

DIPLOMARBEIT

Alterung hämatopoetischer Stammzellen

Ergebnisse aus einem Langzeitexpansionsmodell

eingereicht von
Lukas Schinagl

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr.med.univ)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz,

Abteilung für Pädiatrische Hämatookologie,

am

Institut für Pathophysiologie und Immunologie,

Medizinische Universität Graz,

sowie am

Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik,

Universitätsklinikum Graz

Erstbetreuer

Ao.Univ.Prof. Dr.med.univ. Wolfgang Schwinger

Zweitbetreuerin

Univ.Ass.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿmed.univ. Ingeborg Stelzer

Graz, am 08.01.2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich 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 und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am **08.01.2015**

Lukas Schinagl eh

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schwinger für die Möglichkeit bedanken, dass ich ein Teil dieser Arbeitsgruppe sein durfte und an diesem spannenden Projekt mitarbeiten konnte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ingeborg Stelzer für ihr außerordentliches Engagement und die herzliche Betreuung in jeder Phase des Projektes.

Ich bedanke mich bei Mag. Dr. Robert Fuchs für die kompetente Beantwortung unzähliger Fragen und der Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeit.

Bei den biomedizinischen Analytikerinnen Elvira Kloibhofer, Andrea Raicht und Nathalie Allard möchte ich mich für ihre großartige Arbeit bei der Zellkultur und bei genetischen Analysen bedanken.

Mein Dank gilt auch Univ. Prof. Dr. Joachim Greilberger für die Unterstützung bei der Messung der oxidativen Stressparameter.

Weiters möchte mich auf diesem Wege bei meiner Mutter Mag. Susanne Ibrahim, bei meinem Vater Ing. Günter Schinagl und bei meiner Großmutter Monika Elmecker bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich in all meinen Vorhaben unterstützt haben.

Außerdem gilt meiner Partnerin Alexandra Lumpi meine aufrichtige Dankbarkeit für ihre liebevolle und aufopfernde Unterstützung während der letzten Jahre.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	i
Danksagung	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis.....	x
Tabellenverzeichnis.....	xi
Zusammenfassung.....	xii
Abstract.....	xiv
1 Einleitung	1
1.1 Stammzelltransplantation	3
1.2 Hämatopoese	7
1.3 Telomere und Telomerase	10
1.4 SNEV	11
1.5 Oxidativer Stress	13
1.6 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Zellmaterial und Kultur	17
2.1.1 Isolation	18
2.1.2 Separierung von CD34+ Zellen	19
2.1.3 Primäransatz und Passagierung.....	20
2.2 Zellzahl und Linage-Marker	21
2.3 Colony-Forming-Cell-Assay	22
2.3.1 Primärer Ansatz	22
2.3.2 Sekundärer Ansatz	23
2.4 Comet Assay	25

2.5	Carbonylierte Proteine.....	27
2.5.1	Lyse	27
2.5.2	Carbonylproteine – ELISA	27
2.5.3	Gesamtproteine	28
2.6	Senescence Evasion Factor.....	30
2.6.1	Isolierung der RNA	30
2.6.2	Transskription zu cDNA	31
2.6.3	Real-Time-PCR	32
2.7	Telomerlänge und Telomeraseaktivität	35
2.7.1	Telomeraseaktivität.....	35
2.7.2	Telomerlänge.....	38
2.8	Cyclinexpression	40
2.8.1	Isolation der RNA.....	40
2.8.2	cDNA-Synthese	40
2.8.3	quantitative RT-PCR.....	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	HSC07.....	43
3.1.1	Gesamtleukozyten	43
3.1.2	Expression der Oberflächenantigene.....	44
3.1.3	Colony-Forming-Units.....	47
3.1.4	Comet-Score.....	48
3.1.5	Senescence-Evasion-Factor.....	48
3.1.6	Carbonyl-Proteine.....	49
3.1.7	Telomerlänge und Telomeraseaktivität.....	50
3.1.8	Cyclinexpression.....	51
3.2	HSC14.....	53
4	Diskussion	58

4.1	Monosomie bei HSC14	63
4.2	Limitationen und Ausblick.....	66
5	Literaturverzeichnis.....	68
6	Anhang	76
6.1	Reagenzien, Medien und Puffer.....	76

Abkürzungsverzeichnis

A C G T	Adenosin Cytosin Guanosin Thymidin
A. Bidest.	Aqua bidestillata
ACDA	Acid-Citrat-Dextrose-Lösung A
AKT	Proteinkinase B
ATM	Ataxia-Teleangiektasia-mutated-Protein
ATR	Ataxia-Teleangiectasia-and-RAD3-related Protein
ATRIP	ATR-interacting-Protein
amol	Attomol
BCA	Bicinchinonsäure
BCAS2	Breast-carcinoma-amplified sequence 2
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Diffentiation
CDC	Cell-division-cycle 5-like-Protein
CDK	Cyclin-depended-Kinase
CHK1	Checkpoint-Kinase 1
cm ²	Quadratzenimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
cDNA	complementary DNA
CMF-PBS	Calcium-Magnesium-Free-Phosphate-Buffered-Saline

CMV	Cytomegalievirus
Cq	quantification cycle
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECD	Phycoerythrin-Texas Red
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EPO	Erythropoetin
FACS	Flourescence-activated-cell-sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxO	Forkhead Box O
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
GvHD	Graft versus Host disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
H2AX	Variante des Histons H2A
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	Hematopoietic Stemcell
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
HSPZ	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Lin ⁻	Linage-negative
Log ₂	Logarithmus dualis

MACS	Magnetic-activated-cell-sorting
mA	Milliampere
Min.	Minute
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLP	Multipotente-lymphatische-Progenitorzelle
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MNZ	Mononukleäre Zelle
MPP	Multipotente Progenitor Zellen
mRNA	Messenger RNA
nm	Nanometer
NTC	non-template-control
P	Passage
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PLRG1	Pleiotropic Regulator 1
pmol	Pikomol
PRR	Pattern-recognition-rezeptor
Rb-Familie	Retinoblastomfamilie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication-Protein
RPLP0	ribosomal protein P0

RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RTA	Relative Telomeraseaktivität
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion
sek.	Sekunde
SNEV	Senescence-Evasion-Factor
SOD	Superoxiddismutase
syn	Synonym
TERC	Telomerase-RNA-Component
TERT	Telomerase-Reverse-Transscriptase
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAP	Telomeric repeat amplification Protocol
UV	Ultraviolett
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Hämatopoese	8
Abbildung 2: Kolonie	22
Abbildung 3: Comet-Assay	25
Abbildung 4: HSC07 – Wachstumskurve	43
Abbildung 5: HSC07 – x-fache Vermehrung im zeitlichen Verlauf.....	44
Abbildung 6: HSC07 – Expression der Stammzellmarker	45
Abbildung 7: HSC07 – Expression der Linagemarker	46
Abbildung 8: HSC07 – Colony-Forming-Units-Assay	47
Abbildung 9: HSC07 – Cometscore.....	48
Abbildung 10: HSC07 – SNEV-Expression	49
Abbildung 11: HSC07 – Carbonylierte Proteine	49
Abbildung 12: HSC07 – Telomeraseaktivität und Telomerlänge	50
Abbildung 13: HSC07 – Cyclinexpression	51
Abbildung 14: HSC07 – Cyclinexpressionsänderung je Woche	52
Abbildung 15: HSC14 – fiktive Gesamtzellzahl	53
Abbildung 16: HSC14 – Wachstum pro Woche.....	54
Abbildung 17: HSC14 – primärer CFU – Assay.....	54
Abbildung 18: HSC14 – Expressionsvergleich Beta-Actin und Cyclin B1.....	55
Abbildung 19: HSC14 – Cyclinexpression	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper Durchflusszytometrie	21
Tabelle 2: Mastermix der cDNA-Synthese je Probe.	31
Tabelle 3: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese	32
Tabelle 4: Mastermix der qRT-PCR je Probe	33
Tabelle 5: Temperaturschema RT-PCR	34
Tabelle 6: Temperaturschema TRAP-Assay und PCR.....	36
Tabelle 7: Mastermix cDNA-Synthese.....	40
Tabelle 8: Temperaturprogramm cDNA-Synthese	41

Zusammenfassung

Bei Hämatopoetischen Stammzelltransplantationen, welche das Mittel der Wahl zur Behandlung einiger maligner Erkrankungen des hämatologischen Formenkreises sind, konnte festgestellt werden, dass das Alter des Spender/ der Spenderin einen wichtigen Prognosefaktor darstellt, der über Erfolg oder Misserfolg der Therapie entscheiden kann. Dies wiederum impliziert, dass auch das Hämatopoetische System altert.

Die ex-vivo Expansion von Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HPSZ) führt zu einer deutlichen Proliferation, welche einen Stressfaktor für die HPSZ darstellt und eine zunehmende Alterung des Hämatopoetischen Systems bedingt. Aus diesem Grund diente in der vorliegenden Studie die Langzeitexpansion als Modell für das Altern von Hämatopoetischen Stammzellen.

Aus Nabelschnurblut wurden Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) isoliert und in einer Stroma-freien Umgebung für 25 Wochen kultiviert. In dieser Zeit haben sich die Zellen um den Faktor $6,28 \times 10^7$ vermehrt. Wöchentlich wurden Zellen passagiert und dabei CD34-positive Zellen separiert und hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht.

Das Augenmerk fiel dabei auf Telomerlänge und Telomeraseaktivität, die Expression des Senescence-Evasion-Factors (SNEV), das Auftreten von DNA-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie der Anteil an carbonylierten Protein als Maß für oxidativen Stress. Um abschätzen zu können, in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Mehrheit der Zellen befindet wurde die Expression der Cycline A, B1, C, D1, D3, und E bestimmt. Im Colony-Forming-Unit-Assay (CFU-Assay) wurde die proliferative Kapazität der Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, anhand der Fähigkeit sekundäre Kolonien zu bilden, gemessen.

Im Verlauf der Kultur konnte eine Abnahme der stammzellspezifischen Oberflächenmarker und ein Anstieg der linienspezifischen Oberflächenmarker festgestellt werden, was auf eine vermehrte Differenzierung rückschließen lässt.

Weiters zeigten die HSPZ eine Abnahme der Zellvermehrung, eine Verminderung der proliferativen Kapazität und eine Verkürzung der Telomerlänge, welche auf eine Alterung der HSPZ im Laufe der Kultur schließen lässt.

Bei einer weiteren Probe, welche über 46 Wochen in Kultur gehalten werden konnte und sich um den Faktor $1,15 \times 10^{12}$ vermehrt hat, konnte eine Monosomie 7 festgestellt werden.

Diese und weitere Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Mechanismen des Alterns des Hämatopoetische Systems zu verstehen und künftig gezielte Gegenmaßnahmen entwickeln zu können.

Abstract

In hematopoietic stem cell transplantations, which are the therapy of choice for many hematologic malignancies, the donor-age has been identified as an important prognostic factor, which can decide between success and failure of the therapy. This implicates, that the hematopoietic system is subjected to aging.

The ex-vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells leads to a high proliferative stress, which induces senescence of the hematopoietic system. For that reason the long-term-expansion of the hematopoietic stem and progenitor cells serves a model for aging.

Cord-blood-derived hematopoietic stem- and progenitor cells has been isolated and cultivated in a stroma-free culture for 25 weeks. During this time, the cells have been multiplied by a factor of 6.28×10^7 . Weekly, CD34+-cells has been separated and analyzed regarding different parameters. The focus was placed on telomere-length, telomerase-activity, the expression of the senescence-evasion-factor (SNEV), DNA-double- and single-strand breaks as well as on the amount of carbonylated proteins, which predicts oxidative stress. To test the phase of the cell cycle, the expression of the cyclins A, B1, C, D1, D3 and E have been measured. Using the Colony-Forming-Unit-Assay (CFU-Assay), the proliferative capacity of hematopoietic stem- and progenitor cells, on the basis of the ability to form secondary colonies, has been measured.

During the culture a decrease of stem-cell-specific markers and an increase of lineage-specific markers have been seen, indicating an increased differentiation of the cells. In addition the HSPC showed a decrease of proliferative capacity and a shortening of telomere-length, which implicates the aging of the HSPC during the long-term-expansion.

Another sample, that has been cultivated more than 46 weeks with a proliferation-factor of $1,15 \times 10^{12}$, developed a monosomy 7.

The aim of this and further investigations is to help to get a better understanding of the mechanisms of aging in the hematopoietic system to create strategies to counteract in the future.

1 Einleitung

Das Hämatopoetische System des Menschen ist großen Herausforderungen unterworfen. Aufgrund der teilweise kurzen Lebenszeit der reifen Effektorzellen, wie zum Beispiel die Erythrozyten mit einer Lebensdauer von 120 Tagen oder die neutrophilen Granulozyten mit einer Lebensdauer von ein bis vier Tagen, ist es Schätzungen zufolge nötig im Laufe eines Lebens etwa 4×10^{15} Blutzellen zu produzieren.[1] Es ist nicht verwunderlich, dass eine derartige Expansion ihre Spuren hinterlässt und das blutbildende System altern lässt.

Doch was ist Alterung und was bedingt sie? Gewiss ist sie ein multifaktorieller Prozess, dessen Entstehung und Bedeutung Gegenstand vieler Diskussionen der letzten Jahrzehnte war. Irvin M. R. Rose definierte Alterung als: „[...] *a persistent decline in the age-specific fitness components of an organism due to internal physiological deterioration.*“.[2] Den Verfall der physiologischen Prozesse hat Rose später um den Begriff der Adaptation aus evolutionsbiologischer Sicht erweitert.[3]

Die Tatsache, dass Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) an Funktionalität und Proliferationskapazität einbüßen, ohne dabei ihre phänotypischen Merkmale zu verlieren, könnte Ausdruck eines Mechanismus sein, der darauf abzielt, Entartungen zu verhindern.[4]

Die verminderte Funktionalität und Proliferationskapazität von Zellen, ist ein Phänomen das auch replikative Seneszenz genannt wird. Leonard Hayflick prägte diesen Begriff und postulierte, dass eine Zelle maximal 50 Teilungen durchlaufen kann.[4] Seither wird diskutiert, ob dieses sogenannte Hayflick-Limit für alle Körperkompartimente (inklusive der Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen) anwendbar ist.

Ein mathematisches Modell zeigte, dass die lebenslange Hämatopoese mit den Einschränkungen der replikativen Seneszenz vereinbar ist. Die Voraussetzung dafür ist aber eine niedrige Zellteilungsrate der HSPZ und ein hoher Anteil an self-renewal. Um lebenslang einen adäquaten Pool an HSPZ aufrecht zu erhalten, muss sogenanntes self-renewal stattfinden. Hierbei handelt es sich um Teilungen von HSPZ bei der sie ihre ursprünglichen Eigenschaften behalten.[1]

Die Zellkomponenten werden im Laufe der Zeit durch endogene und exogene Faktoren geschädigt, wodurch die Zelle ihre physiologische Funktion verliert und somit altert. Als Ursache für die Zellschädigung kommen etwa DNA-Schäden infolge von oxidativem Stress infrage.[5], [6]

Die Alterung des Hämatopoetischen Systems zeigt sich zum Beispiel im vermehrten Auftreten von Erkrankungen, wie dem Myelodysplastischen Syndrom.[7] Es existieren Hinweise, dass Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen im Alter eher in die myeloide Linie differenzieren. Die Veränderung der Differenzierungsmuster in Richtung Myelopoese könnte maßgeblich für die Häufung von myeloiden Erkrankungen im Alter sein.[8]

1.1 Stammzelltransplantation

Die Alterung des Hämatopoetischen Systems hat auch Auswirkungen in der Stammzelltransplantation. Studien zeigten, dass einer der wesentlichen Faktoren für das längerfristige Überleben von EmpfängerInnen von Stammzelltransplantationen das Alter des Spenders/ der Spenderin ist. Beispielsweise ist das schlechtere Engraftment des Spendermaterials ein Grund für das schlechtere Outcome und verdeutlicht, dass Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) im Alter an Funktionalität beziehungsweise Proliferationskapazität verlieren.[9]

HSPZ können aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blut oder der Nabelschnur eines Neugeborenen gewonnen werden.

Die allogene Stammzelltransplantation ist die Therapie der Wahl vieler Erkrankungen des hämatologischen Formenkreises.[10],[11] Mögliche Komplikationen sind unter anderem ein verspätetes, respektive fehlendes Engraftment oder die Manifestation einer Graft-versus-Host-Disease (GVHD).[12]

Um eine Graft-versus-Host-Disease zu vermeiden, ist es notwendig eine/n SpenderIn zu finden, dessen HLA-Merkmale mit denen des Empfängers/ der Empfängerin übereinstimmen. Durch fehlende Übereinstimmung der HLA-Merkmale stieg das Risiko an einer akuten GVHD zu erkranken.[9]

Die Graft-versus-Host-Disease ist eine Immunreaktion, welche in 40-50% aller allogenen Stammzelltransplantationen auftritt. Die akute Graft-versus-Host-Disease manifestiert sich hauptsächlich in Lunge, Haut, Leber und nicht zuletzt dem Gastrointestinaltrakt und wird unter anderem über pattern-recognition-receptors (PRR) vermittelt. Da oben erwähnte Organe von kommensalen Keimen besiedelt sind, liegt der Verdacht nahe, dass die Keimflora ebenfalls eine wichtige Rolle bei der GvHD spielen könnte. Insbesondere, da durch die vorangegangene Chemo- und oder Strahlentherapie die Barrierefunktion dieser Organe beeinträchtigt wird, können die Pathogen-assoziierten-molekularen-Muster der Keime über PRR der Spenderzellen erkannt werden. Dadurch und durch die Freisetzung von ATP und Harnsäure aus den untergegangenen Darmepithelzellen

werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) freigesetzt und die Entzündungsreaktion initiiert. Eine zentrale Rolle bei der nachfolgenden Immunreaktion nehmen dabei die T-Zellen des Spendermaterials ein. Eine prophylaktische Antibiose hat sich als wirksam erwiesen die GvHD-Rate zu senken.[11] Die Wahrscheinlichkeit eine GvHD zu entwickeln, kann zudem durch verschiedene Techniken wie etwa CD34+-Selektion oder CD3/CD19-Ablation minimiert werden.[13]

Die Eradikation der entarteten Zellen wurde früher alleinig der myeloablativen Chemotherapie beziehungsweise der Bestrahlung zugeschrieben. Eine nicht zu vernachlässigende Komponente der Therapie stellt allerdings die Immunreaktion des Spendermaterials gegen residuale Tumorzellen dar.[10] Für die sogenannte Graft-versus-Leukemia-Reaktion (GvL), bei der residuale Tumorzellen angegriffen werden, werden ähnliche Pathomechanismen wie für die Graft-versus-Host-Disease vermutet.[11] Die Immunsosuppressive Therapie, um eine Graft-versus-Host-Disease zu behandeln respektive zu vermeiden, stellt daher einen Balanceakt dar.

