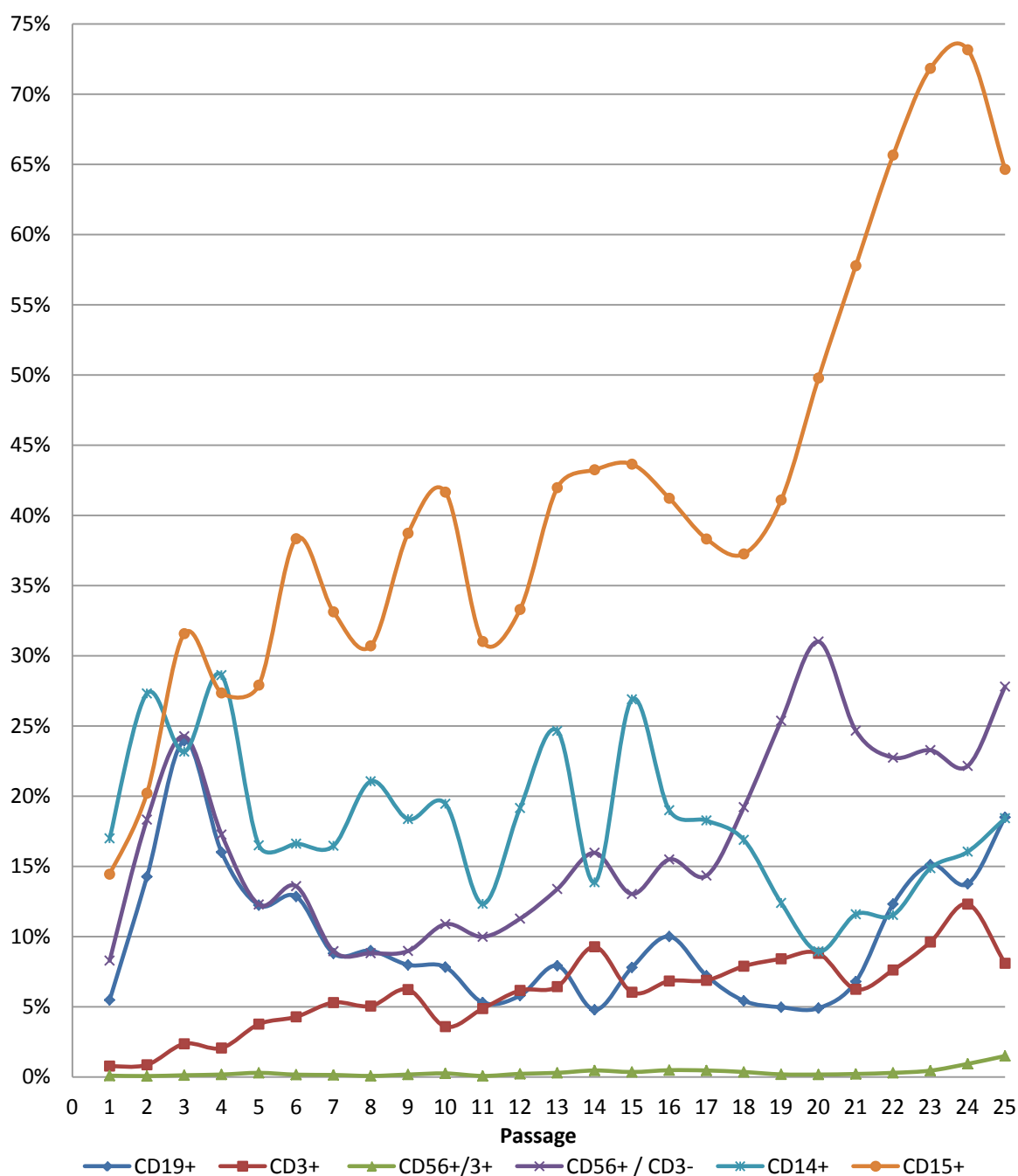


Abb. 17: Expression der Lineage Marker im Zeitverlauf

3.2 Expression von SNEV

In Abb. 18 ist die relative Genexpression des SNEV-Gens über die Zeit bezogen auf Passage 3 aufgetragen. Die Expression von SNEV unterliegt deutlichen Schwankungen. Aber man erkennt, dass SNEV bis zur Passage 5 schwächer exprimiert wurde als bei Passage 3. Dabei senkte sich die Expression um den Faktor 2,4 ab. Danach kam es zu einer Phase, in der die Expression wieder bis auf das 3-fache anstieg, um dann ab Passage 15 wieder auf einen niedrigeren Wert von 45% abzufallen. Ab Passage 21 wurde SNEV wieder stärker exprimiert. Am Ende der Kultur lag die Expression bei 110%. Die Trendlinie wurde eingefügt, um die kleineren Schwankungen im Verlauf optisch zu relativieren.

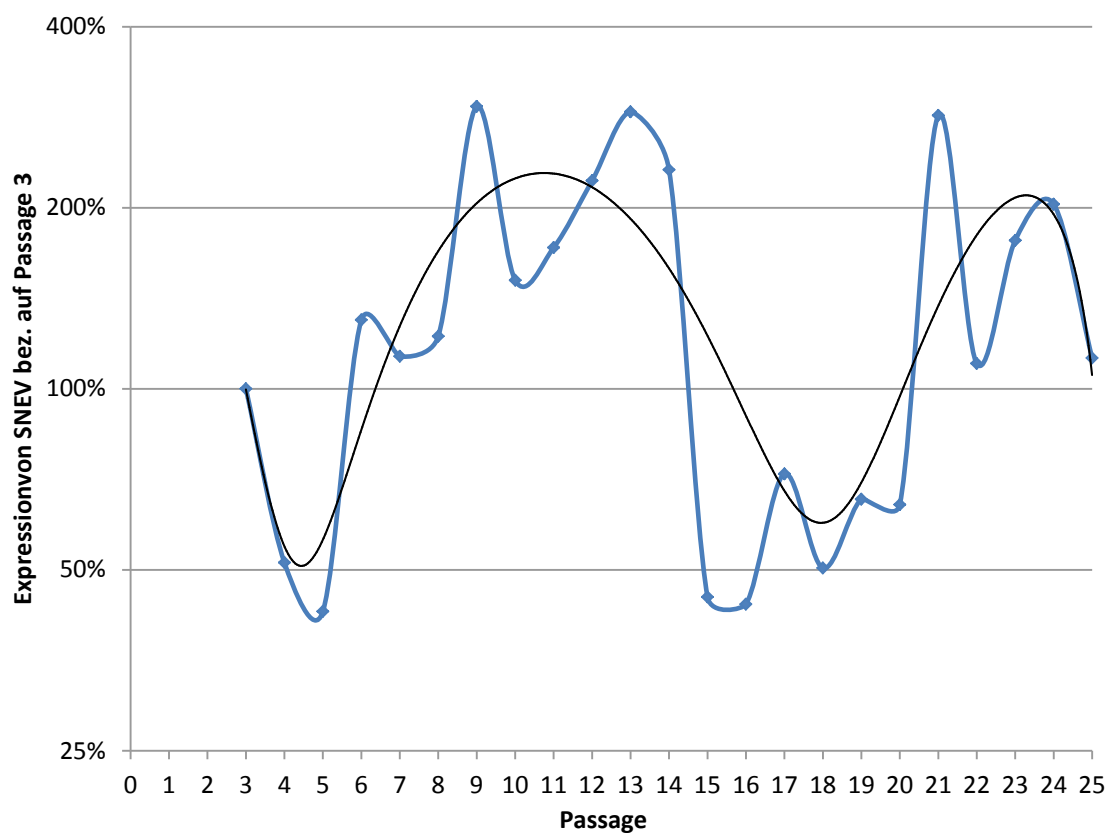


Abb. 18: Expression von SNEV

Die blaue Linie gibt den Verlauf der Genexpression von SNEV wieder und die schwarze Linie stellt eine polynomische Trendlinie 6-ten Grades dar. (Für die Ordinate wurde eine logarithmische Skalierung (Basis 2) gewählt.)

3.3 Expression der Cycline

Die Ausprägung der Cycline wurde über 23 Passagen bestimmt. Grafisch dargestellt findet sie sich in Abb. 19. Es wurde die relative Expression jedes einzelnen Cyclins bezogen auf die Expression desselben Cyclins auf Passage 3 angegeben. Man erkennt, dass alle Cycline den gleichen Schwankungen unterlagen, sie jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Bei Passage 4 kommt es zu einem generellen Abfall aller Cycline. Die Cycline D3 und E zeigen jedoch einen schwächeren Abfall als die übrigen Cycline. In weiterer Folge ergab sich in der Zeit bis zur Passage 11 eine Verstärkung der Expression der Cyclin D1, D3 und E jeweils bezogen auf Passage 3, wohingegen die Expression der Cycline A, B1 und C eher zurück blieb. Bei Passage 12 entsprach die Expression aller Cycline in etwa der von Passage 3. Danach war der Verlauf aller Cycline für die folgenden 4 Passagen relativ homogen. In weiterer Folge kam es zu einem kurzen Abfall der D-Cycline. Über die Passagen 18 bis 23 blieben alle Cycline bis auf die Cycline der Gruppe D, welche im Anstieg begriffen waren, auf unterschiedlichen Niveaus konstant. In der vorletzten Passage steigerte sich die Expression aller Cycline nochmals deutlich, um dann wieder abzufallen. Bei der Grafik ist zu beachten, dass die Ordinate eine logarithmische Skalierung aufweist. Diese Darstellung erlaubt es jedoch besser die Expressionsteigerungen und Expressionabfälle darzustellen, da die Schwankungen im Diagramm nach oben und unten die gleiche Länge aufweisen.

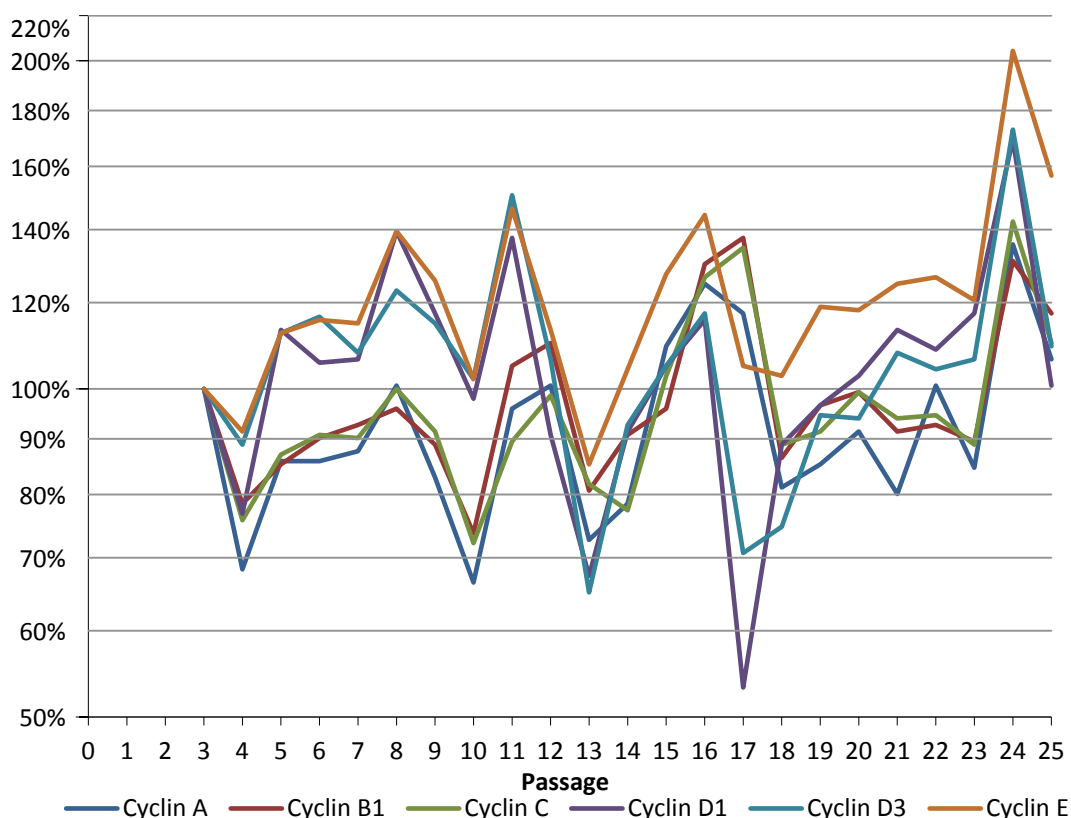


Abb. 19: Expression der Cycline

(Für die Ordinate wurde eine logarithmische Skalierung (Basis 2) gewählt.)

Um die unterschiedlichen Verläufe der Cycline noch besser zu verdeutlichen, wurde in Abb. 20 auf das G₁-Restriktionspunkt-Cyclin Cyclin A normalisiert. Unter der Prämisse, dass die Expression von Cyclin A immer den Wert 1 aufwies, verliefen die Cycline B1 und C relativ konstant und schwankten ebenfalls um eine Expression von 100%. Ihre Ausprägung bewegte sich dabei nur in einem Bereich von +17,5% und -12,5%. Deutlich größere Schwankungen wiesen Cyclin D1 (+47,5%; -45,5%), Cyclin D3 (+57%; -39,5%) und Cyclin E (+52,5%; -10,5%) auf. Während der ersten 8 Passagen lag die Expression dieser drei Cycline etwa um das 1,3-fache höher als die der übrigen. Während der Passagen 12 bis 16 zeigte sich die Expression aller Cycline etwa auf dem gleichen Niveau. Bei Passage 17 kam es zu einem interessanten Einbruch in der Expression der Cycline D1, D3 und E. Am deutlichsten fiel er bei Cyclin D1 aus. Es kam zu einem Abfall auf unter 50%. Das Cyclin D3 verlor immerhin noch 40% an Ausprägung bezogen auf die Passage 3 und das Cyclin E brach in der Passage 17 im Vergleich zu Passage 16 um 28% ein. Dieser Einbruch dauerte aber nur eine Passage an, so dass sich bei Passage 18 diese drei Cycline wieder auf Durchschnittsniveau bewegten. Danach kam es wieder zu einem Anstieg.