Die Wahrscheinlichkeit eine/n KnochenmarksspenderIn mit einer akzeptablen HLA-Übereinstimmung in der Familie zu finden liegt mancherorts bei unter 30 Prozent.[14] Geschwisterspenden haben den Vorteil einer höheren Übereinstimmungsrate des HLA-Muster von 25 Prozent.[15] Die Stammzelltransplantation von nicht verwandten SpenderInnen bietet eine Alternative, welche allerdings eine genaue Übereinstimmung der HLA-Merkmale von SpenderIn und EmpfängerIn erfordert, um eine GvHD zu vermeiden.[14] Bei Transplantation aus Nabelschnurblut müssen SpenderIn und EmpfängerIn nicht exakt in ihren HLA-Merkmalen übereinstimmen.[16]

Bei der Transplantation von Nabelschnurblut gilt eine Übereinstimmung von vier bis fünf HLA-Merkmalen (von insgesamt sechs) als akzeptabel. Außerdem ist das Risiko einer Übertragung von Epstein-Barr-Virus (EBV) oder des Cytomegalievirus (CMV), welche bei immundefizienten EmpfängerInnen schwere Komplikationen verursachen können, deutlich geringer.[17] Sollten PatientInnen jedoch Probleme mit Infektionen von EBV oder CMV gehabt haben, sollte der Einsatz einer

Nabelschnurbluttransplantation jedoch überdacht werden, da keine passive Immunität übermittelt wird.[12] Weitere Vorteile sind die einfache Handhabung der Entnahme und die Möglichkeit einer Cryokonservierung.[18]

Die erste Stammzelltransplantation aus Nabelschnurblut wurde im Jahr 1988 bei einem 5-jährigen Patienten mit aplastischer Anämie infolge einer Fanconi Anämie durchgeführt. Das Spendermaterial stammte von seiner Schwester.[19]

Es wurden weltweit über 20.000 Nabelschnur-Transplantationen durchgeführt.[17] Im Vergleich zur Knochenmarkstransplantation werden bei Kindern mit der Transplantation von Nabelschnurblut zum Teil vergleichbare Ergebnisse erzielt.[16] Die Menge an Stammzellen/Progenitorzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen werden kann, ist im Vergleich zu Knochenmarkspunktionen oder der Stammzellapherese aus dem peripheren Blut allerdings begrenzt. So reicht eine Nabelschnurblutspende meist nicht aus, um das Hämatopoetische System einer erwachsenen Person wiederherzustellen. Das Problem dabei ist das verspätete beziehungsweise ausbeliebende Engraftment des Spendermaterials.[12],[18] Zudem besteht im Falle eines ausbeliebenden Engraftments keine Möglichkeit auf die/den SpenderIn zurückzugreifen und eine erneute Spende anzustreben.[12]

Aus diesen Gründen besteht das Interesse, die Effizienz von Nabelschnurbluttransplantationen zu erhöhen. Dies wird unter anderem durch eine intraossäre Injektion des Spendermaterials versucht, um das Homing zu verbessern. Es werden doppelte beziehungsweise mehrfache Transplantationen durchgeführt, um eine adäquate Menge an Stammzellen zur Verfügung zu haben. Jedoch wurden höhere Raten an Graft-versus-Host-Disease bei doppelten Nabelschnurblut-transplantationen beobachtet.[20]

Des Weiteren werden Möglichkeiten der ex-vivo Expansion mit dem Einsatz von Cytokinen untersucht, um die Menge an verfügbarem Material zu erhöhen und damit ein früheres Engraftment zu erreichen.[14],[16],[18]

Die ex-vivo Expansion wurde auch in einer Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen mit nachfolgender Transplantation in Kombination mit unbehandeltem Nabelschnurblut durchgeführt. Das frühere Engraftment, das

dabei beobachtet wurden, könnte durch Wachstumssignale der mesenchymalen Stammzellen erklärt werden.[21]

Die Nabelschnurbluttransplantation stellt eine Alternative zur Knochenmarkstransplantation dar, wenn kein/e passende/r SpenderIn verfügbar ist.[16], [22]

Durch die Naivität des Nabelschnurblutes sind teils geringere Raten der Graft-versus-Host-Disease zu beobachten. Beim Auftreten der Graft-versus-Leukemia-Reaktion, welche für eine dauerhafte Remission von immenser Bedeutung ist, konnte in einer kürzlich erschienenen wissenschaftlichen Arbeit kein nennenswerter Unterschied zwischen den verschiedenen Stammzellquellen festgestellt werden.[23]

1.2 Hämatopoese

Die Hämatopoese des Menschen wird von den meisten Autoren mit einer hierarchischen Struktur erklärt, welche von einer Hämatopoetischen Stammzelle ausgeht. Eine Hämatopoetische Stammzelle wird als solche bezeichnet, wenn sie zum einen in der Lage ist self-renewal zu betreiben und zum anderen, wenn sie sich zu jeder der verschiedenen Blutzellen differenzieren kann.[24]

Ausgehend von diesen HSZ entwickeln sich Multipotente-Progenitorzellen (MPP), welche weiterhin nicht linienspezifisch sind. Die MPP wiederum differenzieren zu linienspezifischen Progenitorzellen und teilen somit die Hämatopoese in eine myeloische und eine lymphatische Reihe. Die myeloische Reihe besteht aus kurzlebigen Effektorzellen wie Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen, während die lymphatische Reihe aus T-, B- und NK-Zellen besteht, welche die angeborene und erworbene Immunantwort vermitteln.[25]

Ein Problem in der Stammzellforschung ist die genaue Identifikation der verschiedenen Zwischenstufen der Hämatopoese.

Die unterschiedlichen Zellen der Hämatopoese werden durch ihre Oberflächenantigene definiert. Der Phänotyp der einzelnen Zwischenstufen ist noch nicht restlos geklärt und somit Gegenstand aktueller Forschungen. Zudem deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass dieses streng hierarchische Modell nicht vollständig zutrifft. Frühe lymphatische Progenitorzellen, welche auch Zellen der myeloischen Reihe bilden könnten, wie zum Beispiel Monozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen, werden auch multipotente lymphatische Progenitoren (MLP) genannt. Der Verlust des lymphoiden Proliferierungspotenzials wird als erster Differenzierungsschritt angenommen.[25],[26],[27]

Progenitorzellen differenzieren schließlich über Zwischenstufen zu den reifen Effektorzellen (siehe Abbildung 1).[25]

Die Isolierung von Hämatopoetischen Stammzellen erfordert zunächst das Exkludieren von Zellen, welche Oberflächenmarker von differenzierten Blutzellen besitzen (z.B.: CD2, CD3, CD14, CD24, CD16, CD19 und CD56).

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen tragen keine dieser Oberflächenmarker und werden daher als lineage negative (Lin^{-}) bezeichnet. Zusätzlich ist CD34 auf diesen Zellen zu finden.[28]

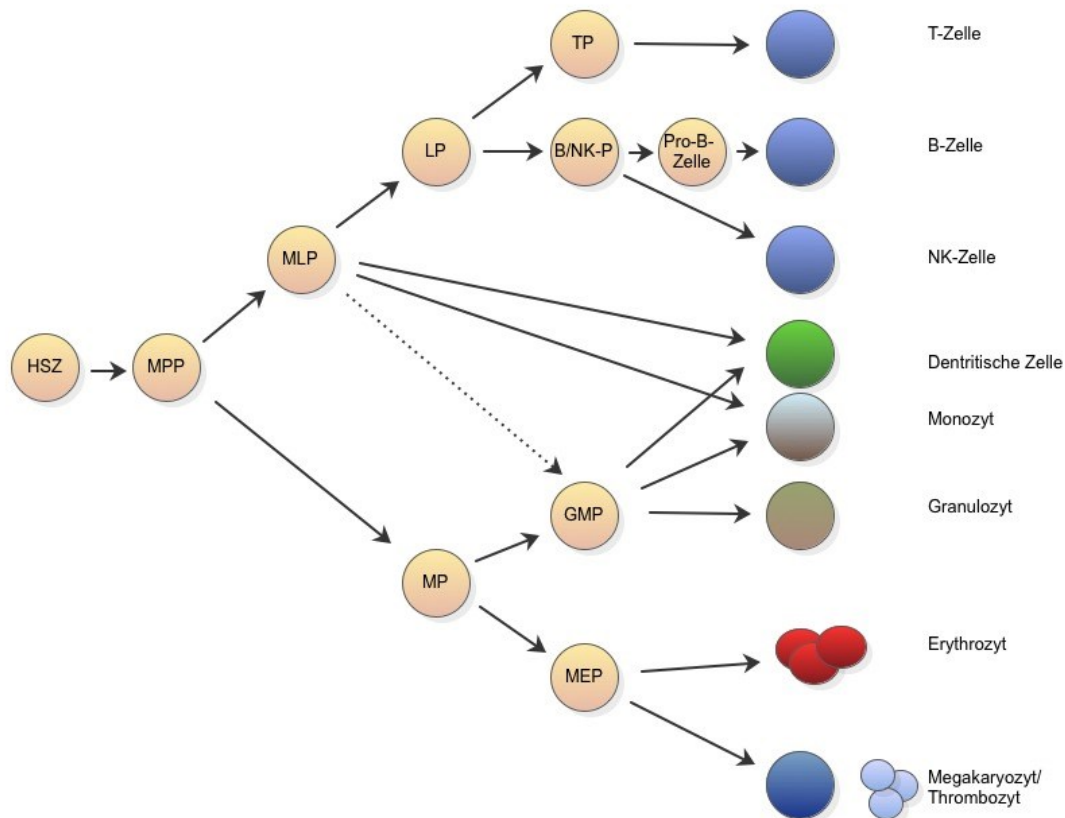


Abbildung 1: Schema der Hämatopoese

Die Abbildung zeigt ein Schema der frühen Hämatopoese. Nicht alle Zwischenstufen sind dargestellt. Die gestrichelte Linie deutet an, dass die MLP auch in Zellen der myeloischen Reihe differenzieren kann. **HSZ** – Hämatopoetische Stammzelle; **MPP** – Multipotente Progenitorzelle; **MLP** – Multipotenter lymphatischer Progenitor; **LP** – Lymphatischer Progenitor; **TP** – thymischer Progenitor; **B/NK-P** – Progenitor der NK und B-Zelle; **MP** – Myeloischer Progenitor; **GMP** – Progenitor der Granulozyten und Monozyten, **MEP** – Progenitor der Erythrozyten und Megakaryozyten; modifiziert nach [25]

CD34 ist ein Transmembranprotein, welches neben Podocalyxin und Endoglycan der CD34-Familie angehört. Es wird auf Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aber auch in Stammzellen anderer Gewebe exprimiert. Außerdem ist es unter anderem in vaskulären Endothelzellen, Fibrozyten oder Mastzellen zu finden. Die multiplen Funktionen, die CD34 zugeschrieben werden, sind noch nicht restlos geklärt. Am besten ist die Funktion bei der

Lymphozytenadhäsion beschrieben. CD34 respektive Podocalyxin binden an L-selectin der naiven Lymphozyten um in weiterer Folge ins sekundäre Lymphorgan migrieren zu können. Es werden der CD34-Familie aber noch weitere Aufgaben, wie etwa im Bereich des Transportes von Hämatopoetischen Stammzellen zwischen Endothel und der Nische des Knochenmarkes oder bei der Differenzierung von Zellen, zugeschrieben.[29]

Auch CD133 ist auf frühen Hämatopoetischen Stammzellen zu finden. Im Vergleich zu CD133-negativen Zellen haben CD133-positive Zellen hohes proliferatives Potential und können in alle Zellen der Hämatopoese differenzieren. Die meisten CD133+ -Zellen exprimieren gleichzeitig CD34 lediglich ein geringer Anteil ist CD133+/CD34-. Es existieren Hinweise, dass CD133+-Zellen aus dem Nabelschnurblut auch in andere, nicht dem Hämatopoetischen System zugehörigen Zellen, differenzieren können.[30]

Eine weitere Unterscheidung ist anhand des CD38-Antigens möglich. Die Stammzellen und frühe Progenitoren (MPP und MLP) tragen kein CD38 an der Oberfläche, spätere Progenitoren hingegen schon. Ebenso konnte auf späteren Progenitoren CD45RA gefunden werden.[31]

Baum et al. konnten eine Subpopulation von fetalen Knochenmarkszellen identifizieren, welche hohe Progenitoraktivität für die myeloerythroide Linie, als auch für B- und T-Zellen zeigte. Diese trugen CD34 und CD90 (Thy-1) an der Oberfläche.[28]

Für die Identifizierung von Hämatopoetischen Stammzellen scheint also der Phänotyp CD34⁺/CD38⁻/CD90⁺/CD45RA⁻ geeignet zu sein.[31]

1.3 Telomere und Telomerase

Bei der Alterung und der genetischen Integrität einer Zelle spielen die Telomere eine bedeutende Rolle.

Sie bestehen aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen und finden sich an den Enden der Chromosomen wieder. In normalen somatischen Zellen bedingt jede Zellteilung eine Verkürzung der Telomere, welche in menschlichen Zellen normalerweise zwischen zwei und fünfzehn Kilobasenpaare lang sind. Jede Teilung bedingt den Verlust von etwa 50 bis 100 Basenpaare. Dieser Verlust ist hauptsächlich darin begründet, dass die Enden der Chromosomen nicht vollständig abgelesen und somit nicht repliziert werden können.[32] Erreichen die Telomere eine kritische Länge führt dies zu einer Apoptoseinduktion. Der Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und dem proliferativen Potential von HSPZ ist noch nicht restlos geklärt. Untersuchungen zeigten eine gesteigerte Proliferationskapazität von erythroiden Vorläuferzellen bei längeren Telomerabschnitten, oder bei Megakaryozyten. Exzessive Verkürzungen von Telomeren von HSPZ wurden bei hämatologischen Erkrankungen, wie dem Myelodysplastischen Syndrom, der aplastischen Anämie oder der Fanconi-Anämie gefunden, was den Verdacht hegt, dass die replikative Seneszenz der HSPZ für diese Erkrankungen prädisponiert.[33]

Der Ribonukleoproteinkomplex Telomerase ist in der Lage diese verkürzten Telomerabschnitte wieder zu verlängern. Telomerase besteht aus dem RNA-Anteil Telomerase-RNA-Component (TERC) und dem Proteinanteil Telomerase-Reverse-Transcriptase (TERT). Das aus 1132 Aminosäuren bestehende Protein TERT nutzt die im Proteinkomplex enthaltene RNA als Vorlage, um verkürzte Telomerabschnitte wieder herzustellen.

Eine Aktivität von Telomerase ist in normalen menschlichen Zellen nicht nachweisbar. Embryonale Stammzellen und Gameten, aber auch über 90% aller menschlichen Tumore nutzen die Telomerase um der Apoptose zu entgehen.[32]

1.4 SNEV

Mahajan und Mitchell identifizierten 2003 hPSO4 als ein hochkonserviertes Gen, welches eine Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt. Das Genprodukt SNEV (syn. hPSO4, PRP19) ist ein 55kD-schweres Protein das ubiquitär exprimiert wird und ist homolog zu PSO4, welches zuvor aus *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert wurde.[34]

Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine U-Box, weshalb von einer Funktion beim pre-RNA-Splicing durch die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität der U-Box ausgegangen wird.[35]

Bei gamma-Bestrahlung von menschlichen Fibrozyten, beziehungsweise durch deren Behandlung mit Zellgiften wie Cisplatin, konnte eine Hochregulierung von SNEV beobachtet werden, während der Einsatz von UV-Strahlung keinerlei Effekte zeigte. Analog dazu kam es bei verminderter Expression durch siRNA zur Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen und zu einer Steigerung der Apoptoserate. Dies führt zur Erkenntnis, dass auch dem humanen PSO4/SNEV eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zukommt.[34] Der genaue Mechanismus ist noch nicht restlos geklärt.