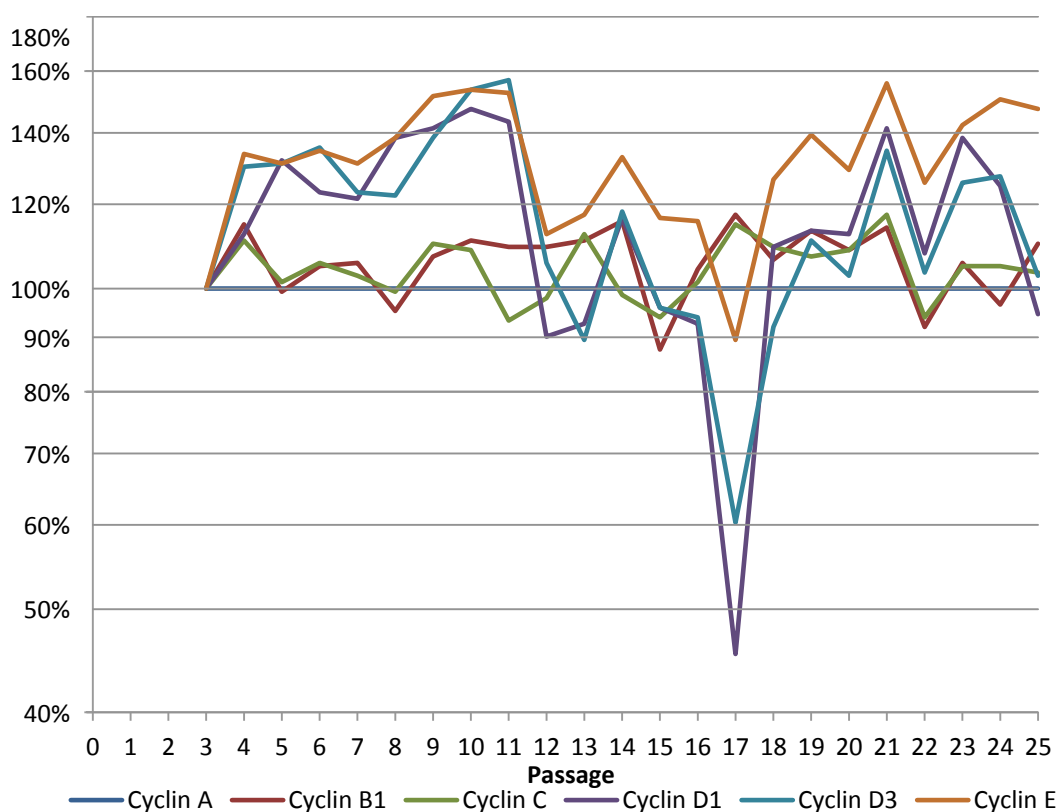


Abb. 20: Cyclinexpression über den Zeitverlauf normalisiert auf Cyclin A
(Für die Ordinate wurde eine logarithmische Skalierung gewählt.)

3.4 Cometscore

In Abb. 21 finden sich die Ergebnisse zu unseren Untersuchungen bezüglich der DNA-Schäden. Überblicksmäßig zeigt sich ein wannenförmiger Verlauf des Cometscores. Anfangs (Passage 2) lag der Cometscore bei 250, bei Passage 10 fiel er auf 26 und bis zu letzten Messung stieg er wieder auf einem Wert von 182. Während der Passagen 4, 11, 13-14 und 16-17 stieg der Cometscore kurz an, um danach gleich wieder abzufallen. Der Anstieg des Cometscore der Passage 4 fiel dabei mit 113 Punkten am deutlichsten aus. In den Passagen 10 bis 18 war die allgemeine Steigerung ausgeprägten Schwankungen unterworfen. Danach war der Verlauf relativ homogen steigend.

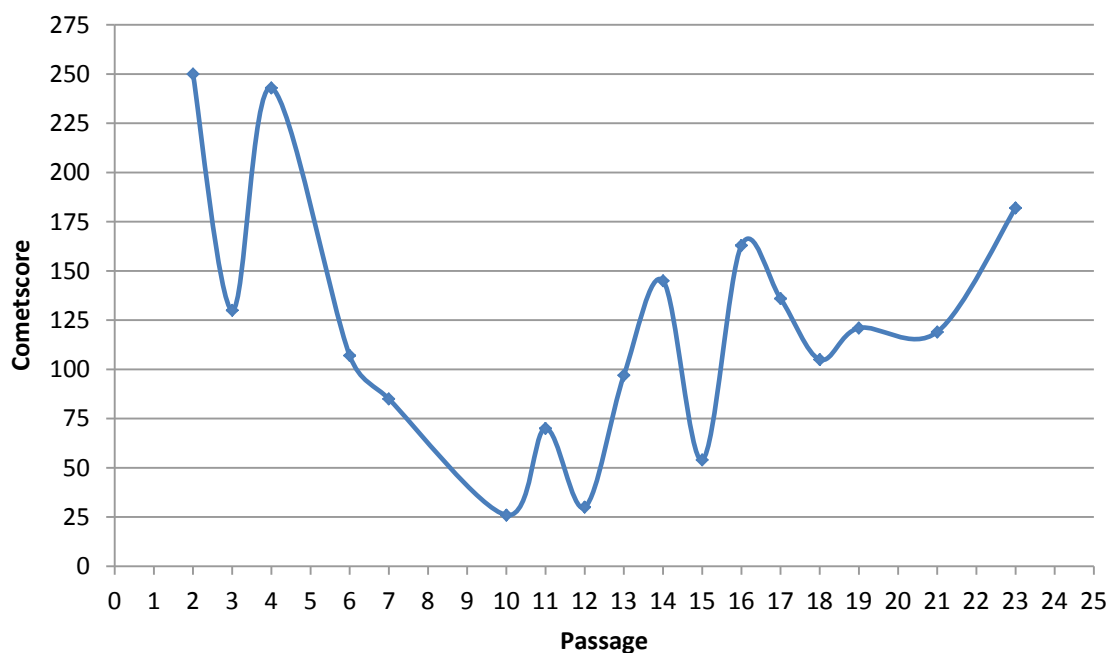


Abb. 21: Cometscore

3.5 Carbonylierte Proteine

Die carbonylierten Proteine wurden von uns nur während der Passagen 11 bis 16 bestimmt (siehe Abb. 22). In den ersten 4 Passagen stieg die Menge an Proteinen mit Carbonylgruppen von 534 pmol/mg je 1mg Eiweiß auf 988 pmol/mg je 1mg Eiweiß und fiel dann bis zur Passage 843 auf pmol/mg je 1mg Eiweiß ab.

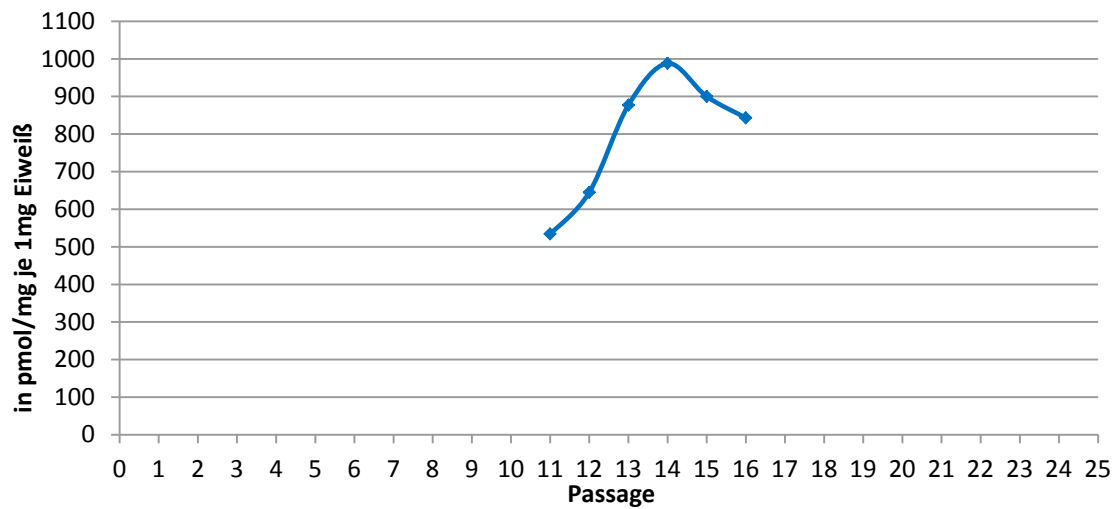


Abb. 22: Carbonylierte Proteine

3.6 Sekundäre koloniebildende-Einheiten-Assay

Die Abb. 23 zeigt die Ergebnisse des sekundäre-koloniebildende-Einheiten-Assays. Der blaue Graph gibt die Anzahl der Teilungen der sekundären CFUs wieder (linke Ordinate) und wurde während der Passagen 2, 3, 5 und 6 bestimmt. Bei Passage 2 kam es zu durchschnittlich 2,7 Teilungen bis sich die endgültige Anzahl von sekundären Kolonien bildete, bei Passage 3 waren es 2,4 Teilungen und bei Passage 5 0,8. Während Passage 6 kam es zu einem Anstieg der proliferativen Kapazität auf 1,9 Teilungen.

Die Anzahl der primären Kolonien, die sich nach dem Ansatz von 1.000 Zellen/ml in 500 µl Methylcellulose (=500 Zellen absolut) bildeten, veranschaulicht der grüne Graph in Abb. 23 (rechte Ordinate). Die Zellen wurden vorher mit MACS nach CD34 separiert. Die primären CFU wurden von Passage 1 bis 24 bestimmt. Bei der ersten Passage wurden nur durchschnittlich 5,5 Kolonien je 500 eingesetzten Zellen gebildet. Bei der zweiten Passage wuchs die Anzahl der gebildeten Kolonien plötzlich auf 27 an und hielt sich während der nächsten Passage auf ähnlichem Niveau (25), um danach bis Passage 5 deutlich auf 6,4 abzufallen. Bei Passage 6 kam es dann wieder zu einem Anstieg auf 31, um anschließend relativ kontinuierlich, in einer asymptotischen Art und Weise, bis auf fast 0 abzufallen. Während der Passagen 15 und 19 kam es zu kleineren Einbrüchen.

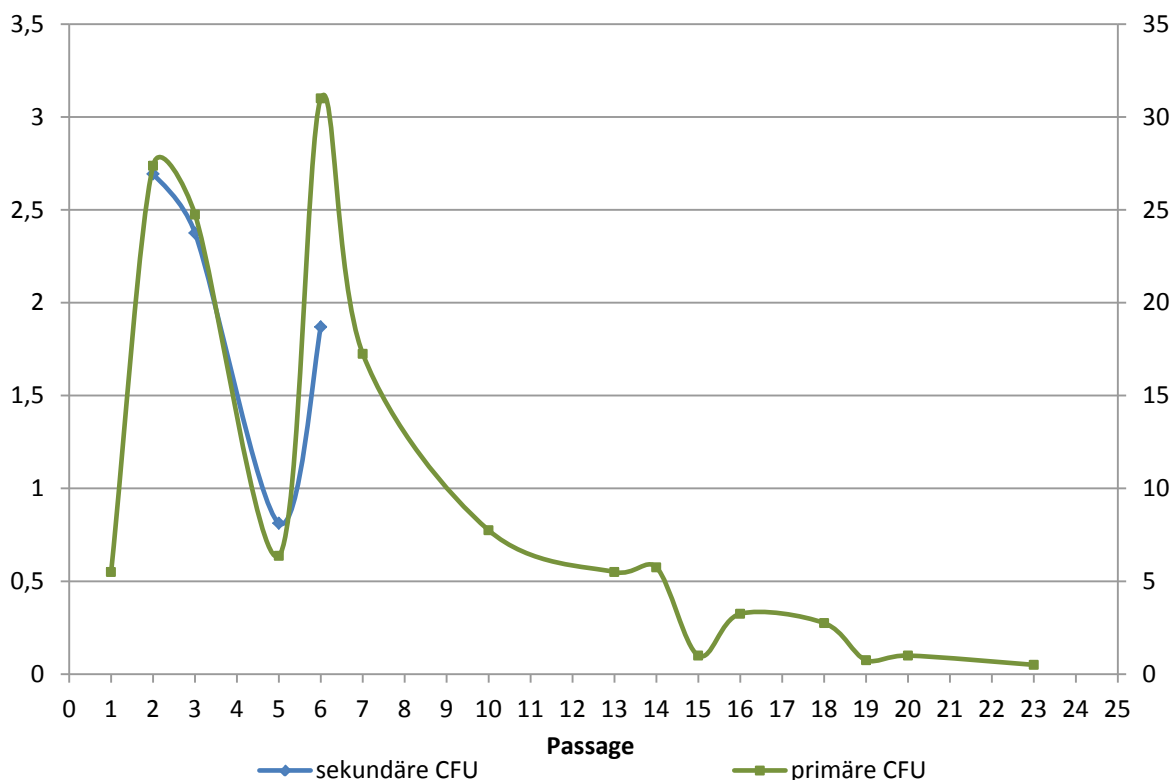


Abb. 23: primäre und sekundäre CFU

Die blaue Linie beschreibt die durchschnittliche Anzahl an symmetrischen Teilungen je eingesetzter Kolonie zur Bildung neuer Kolonien und wird auf der linken Ordinate abgebildet. Die grüne Linie beschreibt die Anzahl von neu gebildeten Kolonien nach Einsatz von 500 Zellen (CD34 MACS positiv) und wird auf der rechten Ordinate abgebildet.

3.7 Telomerlänge und Telomeraseaktivität

Die Telomerlänge und Telomeraseaktivität wurden ab Passage 3 bis zur letzten Passage bestimmt und in dem Diagramm in Abb. 24 dargestellt. Der grüne Graph gibt die Telomerlänge in Kilobasenpaaren (kbp) (linke Ordinate) und der blaue Graph die Telomeraseaktivität in amol/ μ l (rechte Ordinate) wieder.

Bis zur Passage 16 war die Telomeraseaktivität relativ konstant, mit minimalen Schwankungen, in einem Bereich von 0,68 bis 1,2 amol/ μ l. Bei Passage 17 kam es zu einem sprunghaften Anstieg auf 3,83 amol/ μ l. Aber gleich in der nächsten Passage fiel die Aktivität wieder auf einen Wert von 0,87 amol/ μ l ab. Für die nächsten vier Passagen lag die Telomeraseaktivität wieder in einem engen Bereich zwischen 0,68 und 0,99 amol/ μ l. Danach fiel sie bei Passage 23 auf einen sehr niedrigen Wert von 0,06 amol/ μ l ab und stieg während der letzten beiden Passagen auch nur noch auf 0,27 amol/ μ l bzw. 0,21 amol/ μ l.

Die Telomerlänge zeigte einen ähnlichen Verlauf wie der der Telomeraseaktivität. Ebenfalls war bis zur Passage 16 eine Länge der Telomere messbar, die in einem schmalen Fenster, wenn auch stärker schwankend, relativ konstant war. Bis auf Passage 12, wo eine Länge von 6,8 kbp gemessen wurde, lagen alle Werte zwischen 7,0 und 7,2 kbp. Ebenso ähnlich war auch das sprunghafte Ansteigen der Telomerlänge während Passage 17 auf 7,6 kbp. Aber danach kam es zu einem stetigen Abfall, mit einem nur minimalen Zwischenanstieg bei Passage 21, bis zum Schluss auf einen Wert von 6,4 kbp.

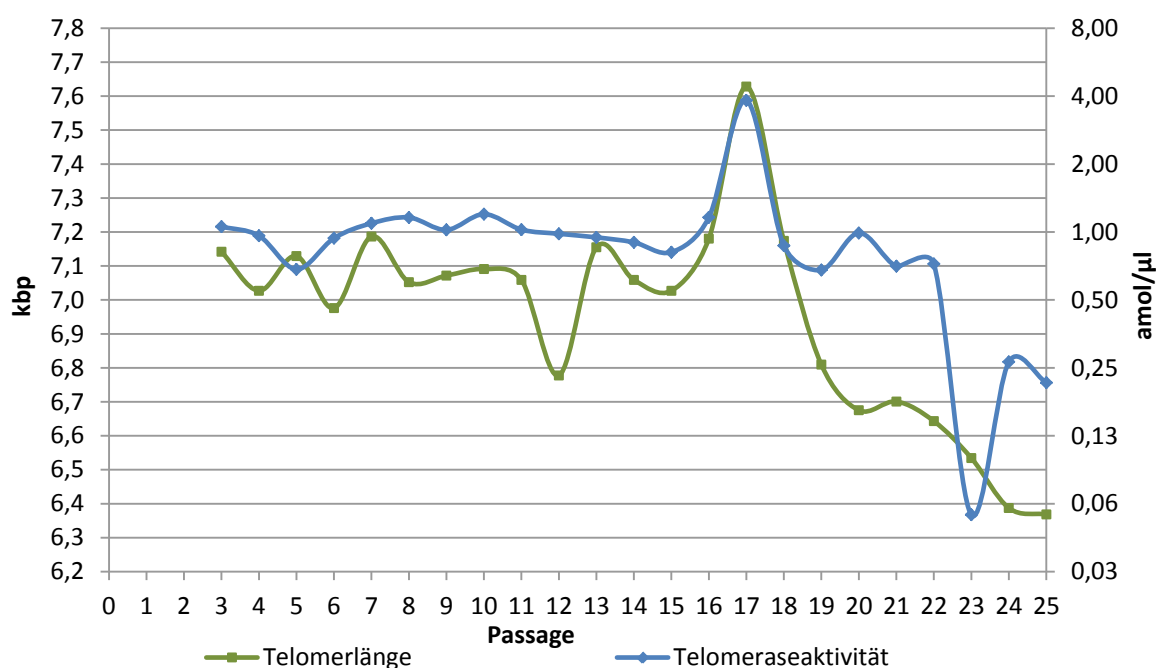


Abb. 24: Telomerlänge und Telomeraseaktivität

(Für die Ordinate der Telomeraseaktivität wurde eine logarithmische Skalierung gewählt.)

4 Diskussion

Hayflick war in den 1960ern einer der ersten, der erkannte und im Folgenden nachwies, dass Zellen nicht unsterblich sind.^[3, 4] Heutzutage stellt das Altern und im Besonderen das Altern von Zellen ein immer noch schwer zu definierendes Prozess dar. Es gibt verschiedene Theorien, die die zelluläre Seneszenz beschreiben. Man unterscheidet grob zwei Ansätze. Zum einen die Schadenstheorien^[6-8] und zum anderen, Theorien, die ein vorprogrammiertes Altern^[9] beschreiben. Insgesamt ist das Altern ein äußerst komplexer Vorgang, der sich als ein Zusammenspiel von unterschiedlichsten Faktoren darstellt.

Im Allgemeinen haftet den Stammzellen der Ruf an, dass sie nicht Altern bzw. durch bestimmte Strategien Alterungsschritte rückgängig machen können, was sie somit quasi unsterblich macht^[82-84], basierend auf den Aussagen der DNA-Unsterblichkeits-Hypothese.^[85]

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Altern hämatopoetischer Stammzellen in einem Langzeitexpansionsmodell. Aber um eine Aussage darüber treffen zu können, muss zuerst einmal die hämatopoetische Stammzelle definiert und isoliert werden. Da hämatopoetische Stammzellen in der derzeitigen Literatur noch nicht eindeutig definiert sind und unter der Bezeichnung „hämatopoetische Stammzellen“ eine Gruppe von Zellen mit unterschiedlichen Phänotypen aufgeführt sind, muss man dabei genau aufpassen, welche Zellen genau beschrieben werden. Bei unseren Versuchen haben wir den Oberflächenmarker CD34⁺ als charakterisierenden Marker verwendet. Die nachfolgenden Aussagen beziehen sich auf Zellen mit diesem Phänotyp.

4.1 Teilungsfähigkeit und Differenzierung der HSC

Unsere Ergebnisse bezüglich der Teilungsfähigkeit zeigen, dass sich die CD34⁺-Zellen besonders in den ersten zwei Wochen der Kultur stark vermehrten. In diesem Zeitraum kam es zu einer Zunahme um den Faktor 37. Dieses Ergebnis deckt sich mit Resultaten anderer Gruppen, die unter ähnlichen Bedingungen, einen Anstieg der CD34⁺-Zellzahl in einem Bereich zwischen dem 20- und 60-fachen erzielten.^[86-88] Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Gesamtpopulation sogar um den Faktor 87 vermehrte, was zu einer prozentualen Abnahme der CD34⁺-Fraktion von 54% auf 23% führte. Daraus schlussfolgernd kam es zu einer verstärkten Ausdifferenzierung der Zellpopulation bei gleichzeitiger Zunahme des Stammzellpools. Des Weiteren ist interessant, dass es ebenfalls zu einer Vermehrung der primitiveren CD133⁺-Zellen kam. Das Ausmaß war dem der CD34⁺-Zellen ähnlich. Was wiederum dafür spricht, dass es nicht nur zu einem Ausdifferenzieren der Population kam sondern auch self-renewal stattfand.

In den weiteren Wochen der Kultur (bis Passage 8) lag das Niveau der Expression von CD133 sogar höher als das von CD34⁺-Zellen und Leukozyten, was bedeutet, dass das self-renewal verstärkt vollzogen wurde.

Über den gesamten Zeitraum bis zur Passage 21 stieg die Anzahl an CD34⁺-Zellen und CD133⁺-Zellen (bis auf kleine Ausnahmen bei Passage 9 und 15). Am Ende der Kultur jedoch nahm die Anzahl der CD133⁺-Zellen deutlich ab, bei in etwa gleichbleibender Menge an CD34⁺-Zellen. Es ist vorstellbar, dass die Zellen ab diesem Zeitpunkt schon so sehr verbraucht und gealtert waren, dass ein Aufrechterhalten des self-renewal nicht mehr möglich war, sie ausdifferenzierten und somit ihre Anzahl kontinuierlich abnahm. Nichtsdestotrotz konnte die Zahl an CD34⁺-Zellen während der Kultur um den Faktor 10⁶ und die der CD133⁺-Zellen um den Faktor 0,5 x 10⁶ erhöht werden. Das zeigt das enorme Potenzial dieser Zellen und entspricht den in der Literatur gefundenen Daten.^[89-91]

Nach jeder Woche wurde die Verteilung der Lineage-Marker CD3, CD14, CD15, CD19 und CD56 gemessen. Diese Oberflächenmoleküle werden jeweils nur von bestimmten Leukozyten exprimiert, so dass man sie nach dessen Vorkommen charakterisieren und einteilen kann (siehe Tab. 10).

CD-Molekül	Vorkommen
CD3	T-Zellen (T-Zellrezeptor)
CD14	Monozyten
CD15	neutrophile Granulozyten und Monozyten
CD19	B-Zellen
CD45	Leukozyten
CD56	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Tab. 10: Lineage-Marker^[49, 92]

Diese Liste gibt nur den Teil aller Lineage-Marker wieder, der von uns gemessen wurde. Sie umfasst vor allem die späten linienspezifischen Antigene.

Die Ausdifferenzierung von HSC in die Vorläuferzellen der Blutzellen und schließlich in vollentwickelte Blutzellen ist abhängig von vielen Faktoren, unter anderem von der Menge und Zusammensetzung an Zytokinen.^[93] Diese Zytokine können dabei von den Zellen selbst produziert werden oder aber auch von außen zugesetzt werden.^[94] Unser Kulturmedium enthält Stammzellfaktor (SCF), Flt3 Ligand (FL), Thrombopoetin (TPO) und Fetales Kälberserum (FBS), die alle auf die Differenzierung Einfluss nehmen können.^[95, 96] SCF und FL haben einen ähnlichen Effekt, der sich bei Vorhandensein beider Wachstumsfaktoren potenziert.^[97] Zusammen üben beide einen proliferationsfördernden Effekt auf die frühen Zellen der Hämatopoese aus.^[97] SCF allein führt zu einem längeren Überleben von LTR-HSC, nicht jedoch zur einen verstärkten self-renewal.^[98] FL verstärkt außerdem den Effekt anderer hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, ohne dabei selber auf die späte Hämatopoese Einfluss zu nehmen.^[99-102] IL-6 kann die Hämatopoese verschiedener Linien stimulieren.^[103] Für TPO wurde gezeigt, dass es in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren, HSC dazu bringen kann CFU-Mk zu bilden. TPO allein kann dann wiederum die Weiter-/Ausdifferenzierung in Thrombozyten fördern.^[104] TPO inhibiert p27 und verstärkt die Expression von Cyclin D (siehe Abb. 25 (S.77)).^[105]

Es ist natürlich auch denkbar, dass die Lebensspanne bzw. Halbwertszeit der Blutzellen eine Rolle bei der Messung der Verteilung bzw. Anzahl der jeweiligen Blutzellen spielt, da bei einer halb so langen Lebensspanne doppelt so viele Zellen produziert werden müssten, um dieselbe Anzahl zu gewährleisten.

4.2 SNEV

SNEV als Spleißingfaktor führt zu einer verstärkten Expression von p16 und p53 und zu einer geringeren Apoptoserate (siehe Abb. 25 (S.77)).^[25-27] Wenn SNEV hochreguliert ist, sind DNA-Schäden weniger stark ausgeprägt.^[24] Dabei führt SNEV vermutlich zu einem transienten Zellzyklusarrest, für die Reparatur der DNA. Auf der anderen Seite führen ausgeprägte DNA-Schäden zu einer Induktion von SNEV.^[22, 24]

Bei unseren Untersuchungen gab es zwei Perioden, in denen SNEV besonders stark exprimiert wurde, zwischen Passage 6 und 14 sowie zwischen Passage 21 und dem Ende der Kultur. Gleichzeitig finden sich gegenläufige Ergebnisse bei unseren Untersuchungen bezüglich der DNA-Schäden. So sind diese besonders in den Perioden hoch, wo SNEV weniger stark exprimiert wird und umgekehrt. Das widerspricht der Annahme, dass stark ausgeprägte DNA-Schäden eine SNEV-Expression induzieren. Auf der anderen Seite könnte man vermuten, dass in den Zeiten, wo SNEV besonders stark exprimiert wird, die DNA-Schäden besser repariert werden. Die Frage ist nun: „Was hat nun zu der verstärkten Expression von SNEV geführt?“. Eine mögliche Erklärung wäre, dass immer, wenn es zu einem Anstieg der SNEV-Expression kam, ein neuer HSC-Zellklon mit hoher SNEV-Expression aus der Ruhephase geholt wurde und sich dann konsekutiv verstärkt vermehrt hat bzw. weniger häufig in Apoptose gegangen ist. Allerdings bedarf diese These weiterer Untersuchungen und ist derzeit bestenfalls als Annahme zu bezeichnen.