Kürzlich konnte eine Interaktion des PSO4-Komplexes (bestehend aus hPSO4/SNEV, CDC5L, PLRG1 und BCAS2) mit dem Replication-Protein A (RPA) gezeigt werden. Bei diesem Modell ist SNEV an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt. Die Bindung des RPA-Komplexes, bestehend aus RPA1, RPA2 und RPA3, an einzelsträngige DNA-Abschnitte führt zur Akkumulation von ATR (Ataxia teleangiectasia-mutated and Rad3 related Protein) an den Stellen der DNA-Schäden. Dadurch kommt es zur CHK1-Aktivierung und zur konsekutiven Initiierung des DNA-Damage-Response. Zum einen soll dafür die Phosphorylierung von RPA1 durch BCAS2 verantwortlich sein. Zum anderen führt die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von SNEV zur Ubiquitinierung des RPA, wodurch es zur Akkumulation des ATR-interacting-Proteins (ATRIP) kommt.[35], [36] Durch die Akkumulation des ATR/ATRIP-Komplexes kommt es zu einer CHK1-Aktivierung und der konsekutiven Initiierung der DNA-Reparatur.[35]

Hohe Expressionen von SNEV sind mit einem hohen Teilungspotential und einer hohen self-renewal-Kapazität assoziiert. In Relation zu Lymphozyten des peripheren Blutes konnte in Lin⁻-Zellen des Knochenmarkes eine hohe Expression von SNEV gefunden werden. Im heterozygoten SNEV-Knockout-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von SNEV eng mit der Proliferationskapazität von Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen verbunden ist. Es wird angenommen, dass ein gewisser Schwellenwert an exprimiertem SNEV für die Aufrechterhaltung der self-renewal Kapazität notwendig ist.[37]

1.5 Oxidativer Stress

Der Oxidative Stress, dem die HSPZ ausgesetzt sind, scheint ebenso große Auswirkungen auf deren self-renewal Potential zu haben. ATM-defiziente (Ataxia-Teleangiectasia-mutated-Protein) Mäuse zeigten in einer Studie von Ito et al. vermindertes self-renewal. Erklärt wird diese Erkenntnis durch das vermehrte Aufkommen von ROS (reactive oxygen species), was zu einer Überexpression von p16^{INK4a} führte. Über die folgende gehemmte Inaktivierung der Proteine aus der Rb-Familie (Retinoblastoma-Proteine) wird die Hemmung des self-renewals mediiert.[38]

Reactive-oxygen-species (ROS) sind aktive Moleküle, welche teils unpaare Elektronen beinhalten und als freie Radikale agieren können. ROS entstehen größtenteils als Nebenprodukt der Atmungskette, aber auch im Rahmen anderer metabolischer Prozesse und entzündlicher Prozesse. ROS beinhalten Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxidase, sowie Hydroxyl-Radikale.[39]

Am Komplex IV der Atmungskette werden 4 Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und mit 4 H⁺-Ionen zu zwei H₂O-Molekülen reduziert. Dabei kann es zur Bildung von ⁻O₂-Molekülen oder Superoxid-Anionen kommen. Diese Superoxid-Anionen werden zum Teil spontan, zum Teil über Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid konvertiert. Unter der Anwesenheit von Fe⁺ oder Cu⁺ kann Wasserstoffperoxid eine Fenton beziehungsweise Harber-Weiss-Reaktion erfahren und so zum hochreaktiven Hydroxyl-Radikal konvertiert werden.[6],[39] Das Hydroxyl-Radikal kann zu DNA-Schäden führen.[39]

HSPZ weisen eine geringe metabolische Aktivität auf, wodurch sie vor ROS-Akkumulationen einigermaßen geschützt sind, dennoch führt kontinuierlicher oxidativer Stress auf lange Sicht zu einer abnormen Hämatopoese.[6] Während massiv erhöhte Level an ROS zum Zelltod führen, kann ein moderat hoher Anteil DNA-Schäden zur Folge haben und in weiterer Folge kanzerogen wirken.[5]

ROS scheinen in die Entstehung von myeloischen Leukämien involviert zu sein. Das vermehrte Auftreten von ROS führt zu einer Apoptoseinduktion von NK und T-Zellen, wodurch sich AML-Zellen ungehindert duplizieren können. ROS könnten

insofern künftig ein Ziel antileukämischer Therapien darstellen.[5] An der Regulation von ROS sind unter anderem auch Mitglieder der Forkhead Box O (FoxO) – Familie von Transkriptionsfaktor maßgeblich beteiligt. Durch die Hochregulation der antioxidativen Enzyme Catalase und der Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), die in Mitochondrien zu finden sind, werden ruhende Hämatopoetische Stammzellen vor oxidativem Stress geschützt.[6],[40]

FoxO1, FoxO2, FoxO4 und FoxO6 sind am PI3K-AKT- Signalweg beteiligt, der in Antwort auf Wachstumssignale wie Insulin oder Growth-factor unter anderem über die Aktivierung von mTOR, Wachstum und Zellproliferation initiiert. FoxO wird von AKT direkt phosphoryliert um in weiterer Folge aus dem Kern geschleust und degradiert zu werden. In Abwesenheit von Stressestimuli verbleibt FoxO aktiv und bewirkt einen Zellzyklusarrest der unter anderem durch die Hemmung von Cyclin D und durch die Aktivierung von Cyclin G2, Cyclin B vermittelt wird.[41]

1.6 Zielsetzung

In der Literatur existieren Hinweise, dass auch die HSPZ altern und dass verschiedene Erkrankungen oder äußere Einflüsse zu einer vorzeitigen Alterung führen können.[8],[37],[42]

Die Durchführung einer Stammzelltransplantation und die zuvor durchgeführte Behandlung könnten somit eine Auswirkung auf das Altern und die Proliferationskapazität der HSZ haben. Es besteht aber die Möglichkeit, dass Mechanismen, die diesem Alterungsprozess entgegenwirken können, existieren. Das Ziel dieser Arbeit ist es die Alterungsmechanismen, aber auch mögliche Mechanismen gegen den Alterungsprozess von Hämatopoetischen Stammzellen zu identifizieren, um mögliche Einflussfaktoren zu erforschen, die der Alterung der HSPZ entgegen wirken.

Da es besonders in der Pädiatrie zu Stammzelltransplantationen kommt, bei dem das Alter des Spenders/ der Spenderin sehr viel höher als das Alter des Empfängers/ der Empfängerin ist[9], ist die Erforschung der Mechanismen, die eventuell diesem Alterungsprozess und damit verminderte Proliferationskapazität entgegen wirken könnten, von immenser Wichtigkeit, um zukünftige Strategien für die Stammzelltransplantation zu entwickeln.

In Langzeitkulturen von Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden) wurden verschiedene Parameter bestimmt, welche Rückschlüsse auf die Alterung, die Funktionalität/Profliferationskapazität und die Integrität der HSPZ erlauben.

Weiters wurden Parameter bestimmt, wie die Telomeraseaktivität oder SNEV, die möglicherweise dem Alterungsprozess entgegenwirken können.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Durchflusszytometrische Analyse zur Evaluierung der Vermehrung der Population sowie des Differenzierungsgrades

- ColonyFormingCell-Assay zur Feststellung des Proliferationspotentials und der Funktionalität, womit auf die self-renewal Kapazität rückgeschlossen werden kann
- Comet-Assay zur Detektion von DNA-Schäden
- Telomerlänge und Telomeraseaktivität
- Expression des Senescence-Evasion-Factors (SNEV)
- Der Anteil carbonylierten Proteine als Maß für oxidativen Stress
- Cyclinbestimmung

2 Material und Methoden

2.1 Zellmaterial und Kultur

Die Zellkultur, welche in dieser Arbeit diskutiert wird, trägt den Namen HSC 07 (hematopoietic stem cell). Des Weiteren wird diese Kultur mit den Ergebnissen von HSC 02 verglichen, welche bereits in der Diplomarbeit von Dr.med. Christian Rehnolt, zusammengefasst sind.[43]

Das Nabelschnurblut wurde im Rahmen von Spontangeburt oder sectiones caesarea an der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Graz aus der Vena umbilicalis entnommen (Ethikkommissionsvotum EK-Nummer: 21-197 ex 09/10).

Vor der Abnahme wurde von der jeweiligen Mutter das Einverständnis für die weiterführende Verarbeitung und wissenschaftliche Verwendung des Blutes eingeholt (informed consent Nabelschnurblut). Ein Einschlusskriterium war eine normale Schwangerschaftsdauer bei gesunden Müttern. Andere Kriterien wurden nicht berücksichtigt.

Die Abnahme erfolgte durch die Study Nurse der Gebärklinik. Das Vollblut wurde in 50ml Falcon-Gefäße gesammelt, in welche bereits 5ml Acid-Citrat-Dextrose-Lösung A (ACDA) vorgelegt wurden. ACDA ist ein Antikoagulans, welches unter anderem bei verschiedenen Formen der Apherese oder alternativ zu Heparin bei der Hämodialyse verwendet wird.[44]

Das gewonnene Material wurde anschließend in das pädiatrisch-hämatonkologische Labor der Kinderklinik Graz transportiert und durch die Biomedizinische Analytikerin Elvira Kloibhofer weiterverarbeitet. Für den Primäransatz der Kultur wurde der Anteil an Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen erhöht. Dafür mussten zunächst mononukleäre Zellen isoliert und dann die CD34-positiven Zellen separiert werden.

2.1.1 Isolation

Die Isolation der mononukleären Zellen funktioniert mit der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll, mit dem spezifischen Gewicht von 1,077g/ml, wird dabei mit verdünntem Vollblut überschichtet. Durch die nachfolgende Zentrifugation werden die unterschiedlichen Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Dabei trennt Ficoll die mononukleären Zellen (MNZ) und das Plasma von den restlichen Blutbestandteilen ab. Die MNZ sind dabei direkt oberhalb der Ficollschicht als buffy-coat abgelagert. Die Isolation wurde nach folgendem Schema unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. 9ml Vollblut mit 21ml CMF-PBS-Puffer (siehe Anhang) vermischen
2. 15ml Ficoll in einem 50ml-Falcon-Gefäß vorlegen und die 30ml des verdünnten Blutes vorsichtig darüberschichten
3. Zentrifugation bei 400g bei 20°C für 30min
4. Abheben des buffy-coats mit einer sterilen Pasteurpipette und Überführung in ein neues 50ml Gefäß
5. Auffüllen mit 50ml CMF-PBS-Puffer
6. Zentrifugation bei 300g bei 10°C für 10min
7. Nach der Abhebung des Überstandes verbleibt nun das Zellpellet am Boden des Gefäßes

Die Punkte 5 und 6 können gegebenenfalls wiederholt werden. Das Zellpellet sollte nun die gewünschten mononukleären Zellen und damit HSPZ enthalten.

2.1.2 Separierung von CD34+ Zellen

Durch die Methode des Magnetic-activated-cell-sorting (MACS) wurden von den gewonnenen MNZ die CD34-positiven Zellen separiert. Hierbei kommt ein Antikörper gegen CD34 zum Einsatz der an ein magnetisches Partikel gebunden ist. Die Zellsuspension wird dabei mit dem Antikörper inkubiert, sodass er an den CD34-Rezeptor binden kann. Anschließend werden die Zellen durch eine Säule gepresst, welche sich in einem magnetischen Feld befindet. An der Säulenwand haftet nun der Antikörper an und so werden die CD34-positiven Zellen zurückgehalten. Durch die nachfolgende Spülung außerhalb des Magnetfeldes, werden die rezeptor-positiven Zellen in einer hohen Reinheit gewonnen. Das genaue Prozedere ist im Folgenden beschrieben:

Markierung

- Zu 10^8 Zellen werden 100µl FcR-Blocking-Reagent sowie 100µl CD34 Microbeads (Eisenoxid-markierte Antikörper gegen CD34) hinzugefügt
- Inkubation bei 4° C für 30 Minuten nach sorgfältiger Durchmischung der Suspension
- Zugabe von 5-10ml MACS-Puffer und Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten.
- Verwerfen des Überstandes und Resuspension in 500µl MACS-Puffer

Separation

- Die Säule im Magnetfeld wird mit 3ml MACS-Puffer durchgespült
- Einbringen der Probe in die obere Öffnung der Säule – der Durchfluss wird dabei aufgefangen.
- Spülung der Säule (3x) mit 3ml MACS-Puffer.
- Außerhalb des Magnetfeldes werden die CD34-positiven Zellen anschließend mit 5ml MACS-Puffer herausgedrückt unter Zuhilfenahme eines speziellen Stempels

Bei Bedarf wird die Separation wiederholt, um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen. Der Erfolg der Separation wird im Anschluss durchflusszytometrisch kontrolliert (siehe Kapitel 2.2).

2.1.3 Primäransatz und Passagierung

Die angereicherte Zellsuspension wurde nun in Kultur gebracht. In Zellkulturfalschen (75 bzw. 225cm²) wurde mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen begonnen und für eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das verwendete Stammzellmedium ist im Anhang ersichtlich.

Sobald ausreichend Zellmaterial zur Verfügung stand, kam bei der Passagierung jede Woche die gleiche Anzahl an Zellen in Kultur (3×10^8 Zellen in 300ml Medium). So konnte annähernd die gleiche Zelldichte gehalten werden, um später vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Mindestens die Hälfte des Stammzellmediums wurde durch frisches ersetzt. Übrig gebliebenes Material wurde unter anderem für die Erhebung von Zellzahl und Expressionsmuster verwendet.

Für weiterführende Untersuchungen (siehe Kapitel 2.3 – 2.8) wurde ein Teil der wöchentlich entnommenen Zellen wieder durch MACS (CD34) angereichert, um bei der Analyse nur eine standardisierte Population der CD34-positiven Zellen zu berücksichtigen.

2.2 Zellzahl und Linage-Marker

Die Feststellung der Zellzahl in der Kultur erfolgte mit dem Casy-Cellcounter (Schärfe, Deutschland). Eine nachfolgende Analyse mit dem Fluoreszenzaktivierten Zellsorter (engl. FACS) lieferte Auskunft über den Differenzierungsgrad der Kultur:

- In Mikrotubes werden entsprechende Antikörper vorgelegt, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (siehe Tabelle 1). Anschließend wurden die Tubes mit CMF-PBS auf 20µl aufgefüllt.

Tabelle 1: Antikörper Durchflusszytometrie

Zusätzlich zu den angegebenen Antikörpern wurden Negativkontrollen durchgeführt.

	FITC	ECD	PE	PE-Cy5	Pe-Cy7
Unspezifische Bindungen	IgG1 (5µl)	IgG1 (2µl)	IgG2a (2µl)	IgG1 (2µl)	IgG1 (2µl)
CD-Marker	CD14 (1µl)	CD45 (2µl)	CD133 (5µl)	CD19 (2µl)	CD3 (2µl)
	CD15 (5µl)	CD45 (2µl)	CD34 (5µl)	CD56 (2µl)	CD3 (2µl)

- Danach werden je 50µl der Probe ($5 \cdot 10^4$ Zellen) hinzugefügt
- Bei 4-8°C können die Antikörper während einer 20-minütigen Inkubationszeit binden
- Beim anschließenden Waschschrift wird 1ml FACS-Puffer (siehe Anhang) hinzugefügt und die Suspension bei 300g für 30 Sekunden zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 50µl des FACS-Puffer resuspendiert
- Messung am FC500 (Beckman Coulter Krefeld, Deutschland)

Die Hämatopoetische Stamm und Progenitorzellen charakterisieren sich in der Durchflusszytometrie als CD34-positiv, CD45dim und Side scatter low und sind dadurch messbar.[45]

2.3 Colony-Forming-Cell-Assay

Die Anzahl an teilungsfähigen Stamm- und Progenitorzellen in der Zellpopulation wurde mit einem Colony-Forming-Cell-Assay (CFC-Assay) gemessen. Das Augenmerk fiel dabei auf die Colony-Forming-Units-GM (CFU-GM), welche vor allem Progenitorzellen beinhalten, die zu Granulozyten und Makrophagen differenzieren. Mit dem CFC-Assay werden hauptsächlich Progenitorzellen erfasst. Es können also vor allem Rückschlüsse auf die Teilungsfähigkeit der Progenitoren gezogen werden.[46]

2.3.1 Primärer Ansatz

Es wurden je Passage 6 Wells einer 12 Well-Platte mit CD34 positiven Zellen in 50µl RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis/MO, USA) unter sterilen Bedingungen versehen. Dabei wurden in der Regel mehrere Verdünnungsstufen eingesetzt. Beim Versuch kam ein Methylcellulose-basiertes Medium (Methocult® H4534 classic without EPO, Stem Cell Technologies, Vancouver/Canada) zum Einsatz, von welchem anschließend 500µl mit einer 1ml Spritze und einer 20G-Nadel zur Zellsuspension hinzugegeben wurden. Um eine möglichst gute Verteilung der einzelnen Zellen auf der Platte zu erreichen und so später die gebildeten Kolonien besser voneinander unterscheiden zu können, wurde die Platte zunächst bei 800 Umdrehungen pro Minute im Mikrotiterplatten-Mixer gerüttelt. Anschließend wurde jedes Well mit einer sterilen 200µl Pipettenspitze umgerührt.



Abbildung 2: Kolonie
Inverse Durchlichtmikroskopie
100-fache Vergrößerung

Die randständigen Felder wurden ausgespart und mit CMF-PBS-Puffer (siehe Anhang) aufgefüllt, um die Kultur während der mehrtägigen Inkubation vor Austrocknung zu schützen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die gebildeten Kolonien wurden am Tag 8 nach dem Ansatz unter mikroskopischer Sicht ausgezählt.

Eine Kolonie wurde als solche gewertet, wenn sie aus 40 oder mehr Zellen, in enger räumlicher Beziehung, bestanden hat. Denn nur eine CFU ist in der Lage eine derartige Menge an Zellen zu bilden.

Wenn es vorkam, dass in einem Feld mit höheren Zellkonzentrationen, so viele Kolonien gebildet wurden, dass sie nicht mehr voneinander abgegrenzt werden konnten (=overplated), wurde das Feld nicht für die Auswertung in Betracht gezogen.

Die erhobenen Werte wurden mit der Anzahl an eingesetzten Zellen in den einzelnen Wells in Relation gebracht:

$$x = \frac{\text{Anzahl an gebildeten Kolonien}}{\text{eingesetzte Zellen (CD34+)}}$$

2.3.2 Sekundärer Ansatz

Beim Sekundäransatz wurden die gebildeten Kolonien unmittelbar nach der Auszählung unter sterilen Bedingungen und unter mikroskopischer Sicht einzeln mit einer 10µl Kolbenhubpipette aufgenommen und in ein Feld einer 48-well-Platte überführt. Um Dehydratation der Zellen zu verhindern und die richtige Aufbereitung des Methocultmediums gemäß der Herstellerinformation zu gewährleisten, wurden zuvor bereits 10 µl RPMI 1640 - Medium in das Feld vorgelegt, in welchem die Kolonie dann vorsichtig resuspendiert wurde. Anschließend wurden 100µl Methocult® H4534 -classic without EPO hinzugefügt und wie beim Primäransatz umgerührt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die umliegenden Felder der Platte wurden wiederum mit CMF-PBS-Puffer versehen bevor die Platte bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit für weitere 13 Tage inkubiert wurde.

Am Tag 13 wurde die Anzahl an gebildeten Kolonien, wieder unter mikroskopischer Sicht ausgewertet. Wieder, zählte eine Kolonie als solche, wenn sie aus 40 oder mehr Zellen bestand.

Da zur Bildung der Kolonie eine CFU im sekundären Ansatz anwesend sein musste, folgte daraus, dass die ursprüngliche CFU self-renewal betrieben hat. Aus der Anzahl der sekundären Kolonien in einem Well lässt sich nun über den Logarithmus dualis berechnen, wie viele symmetrische Teilungen im Sinne eines self-renewal die ursprüngliche CFU vollzogen hat. Die Anzahl an sekundären Kolonien wurde noch mit eins addiert, da bereits im primären Ansatz eine Kolonie gebildet wurde:

$$\text{Symmetrische Teilungen} = \log_2(\text{Durchschnittliche Anzahl sek. Kolonien} + 1)$$

Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2011 für Mac (Microsoft Corporation, USA).[47]

2.4 Comet Assay

Um Einzel- und Doppelstrangbrüche zu detektieren wurde der Comet-Assay, eine Einzelzellelektrophorese, angewandt.[48]

Es wurden je Passage zwei Objektträger vorbereitet. Diese wurden zunächst in 100°C heiße Normal-Melting-Agarose (NMA) eingetaucht und auf der Heizplatte bei 100°C getrocknet um eine optimale Haftfläche zu erhalten. Im nächsten Schritt wurde 1ml NMA auf den Objektträger pipettiert und mit zwei Deckgläsern versehen (ein kreisrundes Deckglas mit einem Durchmesser von 18mm und darüber ein rechteckiges Deckglas mit den Maßen 24 x 60mm). Nach der Aushärtung bei 4°C wurden die Deckgläser entfernt, wodurch eine Kammer in der Agarose geschaffen wurde.

In diese Kammer wurden je 10^4 Zellen (CD34+) in 35 μ l Low-Melting-Agarose (LMA, 37°C) eingebettet und nach Aushärtung bei 4°C mit weiteren 90 μ l LMA überzogen. Die Objektträger wurden schließlich über Nacht unter Lichtschutz lysiert (Lysepuffer siehe Anhang).