4.3 DNA-Schäden

Der von uns angewandte Comet-Assay ist eine sensitive Methode, um DNA-Schäden in nur geringen Zellmengen zu detektieren und zu quantifizieren. Es zeigte sich, dass schon während der ersten Passagen der Comet-Score schon recht hohe Werte annahm, was bedeutet, dass die Zellen höhergradigen DNA-Veränderungen unterworfen waren. Der Grund dafür können zum einen höherer exo- oder endogener Stress sein, zum anderen aber auch fehlerhafte Reparaturmechanismen.

Arten von DNA-Schäden

Die Arten von DNA-Schäden sind vielfältig und reichen von Chromosomenanomalien bis zu Einzelbasenveränderungen des Genoms. Die Ursachen werden in exogene und endogene eingeteilt. Zu den endogenen Ursachen zählen Stoffwechselabfallprodukte wie reaktive Sauerstoffspezies (rOS), wozu Wasserstoffperoxid oder Hydroxid-Anionen gehören, oder Schäden, die durch Fehler, bei der Replikation der DNA entstehen. Mögliche exogene Noxen sind zum Beispiel energiereiche Strahlung (UV- oder γ -Strahlen), Chemikalien und Toxine oder Viren.^[17, 106, 107] Natürlich können auch fehlerhafte zelluläre Reparaturmechanismen durch Basen-, oder Nukleotid-exzision DNA-Schäden hervorrufen.^[108]

DNA damage response

Die DNA-Schäden induzieren Reparaturmechanismen. In Abhängigkeit von der Art der DNA-Veränderungen und der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zelle gerade befindet, wird die Expression von bestimmten Proteinen verstärkt oder vermindert und dadurch eine DNA-Reparaturkaskade („DNA damage response“, DDR) in Gang gesetzt (siehe Abb. 25 (S.77)). Eine zentrale Rolle spielen die Proteinkinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ATM und Rad3-related).^[109] ATM wird eher bei Doppelstrangbrüchen aktiv und ATR eher bei Einzelstrangveränderungen.^[110] Normalerweise wird p53 durch das Molekül MDM2 (murine double minute 2) weniger exprimiert und auch verstärkt abgebaut. Allerdings kommt es bei DNA-Schäden in der G₁-Phase zur Aktivierung von ATM, welches eine Hemmung von MDM2 und eine direkte Phosphorylierung von p53 sowie indirekt über Chk2 (Checkpoint Kinase 2) bewirkt.^[111-113] Durch die Phosphorylierung kann p53 nicht mehr so schnell abgebaut werden und akkumuliert. ATR hat einen ähnlichen Effekt. Dieser ist jedoch nicht so genau geklärt und geht eher über Chk1 (Checkpoint Kinase 1).^[114, 115] p53 führt nun zu einer Hochregulierung von verschiedenen Genen (MDM2, GADD45 und p21^{Cip}). Entscheidend ist nun, dass p21^{Cip} die Cyclin abhängigen Kinasen inhibiert und zu einem Zellzyklusarrest führt. Sollte der DNA-Schaden zu stark sein, wird über p53 der apoptotische Zelltod initiiert. p53 aktiviert dabei BAX (Bcl-2 associated x protein). Diese setzen Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran frei und entlassen es ins Zytosol der Zelle. Dadurch Kaskade von Caspasen in Gang gesetzt und die Zelle degradiert sich.^[17, 116, 117]

In der S-Phase kommt es bei DNA-Schäden auch zur Aktivierung von ATM und Chk2. Aber diesmal wird dadurch Cdc25A (cell division cycle 25A) phosphoryliert und dadurch Ubiquitin-abhängig abgebaut.^[118] Cdc25 Moleküle entfernen Phosphatmoleküle von Cyclin abhängigen Kinasekomplexen und unterstützen sie somit in deren Funktion beim Fortschreiten des Zellzyklus.^[119]

Während der G₂-Phase spielt wiederum die Aktivierung von ATM bzw. ATR und Chk2 sowie Chk1 eine Rolle. Aber diesmal steht im Folgenden die Downregulation von Cdc25C an zentraler Stelle.^[120]

DNA-Schäden können während jeder dieser Phasen zu einem transienten Arrest des Zellzyklus, zu einem irreversiblen Arrest des Zellzyklus und auch in den apoptotischen Zelltod führen.^[121] Der Zustand der Zelle, bei dem sie einen endgültigen Stillstand ihrer Proliferationsfähigkeit erreicht hat und sie jedoch noch immer am Leben ist, bezeichnet man als zelluläre Seneszenz und hat natürlich auch Auswirkungen auf das Altern im Allgemeinen.^[121] Es ist anzunehmen, dass stärkere Schäden an der DNA eher zu einem irreversiblen Anhalten des Zellzyklus und geringerer Schaden eher zu reversiblen Anhalten führen.

In Anbetracht der Tatsache, dass die HSC frisch aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden und sie in vitro ohne inhibitorische Zytokine einem hohen Proliferationsdrang unterworfen waren^[122], liegt die Vermutung nahe, dass sie aufgrund der hohen Teilungsraten vermehrt DNA-Schäden ausbilden, denn bei hohen Proliferationsraten kommt es zu einem vermehrtem Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (erhöhtem endogenen Stress) und folglich zu DNA-Schäden.^[123] Dadurch wird DDR in Gang gesetzt und es kommt zum erhöhtem Auftreten von zellulärer Seneszenz.^[124]

In weiterer Folge (zwischen Passage 6 und 13) kam es zu einem Abfall der Cometscores. Gleichzeitig lagen die durchschnittlichen Teilungsraten der HSC auf dem niedrigsten Niveau der gesamten Kultur, wenn auch nur geringfügig und ohne das Ende der Kultur miteinzubeziehen, was vermutlich zu einer geringeren Produktion von rOS führte und auch DNA-Reparaturmechanismen begünstigte.

Nach der Passage 13 kam es zu einem mehr oder weniger konstanten Ansteigen der DNA-Schäden. Die Proliferationsrate ist wieder etwas höher, was wieder die weiter oben genannten Konsequenzen haben kann.

4.4 Oxidativer Stress

Der Anteil carbonylierter Proteine am Gesamteiweiß gibt Aufschluss darüber, wie viel oxidativem Stress die Zellen ausgesetzt waren. Dabei werden die Carbonylgruppen gemessen, die sich an die Aminosäuren angelagert haben. Diese Bindungen sind irreversibel und können nur durch Proteinabbau vermindert werden.^[125, 126] Besonders hoch ist der Anteil von carbonylierten Proteinen in postmitotischen Zellen – Zellen, die sich nicht mehr teilen. Man geht davon aus, dass durch Proliferieren der Anteil an carbonylierten Proteinen verdünnt wird.^[127] Außerdem wird vermutet, dass carbonylierte Proteine auch eine positive Funktion haben können. So werden sie durch die Markierung mit Carbonylgruppen, schneller abgebaut. Das führt zu einem regelmäßigen Erneuern dieser Proteine.^[128-130]

Die carbonylierte Proteine wurden leider nur während der Passagen 11 bis 16 bestimmt, so dass sich kaum eine Aussage darüber machen lässt. Die Veränderungen entsprechen in etwa denen des Cometscores während der gleichen Zeit, was wiederum belegt, dass zwischen rOS und DNA-Schäden ein enger Zusammenhang besteht.

Ito und Kollegen haben gezeigt, dass rOS in ATM-defizienten Mäusen ansteigen. Das induziert p38-MAPK, was wiederum die INK-Familie aktiviert, dadurch zu einem Arrest des Zellzyklus und schließlich zu zellulärer Seneszenz führt.^[123] Zur Ink4-Familie gehören p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d} und das funktionell verschiedene p19^{ARF}.^[131] Diese wirken durch eine Inaktivierung des Cyclin-Cdk-Kinasekomplexes und außerdem aktivieren sie das inhibitorische Rb-Protein (siehe Abb. 25 (S.77)).^[123] Gleichzeitig stellten sie eine Abnahme der Anzahl von side-population cells (SP⁺-Zellen) fest, einer unter den HSC quieszenten (ruhend, nicht aktiviert) Zellpopulation.^[123] Auf der anderen Seite bewahren Stoffe, die zu einer Abnahme der intrazellulären rOS führen, die HSC von der Aktivierung p38-MAPK-Wegs und führen im Wildtyp zu einer Verlängerung der Lebenszeit und einer Verbesserung des Repopulationsvermögens in seriellen Stammzelltransplantationen.^[123] Es ließ sich darauf schließen, dass rOS einen Einfluss auf das self-renewal von HSC haben.^[123]

4.5 Primäre und sekundäre koloniebildende Einheiten

Der sekundäre koloniebildende Einheiten Assay oder auch CFU-GM-replating Assay ist ein von der Gruppe um Myrtle Gordon entwickeltes Verfahren, um das self-renewal Potenzial von koloniebildenden Einheiten (CFU) einschätzen zu können.^[132-135] Dabei wird davon ausgegangen, dass die CFU-GM, die nur noch ein begrenztes Potenzial besitzen Tochterkolonien zu bilden, weniger self-renewal betreiben können als solche, die aufgrund von Selbstverdoppelung (self-renewal) ihre Anzahl erhöhen können.^[136] Gordon et al. fanden heraus, dass es unter den Progenitoren solche gibt, die zuerst self-renewal betreiben und dann Kolonien bilden und solche, die kaum self-renewal betreiben und schon früh anfangen auszudifferenzieren, somit aber in ihrer möglichen Maximalanzahl von zu bildenden Zellen beschränkt sind.^[132]

Die Anzahl der primären und sekundären Kolonien wurde bestimmt. Es zeigte sich in Passage 3 und 4, dass das self-renewal Potenzial bzw. die Anzahl der möglichen Teilung relativ hoch war. In Passage 1 und 5 war die Teilungsrate in unseren Versuchen bzgl. der primären und sekundären Kolonien sehr niedrig, was nicht so recht erklärbar ist und vermutlich eher auf zufällige Fehler in der Versuchsdurchführung oder auf mangelhafte Komponenten (zum Beispiel Kontamination) zurückzuführen ist. Eine ähnliche Veränderung zeigte sich auch in den ersten fünf Passagen bei den primären Kolonien. Im späteren Verlauf fiel die Anzahl der gebildeten primären Kolonien je eingesetzten 500 CD34⁺-Zellen von 31 bei Passage 6 auf fast 0 bis zum Ende der Kultur ab. Das deutet darauf hin, dass die Zellen eher weniger self-renewal betrieben haben. Allerdings muss man bei dieser Aussage vorsichtig sein, da bei der Messung der primären Kolonien nicht nur das self-renewal Potenzial eingeschätzt wird, sondern dabei noch mehr Faktoren eine Rolle spielen. Einfluss nehmen können dabei die Qualität der eingesetzten Zellen, hinsichtlich der Apoptoserate oder zelluläre Seneszenz, aber auch die tatsächliche Anzahl von eingesetzten CFU-GM, denn in der eingesetzten CD34⁺-Fraktion können natürlich noch andere Zellen vorhanden sein. Als Beispiel sei hier nur CFU-ME genannt.

4.6 Zellzyklus

Der Körper benötigt jeden Tag ständig neue Blutzellen. Um dies zu gewährleisten, werden kontinuierlich Zellen ausgehend von den HSC gebildet. Es muss allerdings auf der anderen Seite verhindert werden, dass sich zu viele neue Zellen bilden oder sich zu stark genetisch veränderte Zellen vermehren und sich ein neoplastisches Krankheitsbild entwickelt. Diese beiden Bedingungen werden durch ein komplexes Netzwerk von verschiedenen aktivierenden und inhibitorischen Signalen reguliert. Im Zentrum all dieser Faktoren steht der Zellzyklus. Schreitet er voran, bewegt sich die Zelle auf eine mögliche Teilung zu. Kommt es zu einem Arrest, kann dies verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann es aufgrund von DNA-Schäden und der benötigten Zeit zur Reparatur der Schäden zu einem Anhalten des Zellzyklus kommen,^[121] zum anderen kann aber auch das Vorhandensein ausreichender Blutzellen zu einem Arrest führen oder aber es ist genetisch determiniert.