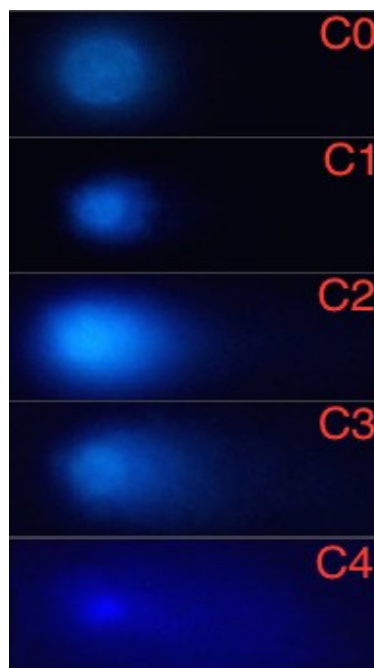


Abbildung 3: Comet-Assay

Dadurch, dass beim Comet-Assay die Zellen bereits vor der Lyse in Agarose eingebettet werden, ist es möglich, jede Zelle einzeln zu evaluieren. Die Objektträger wurden nach 24 Stunden unter Lichtschutz für 20 Minuten in einem Elektrophoresepuffer (siehe Anhang) inkubiert. Der alkalische Elektrophoresepuffer (pH-Wert: 10) führt dabei zu einer Entwindung der DNA-Doppelhelix, sodass auch Einzelstrangbrüche detektiert werden können. Anschließend wurden sie einem elektrischen Feld von 20V und 290mA für 30 min. ausgesetzt und dann für 10 Minuten in einen Neutralisationspuffer (pH 7,4; siehe Anhang) eingelegt, um wieder physiologische pH-Werte zu erreichen. Die negativ geladenen Bruchstücke wanderten während der Elektrophorese entsprechend ihrer Größe durch die Agarose in Richtung Pluspol, sodass eine geschädigte Zelle nach der Färbung mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 1:1000 verdünnt) mit einem Schweif imponiert.

Es wurden je Passage dreimal 100 Zellen an verschiedenen Stellen der Objektträger, mit dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert und entsprechend ihrer Morphologie in die Gruppen C0 (keine sichtbaren Schäden) bis C4 (viele Schäden) eingeteilt (siehe oben) und den Gruppen entsprechend null bis vier Punkte vergeben. Diese Punkte wurden addiert und ihr arithmetisches Mittel errechnet, woraus sich der Cometscore ergibt.

2.5 Carbonylierte Proteine

Als Maß für den oxidativen Stress dem die Zellen ausgesetzt waren, wurde der Anteil an carbonylierten Proteinen bestimmt. Zur Messung der carbonylierten Proteine wurde der Carbonyl Proteine Elisa Kit (Immundiagnostik AG; Bensheim, Deutschland) verwendet. Die Gesamteproteinkonzentration, welche mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) bestimmt wurde, dient als Referenz dazu.

2.5.1 Lyse

Für die Lyse der Zellen und die Gewinnung der Proteine wurden je 10^4 Zellen (CD34+) in 50µl Aqua bidest. in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und im geeisten Ultraschallbad 2x3 min. lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4° C mit 14000g 20 min. zentrifugiert. 40µl Überstand wurden zur weiteren Verwendung abgehoben und bei -20° C zwischengelagert.

2.5.2 Carbonylproteine – ELISA

Die Feststellung des Gehaltes an Carbonylproteinen erfolgt mittels ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay). Dazu müssen die Carbonyle zunächst mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) derivatisiert werden. An dieses Molekül kann nun ein anti-DNPH-Antikörper spezifisch binden. Der zweite verwendete Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen) ist mit einer Peroxidase markiert und bindet an den Primärantikörper. Das anschließend hinzugefügte Tetramethyl-bezidin (TMB) wird durch die Peroxidase aktiviert und erfährt eine zunehmende Blaufärbung. Durch die Hinzugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und die Farbe der Proben schlägt nach gelb um (Absorptionsmaximum: 450nm).

Der Assay wurde wie folgt durchgeführt:

- je 20µl der Proben wurden mit 60µl Derivatisierungsreagenz versehen und bei Raumtemperatur für 45 min. inkubiert. Für die Kontrollen wurden zu 4µl des Standards ebenfalls 60µl Derivatisierungsreagenz pipettiert und die Inkubationszeit eingehalten.

- Anschließend wurden je 180µl Assaypuffer hinzugefügt und 100µl der Proben und Standards sowie der Negativkontrolle auf eine Mikrotiterplatte überführt, welche dann mit einem Paraffinfilm luftdicht verschlossen wurde. Im Zuge dessen wurde eine Standardverdünnungsreihe (1+1 Verdünnung - 7x) hergestellt.
- Bei 4°C wurden die Mikrotiterplatten über Nacht inkubiert.
- Es folgte ein Waschschrift mit dem mitgelieferten Waschpuffer (sechs Wiederholungen).
- Anschließend wurden die einzelnen Felder mit 100µl des ersten Antikörpers versehen (1:101 verdünnt) und nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wie zuvor gewaschen.
- Dann wurden je 100µl des zweiten Antikörpers (Konjugat, Ziege-anti-Kaninchen, Peroxidase-markiert) hinzugefügt und wiederum für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach einem weiteren Waschschrift (wie oben) wurden je 100µl des Substrates (TMB) hinzugefügt und für etwa 15 min. unter Lichtausschluss inkubiert.
- Mit je 50µl der Stopplösung wird die Reaktion angehalten.
- Die Messung im Photometer erfolgte bei 450nm gegen die Referenzwellenlänge 620nm.
- Anhand einer Standardkurve ließ sich nun die Menge an carbonylierten Proteinen bestimmen.

2.5.3 Gesamtproteine

Die Bestimmung des gesamten Proteingehaltes der Probe funktioniert nach der BCA-Methode nach Smith et al.[49]

Der erste Teil der Methode besteht aus der sogenannten Biuret-Reaktion. Bei dieser Reaktion gehen Peptidverbindungen in der Probe mit hinzugefügten zweiwertigen Kupferionen unter alkalischen Bedingungen eine Komplexbindung ein. Dabei wird das Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert. Der gebildete Komplex führt zu einem Farbumschlag nach violett.

Im zweiten Teil kommt es zu einer Chelatkomplexbildung aus einem Cu^{1+} -Ion mit

zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA). Der Komplex zeigt abhängig von der Proteinkonzentration einen streng linearen Anstieg der Extinktion, welche in einem Photometer bei 562nm gemessen wird. Die Extinktion wird durch die Anlagerung der zwei Moleküle BCA verstärkt, wodurch eine geringere Sensitivitätsgrenze zu erreichen ist.

Entsprechend den Herstellerangaben wurde der Versuch folgendermaßen ausgeführt:

- a) Mischung der Arbeitslösung: 50 Teile Reagens A (u.a. BCA) mit einem Teil Reagens B (4% Kupfersulfat)
- b) Vorbereitung der 7 Standards mit einer Verdünnungsreihe:
1mg/ml – 15,625µg/ml
- c) Pipettieren von 10µl der Proben sowie 10µl der Standards in eine 96-well-Mikrotiterplatte. Als Negativkontrolle dienten 10µl ddH₂O.
- d) Hinzugabe 200µl Arbeitslösung in jedes Well und Durchmischung auf einem Mikrotiterplatten-Mixer
- e) Versiegelung der Platte und Inkubation für 30 min bei 60°C (Enhanced Protokoll)
- f) Abkühlung bis Raumtemperatur und photometrische Messung bei 562nm
- g) Anhand einer Standardkurve wurde schließlich das Gesamtprotein jeder Probe bestimmt

Auswertung:

Das Ergebnis der carbonylierten Proteine wird nun mit jenem der Gesamtproteine in Relation gebracht:

$$CP \text{ normiert } [pmol/mg] = \frac{CP_{Probe} [pmol/mg] \times Proteine_{Standard 1} [mg/mL]}{Proteine_{Probe} [mg/mL]}$$

2.6 Senescence Evasion Factor

Zur Messung der SNEV-Expression wurde die wöchentlich isolierte RNA zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. In der folgenden quantitativen Real-Time-PCR wurde die cDNA mit SNEV-spezifischen Primern amplifiziert. Der hinzugefügte Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green ist charakterisiert durch eine 1000-fache Verstärkung des Fluoreszenzsignals bei der Anlagerung an doppelsträngige DNA im Vergleich zu einzelsträngiger DNA. Aus der Echtzeitfluoreszenzmessung dieses Farbstoffes können nun Rückschlüsse auf die Menge an amplifizierter cDNA gezogen werden. Diese entspricht auch der Menge an mRNA der ursprünglichen Probe und ist somit als Maß für die Genexpression geeignet.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Schritte näher eingegangen.

2.6.1 Isolierung der RNA

Die Biomedizinische Analytikerin Andrea Raicht führte die Isolierung der RNA durch. Hierzu wurde der RNEASY Minikit (Qiagen, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet:

- Zentrifugation für 5 min. bei 20° C und 1400rpm
- Resuspendierung des Zellpellets in 350µL Lysepuffer (RLT) (dieser enthält Beta-Mercaptoethanol (10µL/mL), welches RNAsen denaturiert)
- Überführen in die QIASchredder column und Zentrifugation bei 20.000g für 2 min.
- Zum Durchfluss werden 350µL Ethanol (70%) und die Suspension anschließend in die RNEasy Spin Column überführt. Dabei lagert sich die RNA an die Silicamembran an. Die Spin Column wird auf ein 2mL Eppendorfgesäß aufgesetzt.
- Zentrifugation für 15 sek. bei 8000g

Es folgen nun einige Waschschr itte bei welchen mitgelieferte Puffer in die RNEASY Spin Column hinzugefügt werden. Nach der Zentrifugation wird der Durchfluss jeweils verworfen:

- Hinzugabe von 700 L RW1-Puffer und Zentrifugation für 15 sek. bei 8000g
- Hinzugabe von 500 L RPE-Puffer und Zentrifugation für 15 sek. bei 8.000g
- Hinzugabe von 500 L RPE-Puffer und Zentrifugation für 2 min. bei 8.000g
- Hinzugabe von 500 L RPE-Puffer und Zentrifugation für 15 sek. bei 8.000g
- Um Verunreinigungen mit verwendeten Puffern (zum Beispiel an der Außenseite der Spin Column) zu vermeiden, wird die Spin Column auf ein neues Eppendorfgefäß platziert und für 1 min. bei 20.000g zentrifugiert
- Mit 30mL RNase-freiem Wasser wird die RNA anschließend aus der Spin Column eluiert (Zentrifugation bei 8.000g für 1 min. in ein neues Eppendorfgefäß). Dieser Schritt wird zweimal durchgeführt.

2.6.2 Transskription zu cDNA

Da das Probenmaterial für die RT-PCR in Form von DNA vorzuliegen hat, muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde der High capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, USA) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Um die Enzymaktivität bis zum gewünschten Start der Reaktion möglichst zu minimieren wurde auf Eis gearbeitet.

Zunächst wurde ein Mastermix aus Enzymen und Nukleotiden vorbereitet, der je Probe, die in Tabelle 2 ersichtlichen Mengen enthielt.

Tabelle 2: Mastermix der cDNA-Synthese je Probe.

Werte in Klammern beziehen sich auf das Reaktionsgemisch für die Negativprobe

Komponenten	Öl	
10x RT-Buffer	2	
25x dNTP-Mix	0,8	
10x Random Primer	2	
Enzym	1	(0)
RNase-free ddH ₂ O	4,2	(5,2)
Gesamt je Probe	10	

Die RNA-Proben wurden verdünnt, sodass in jeder Probe 500ng RNA in 10µl RNase-freien-ddH₂O vorlagen.

Für die Negativkontrolle wurden alle RNA-Proben zu gleichen Teilen gemischt und ebenso verdünnt, um die gleiche RNA-Konzentration von 50ng/µl zu erhalten. In Eppendorffgefäßen wurden nun je 10µl des Mastermixes zu je 10µl der Proben hinzugefügt. Die Gefäße mit dem Gesamtvolumen von 20µl wurden dann kurz abzentrifugiert, im Thermocycler platziert und das in Tabelle 3 ersichtliche Programm gestartet.

Tabelle 3: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese

Temperatur[°C]	Dauer
25	10min.
37	120min.
85	5sek.
4	∞

Durch die zufälligen Primer wurden alle RNA-Arten (mRNA, rRNA, ...) zu einer komplementären DNA umgeschrieben. Das verantwortliche Enzym hierfür ist die reverse Transkriptase, welche entsprechend der Basenabfolge der RNA die cDNA synthetisiert. Gleichsam fungiert die reverse Transkriptase aber auch als DNA-Polymerase.

Bis zur weiteren Verwendung am nächsten Tag wurden die Proben nun bei 4°C zwischengelagert.

2.6.3 Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR wurde zunächst ein Mastermix hergestellt (Zusammensetzung siehe Tabelle 4). Der enthaltene IQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, USA) besteht unter anderem aus einer DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten und einem Fluoreszenzfarbstoff. Da bei der cDNA-Synthese jede Art von RNA umgeschrieben wurde, ist es nun notwendig SNEV-spezifische Primer zu verwenden. Als Referenz dazu wurden spezifische

Primer für GAPDH verwendet. Um beide Einzelstränge zu verdoppeln, wurden sowohl forward als auch reverse Primer (in 5' → 3') verwendet:

SNEV forward ATGTCCCTAATCTGCTCCATCT

SNEV reverse ATTCTCCGCAATGTACTTCTCG

GAPDH forward ACATGTTCCAATATGATTCCA

GAPDH reverse TGGACTCCACGACGTACTION

Um eine Standardkurve als Qualitätskontrolle zu erstellen wurden Standards zu 50, 10, 2 beziehungsweise 0,1ng cDNA eingesetzt. Als Negativkontrollen wurde eine NonTemplateControl (NTC) und eine reverse Transkriptase-negative Kontrolle(RT⁻-Kontrolle) durchgeführt.

Tabelle 4: Mastermix der qRT-PCR je Probe

Für die Standards wurde gepoolte cDNA in den Konzentrationen 12,5, 2,5, 0,5 und 0,025ng/μl eingesetzt. Die cDNA wurde für die NTC durch H₂O und für die RT⁻-Kontrolle durch untranskribierte RNA ersetzt.

Inhaltstoff	μl
SYBR-Green Supermix	7,5
Forward-Primer (0,2μM)	0,3
Reverse-Primer (0,2μM)	0,3
H ₂ O	2,9
cDNA	4
Gesamt	15

Die Proben, die Standards sowie die Negativkontrollen mit einem Gesamtvolumen von je 15μl wurden in 96-Well-Platten pipettiert. Die Platten wurden anschließend versiegelt, kurz abzentrifugiert, in das RT-PCR-System (CFX96; Bio-Rad, USA) eingesetzt und die Reaktion gestartet. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 5 ersichtlich. Der Versuch erfolgte im Dreifachansatz. Das heißt, es wurde jede Probe und jeder Standard dreimal gemessen und das Ergebnis später gemittelt.

Tabelle 5: Temperaturschema RT-PCR

Temperatur	Dauer
1. 95°C	5min
2. 95°C	10sek
3. 60°C	30sek
4. 95°C	30sek (39x zurück zu 3.)
5. 55°C	30sek
6. Anstieg zu 95°C (Schmelzkurve)	0,5°C/s

Als Ergebnis erhält man den Cq-Wert jeder Probe. Der Cq-Wert beschreibt den Zeitpunkt bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über das Hintergrundsignal ansteigt. Das heißt, je mehr cDNA in einer Probe vorliegt, desto niedriger ist ihr Cq-Wert, da das Signal früher ansteigt. Der relative Expressionsunterschied wird mit $\Delta\Delta Cq$ -Methode nach Livak und Schmittgen errechnet.[50] Der Cq-Wert des interessierenden Gens wird vom Cq-Wert des Referenzgens subtrahiert, um den ΔCq -Wert zu erhalten. $\Delta\Delta Cq$ errechnet sich indem ΔCq von ΔCq des Ausgangswertes (erste gemessene Passage) abgezogen wird, um zeitliche Schwankungen darzustellen. Der Relative Expressionsunterschied R errechnet sich wie folgt:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

2.7 Telomerlänge und Telomeraseaktivität

Die Bestimmung der Telomerlänge und der Telomeraseaktivität wurde von Andrea Raicht durchgeführt und ist nachfolgend beschrieben.

2.7.1 Telomeraseaktivität

Um die Telomeraseaktivität zu bestimmen zu können, wurde der TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}-Kit (Roche Diagnostics, Deutschland) verwendet. Der Assay besteht aus vier Teilen. Im ersten Teil wird die Telomerase isoliert. Die Telomerase lagert sich im nächsten Teil an das 3'-Ende von speziellen Primer (TS-Primer) an und bildet Telomerasequenzen. In der nachfolgenden PCR werden diese DNA-Stränge sowie interne Standards amplifiziert. Hierbei kommt ein zweiter Primer (3'→5') zum Einsatz. Im vierten und letzten Schritt werden die gebildeten Sequenzen mithilfe eines ELISA dargestellt: Die PCR-Produkte werden denaturiert und mit spezifischen Sonden, an welche Digoxigenin gebunden ist, hybridisiert. Die TS-Primer sind mit Biotinmolekülen markiert. Dadurch haften die Telomerasequenzen am Boden von Mikrotiterplatten, welche mit Streptavidin beschichtet sind. Nun kommt ein Antikörper gegen Digoxigenin zum Einsatz der mit einer Peroxidase markiert ist. Die Peroxidase aktiviert das hinzugefügte Tetramethylbenzidin und bewirkt dadurch einen Farbumschlag. Die anschließende photometrische Auswertung gibt Auskunft über die Menge an gebildeten Telomerasequenzen, wodurch auf die Telomeraseaktivität geschlossen werden kann.

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte näher beschrieben:

Isolation der Telomerase

- Zunächst wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen (MACS sortiert - CD34-positiv) als Zellpellet in 200µl gekühltem Lysepuffer resuspendiert.
- Inkubation auf Eis für 30 min
- Zentrifugation für 20 min bei 16000g und 4°C
- Der Überstand (175µl) wird im TRAP-Assay (telomeric repeat amplification protocol – Assay) weiterverwendet.

TRAP-Assay und PCR

- Zu je 1µl Probe wurden 5µl vom internen Standard, sowie 25µl des mitgelieferten Reaktionsgemisches hinzugefügt und mit Aqua bidest. auf 50µl aufgefüllt. Gleichsam wurde eine Positivkontrolle durchgeführt.
- Für eine Negativkontrolle wurde 5µl Zellsuspension mit 1µl RNase versehen und für 20 min. bei 37°C inkubiert. 1µl davon wurden statt der Probe eingesetzt
- Für eine zweite Negativkontrolle wurde die Probe durch 1µl des Lysepuffers ersetzt
- Im Thermocycler wurde die Reaktion mit in Tabelle 6 ersichtlichem Programm gestartet

Tabelle 6: Temperaturschema TRAP-Assay und PCR

	Dauer	Temperatur
	20 min	25°C
	5min	94°C
29x wiederholen	30sek.	94°C
	30sek.	50°C
	90sek.	72°C
	10min	72°C
	∞	4°C

ELISA

- 2,5µl der amplifizierten DNA werden in Mikrotiterplatten zu je 10 µl eines Denaturierungsreagenz pipetettiert (zweimal je Probe) und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert.
- Die Proben werden gegen einen Internen Standard und gegen eine Negativkontrolle normalisiert. Dazu, werden im nächsten Schritt, je 100µl eines Telomerase-spezifischen-Bindungspuffers zur Probe und je 100µl eines internen Standard-spezifischen-Bindungspuffer zur gleichen Probe, pipettiert. Außerdem wird auch die Negativkontrolle (der RNase-behandelten Probe entsprechend) mit 100µl des Telomerase-spezifischen-Bindungspuffers versehen.

- Zusätzlich wird bei einem Triplet die Probe durch eine Positivkontrolle ersetzt um so eine Positivkontrolle und den Internen Standard der Positivkontrolle zu erhalten.
- Zentrifugation bei 300 rpm für 2 Std. (37°C)
- Hybridisierungslösungen entfernen
- Es folgt ein Waschschrift bei dem 300µl des Waschpuffers für 30 sek. inkubiert wird und anschließend entfernt wird (2x wiederholen)
- Hinzugabe von je 100µl Anti-DIG-HRP-Solution und Versiegelung der Mikrotiterplatten
- Zentrifugation bei 300 rpm für 30 min. (bei Raumtemperatur)
- Lösung entfernen
- Hinzugabe von je 100µl Tetramethylbezidin
- Zentrifugation bei 300 rpm für 15 min. (bei Raumtemperatur)
- Hinzugabe von je 100µl einer Stop-solution
- Die Auswertung erfolgt bei 450nm gegen 690nm in einem Mikrotiterplattenphotometer

Die relative Telomeraseaktivität (RTA) wird in amol/ml dargestellt und errechnet sich wie folgt:

$$RTA = \frac{\frac{\text{Absorption der Probe} - \text{Absorption der Negativkontrolle (RNase)}}{\text{Absorption des internen Standard der Probe}}}{\frac{\text{Absorption der Postivkontrolle} - \text{Absorption der Negativkontrolle (Lysepuffer)}}{\text{Absorption des internen Standards der Postivkontrolle}}} \times 100$$

2.7.2 Telomerlänge

Um die Länge der Telomere zu bestimmen, muss zunächst die DNA aus den Zellen isoliert und anschließend mit einer quantitativen RT-PCR amplifiziert werden. Bei der qRT-PCR mit SYBR-Green wird die relative DNA-Menge im Verhältnis zu einem single-copy-gene ermittelt.

Die DNA-Isolierung wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Deutschland) nach Angabe des Herstellers durchgeführt:

- a) 200µl Zellsuspension (ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen in CMF-PBS) + 20µl Qiagen Protease in 1,5ml-Eppendorfgefäß
- b) 200 µl des Lysepuffers (AL) hinzufügen
- c) Inkubation bei 56°C für 10 min.
- d) Durchmischung und Zentrifugation (um Tropfen an der Wand zu entfernen)
- e) 200µl Ethanol hinzufügen (96-100%)
- f) Durchmischung und Zentrifugation (um Tropfen an der Wand zu entfernen)
- g) Die Probe in die QIAamp Spin Column überführen
- h) Zentrifugation in ein neues Eppendorfgefäß bei 6000g für 1 min.
- i) 500µl Waschpuffer (AW1) hinzugeben und bei 6000g für 1 min. in ein neues Eppendorfgefäß zentrifugieren
- j) 500µl Waschpuffer (AW2) hinzugeben und bei 20000g für 3 min. in ein neues Eppendorfgefäß zentrifugieren
- k) Um eine Verschleppung des Waschpuffers zu vermeiden wird die Spin Column nochmals für 1 min bei 20.000g in ein neues Eppendorfgefäß zentrifugiert
- l) 200µl Aqua bidest. hinzugeben und für 1 min bei RT inkubieren
- m) Abzentrifugation der DNA in ein neues Eppendorfgefäß

Analog zu Kapitel 2.6.3 wurde eine Real-Time-PCR mit folgenden Primern durchgeführt (in 5'→3'-Richtung):

Telomer

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

RPLP0

forward: CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A

reverse: CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC

RPLP0 (ribosomal protein P0) ist ein single-copy-gene. Es kommt also nur in einer Kopie auf Chromosom 12 vor. Daher lässt sich aus dem Verhältnis der 2^{-ddcq} -Werte die Länge der Telomere ableiten.[51]

2.8 Cyclinexpression

Die Bestimmung der relativen Cyclinexpression wurde von der BMAⁱⁿ Andrea Raicht durchgeführt.

2.8.1 Isolation der RNA

Siehe Kapitel 2.6.1.

2.8.2 cDNA-Synthese

Aus der mRNA wird mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Schweiz) ein cDNA Klon geschrieben. Zunächst wurde ein Mastermix mit den nötigen Enzymen und Nukleotiden hergestellt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 7: Mastermix cDNA-Synthese

Zusammensetzung je Probe.

Für die Negativkontrolle wurde ein Gemisch ohne Reverse-Transcriptase hergestellt.

Inhaltstoff	µl
RT-Puffer (10x)	4
dNTPs (je 1mM)	2
Oligo-(dT) ₁₅ -Primer (pmol/µL)	1,6
AMV-Reverse-Transcriptase (20U/µL)	1
RNAse-Inhibitor (50U/µL)	1
Gesamt	9,6

Je 9,6 µL des Mastermixes und 1µg RNA (in Aqua bidest und Diethylpyrocarbonat gelöst) werden vermischt. Mit Aqua bidest. wird ein Volumen von 20µL hergestellt. Die Proben werden in 96-Well-Platten pipettiert, versiegelt und abzentrifugiert. Anschließend werden die Platten im Thermocycler platziert und das in Tabelle 8 ersichtliche Programm gestartet.

Tabelle 8: Temperaturprogramm cDNA-Synthese

Temperatur[°C]	Dauer
25	10min.
42	60min.
99	5min.
4	∞

2.8.3 quantitative RT-PCR

Mittels qRT-PCR wurden die relativen Expressionen von Cyclin A, B1, C, D1, D2, E bestimmt. Als Referenzgen diente auch hier GAPDH.

Zur Durchführung der RT-PCR wird auf Kapitel 2.6.3 verwiesen. Es wurden folgende Primer verwendet (5' → 3'):

GAPDH

forward: ACA TGT TCC AAT ATG ATT CCA

reverse: TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG

Cyclin A

forward: AAG AAG CCA GCT GAA TCT CAA A

reverse: GGT CCA GGT AAA CTA ATG GCT GAA

Cyclin B1

forward: CCC TGC TGC AAC CTC CAA

reverse: TGT TCA CTG ACT TTG TTA CCA ATG TC

Cyclin C

forward: GCC GGC TGG TGC TTT TTT A

reverse: TGG GAG CTC TGC CAA AAG TT

Cyclin D1

forward: CCG TCC ATG CGG AAG ATC

reverse: AAC AAG TTG CAG GGA AGT CTT AAG A

Cyclin D3

forward: CTG TCT CTC CCC GCC AGT T

reverse: CTG ATA TCT CAA GCT TTC CTT TTC CT

Cyclin E

forward: CCC CGC TGC CTG TAC TGA

reverse: AGC ATG GAG TAA GAG ACC TGG AA

3 Ergebnisse

3.1 HSC07

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen von HSC07 dargestellt.

3.1.1 Gesamtleukozyten

Die Abbildung 4 zeigt den Wachstumsverlauf von HSC07. Hierbei sei erwähnt, dass es sich um fiktive Wachstumskurven handelt, da bei der Passagierung jede Woche die gleiche Anzahl an Zellen in Kultur gebracht wurden. In Abbildung 5 ist die Vermehrungsrate pro Woche der beiden Kulturen ersichtlich.

HSC07 hat sich in 23 Wochen um den Faktor $1,98 \times 10^7$ vermehrt. Durch einen technischen Defekt des Brutschrankes gegen Ende der Kultur (Woche 23), kann nicht vorhergesagt werden, wie lange man HSC07 noch kultivieren hätte können, obwohl das Absinken der Colony-Forming-Units ab Passage 20 bereits auf eine verminderte Teilungspotenz schließen lässt.

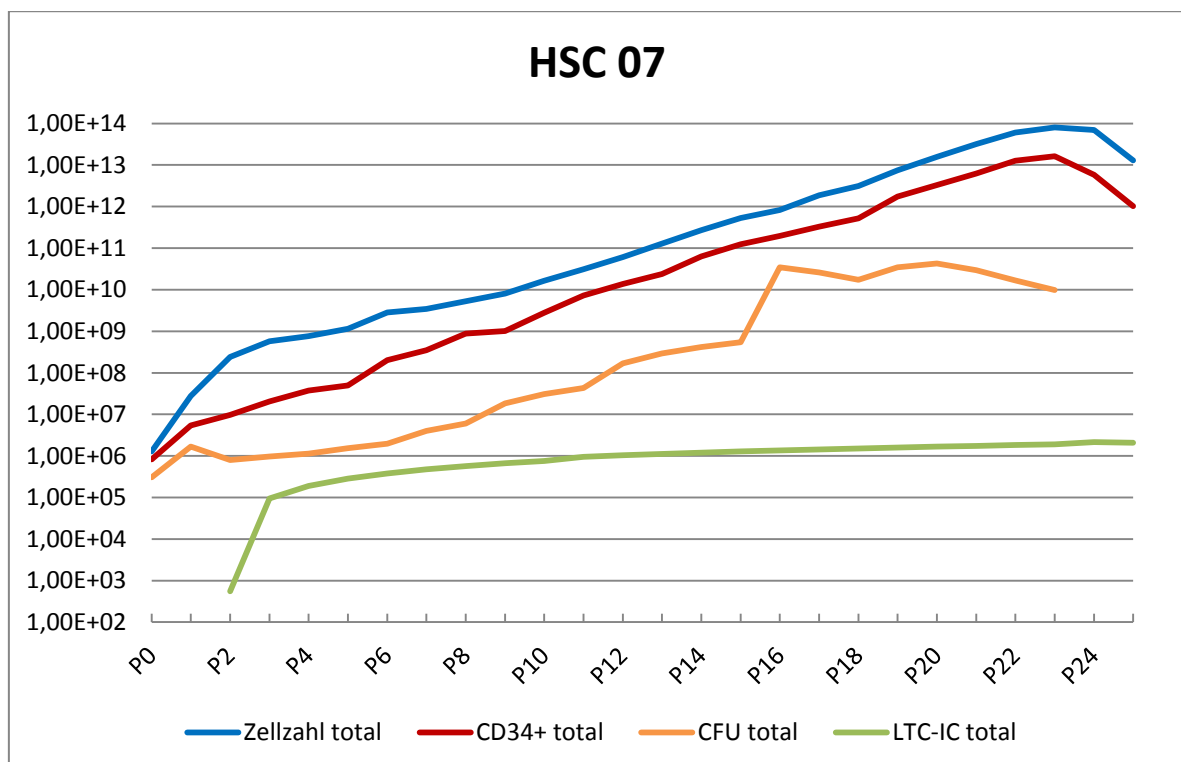


Abbildung 4: HSC07 – Wachstumskurve

Die blaue Linie zeigt die fiktive Gesamtanzahl an Leukozyten, die rote Linie die fiktive Anzahl an CD34-positiven Zellen. Die orange Linie markiert die Colony-Forming-Units/CD34+ Zellen interpoliert auf die fiktive Anzahl an CD34-positiven Zellen.

Ausgehend von einem Wachstumsfaktor von 21,37 bei Passage 1 sinkt der Wert bereits nach einer Woche auf 8,77. Nach einer weiteren Woche sinkt der Wert bereits auf einen Wachstumsfaktor von 2,4. Ab diesem Zeitpunkt sind über die restliche Laufzeit der Kultur nur noch geringe Schwankungen zu verzeichnen. Auch bei HSC 02 waren ähnliche Beobachtungen zu machen.[43]

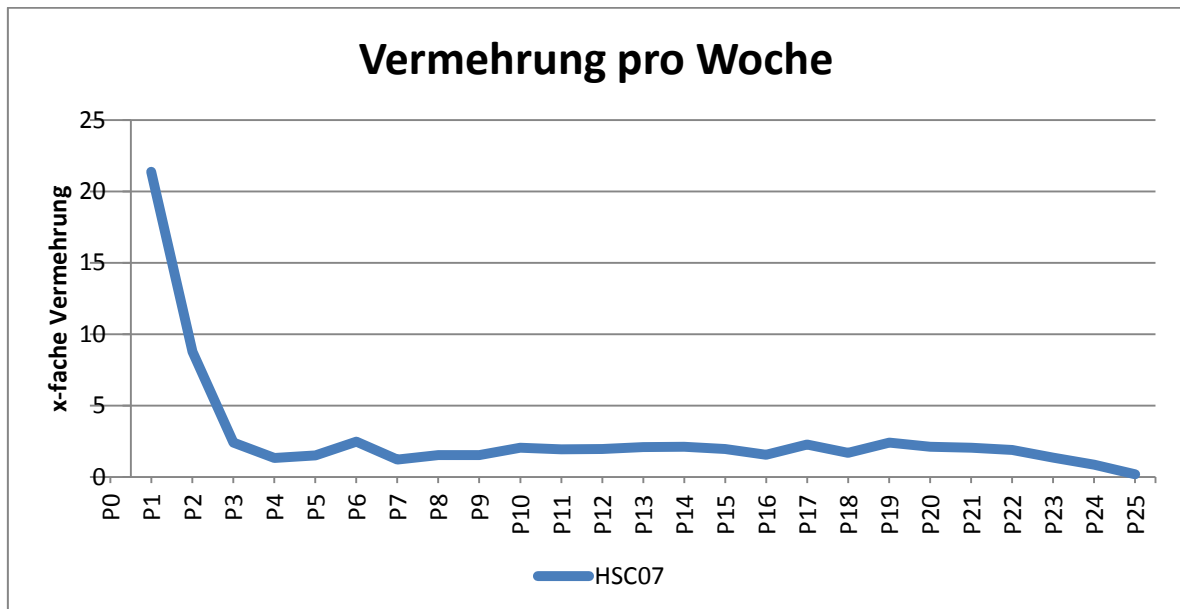


Abbildung 5: HSC07 – x-fache Vermehrung im zeitlichen Verlauf
Jeweils bezogen auf die Vorwoche

3.1.2 Expression der Oberflächenantigene

Die Expression der Stammzell-spezifischen Oberflächenantigene (CD34⁺/CD45dim und CD133) ist in Abbildung 6 dargestellt.

Durch MACS wurde beim Primäransatz eine Reinheit von 64,01% an CD34⁺/CD45dim Zellen erreicht. In Kulturbedingungen sank dieser Anteil rasch auf 4,05% bei P2 ab. Danach stieg der Anteil wieder an, um sich zwischen den Passagen 10 und 23 in einem Bereich von 17% bis 23,86% zu bewegen. Bei P24 sank der Anteil erneut ab auf 8,3%.

Die Expression von CD133 scheint der von CD34⁺/CD45dim bis zur Passage 13 zu folgen. Erst danach sinkt der Wert ab und bewegt sich unter dem Anteil von CD34⁺/CD45dim.

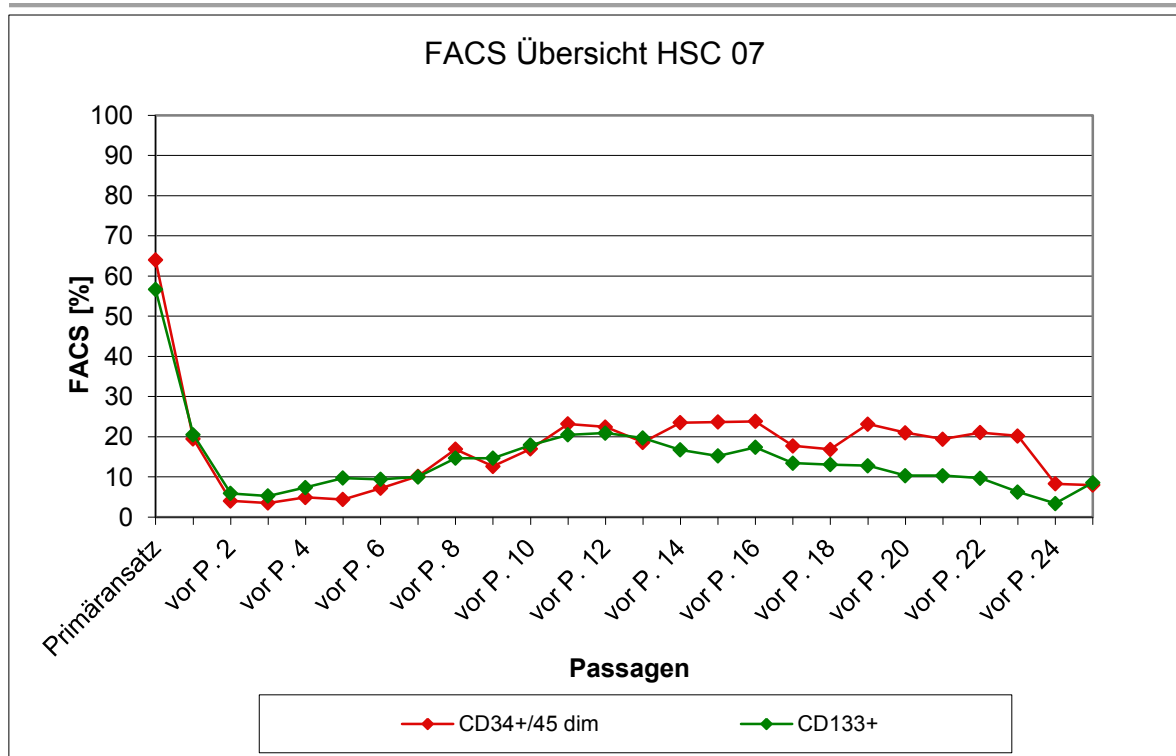


Abbildung 6: HSC07 – Expression der Stammzellmarker

Außerdem wurde mittels FACS der prozentuelle Anteil an $CD3^+$, $CD14^+$, $CD15^+$, $CD19^+$, $CD56^+/CD3^+$ und $CD56^+/CD3^-$ Zellen bestimmt.

Anfangs tragen nur wenige Zellen linienspezifische Antigene.