Durch BrdU-Aufnahmestudien (Bromdesoxyuridin) wurde herausgefunden, dass sich zu einem bestimmten Zeitpunkt unter den adulten HSC nur fünf bis zehn Prozent außerhalb der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus und somit in einem ruhenden bzw. quieszenten Zustand befinden.^[137] Allerdings fand man auch heraus, dass dieser Zustand ein fließender ist, was bedeutet, dass die Zellen in regelmäßigen Abständen von Quieszenz in den aktiven Zustand wechseln. Für menschliche HSC geschieht das ungefähr alle 40 Wochen, dass sie einmal den Zellzyklus durchlaufen.^[138] Quieszenz scheint für die HSC wichtig zu sein, da es bei Störung dieser früher oder später zu einem Erschöpfen der Blutbildungsfähigkeit kommt.^[139] Bei diesem Wechselspiel haben viele Faktoren sowohl intrinsische als auch extrinsische einen Einfluss.

In der Einleitung (1.1.3 Zellzyklus (S.10)) wurde bereits beschrieben, dass für das Fortschreiten des Zellzyklus bestimmte Proteine die Cycline nötig sind (siehe auch Abb. 25 (S.77)). Diese verbinden sich mit den Cyclin abhängigen Kinasen (CdKs) und phosphorylieren die Mitglieder der Retinoblastom (Rb) –Familie. Dazu gehören die Proteine pRb, p107 und p130.^[140] Bis vor kurzem dachte man, dass die Rb-Proteine bei der Hämatopoese nur eine kleine Rolle spielen, da durch Ausschalten einzelner Mitglieder der Familie kaum ein Unterschied im Phänotyp auszumachen war. Erst als alle drei parallel ausgeschaltet wurden, führte dies zu einem myeloproliferativen Phänotyp und die HSC zeigten Schwierigkeiten nach der Transplantation die Blutbildung vollständig zu rekonstituieren. Die verschiedenen Mitglieder der Rb-Familie sind zueinander redundant, wenn auch auf unterschiedlichen Ebenen.^[141, 142] In ihrem nicht phosphorylierten Zustand hemmen sie den Transkriptionsfaktor E2F und halten die HSC in der G_1 -Phase. Ein Zielgen von E2F ist das Cyclin E.^[143] Die Rb-Proteine werden durch D-Cyclin/CdK-4/CdK-6-Kinasekomplex und E-Cyclin/CdK-2-Kinasekomplex gehemmt.^[143]

Die D-Cyclin-Familie umfasst die Mitglieder Cyclin D1 (Ccnd1), Cyclin D2 (Ccnd2) sowie Cyclin D3 (Ccnd3) und auch diese sind zueinander redundant.^[142, 144] Knockoutmäuse für alle drei D-Cycline zeigten schwere Blutbildungsstörungen schon in der Embryogenese.^[145]

Noch eine Stufe höher stehen die Mitglieder der Ink4-Familie (siehe S.73 und Abb. 25 (S.77)). Sie inhibieren den D-Cyclin/Cdk-4/Cdk-6-Kinasekomplex, führen zu einer Induktion von p53^[131], einer Induktion des Rb-Proteins^[146] und zu einem Schutz vor dem Abbau von p21^{Cip} und p27^{Kip1}.^[147] Besonders wenn die HSC unter tumorösem Stress steht und das Protoonkogen Ras aktiviert ist, kommt es zu einer von Aktivierung von p16^{Ink4a} und p15^{Ink4b}.^[148, 149] Das Molekül Bmi1 wirkt inhibitorisch auf den Genexpressionslokalus der INK4-Familie.^[150]

Eine weitere Gruppe von Zellzyklusinhibitoren ist die Cip/Kip-Familie (siehe Abb. 25 (S.77)). Dazu gehören p21^{Cip}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}.^[143] Diese verhindern den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus durch Inhibieren des E-Cyclin/Cdk2-Kinasekomplexes. Sie werden unter anderem von p53 aktiviert.^[151] Von außen kann TGF- β (Transforming growth factor beta) oder Notch Liganden über die Transkriptionsfaktoren junB und Hes1 zu einer Expression von p21^{Cip} und p57^{Kip2} führen.^[152-154]

Des Weiteren gibt es noch den Phosphatidylinositol-3-Weg (siehe Abb. 25), der einen Pfad von extrinsischen Signalen auf den Zellzyklus darstellt. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) leitet dabei die stimulatorischen Signale von TPO und SCF weiter.^[143] Es wird die Threonine/Serinekinase Akt aktiviert, welche wiederum mTOR (mammalian target of rapamycin) aktiviert. Gleichzeitig führt PI3K zur Unterdrückung der Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie (forkhead box O). Dieser Pathway kann durch PTEN (phosphatase and tensin homologue) inhibiert werden. PI3K führt über Akt zu einer Beschleunigung des Zellzyklus zum einen durch Stabilisierung der D-Cycline und durch Inhibierung von FoxO und dessen Transkriptionsprodukte der Cip/Kip-Familie.^[155]

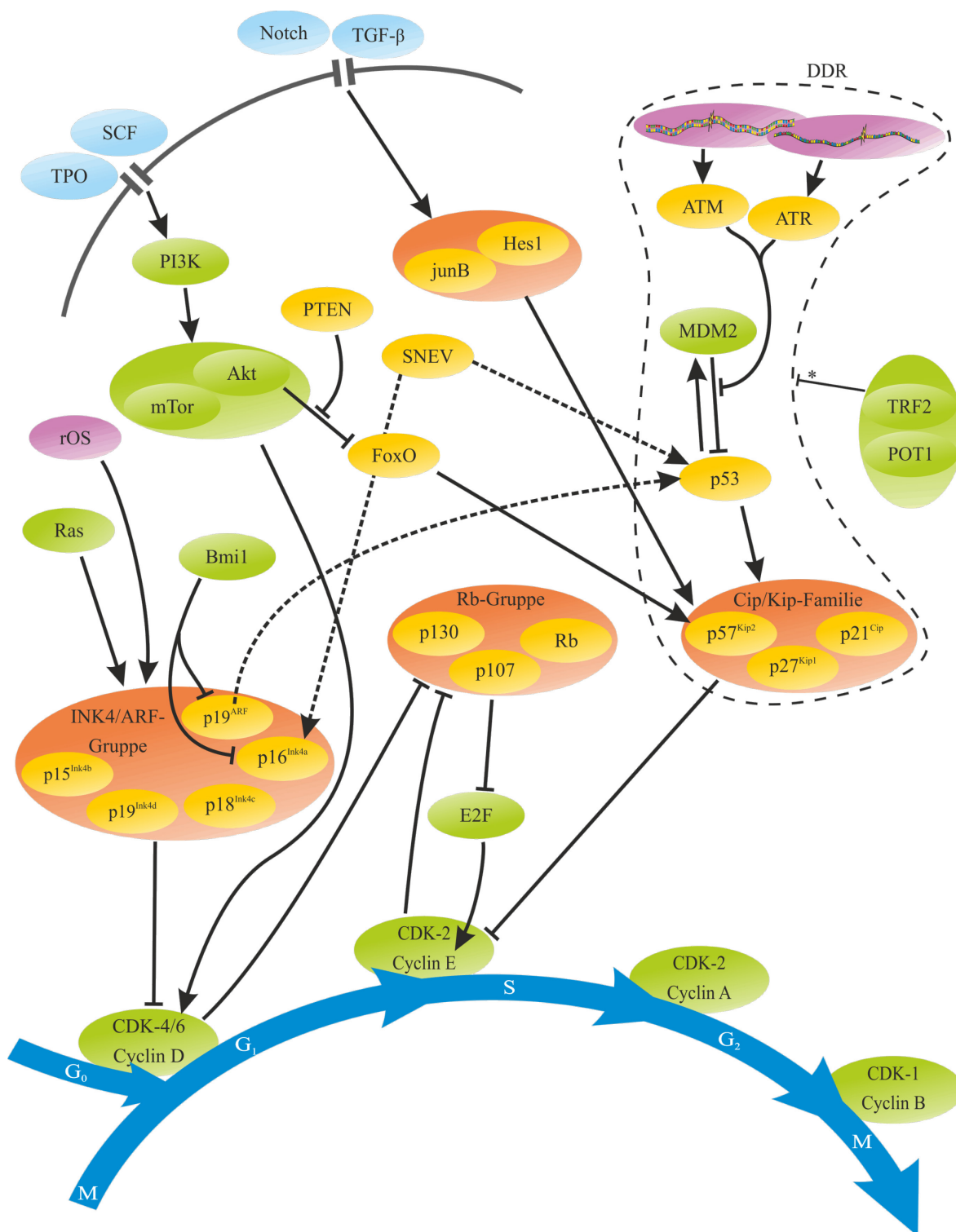


Abb. 25: Kontrollwege des Zellzyklus

* nur aktiv bei nicht kurzen Telomeren

Erklärung siehe Text. Durchgezogene und gestrichelte Pfeile haben dieselbe Bedeutung und wurden nur aufgrund der Übersichtlichkeit gewählt.

Modifiziert und ergänzt nach Pietras et al.^[143]

Bei unseren Untersuchungen zum Zellzyklus haben wir uns auf die Expression der Cycline konzentriert. Grundsätzlich unterliegen alle von uns bestimmten Cycline den gleichen Schwankungen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Das kann auf den Wechsel zwischen ruhenden und akti-

ven Zellen zurückzuführen sein, da die Cyclin Level in ruhenden Zellen geringer sind als in aktiven Zellen.^[156]

Es fällt prinzipiell auf, dass es über den Zeitverlauf drei voneinander differenzierbare Phasen gab. Phase 1 ist bis Passage 10, Phase 2 zwischen Passage 11 und Passage 18 und Phase 3 ab Passage 19.

Während Phase 1 kam es zu einer Hochregulierung der Cycline, die für die Überwindung des G₁/S-Checkpoints nötig sind, bei gleichzeitiger Mindereexpression der Cycline A und B. Das könnte dafür sprechen, dass die Zellen einem von extern erhöhtem Teilungsdrang durch fehlende inhibitorische Signale unterlagen. Zu diesen Signalen gehört zum Beispiel der Tie2/Angiopoietin-1-Weg, der eine wichtige Rolle bei der HSC Quieszenz spielt.^[157] Gleichzeitig waren die DNA-Schäden, die wir mittels des Comet-Assays während dieser Phase bestimmt haben besonders hoch, was zu einer Induktion von p53 und konsekutiv p27 geführt haben könnte. p27 führte dann möglicherweise zu einem Zellzyklus Arrest bei trotzdem erhöhten Cyclinleveln. SNEV weist in eine ähnliche Richtung. Unsere Untersuchungen bezüglich der Teilungsfähigkeit zeigten kein starkes Wachstum in dieser Zeit, was aber auch damit erklärt werden kann, dass gleichzeitig Zellen vermehrt in die Apoptose gegangen sein könnten.

Während der Phase 2 kam es wieder zu einer Abnahme der relativen Überexpression der G₁/S-Cycline. Zur selben Zeit sind aber die DNA-Schäden auf einem geringeren Niveau als es in der Phase 1 der Fall war. Auch SNEV war weniger stark exprimiert als noch in der ersten Phase.

Während der Passage 17 kam es zu einem plötzlichen Abfall der G₁/S-Cycline bei gleichzeitigem Anstieg der S/G₂/M-Cycline. Gleichzeitig kam es auch zu einem plötzlichen Anstieg der Telomeraseaktivität und der Telomerlänge. Die größte Telomeraseaktivität findet sich meist während der mittleren und späten S-Phase des Zellzyklus.^[158, 159] Es kann also sein, dass aufgrund der erhöhten Telomeraseaktivität und der verstärkten Verlängerung der Telomere es zu einem Arrest des Zellzyklus in der S-Phase gekommen sein könnte.

Die Phase 3 war dann der ersten Phase wieder sehr ähnlich.

Das Cyclin C ist normalerweise für die Induktion des Zellzyklus verantwortlich und findet sich deshalb am Übergang von der G₀- zur G₁-Phase. Es verbindet sich mit Cdk3 und bildet den C-Cyclin/Cdk3-Kinasekomplex.^[160] Es spielt außerdem eine Rolle beim Aufrechterhalten der Quieszenz in HSC.^[161] Bei unseren Untersuchungen zeigt sich der Verlauf von Cyclin C gleich dem Verlauf von Cyclin B, welches zusammen mit Cyclin A eher für den Transit S/G₂/M-Phase zuständig ist.