13,24% der Zellen des Primäransatzes sind $CD3^+$. Bereits nach einer Woche tragen nur noch 1,37% dieses Antigen. Nach einem kurzen Anstieg auf 5,25% bei Passage 3, sind $CD3^+$ -Zellen ab Passage 10 kaum noch nachzuweisen. Der Anteil an $CD56^+/CD3^+$ -Zellen bewegt sich im Laufe der Kultur zwischen 0,07% und 1,07%.

Im Laufe der ersten vier bis fünf Wochen steigt der Anteil von $CD14^+$ (34,80%), $CD15^+$ (61,25%), $CD19^+$ (46,79%) sowie $CD56^+/CD3^-$ (42,85%) Zellen rasant an.

Passage 23 zu 24 ist ein starker Anstieg der $CD14^+$, $CD15^+$, $CD19^+$ sowie $CD56^+/CD3^-$ Zellen zu verzeichnen.

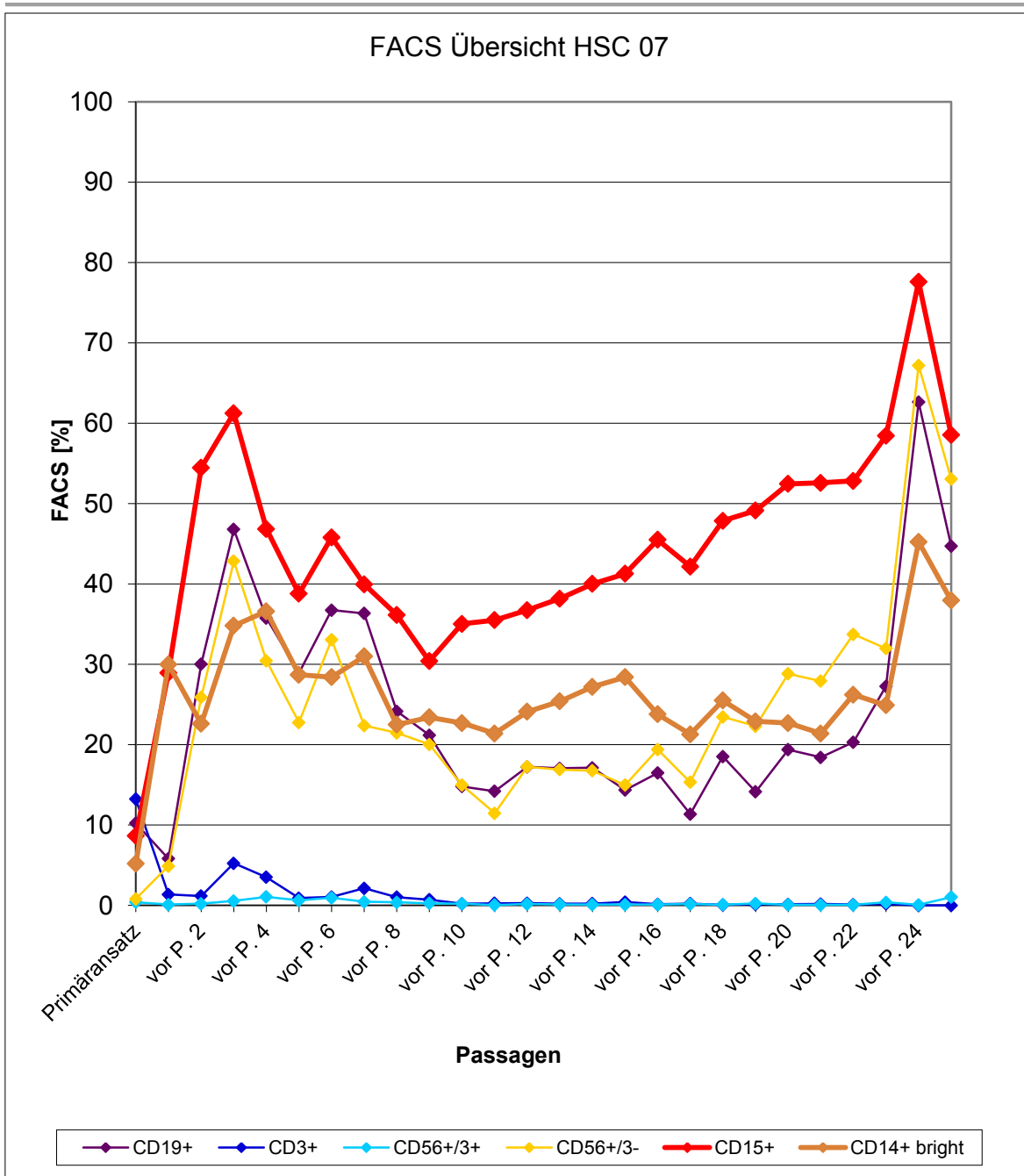


Abbildung 7: HSC07 – Expression der Linagemarker

3.1.3 Colony-Forming-Units

In Abbildung 8 sind sowohl die Ergebnisse des Primäransatzes sowie des Sekundäransatzes von HSC07 dargestellt. Beim Primäransatz ist ein rascher Abfall der gebildeten Kolonien in den ersten Wochen auffallend. Ausgehend von einem Wert von 37,28% (kolonie-bildende-Einheiten pro eingesetzter CD34⁺-Zelle) sinken die zählbaren Kolonien bis Passage 6 auf 0,97% ab. Bis zum Ende der Kultur verbleibt der Wert auf ähnlich niedrigem Niveau – mit einem kurzzeitigen moderaten Anstieg bei Passage 20 (1,30%) und dem Minimum bei Passage 23 (0,06%).

Beim Sekundäransatz (bis Passage 15 durchgeführt) ist ein ähnlich rascher Abfall zu beobachten. Bereits nach einer Woche ist ein markanter Abfall zu beobachten (von 4,44 auf 0,74 Teilungen). Jedoch ist hier das Minimum bereits bei Passage 6 mit 0,71 erreicht, danach findet ein moderater Anstieg auf 1,17 Teilungen statt um bis Passage 15 wieder auf 0,9 abzusinken.

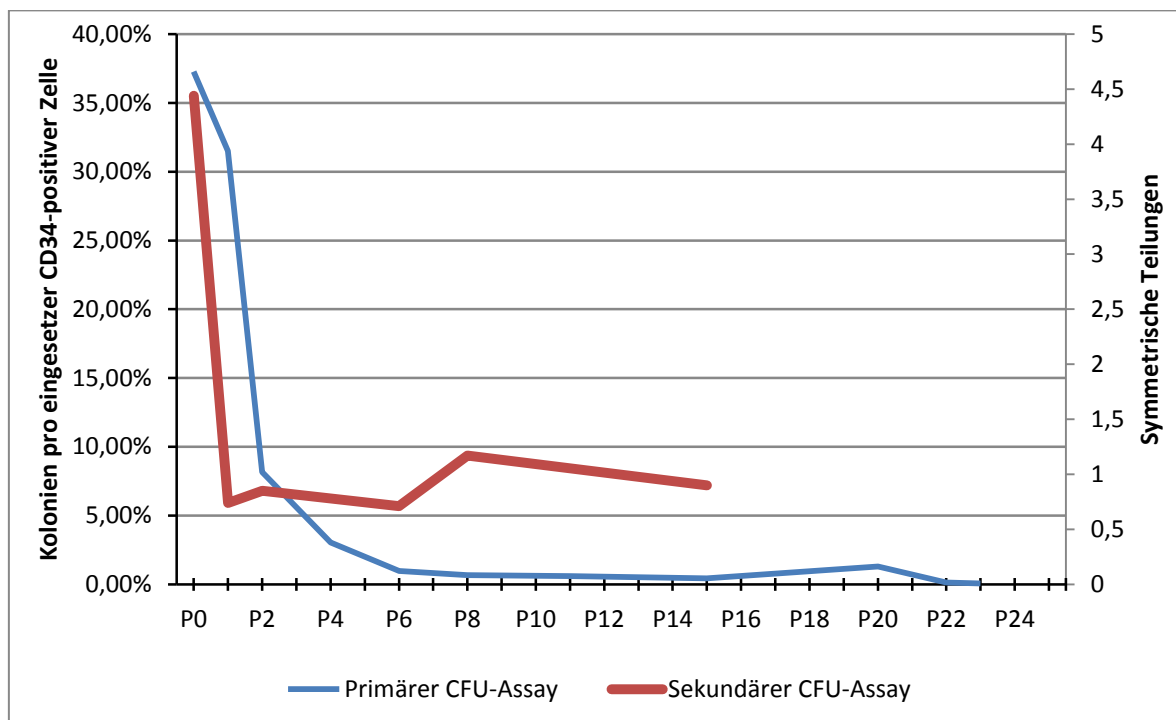


Abbildung 8: HSC07 – Colony-Forming-Units-Assay

Blaue Linie – bezogen auf die linke Ordinate: Ausgezählte Kolonien pro eingesetzter CD34-positiver Zelle (in Prozent). Die Auswertung erfolgte jeweils am Tag 8 nach Ansatz des Assays.

Rote Linie – bezogen auf die rechte Ordinate: sekundärer CFU-Assay – Symmetrische Teilungen berechnet gemäß Formel in Kapitel 2.3.2. Die Auswertung erfolgte jeweils am Tag 13 nach Ansatz des Assays.

3.1.4 Comet-Score

Der Cometscore bei HSC07 (siehe Abbildung 9) zeigte vom Ausgangswert von 64,5 einen raschen Anstieg bis Passage 5 (272,5). Danach sank der Wert bei Passage 8 (108,33) und unterlief in den 14 darauffolgenden Wochen nur geringen Schwankungen (Minimum 87; Maximum 136). Bei Passage 23 ist ein neuerlicher Anstieg zu verzeichnen (208).

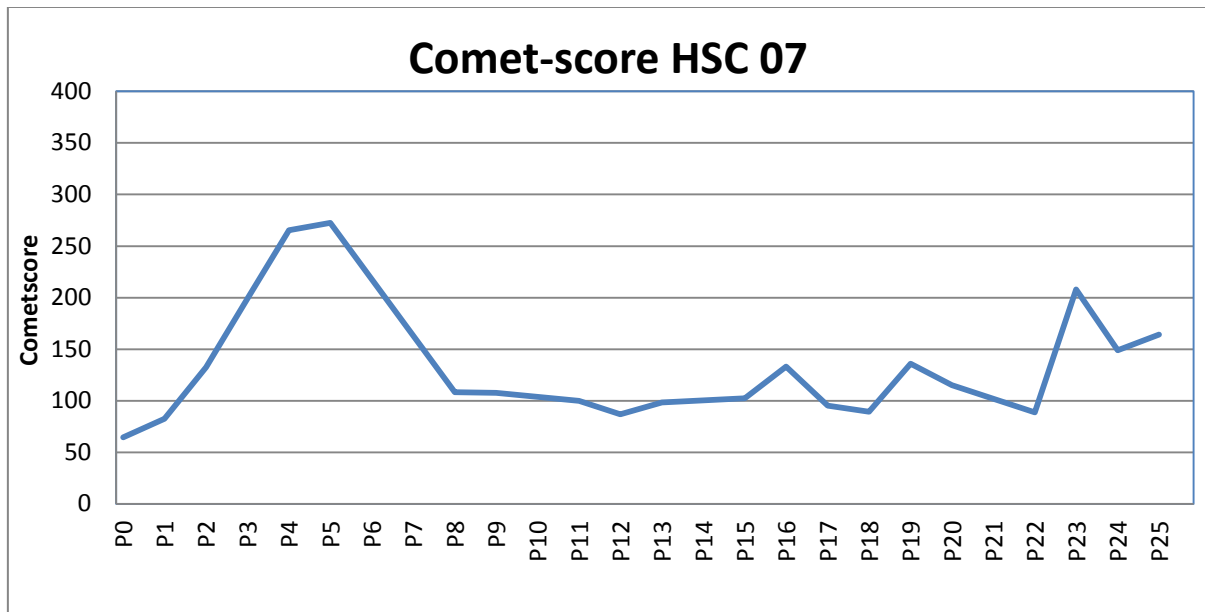


Abbildung 9: HSC07 – Cometscore

3.1.5 Senescence-Evasion-Factor

Die Expression des Senescence-Evasion-Factors wurde sowohl auf die erste messbare Passage, als auch gegen das Referenzgen GAPDH normalisiert und ist in folgenden Abbildungen somit als n-fache Expression im zeitlichen Verlauf dargestellt.

In den ersten Passagen von HSC07 sind nur relativ geringe Schwankungen zu sehen. Den ersten größeren Anstieg verzeichnet Passage 15 (6,15). Passage 22 zeigt mit einem Wert von 10,93 die maximale Ausprägung. Unmittelbar danach bei Passage 23 wurde mit 0,30 der niedrigste Wert festgestellt.

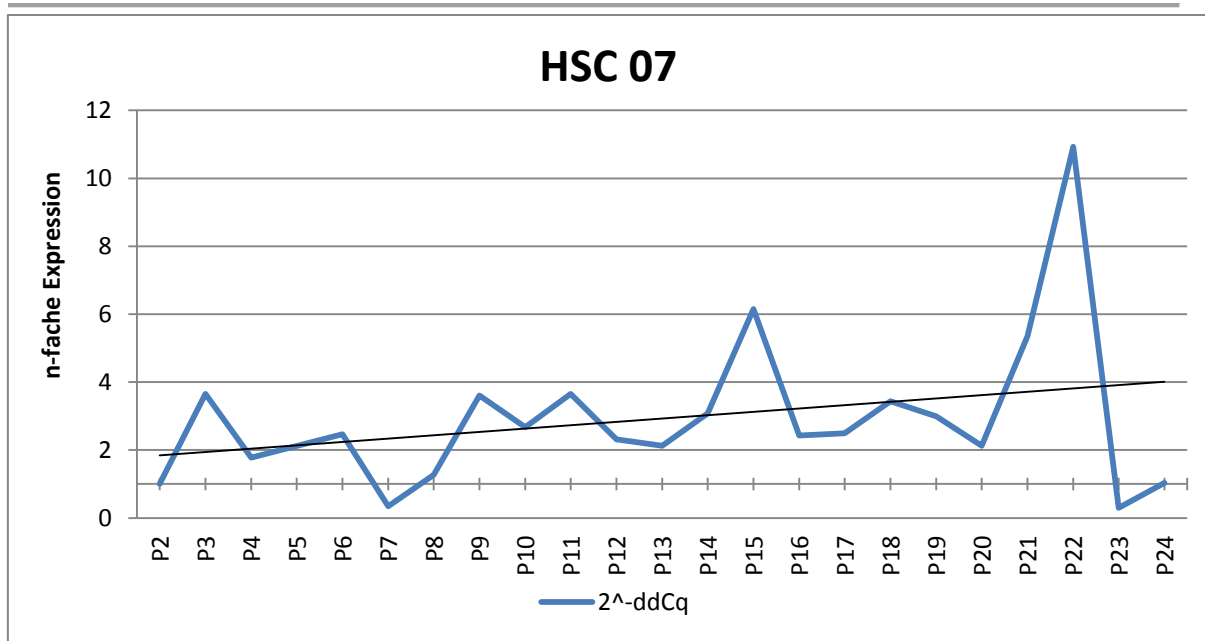


Abbildung 10: HSC07 – SNEV-Expression
normalisiert auf Passage 2 und GAPDH

3.1.6 Carbonyl-Proteine

Der Anteil an Carbonylproteinen weist im Verlauf der Kultur große Schwankungen auf. Ausgehend von einem Wert von 7.042 pmol/mg bei Passage 3 war ein rascher Anstieg auf 28.790 bei Passage 6 zu beobachten. Das Minimum an Carbonylproteinen wurde schließlich in Woche 10 gemessen (4.870 pmol/mg). Der höchste Wert wurde bei Passage 18 mit 52.537 pmol/mg ermittelt.

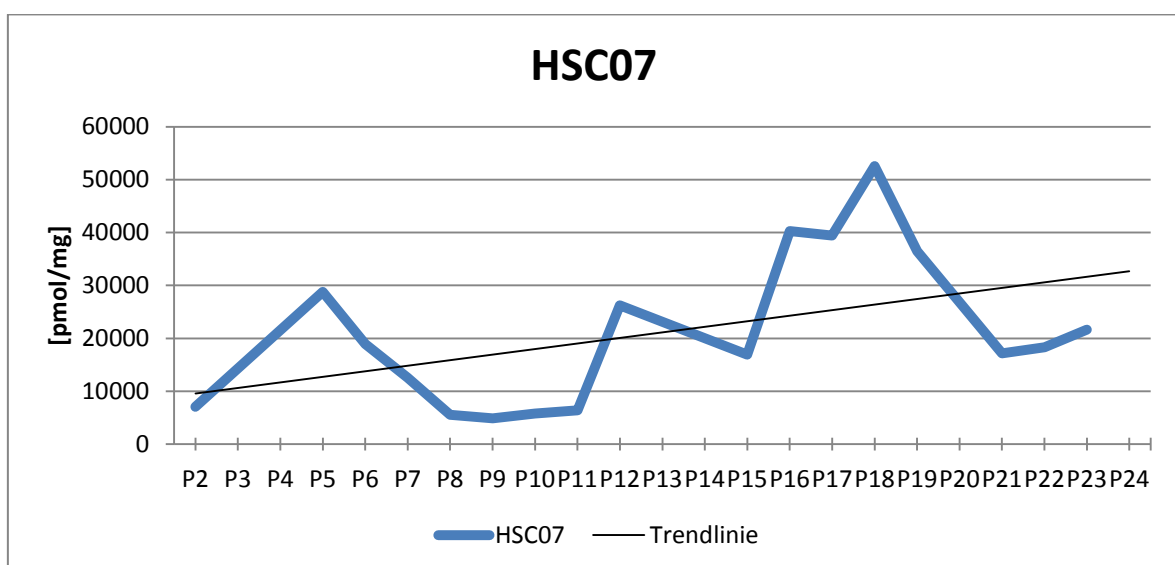


Abbildung 11: HSC07 – Carbonylierte Proteine

3.1.7 Telomerlänge und Telomeraseaktivität

Die Telomeraseaktivität sank vom Ausgangswert 13,3 amol/μL bei Passage 2 binnen einer Woche rapide auf 1,0 ab. Bis Passage 10 blieb der Wert auf vergleichbar niedrigem Niveau. Bei Passage 7 konnte keine Aktivität festgestellt werden. Zwei größere Anstiege waren bei den Passagen 12 und 15 zu beobachten (7,7 bzw. 9,0).

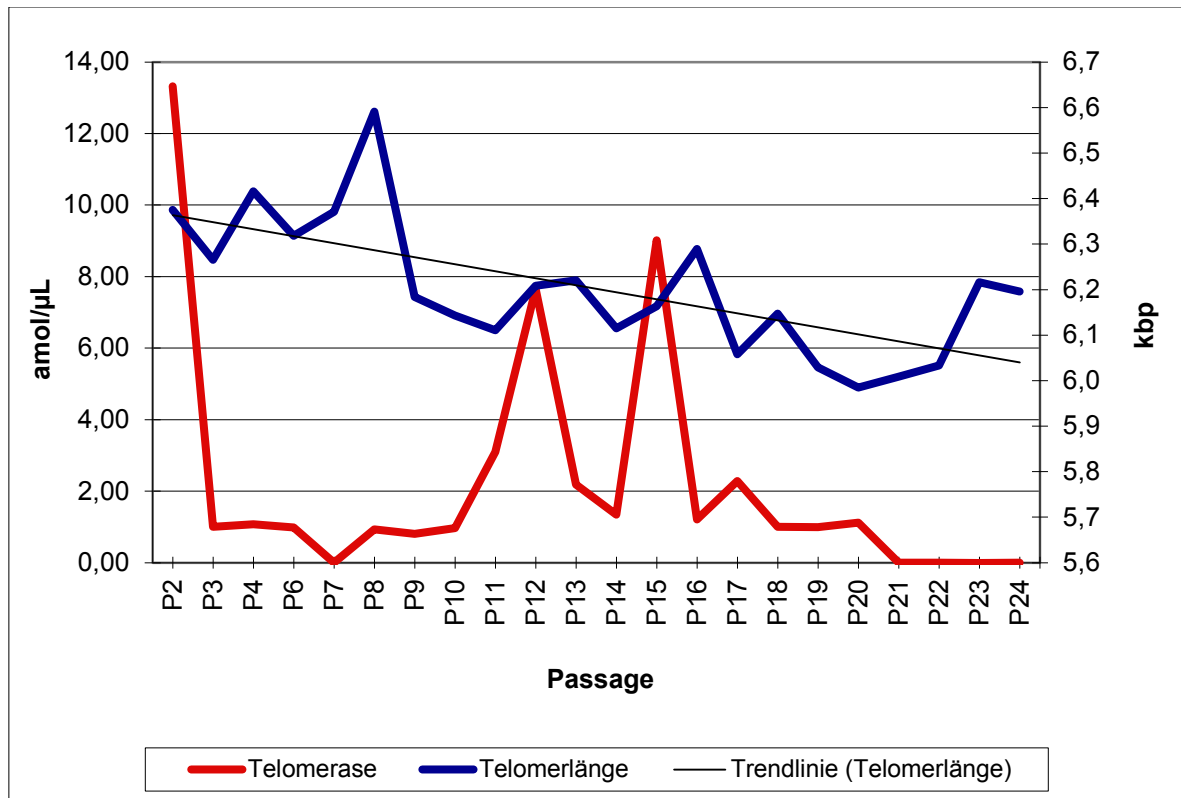


Abbildung 12: HSC07 – Telomeraseaktivität und Telomerlänge

Die Telomeraseaktivität (rote Linie) bezieht sich auch die linke Ordinate [amol/μL], während sich die Telomerlänge (blaue Linie) auf die rechte Ordinate (Kilobasenpaare) bezieht. Die eingefügte Trendlinie bezieht sich auf die Telomerlänge.

3.1.8 Cyclinexpression

Die Abbildung 13 zeigt die Expression der Cycline A, B1, C, D1, D3 und E im zeitlichen Verlauf und normalisiert auf Passage 3.

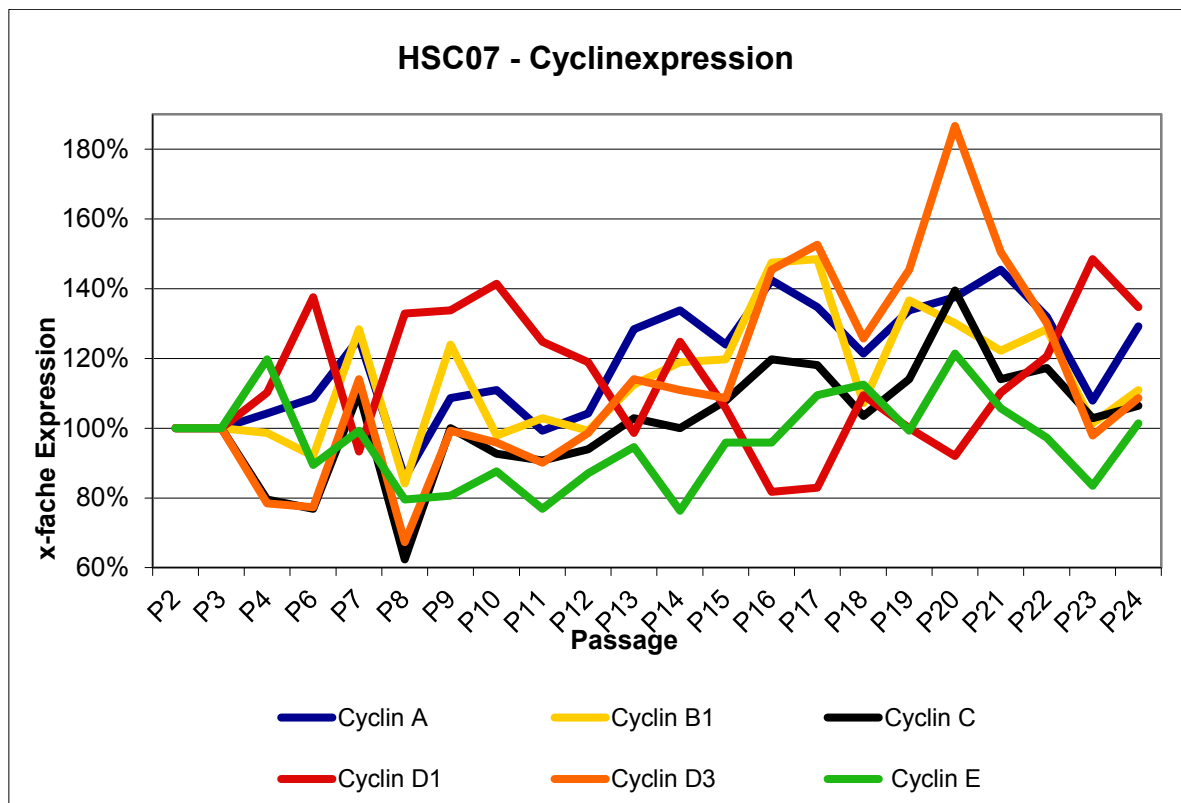


Abbildung 13: HSC07 – Cyclinexpression
normalisiert auf Passage 3

In Abbildung 14 ist die Änderung der Cyclinexpression je Woche ersichtlich. Auffällig sind vor allem die isolierten Erhöhungen des Cyclins D1 (roter Balken) bei gleichzeitig sinkenden Cyclinen anderer Subtypen bei den Passagen 6, 8, 14, 18, 21, 23.

Besonders bei den Passagen 7, 13 und 16 sind gegenteilige Effekte zu beobachten.

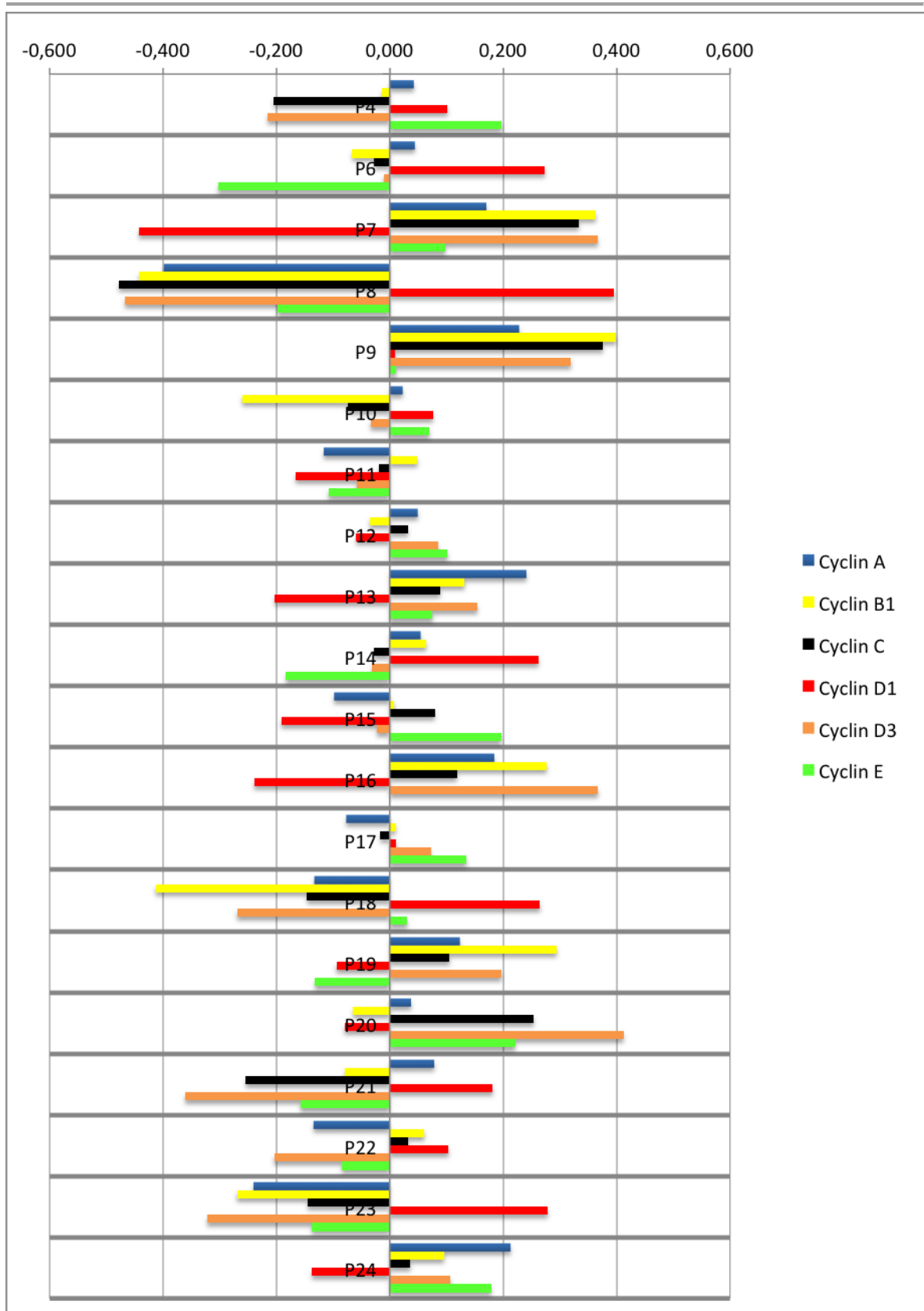


Abbildung 14: HSC07 – Cyclinexpressionsänderung je Woche

Die Balken zeigen die wöchentliche Änderung der relativen Cyclinexpression (normalisiert auf Passage 3) an.

3.2 HSC14

HSC14 konnte über 59 Wochen in Kultur gehalten werden. In dieser Zeit haben sich die Zellen um den Faktor $1,15 \times 10^{12}$ vermehrt. Im Laufe der Kultur wurde im Karyogramm eine Monosomie 7 festgestellt. Der genaue Zeitpunkt des Chromosomenverlustes ist nicht eruierbar.

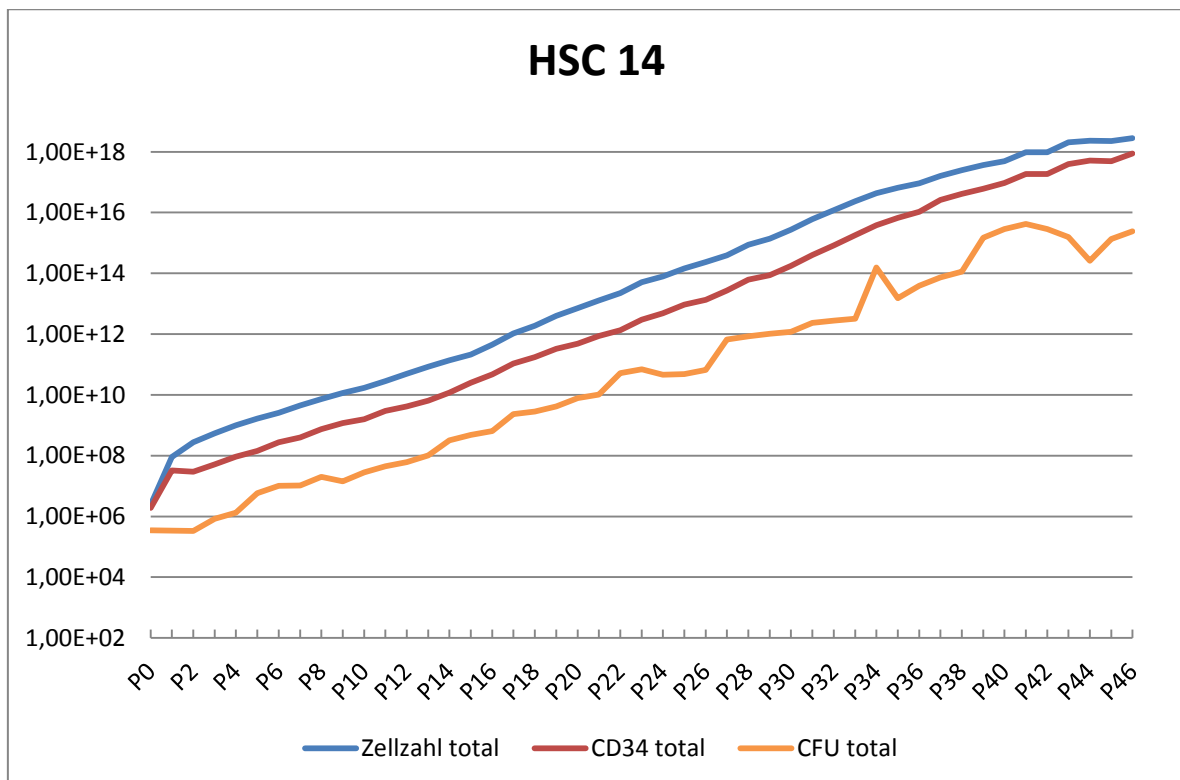


Abbildung 15: HSC14 – fiktive Gesamtzellzahl

Die blaue Linie bildet die fiktive Gesamtzellzahl ab der Passagen 0 bis 46 ab. Die rote Linie zeigt die fiktive Gesamtzahl an CD34-positiven Zellen. Die orange Linie zeigt die Ergebnisse des CFU-Assays (gebildete Kolonien pro Zelle), interpoliert auf die Gesamtzellzahl. Nach Passage 46 wurde die Kultur noch 13 Wochen aufrecht erhalten.

Auch bei HSC14 fällt ein deutlicher Abfall der wöchentlichen Vermehrung bereits nach einer Woche auf (siehe Abbildung 16). Von einem initialen Vermehrungsfaktor von 36,9 fällt der Wert in Passage 2 auf 3,1 ab um während der restlichen Kultur auf ähnlich niedrigem Niveau zu bleiben.

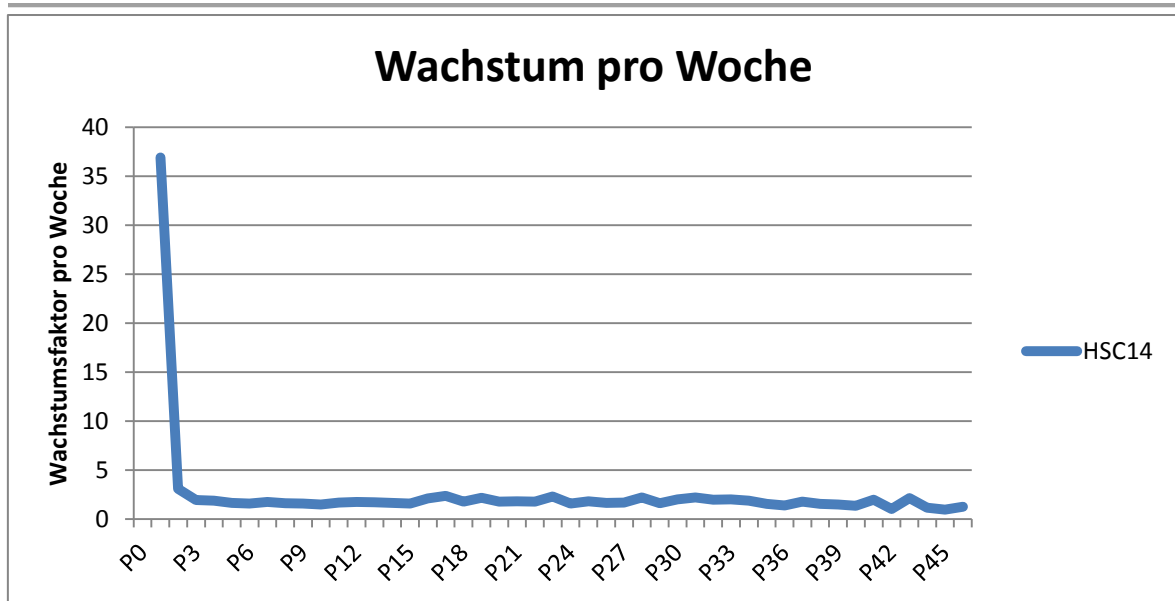


Abbildung 16: HSC14 – Wachstum pro Woche

Die primären Kolonien im CFU-Assay zeigen ebenfalls in der Anfangsphase den größten Abfall. Bildeten bei Passage 0 noch 18,40% aller CD34-positiven Zellen eine Kolonie, waren es nach zwei Wochen nur noch 1,13%. Jedoch sind bei dieser Kultur Peaks bei den Passagen 6 (3,73%), 11 (4,65%), 15 (7,27%), 22 (3,82), 27 (2,43%), 34 (3,99%) und 41 (2,24%) zu beobachten.