4.7 Telomerlänge und Telomeraseaktivität

Telomere sind spezielle Chromatin Strukturen an den Enden der Chromosomen, die das Ende der DNA davor bewahrt als Strangbruch erkannt zu werden. Diese DNA-Sequenzen sind aus sich wiederholenden TTAGGG Wiederholungen zusammengesetzt. Bei jeder Zellteilung verliert die Zelle ein Stück ihrer Telomere, da die Replikation nicht bis zum Ende des DNA Strangs erfolgen kann. Aus diesem Grund müssen die Telomere von einer bestimmten Polymerase gebildet werden – der Telomerase (telomerase reverse transcriptase, TERT).^[162]

Wenn die Telomere eine kritisch kurze Länge erreichen, lässt die Integrität sowie die Stabilität des Genoms nach, Reparaturmechanismen wie die homologe Rekombination (HR) oder Non-homologous end joining (NHEJ) würden fehlerhaft korrigieren und es kann konsekutiv zu Chromosomenaberrationen kommen.^[163, 164] Um dem entgegen zu wirken, werden Zellen bei kürzer werdenden Telomere in Apoptose geschickt oder es kommt zu einem Arrest des Zellzyklus. Geschieht dies in Stammzellen, ist die Regeneration von Gewebe nicht mehr gewährleistet und es kommt zu Alterungserscheinungen.^[165, 166] Auf der anderen Seite ist dies ein Mechanismus um Neoplasien vorzubeugen. Bei sich schnell teilendem Tumorgewebe können kritisch kurze Telomere zu einem Wachstumsstopp führen und die Zellen müssen, um sich weiter teilen zu können die Telomerase erst wieder aktivieren oder einen Weg finden die Telomere zu verlängern.^[162, 167-169]

Haben die Telomere eine Länge, die mehr als eine gewisse Thresholdlänge beträgt, blockieren sie mit an ihnen gebundenen Enzymen wie dem telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2), dem double-stranded telomeric DNA-binding Protein und dem protection of telomeres 1 (POT1) den DNA damage response pathway (DDR). Dabei inhibieren sie ATM und ATR. (siehe DNA damage response (S.71)) Es ist aber zu beachten, dass nicht die durchschnittliche Länge der Telomere ausschlaggebend ist, sondern schon die Anwesenheit von einiger weniger kurzer Telomere innerhalb einer Zelle.^[121, 164, 170]

Es wurde gezeigt, dass HSC im Vergleich zu Fibroblasten eine relativ geringe Aktivität an Telomerase zeigen, sie aber unter Zytokinstimulation und Zellzyklusaktivierung ansteigen kann.^[171-173] Nichtsdestotrotz ist die Telomerase nicht in der Lage in menschlichen Zellen die Telomere auf Dauer konstant zu halten.^[174] Allerdings kann erhöhte Telomeraseexpression eine Verkürzung der Telomere nicht verhindern.^[175] Des Weiteren ist wahrscheinlich, dass die Telomerase nicht nur einen Effekt hinsichtlich der Länge der Telomere, sondern auch ein Rolle als Regulator des self-renewal hat. So zeigten TERT Knockout HSC eine signifikante Minderung ihres Expansionsvermögens in vitro.^[176-178]

Bei den Ergebnissen der stromafreien HSC-Langzeitkultur zeigte sich eine relative Konstanz der Telomerlänge bis zur Passage 16. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Gruppen.^[179]

Bei uns kam es jedoch bei Passage 17 zu einem deutlichen Anstieg der Telomerlänge und gleichzeitigem Anstieg der Telomeraseaktivität, der bei keiner anderen Gruppe auftrat. Es ist noch nicht wirklich viel über die Induktion der Telomerase in HSC bekannt. Allerdings scheinen Proteine wie p53, MDM2 und E2F TERT eher zu inhibieren und das Protoonkogen c-Myc sie eher zu aktivieren.^[166, 180-182] Es bleibt abzuwarten, ob sich dieses Ergebnis in weiteren Kulturen wiederholt. Ab der Passage 18 kam es gleich wie in den Untersuchungen von Gammaitoni et al. zu einem kontinuierlichen Abfall der Telomerlänge.^[179] Die Telomeraseaktivität fiel in ihrer Studie kontinuierlich ab der ersten Woche ab, wohingegen sie bei unserer Studie bis zur Passage 22, abgesehen von dem Ausschlag nach oben bei Passage 17, relativ konstant blieb und erst danach abfiel. Allerdings ist dies vermutlich darauf zurückzuführen, dass sie in ihren Versuchen die Telomeraseaktivität auf alle Zellen und nicht auf CD34⁺-Zellen bezogen haben. Die steigende Anzahl an ausdifferenzierten Zellen nahm dabei relativ gesehen zu den CD34⁺-Zellen zu. Da die Telomerase aber nur in frühen HSC stärker exprimiert wird, kam es zu einem Verdünnungseffekt, der, wenn man ihn berücksichtigte, zu ähnlichen Ergebnissen wie den unseren geführt hätte.

5 Schlussfolgerung

Stammzellen im Allgemeinen und HSC im Speziellen wird eine große Bedeutung zugesprochen. Man erhofft sich von ihnen Therapien gegen ein weites Feld an Erkrankungen. Angefangen von Tumoren, über Erbkrankheiten bis hin zur Behandlung von degenerativen Veränderungen. Aus diesem Grund ist das Gebiet der Stammzellen ein weitbeforschtes Feld. Schon heute ist es möglich mit einer gewissen Menge an HSC das komplette Immun- bzw. blutbildende System wiederherzustellen. Allerdings bestehen dabei weiterhin Probleme. So ist die Wahrscheinlichkeit einen Spender zu finden, der das gleiche Antigenmuster hat wie der Empfänger, relativ gering.^[70] Um trotzdem, bei nicht hundertprozentigem Übereinstimmen der HL-Antigene, eine Regeneration des blutbildenden System im Empfänger zu erreichen, muss eine höhere Menge an Spenderblut transplantiert werden.^[183] Alternative Wege werden in der Verwendung von Nabelschnurblut (UCB) aus der eigenen Nabelschnur oder aus Blutbanken gesucht. So ist es bei UCB möglich dies auch zu transplantieren, wenn nicht alle HLA-Muster übereinstimmen.^[184] Das hat den Nachteil, dass eine Graft-versus-Host Reaction (GvHR) mit höherer Wahrscheinlichkeit auftritt. Bei der GvHR erkennen die Zellen des Spenders die Zellen des Empfängers als fremd und lösen eine Immunreaktion aus.^[185] Je nach Ausprägung und Anzahl der befallenen Organe wird die GvHR in vier Schweregrade eingeteilt.^[186] Diese Reaktion kann aber auch von Vorteil sein, da die Zellen des Spenders nicht nur die gesunden sondern auch die malignen Zellen attackieren und dies kann zu einer aktiven Bekämpfung von Tumorzellen führen. Dieser Effekt wird dann Graft-versus-Malignancy (GvM) oder spezieller Graft-versus-Leukemia (GvL) bezeichnet. Interessanterweise beruht der GvM-Effekt im Gegensatz zur GvRH, welche T-Zell mediiert ist, eher auf dem Effekt von NK-Zellen.^[185, 187] Bei der Stammzelltransplantation korrelieren die Wahrscheinlichkeit des Rekonstitutionsvermögens und die Zeit bis zur vollständigen Rekonstitution mit der Menge an transplantierten Zellen.^[188] Die Menge an Nabelschnurblut als Spenderorgan ist beschränkt und reicht normalerweise nur aus, für Personen mit geringem Körpergewicht bis 60 kg und Kinder. Ein Ausweg besteht darin, mehrere Einheiten von UCB zu transplantieren.^[122] Dabei ist es jedoch noch schwieriger kompatible Spender zu finden. Eine Expansion von Stammzellen in vitro vor der Implantation wäre eine elegantere Methode. Dieser Lösungsansatz wirft jedoch wiederum Probleme auf. So kommt es bei der Kultur zu einem ausreifen der Zellen^[122], einer Störung des Homing^[189], vermehrter Apoptose^[190] und zu einer Initiierung des Zellzyklus.^[191] Das hat zur Folge, dass die Quieszenz gestört wird, sich das blutbildende System auf Dauer erschöpft, und dass eine Alterung der Stammzellen eintritt.^[122] Des Weiteren ist die Kultivierung außerhalb des Körpers mit erhöhtem Sauerstoff und damit oxidativen Stress verbunden, was sich negativ auf den Alterungsprozess der HSC auswirken könnte.^[192] Diese und folgende Arbeiten sollen dazu beitragen, die Geschehnisse bei der ex vivo Kultur von UCB besser zu verstehen und in Zukunft möglicherweise Stammzelltransplantationen effektiver zu gestalten.

6 Limitationen

Bei HSC04, HSC05 und HSC06 gab es Schwierigkeiten beim Anwachsen bzw. konsekutiv bei der Vermehrung der Zellkultur, so dass diese Kulturen nach Passage 3-4 beendet wurden, was nach unseren Vermutungen am ehesten auf eine nicht optimale Zusammensetzung des Stammzellmediums zurückzuführen war. Dabei schien es, dass das TPO die Ursache sein könnte.

Als ein weiteres Problem stellte sich die Aufreinigung der CD34⁺-Zellen dar. Aufgrund einer zu kleinen Säule (MS) beim MACS lag die Reinheit der CD34⁺-Zellen bis zur Passage 6 und bei Passage 15 nur bei 30-67%, wohingegen sie sonst mit der LS-Säule mehr als 85% aufwies.

Die Zellzyklusbestimmung durch eine Cyclinbestimmung hat den Nachteil, dass sich nicht genau differenzieren lässt, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befinden. Um dies zu gewährleisten, wäre es möglich sich den DNA-Gehalt der Zelle mit HOECHST 33342 und Pyronin Y (PY) darzustellen und dann mittels der Information, ob die Zellen den einfachen (2N) oder doppelten (4N) DNA-Gehalt aufweisen, rückzuschließen, ob sich die Zellen in der G₀/G₁-Phase oder der S/G₂/M-Phase befinden.^[142] Des Weiteren lässt sich mittels BrdU-Labeling (Messung der Aufnahme von BrdU in sich teilende Zellen) noch weiter diskriminieren, ob sich die Zellen hauptsächlich in der G₀- oder der G₁-Phase befinden.^[142]

7 Anhang

7.1 Lösungen, Medien und Puffer

Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die Mengenangaben auf Aqua bidest.

7.1.1 Calcium und Magnesium freier Phosphatpuffer (CMF-PBS)

Substanz	g/l
NaCl	8
KCl	0,3
Glucose · 1 H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	0,02
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	91,4

pH-Wert sollte 7,4 sein

7.1.2 Acid Citrate Dextrose solution A

Substanz	g/l
C ₆ H ₈ O ₇	7,3
C ₆ H ₅ O ₇ · 2 H ₂ O · 3 Na	22
C ₆ H ₁₂ O ₆ · 1 H ₂ O	24,5

7.1.3 Stammzellmedium

Das Stammzellmedium wird jedes Mal frisch hergestellt.

Substanz	ml/l*
10% FBS	100
50ng/ml SCF	1 (50ng)
50ng/ml Flt3/Flk2	1 (50ng)
10ng/ml TPO	1 (10ng)
10ng/ml IL-6	1 (10ng)
Phenolrot	896

*ml eingesetzte Substanz je 1l CMF-PBS

7.1.4 Pufferlösungen für den Comet-Assay

Lysepuffer

Substanz	g/l
NaCl	146,1
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	37,2
TRIS	1,2
NaOH	8
1% Triton X-100*	

* erst kurzfristig vor Verwendung zugeben
pH-Wert sollte größer als 10 sein

Elektrophorese-Puffer

Der Elektrophoresepuffer wird für jede Anwendung frisch zubereitet.

Substanz	g/l
NaOH	12
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0,3722

pH-Wert sollte größer als 13 sein

Neutralisationslösung

Substanz	g/l
TRIS	48,5

pH-Wert sollte mit rauchender HCl auf 7,4 eingestellt werden

Low melting Agarose

Substanz	%
Low melting Agarose (LE) (BMA)*	1

*sollte in CMF-PBS gelöst werden

Normal melting Agarose

Substanz	g/l
Normal Melting Agarose (ME) (Promega)	10

7.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
ACDA	Acid Citrate Dextrose solution A
ALDH	ALdehydDeHydrogenase
amol	Attomol
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM und Rad3-related
BAX	Bcl-2 Associated x protein
BFU	Burst Forming Unit
BFU-E	BFU-Erythrozytär
BFU-Mega	BFU-Megakaryozytär
BMA	Biomedizinischen Analytikerin
b-ME	b-MercaptoEthanol
BMEC	Bone Marrow Sinusoidal Endothelial-Cells
bp	basepair
BrdU	BromdesoxyUridin
BSA	Bovine Serum Albumin
Ccd	Cyclin D
CD	Cluster of Differentiation
Cdc	Cell division cycle
Cdk	Cyclin-dependent Kinases
CFU	Colony Forming Unit
CFU-Baso	CFU-Basophil granulozytär
CFU-E	CFU-erythrozytär
CFU-Eo	CFU-eosinophil granulozytär
CFU-G	CFU-granulozytär
CFU-GEMM	CFU-granulozytär, erythrozytär, megakaryozytär, makrophagozytär
CFU-GM	CFU-granulozytär, makrophagozytär
CFU-L	CFU-lymphozytär
CFU-M	CFU-makrophagozytär
CFU-ME	CFU-erythrozytär, megakaryozytär

CFU-Mega	CFU-megakaryozytär
Chk	Checkpoint kinases
CMF-PBS	Calcium/Magnesium-Free PhosphatBuffer
CXCL	CXC-chemokine Ligand
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndol
DDR	DNA Damage Response
DEPC	DiEthylPyroCarbonat
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dsDNA	double strand DNA
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
Flt3/Flk2	Fms-like tyrosine kinase receptor-3
FoxO	Forkhead box O
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
GAPDH	GlycerinAldehyd-3-PhosphatDeHydrogenase
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPC	Hematopoietic Progenitor Cell
HR	Homologous Recombination
HSC	Hematopoietic Stem Cell
Ig	Immunglobulin
IL-6	InterLeukin-6
iPS	induced Pluripototent Stem cell
IS	Internal Standard
kbp	kilo basepair
lg	Logarithmus zur Basis 10
LMA	Low Melting Agarose
LT-HSC	LongTerm HSC
mA	Milliampere
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MDM2	murine Double Minute 2
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNC	MonoNuclear Cell
MSC	Mesenchymal Stem Cell
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin

NHEJ	Non-Homologous End Joining
NK-Zellen	Natural Killer cells
nm	Nanometer
NMA	Normal Melting Agarose
nmol	Nanomol
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
NTC	No Template Control
OD ₂₆₀	Optical Density at 260nm
OD ₂₈₀	Optical Density at 280nm
PCR	Polymerase Chain Reactions
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
POT	Protection Of Telomeres
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
PY	Pyronin Y
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
R ²	Bestimmtheitsmaß
Rh-123	Rhodamine 123
RNA	RiboNucleic Acid
rOS	reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT ⁻	Reverse Transcriptase negativ-control
RTA	Relative Telomerase Activity
s	Sekunden
S.	Seite
SCF	Stem Cell Factor
SNEV	SeNescence EVasion factor
SP	Side Population cells (Hoechst 33342)
ssDNA	single strand DNA
ST-HSC	Short Term HSC
TERT	TElomerase Reverse Transcriptase
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TPO	ThromboPOetin
TRF	Telomeric Repeat-binding Factor
TRIS	TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan
UCB	Umbilical Cord Blood
V	Volt

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verlauf der Cycline im Zellzyklus	11
Abb. 2: Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen	13
Abb. 3: Schema der frühen Hämatopoese	15
Abb. 4: Ablauf des Ficoll	22
Abb. 5: Versuchsanordnung primäre CFUs	26
Abb. 6: Versuchsanordnung sekundäre CFUs	27
Abb. 7: Schema eines Comet	29
Abb. 8: Arbeitsschritte zur Herstellung eines Comet-Assay-Objektträgers.....	31
Abb. 9: Einteilung der Comets	33
Abb. 10: Prinzip der qRT-PCR mit Sybr-Green	38
Abb. 11: Lyse der Zellen für die Bestimmung der carbonylierten Proteine	46
Abb. 12: Gesamtleukozytenzahl im Zeitverlauf.....	55
Abb. 13: Morphologie der Zellkultur (lichtmikroskopische Fotografie; 200-fache Vergrößerung)	55
Abb. 14: Zellzahl von CD34+/CD34 ^{dim} -Zellen und CD133+-Zellen im Zeitverlauf.....	56
Abb. 15: Expression der Stammzellmarker im Zeitverlauf.....	57
Abb. 16: Verhältnis von CD34+-Zellen zu CD133+-Zellen.....	58
Abb. 17: Expression der Lineage Marker im Zeitverlauf	59
Abb. 18: Expression von SNEV	60
Abb. 19: Expression der Cycline.....	61
Abb. 20: Cyclinexpression über den Zeitverlauf normalisiert auf Cyclin A.....	62
Abb. 21: Cometscore.....	63
Abb. 22: Carbonylierte Proteine.....	64
Abb. 23: primäre und sekundäre CFU	65
Abb. 24: Telomerlänge und Telomeraseaktivität.....	66
Abb. 25: Kontrollwege des Zellzyklus.....	77

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen von humanen und murinen HSC	17
Tab. 2: Pipettierschema für die Durchflusszytometrie	24
Tab. 3: Berechnung des Cometscore	33
Tab. 4: Volumina des Mastermix für die cDNA-Synthese je Probe	36
Tab. 5: Substanzzusammensetzung Gradient PCR	41
Tab. 6: Substanzzusammensetzung Mess-PCR	42
Tab. 7: Volumina des Mastermix für die cDNA-Synthese je Probe	44
Tab. 8: Substanzzusammensetzung des TRAP-Assay	51
Tab. 9: Pipettierschema des TRAP-Assay	52
Tab. 10: Lineage-Marker ^[49, 92]	69

8 Literaturverzeichnis

- [1] Carrel A, Ebeling AH. Age and Multiplication of Fibroblasts. *The Journal of experimental medicine*. 1921;34(6):599-623. Epub 1921/11/30.
- [2] Witkowski JA. Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Medical history*. 1979;23(3):279-96. Epub 1979/07/01.
- [3] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961;25:585-621. Epub 1961/12/01.
- [4] Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*. 1965;37:614-36. Epub 1965/03/01.
- [5] Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(1):1-8. Epub 2010/02/10.
- [6] van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RG. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer*. 2007;43(15):2144-52. Epub 2007/09/04.
- [7] Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *Journal of postgraduate medicine*. 2007;53(3):207-13. Epub 2007/08/19.
- [8] Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. Aging and glycoxidant stress. *Hormones (Athens)*. 2008;7(2):123-32. Epub 2008/05/15.
- [9] Ljubuncic P, Reznick AZ. The evolutionary theories of aging revisited--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(2):205-16. Epub 2009/02/10.
- [10] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13. Epub 1985/12/01.
- [11] Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564-79. Epub 2002/02/19.
- [12] Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 1996;18(2):173-9. Epub 1996/01/01.
- [13] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):787-91. Epub 1997/04/01.
- [14] Reddel RR, Bryan TM. Alternative lengthening of telomeres: dangerous road less travelled. *Lancet*. 2003;361(9372):1840-1. Epub 2003/06/06.
- [15] Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *The EMBO journal*. 1994;13(20):4953-62. Epub 1994/10/17.
- [16] O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(10):1218-25. Epub 2010/10/05.
- [17] Horn F, Armbruster M. *Biochemie des Menschen das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 4., aktualisierte und erw. Aufl. ed. Stuttgart u.a.: Thieme; 2009. XVIII, 643 S. p.
- [18] Grillari J, Ajuh P, Stadler G, Loscher M, Voglauer R, Ernst W, et al. SNEV is an evolutionarily conserved splicing factor whose oligomerization is necessary for spliceosome assembly. *Nucleic acids research*. 2005;33(21):6868-83. Epub 2005/12/08.
- [19] Tam WY, Lee KR, Cheng SC. Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(22):10821-5. Epub 1993/11/15.
- [20] Schraml E, Voglauer R, Fortschegger K, Sibilina M, Stelzer I, Grillari J, et al. Haploinsufficiency of senescence evasion factor causes defects of hematopoietic stem cells functions. *Stem cells and development*. 2008;17(2):355-66. Epub 2008/05/02.
- [21] Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(35):33111-20. Epub 2001/07/04.
- [22] Mahajan KN, Mitchell BS. Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10746-51. Epub 2003/09/10.
- [23] Zhang N, Kaur R, Lu X, Shen X, Li L, Legerski RJ. The Pso4 mRNA splicing and DNA repair complex interacts with WRN for processing of DNA interstrand cross-links. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(49):40559-67. Epub 2005/10/15.
- [24] Voglauer R, Chang MW, Dampier B, Wieser M, Baumann K, Sterovsky T, et al. SNEV overexpression extends the life span of human endothelial cells. *Experimental cell research*. 2006;312(6):746-59. Epub 2006/01/04.

- [25] Giannattasio M, Lazzaro F, Longhese MP, Plevani P, Muzi-Falconi M. Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. *The EMBO journal*. 2004;23(2):429-38. Epub 2004/01/17.
- [26] Runger TM, Vergilis I, Sarkar P, DePinho RA, Sharpless NE. How disruption of cell cycle regulating genes might predispose to sun-induced skin cancer. *Cell Cycle*. 2005;4(5):643-5. Epub 2005/04/23.
- [27] Decraene D, Agostinis P, Pupe A, de Haes P, Garmyn M. Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2001;63(1-3):78-83. Epub 2001/10/31.
- [28] Tajbakhsh S, Rocheteau P, Le Roux I. Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009;25:671-99. Epub 2008/01/10.
- [29] Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74. Epub 2006/07/01.
- [30] Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2009;114:185-99. Epub 2009/04/04.
- [31] Knoepffler N, Schipanski D, Sorgner SL. Human biotechnology as social challenge : an interdisciplinary introduction to bioethics ; [international Wartburg conference entitled 'Human biotechnology as a social challenge' at the hotel in the Wartburg Castle in Eisenach, Germany from 6 to 8 May 2004]. Aldershot [u.a.]: Ashgate; 2007. XI, 173 S. p.
- [32] Gong JK. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science*. 1978;199(4336):1443-5. Epub 1978/03/31.
- [33] Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 2005;309(5743):2064-7. Epub 2005/09/06.
- [34] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-10. Epub 1992/03/27.
- [35] Kolle G, Ho M, Zhou Q, Chy HS, Krishnan K, Cloonan N, et al. Identification of human embryonic stem cell surface markers by combined membrane-polysome translation state array analysis and immunotranscriptional profiling. *Stem Cells*. 2009;27(10):2446-56. Epub 2009/08/04.
- [36] Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*. 1974;2(2):83-92. Epub 1974/01/01.
- [37] Welsch U, Deller T. *Lehrbuch Histologie : [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]*. 3. Aufl. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010. XI, 596 S. p.
- [38] Löffler H, Rastetter J, Haferlach T, Heilmeyer L, Begemann H. *Atlas of clinical hematology : with 17 tables*. 6., rev. ed ed. Berlin [u.a.]: Springer; 2005. XIII, 429 S p.
- [39] Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. *Netter's essential histology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008. xv, 493 p. ill. (some col.) p.
- [40] Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273(5272):242-5. Epub 1996/07/12.
- [41] Domen J, Weissman IL. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Molecular medicine today*. 1999;5(5):201-8. Epub 1999/05/14.
- [42] Jones RJ, Collector MI, Barber JP, Vala MS, Fackler MJ, May WS, et al. Characterization of mouse lymphohematopoietic stem cells lacking spleen colony-forming activity. *Blood*. 1996;88(2):487-91. Epub 1996/07/15.
- [43] Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature*. 1990;347(6289):188-9. Epub 1990/09/13.
- [44] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-21. Epub 2005/07/02.
- [45] Visser JW, Bauman JG, Mulder AH, Eliason JF, de Leeuw AM. Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 1984;159(6):1576-90. Epub 1984/06/01.
- [46] Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241(4861):58-62. Epub 1988/07/01.
- [47] Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(7):2804-8. Epub 1992/04/01.
- [48] Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research*. 2003;34(6):461-75. Epub 2004/01/22.
- [49] Knapp W. *Leucocyte typing IV : white cell differentiation antigens*. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1989. xxiv, 1182 p. p.

- [50] McKenzie JL, Takenaka K, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood*. 2007;109(2):543-5. Epub 2006/09/23.
- [51] Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(4):1797-806. Epub 1996/04/01.
- [52] Kim M, Cooper DD, Hayes SF, Spangrude GJ. Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood*. 1998;91(11):4106-17. Epub 1998/05/30.
- [53] Fallon P, Gentry T, Balber AE, Boulware D, Janssen WE, Smilee R, et al. Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *British journal of haematology*. 2003;122(1):99-108. Epub 2003/06/26.
- [54] Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology*. 1993;122(4):897-902. Epub 1993/08/01.
- [55] Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41. Epub 2003/10/24.
- [56] Lerner C, Harrison DE. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Experimental hematology*. 1990;18(2):114-8. Epub 1990/02/01.
- [57] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(2):93-106. Epub 2006/02/24.
- [58] Murphy MJ, Wilson A, Trumpp A. More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends in cell biology*. 2005;15(3):128-37. Epub 2005/03/09.
- [59] Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004;432(7017):625-30. Epub 2004/12/04.
- [60] Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:349-56. Epub 2005/09/22.
- [61] Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 2005;435(7044):969-73. Epub 2005/06/17.
- [62] Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*. 2004;10(1):64-71. Epub 2004/01/02.
- [63] Rafii S, Mohle R, Shapiro F, Frey BM, Moore MA. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leukemia & lymphoma*. 1997;27(5-6):375-86. Epub 1998/02/26.
- [64] Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001;294(5548):1933-6. Epub 2001/12/01.
- [65] Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;938:208-18; discussion 18-20. Epub 2001/07/19.
- [66] Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369-77. Epub 2001/05/12.
- [67] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284(5417):1168-70. Epub 1999/05/15.
- [68] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine*. 2000;6(11):1229-34. Epub 2000/11/04.
- [69] Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Experimental hematology*. 2002;30(9):973-81. Epub 2002/09/13.
- [70] Arastéh K. *Innere Medizin : 643 Tabellen. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.* Stuttgart: Thieme; 2009. XXXVIII, 1496 S. p.
- [71] Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8. Epub 1990/01/01.
- [72] Olive PL, Wlodek D, Banath JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer research*. 1991;51(17):4671-6. Epub 1991/09/01.
- [73] Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2006;98(4):336-45. Epub 2006/04/21.

- [74] Fuchs R, Stelzer I, Drees CM, Rehnolt C, Schraml E, Sadjak A, et al. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. *Cell biology international*. 2012;36(1):113-7. Epub 2011/09/17.
- [75] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9. Epub 1987/04/01.
- [76] Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR. Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *Journal of clinical pathology*. 2005;58(5):509-14. Epub 2005/04/29.
- [77] Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine*. 1997;23(3):361-6. Epub 1997/01/01.
- [78] Mayer B, Zitta S, Greilberger J, Holzer H, Reibnegger G, Hermetter A, et al. Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1638(3):267-72. Epub 2003/07/25.
- [79] Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*. 2002;30(10):e47. Epub 2002/05/10.
- [80] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5. Epub 1994/12/23.
- [81] Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic acids research*. 1995;23(18):3794-5. Epub 1995/09/25.
- [82] Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nature cell biology*. 2006;8(7):677-87. Epub 2006/06/27.
- [83] Rambhatla L, Ram-Mohan S, Cheng JJ, Sherley JL. Immortal DNA strand cosegregation requires p53/IMPDH-dependent asymmetric self-renewal associated with adult stem cells. *Cancer research*. 2005;65(8):3155-61. Epub 2005/04/19.
- [84] Karpowicz P, Morshead C, Kam A, Jarvis E, Ramunas J, Cheng V, et al. Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro. *The Journal of cell biology*. 2005;170(5):721-32. Epub 2005/08/24.
- [85] Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975;255(5505):197-200. Epub 1975/05/15.
- [86] Srouf EF, Brandt JE, Briddell RA, Grigsby S, Leemhuis T, Hoffman R. Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood*. 1993;81(3):661-9. Epub 1993/02/01.
- [87] Coutinho LH, Will A, Radford J, Schiro R, Testa NG, Dexter TM. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (CSF), human granulocyte macrophage-CSF, and gibbon interleukin-3 on hematopoiesis in human long-term bone marrow culture. *Blood*. 1990;75(11):2118-29. Epub 1990/06/01.
- [88] Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*. 1993;81(10):2579-84. Epub 1993/05/15.
- [89] Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*. 1997;89(8):2644-53. Epub 1997/04/15.
- [90] Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*. 1999;93(11):3736-49. Epub 1999/05/26.
- [91] Verhasselt B, Kerre T, Naessens E, Vanhecke D, De Smedt M, Vandekerckhove B, et al. Thymic repopulation by CD34(+) human cord blood cells after expansion in stroma-free culture. *Blood*. 1999;94(11):3644-52. Epub 1999/11/26.
- [92] Egeland T, Steen R, Quarsten H, Gaudernack G, Yang YC, Thorsby E. Myeloid differentiation of purified CD34+ cells after stimulation with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte-CSF, monocyte-CSF, and interleukin-3. *Blood*. 1991;78(12):3192-9. Epub 1991/12/15.
- [93] Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of medical research*. 2002;33(2):107-14. Epub 2002/03/12.
- [94] Sconocchia G, Fujiwara H, Rezvani K, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, Grube M, et al. G-CSF-mobilized CD34+ cells cultured in interleukin-2 and stem cell factor generate a phenotypically novel monocyte. *Journal of leukocyte biology*. 2004;76(6):1214-9. Epub 2004/09/04.

- [95] Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*. 1998;92(10):3647-57. Epub 1998/11/10.
- [96] Arrighi JF, Hauser C, Chapuis B, Zubler RH, Kindler V. Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and a CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor. *Blood*. 1999;93(7):2244-52. Epub 1999/03/26.
- [97] Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, et al. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood*. 1995;86(5):1661-70. Epub 1995/09/01.
- [98] Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood*. 1994;84(2):408-14. Epub 1994/07/15.
- [99] Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*. 1994;368(6472):643-8. Epub 1994/04/14.
- [100] Zeigler FC, Bennett BD, Jordan CT, Spencer SD, Baumhueter S, Carroll KJ, et al. Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood*. 1994;84(8):2422-30. Epub 1994/10/15.
- [101] Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, et al. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1994;83(10):2795-801. Epub 1994/05/15.
- [102] Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin- cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1991;77(11):2316-21. Epub 1991/06/01.
- [103] Patchen ML, MacVittie TJ, Williams JL, Schwartz GN, Souza LM. Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. *Blood*. 1991;77(3):472-80. Epub 1991/02/01.
- [104] Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;87(12):4998-5005. Epub 1996/06/15.
- [105] Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *The New England journal of medicine*. 2006;354(19):2034-45. Epub 2006/05/12.
- [106] Alberts B, Wilson J, Johnson A. *Molecular biology of the cell* : [media DVD-ROM inside]. 5. ed. New York, NY [u.a.]: Garland Science; 2008. Getr. Zählung [XXXIII, 1630, G40, I49, T1 p.] p.
- [107] Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic acids research*. 2007;35(22):7417-28. Epub 2007/10/05.
- [108] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*. 2004;26(3):249-61. Epub 2004/03/09.
- [109] Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development*. 2001;15(17):2177-96. Epub 2001/09/07.
- [110] Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell*. 2006;21(2):187-200. Epub 2006/01/24.
- [111] Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 2002;23(4):541-7. Epub 2002/04/19.
- [112] Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(19):10389-94. Epub 2000/09/06.
- [113] Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & development*. 2001;15(9):1067-77. Epub 2001/05/02.
- [114] Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & development*. 2000;14(3):289-300. Epub 2000/02/16.
- [115] Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, et al. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *The Journal of cell biology*. 2006;173(2):195-206. Epub 2006/04/19.

- [116] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516. Epub 2007/06/15.
- [117] Silbernagl S, Lang F, Gay R. Taschenatlas Pathophysiologie. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2009. XII, 427 S. p.
- [118] Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, et al. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(24):21767-73. Epub 2003/04/05.
- [119] Strausfeld U, Labbe JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, et al. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature*. 1991;351(6323):242-5. Epub 1991/05/16.
- [120] Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997;277(5331):1501-5. Epub 1997/09/05.
- [121] d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(7):512-22. Epub 2008/06/25.
- [122] Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone marrow transplantation*. 2007;39(1):11-23. Epub 2006/12/14.
- [123] Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature medicine*. 2006;12(4):446-51. Epub 2006/03/28.
- [124] Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011;118(11):2941-50. Epub 2011/07/08.
- [125] Nystrom T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*. 2005;24(7):1311-7. Epub 2005/03/19.
- [126] Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine*. 2002;32(9):790-6. Epub 2002/04/30.
- [127] Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(12):2519-30. Epub 2004/08/25.
- [128] Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nystrom T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(11):5746-9. Epub 2000/05/17.
- [129] Bota DA, Davies KJ. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature cell biology*. 2002;4(9):674-80. Epub 2002/08/29.
- [130] Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;305(3):709-18. Epub 2003/05/24.
- [131] Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(10):731-7. Epub 2001/10/05.
- [132] Gordon MY, Blackett NM, Lewis JL, Goldman JM. Evidence for a mechanism that can provide both short-term and long-term haemopoietic repopulation by a seemingly uniform population of primitive human haemopoietic precursor cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 1995;9(7):1252-6. Epub 1995/07/01.
- [133] Gordon MY, Lewis JL, Grand FH, Marley SB, Goldman JM. Phenotype and progeny of primitive adherent human hematopoietic progenitors. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 1996;10(8):1347-53. Epub 1996/08/01.
- [134] Healy LE, Nirsimloo N, Scott M, Apperley JF, Gordon MY. In vitro proliferation by cells mobilized into the peripheral blood for collection and autologous transplantation. *Experimental hematology*. 1994;22(13):1278-82. Epub 1994/12/01.
- [135] Lewis JL, Blackett NM, Gordon MY. The kinetics of colony formation by CFU-GM in vitro. *British journal of haematology*. 1994;88(2):440-2. Epub 1994/10/01.
- [136] Gordon MY, Marley SB, Lewis JL, Davidson RJ, Nguyen DX, Grand FH, et al. Treatment with interferon-alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with chronic myeloid leukemia but spares normal CFU-GM. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(4):710-5. Epub 1998/08/26.
- [137] Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008;135(6):1118-29. Epub 2008/12/09.

- [138] Catlin SN, Busque L, Gale RE, Gutter P, Abkowitz JL. The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*. 2011;117(17):4460-6. Epub 2011/02/24.
- [139] Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):115-28. Epub 2008/01/19.
- [140] Chow KN, Starostik P, Dean DC. The Rb family contains a conserved cyclin-dependent-kinase-regulated transcriptional repressor motif. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(12):7173-81. Epub 1996/12/01.
- [141] Viatour P, Somervaille TC, Venkatasubrahmanyam S, Kogan S, McLaughlin ME, Weissman IL, et al. Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family. *Cell stem cell*. 2008;3(4):416-28. Epub 2008/10/23.
- [142] Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(11):1599-611. Epub 2005/12/07.
- [143] Pietras EM, Warr MR, Passegue E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology*. 2011;195(5):709-20. Epub 2011/11/30.
- [144] Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*. 2004;118(4):493-504. Epub 2004/08/19.
- [145] Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagodzón A, Sicinska E, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*. 2004;118(4):477-91. Epub 2004/08/19.
- [146] Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*. 2002;2(2):103-12. Epub 2002/09/03.
- [147] Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21(21):3403-13. Epub 2002/05/29.
- [148] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602. Epub 1997/03/07.
- [149] Malumbres M, Perez De Castro I, Hernandez MI, Jimenez M, Corral T, Pellicer A. Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Molecular and cellular biology*. 2000;20(8):2915-25. Epub 2000/03/25.
- [150] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003;423(6937):255-60. Epub 2003/04/26.
- [151] Asai T, Liu Y, Bae N, Nimer SD. The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(9):2215-21. Epub 2011/06/11.
- [152] Scandura JM, Bocconi P, Massague J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(42):15231-6. Epub 2004/10/13.
- [153] Yu X, Alder JK, Chun JH, Friedman AD, Heimfeld S, Cheng L, et al. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells*. 2006;24(4):876-88. Epub 2006/03/04.
- [154] Santaguida M, Schepers K, King B, Sabnis AJ, Forsberg EC, Attema JL, et al. JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal. *Cancer cell*. 2009;15(4):341-52. Epub 2009/04/07.
- [155] Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306. Epub 2004/11/19.
- [156] Alberts B, Wilson J, Hunt T, Johnson A. *Molecular biology of the cell* : [media DVD-ROM inside]. 5. ed. New York, NY [u.a.]: Garland Science; 2008. XXXIII, 1268 S, getr. Zählung p.
- [157] Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-61. Epub 2004/07/21.
- [158] Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, et al. Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Molecular cell*. 2011;44(5):819-27. Epub 2011/12/14.
- [159] Zhu X, Kumar R, Mandal M, Sharma N, Sharma HW, Dhingra U, et al. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):6091-5. Epub 1996/06/11.
- [160] Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*. 2004;117(2):239-51. Epub 2004/04/16.
- [161] Miyata Y, Liu Y, Jankovic V, Sashida G, Lee JM, Shieh JH, et al. Cyclin C regulates human hematopoietic stem/progenitor cell quiescence. *Stem Cells*. 2010;28(2):308-17. Epub 2009/12/08.

- [162] Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*. 2002;21(4):553-63. Epub 2002/02/19.
- [163] Artandi SE, DePinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Current opinion in genetics & development*. 2000;10(1):39-46. Epub 2000/02/19.
- [164] Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell*. 2004;14(4):501-13. Epub 2004/05/20.
- [165] Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nature chemical biology*. 2007;3(10):640-9. Epub 2007/09/19.
- [166] Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(3):254-60. Epub 2006/04/18.
- [167] Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Human molecular genetics*. 2005;14 Spec No. 2:R191-6. Epub 2005/10/26.
- [168] Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature genetics*. 2000;26(4):447-50. Epub 2000/12/02.
- [169] Shay JW, Wright WE. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(7):577-84. Epub 2006/06/15.
- [170] Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001;107(1):67-77. Epub 2001/10/12.
- [171] Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(20):9082-6. Epub 1995/09/26.
- [172] Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutation research*. 1996;366(1):45-63. Epub 1996/10/01.
- [173] Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 1996;14(2):239-48. Epub 1996/03/01.
- [174] Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*. 1997;90(1):182-93. Epub 1997/07/01.
- [175] Wang JC, Warner JK, Erdmann N, Lansdorp PM, Harrington L, Dick JE. Dissociation of telomerase activity and telomere length maintenance in primitive human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(40):14398-403. Epub 2005/09/21.
- [176] Sekulovic S, Gylfadottir V, Vulto I, Gasparetto M, Even Y, Brookes C, et al. Prolonged self-renewal activity unmasks telomerase control of telomere homeostasis and function of mouse hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011;118(7):1766-73. Epub 2011/07/07.
- [177] Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009;460(7251):66-72. Epub 2009/07/03.
- [178] Calado RT, Yewdell WT, Wilkerson KL, Regal JA, Kajigaya S, Stratakis CA, et al. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood*. 2009;114(11):2236-43. Epub 2009/06/30.
- [179] Gammaitoni L, Weisel KC, Gunetti M, Wu KD, Bruno S, Pinelli S, et al. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. *Blood*. 2004;103(12):4440-8. Epub 2004/01/17.
- [180] Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, et al. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(4):1239-47. Epub 2000/04/25.
- [181] Zhao J, Bilsland A, Jackson K, Keith WN. MDM2 negatively regulates the human telomerase RNA gene promoter. *BMC cancer*. 2005;5:6. Epub 2005/01/20.
- [182] Li H, Lee TH, Avraham H. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(23):20965-73. Epub 2002/03/28.
- [183] Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002;100(5):1611-8. Epub 2002/08/15.

- [184] Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2002;8(5):257-60. Epub 2002/06/18.
- [185] Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet journal of rare diseases*. 2007;2:35. Epub 2007/09/06.
- [186] Martino R, Romero P, Subira M, Bellido M, Altes A, Sureda A, et al. Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. *International Bone Marrow Transplant Registry. Bone marrow transplantation*. 1999;24(3):283-7. Epub 1999/08/24.
- [187] Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38. Epub 1990/12/15.
- [188] Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000;96(8):2717-22. Epub 2000/10/07.
- [189] Orschell-Traycoff CM, Hiatt K, Dagher RN, Rice S, Yoder MC, Srouf EF. Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood*. 2000;96(4):1380-7. Epub 2000/08/15.
- [190] Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(2):253-64. Epub 2000/01/19.
- [191] Giet O, Huygen S, Beguin Y, Gothot A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitor cells increases very late antigen-5-mediated adhesion to fibronectin. *Experimental hematology*. 2001;29(4):515-24. Epub 2001/04/13.
- [192] Hao YW, Cheng DY, Zhou WL, Ma YR, Wang YT. [Effect of various oxygen concentrations on biological function of human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology*. 2010;18(4):997-1001. Epub 2010/08/21.