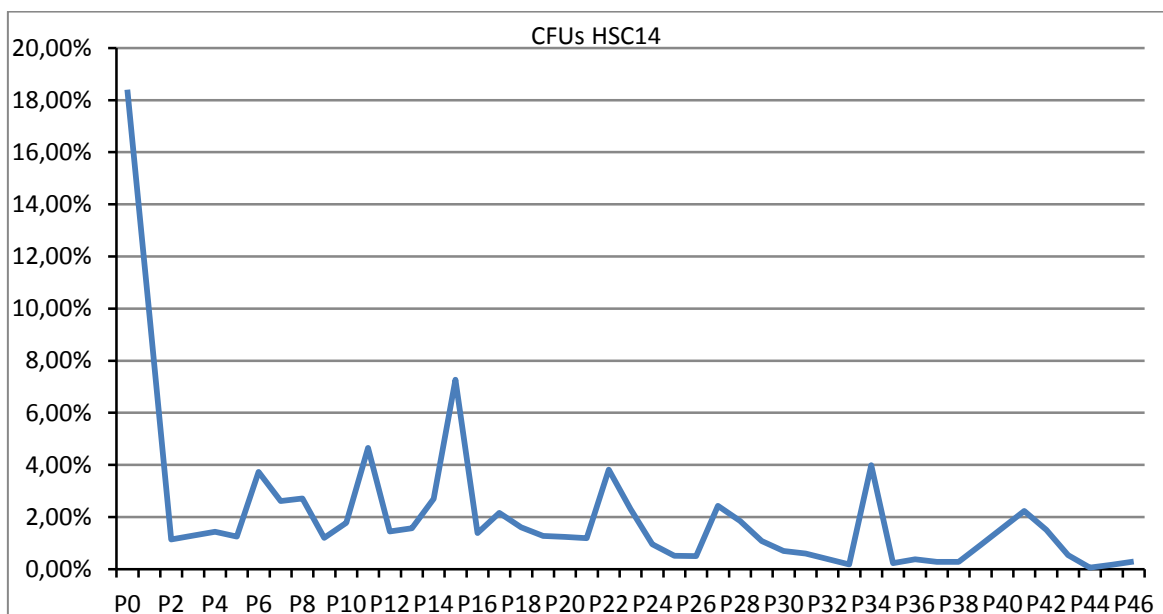


Abbildung 17: HSC14 – primärer CFU – Assay
Kolonien pro eingesetzter CD34⁺-Zelle (in Prozent).

Die Abbildung 18 zeigt die Expressionen von Cyclin B1 sowie von Beta-Actin im Vergleich. Hierbei sind vier Phasen beobachtet. Anfangs (Passage 2-13) bewegen sich Expressionen um den normierten Ausgangswert von 1. Beta-Actin bewegt sich zwischen 0,93 und 1,53 und Cyclin B1 zwischen 1 und 1,68. In der zweiten Phase sinkt die Beta-Actin-Expression (0,06-0,62), während Cyclin B1 vermehrt exprimiert wird (1,77-3,48). In der dritten Phase sinkt Cyclin B1 wieder auf Werte zwischen 0,77 und 1,89 ab und Beta-Actin steigt wieder auf Werte von 0,86 und 2,14 an. Die vierte und letzte Phase ähnelt der zweiten Phase. Die Beta-Actin Wert sinken wiederum auf 0,01-0,33 ab während die Cyclin B1-Expression auf 1,96-3,25 ansteigt.

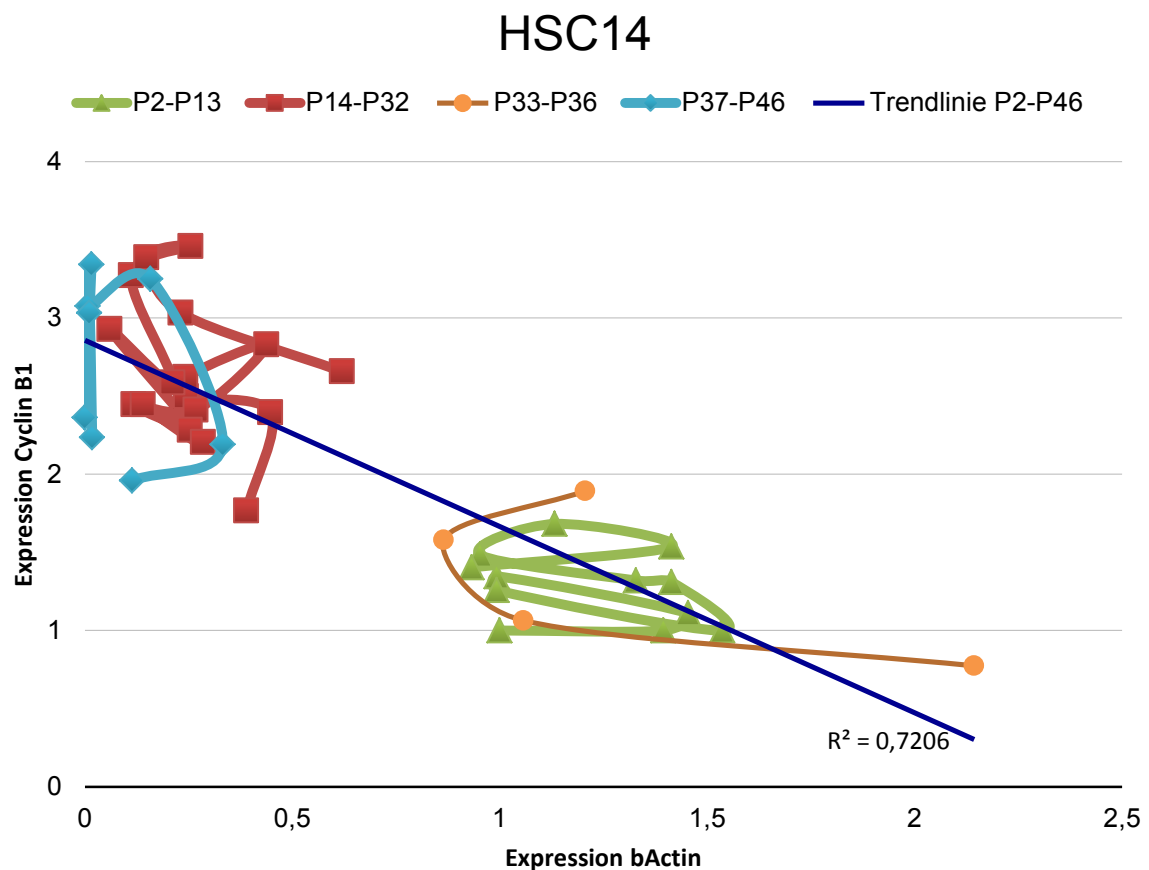


Abbildung 18: HSC14 – Expressionsvergleich Beta-Actin und Cyclin B1

x-fache Expressionen von beta-Actin und Cyclin B1 jeweils bezogen auf P3. Für die Cyclin B1-Expressionsmessung wurde GAPDH als house-keeping-gene verwendet. Die blaue Linie stellt eine lineare Trendlinie der Passagen 2 bis 46 dar.

Ein ähnlich starker indirekt proportionaler Zusammenhang wie zwischen Beta-Actin und Cyclin B1 (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,72$) kann auch zwischen Beta-Actin und Cyclin A ($R^2 = 0,62$) und zwischen Beta-Actin und Cyclin C ($R^2 = 0,58$) gefunden werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

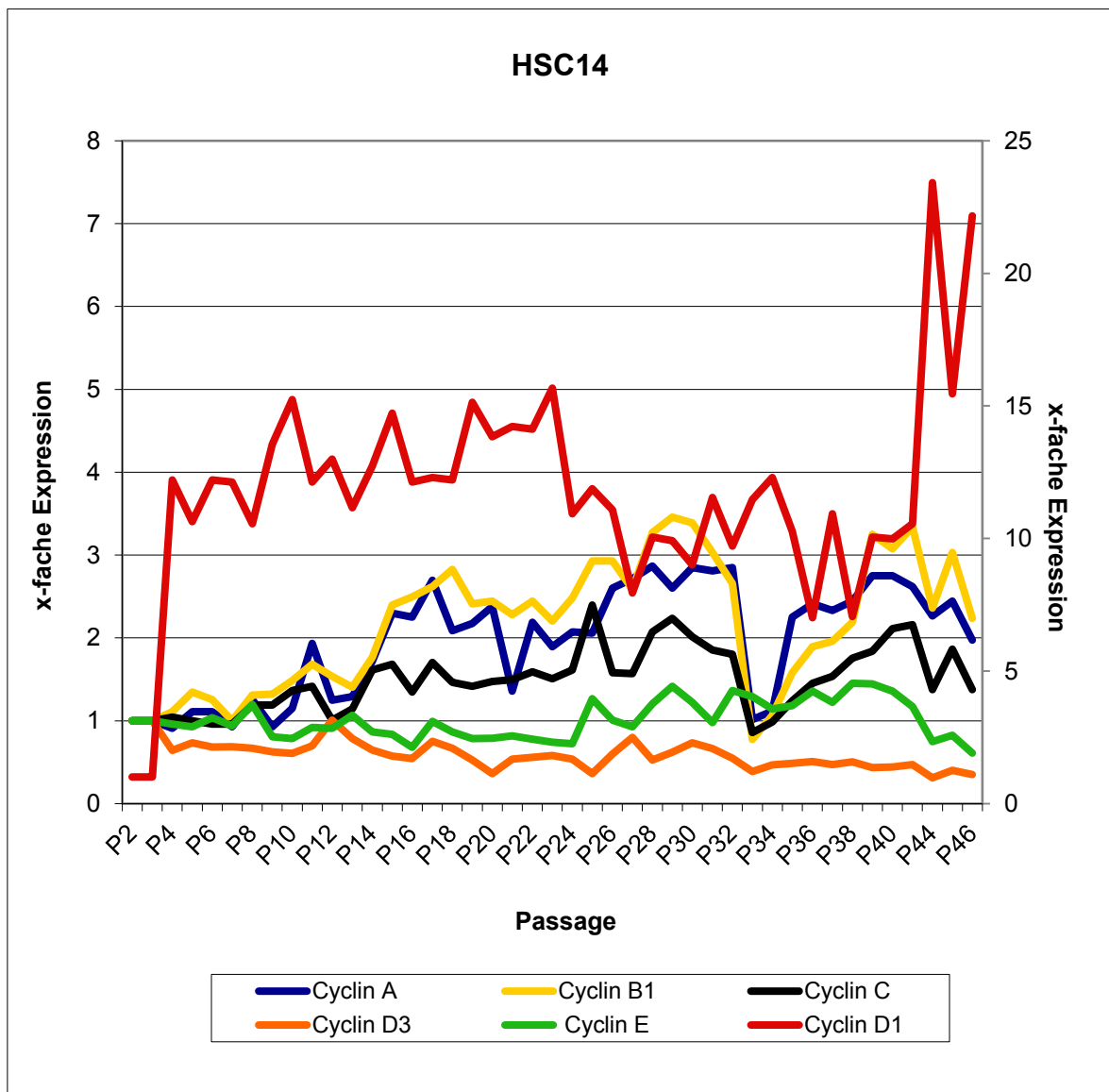


Abbildung 19: HSC14 – Cyclinexpression

X-fache Expression normalisiert auf Passage 3

Cyclin D1 bezieht sich auf die rechte Ordinate, die anderen Cycline auf die linke Ordinate.

In Abbildung 19 ist die Expression der Cycline normalisiert auf Passage 3 und GAPDH dargestellt (relative Expression bei P3 = 1). Cyclin A bewegt sich zwischen 0,91 und 2,87, Cyclin B1 zwischen 0,77 und 3,48 und Cyclin C zwischen

0,96 und 2,4. Bei Passage 33 ist zudem ein deutlicher Abfall der Cycline A, B1 und C zu verzeichnen.

Cyclin D3 und Cyclin E weisen im Kulturverlauf keine großen Änderungen auf. Cyclin D3 bewegt sich zwischen 0,31 und 1,01 und ist insgesamt fallend, während sich Cyclin E zwischen 0,61 und 1,45 bewegt und über Wochen annähernd gleich exprimiert wird.

Besonders auffällig ist die starke Expression von Cyclin D1. Ausgehend von 1 steigt die Expression binnen einer Woche um das 12,21-fache an. Bis Passage 41 bleibt die Expression auf ähnlich hohem Niveau (7,01-15,67) um bei Passage 42 nochmals anzusteigen auf Werte bis 23,43.

4 Diskussion

Bislang wurden an der Abteilung für Pädiatrische Hämatonkologie 14 HSZ-Kulturen unter gleichen Bedingungen gestartet. Zwei von ihnen konnten über einen ausreichend langen Zeitraum (zirka 26 Wochen) in Kultur gehalten werden und können für eine Auswertung herangezogen werden.

Bei der verwertbaren Kultur HSC07, aber auch bei HSC02 [43] war zu beobachten, dass die Kulturen in der ersten Woche noch beträchtlich expandierten. Danach war aber eine rasante Abnahme der Zellvermehrung auffällig (siehe Abbildung 5).

Die massive Abnahme der Vermehrung in Kultur, welche bereits nach ein bis zwei Wochen zu sehen war, könnte auf das unphysiologische Milieu in-vitro zurückzuführen sein. Hier könnte der für Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen unphysiologisch hohe Sauerstoffpartialdruck in-vitro eine große Rolle spielen, denn der Sauerstoffpartialdruck in der Nische des Knochenmarkes ist deutlich geringer als im ex-vivo-Versuchsaufbau.[52]

In der Folge kann das vermehrte Aufkommen von ROS in Kultur zu vermehrten DNA-Schäden führen und über p53-Aktivierung die Zellen eine vermehrte Apoptoserate der Zellen bewirkt haben.[5] Der oxidative Stress kann über TNF- α -Aktivierung zusätzlich zur Apoptose auch zu vermehrter Nekrose der HSPZ geführt haben.[53]

Auf niedrigerem Niveau stabilisierte sich das Wachstum und konnte über viele Wochen konstant aufrechterhalten werden, was auf die Möglichkeit eines Adaptationsmechanismus an die ex-vivo Bedingungen hinweisen würde.

Bei den Colony-Forming-Units waren ähnliche Beobachtungen zu machen. Sowohl beim Primär- als auch beim Sekundäransatz kam es zu einem beträchtlichen Abfall der Kolonien im Primäransatz beziehungsweise zu einem Abfall der proliferativen Kapazität, welche aus dem sekundären CFU-Assay abgeleitet werden kann.[47] Lediglich bei Passage 8 ist ein minimaler Anstieg der proliferativen Kapazität zu sehen. Diese Ergebnisse sind weitere Hinweise für eine mögliche Zunahme von Apoptose beziehungsweise Nekrose der HPSZ im Laufe der Kultur. Die Abnahme der Bildung von sekundären CFUs besonders in

den ersten Wochen, würde für eine Abnahme der proliferativen Kapazität sprechen.

Nicht nur der Vermehrungsfaktor, sondern auch andere Messgrößen zeigten besonders in den ersten Wochen massive Veränderungen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Anteil der Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen abnahm (siehe Abbildung 6). Zusätzlich kam es zu einer Veränderung des Oberflächenmarkerprofils (siehe Abbildung 7). Nach einem initialen Anstieg der linienspezifischen Oberflächenmarker bei Passage 3 sanken sie wieder ab um gegen Ende der Kultur ihr Maximum zu erreichen. In der FACS-Analyse stiegen die summierten prozentuellen Anteile aller gemessenen linienspezifischen Oberflächenantikörper gegen Ende der Kultur an und lagen bei bis zu 261 Prozent. Aufgrund der hohen prozentuellen Anteile müssen bei vielen Zellen Koexpressionen von mehreren dieser Oberflächenantigene vorkommen. Außerdem kommt es zu einer Verminderung der CFUs (siehe Abbildung 8). Diese Beobachtungen sind Hinweise, dass die HPSZ im Laufe der Kultur zur vermehrten Ausdifferenzierung neigen. Diese Entwicklung wurde auch bei HSC02 beobachtet.[43]

Die Telomeraseaktivität sank in einer Woche auf weniger als ein Zehntel des Ausgangswertes. Nach initialer Abnahme der Aktivität waren zwei Spitzen in den Wochen 12 und 15 zu verzeichnen. Diese Erhöhung war gefolgt von einer moderaten Verlängerung der Telomerlängen (siehe Abbildung 12). Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen von HSC02.[43] Die Telomerlänge beziehungsweise die Telomeraseaktivität dürften laut Ito et al. beim self-renewal keine Rolle spielen.[38] Jedoch herrscht darüber keine Einigkeit, so gehen andere Autoren davon aus, dass das self-renewal stark von der Telomerlänge respektive der Telomeraseaktivität abhängig ist.[54], [55]

Eine weitere Auffälligkeit im Kulturverlauf war das Auftreten von zwischenzeitlichen Erhöhungen (Peaks), wie etwa von der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und der SNEV-Expression. Eine mögliche Erklärung für diese Peaks wäre die Annahme, dass ein HSPZ-Klon eine dominante Stellung eingenommen haben könnte, um dann später wieder an Potenz zu verlieren. Wenn dieser HPSZ-Zellklon an Potenz verliert, könnte ein anderer HSPZ-Klon zur

Proliferation angeregt worden sein um dann seinerseits die dominante Rolle zu übernehmen.

Die Tatsache, dass die massive Erhöhung der Telomerase nur zu geringen Änderungen der Telomerlängen führte, könnte darauf hinweisen, dass ein HSPZ-Klon mit guter Telomeraseaktivität in der Lage war exzessiv zu proliferieren, jedoch durch den großen Proliferationsstress schnell verbraucht wurde.

Eine zweite Erklärung für die Peaks bei der SNEV-Expression und Telomeraseaktivität im Laufe der Zellkultur, könnte die Reaktion auf akkumulierte Alterungserscheinungen wie etwa DNA-Schäden im Sinne eines Gegenregulationsmechanismus sein.

Eine weitere mögliche Erklärung für die isolierten Erhöhungen der Telomeraseaktivität, wäre das kurzfristige Durchbrechen eines Tumorzellklons, da nicht nur HSPZ, sondern auch Tumorzellen Telomerase exprimieren.

Ab Passage 21 war praktisch keine Telomeraseaktivität mehr messbar. Die Telomerlänge unterlag im Verlauf geringen Schwankungen zeigte aber in HSC07 und HSC02 [43] insgesamt eine Verkürzung gegen Ende der Kulturen. In weiterer Folge war eine Abnahme der stammzellspezifischen Oberflächenantigene zu sehen. Insbesondere die Oberflächenmarker der frühen Stammzellen (CD133) nahmen ab (siehe Abbildung 6). Außerdem war eine weitere Abnahme der Vermehrung zu bemerken. Diese Ergebnisse weisen neben der kontinuierlichen Abnahme der Telomerlängen auf eine vermehrte Differenzierung der HSPZ und daher verminderte proliferative Kapazität im Laufe der Zellkultur hin.

Bei der Analyse der Cycline welche ihrerseits als Mediatoren im Zellzyklus fungieren fiel besonders bei den Passagen 6, 8, 14, 18, 21 und 23 eine isolierte Erhöhung des Cyclin D1-Expression bei gleichzeitiger Abnahme der anderen Cycline (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14) auf. Cyclin D1 mediiert die G1/S-Phasen-Transition indem es mit CDK4 oder CDK6 interagiert und so zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Retinoblastom-Familie führt. Infolge dessen wird E2F freigesetzt wodurch es zur Transskription von S-Phasen Genen kommt.[56] Cyclin D1 erfüllt aber noch eine weitere Funktion abseits der Zellzykluskontrolle.

Jirawatnotai et al. fanden heraus, dass Cyclin D1 direkt an RAD51 bindet und mit BRCA2 interagiert um den Reparatur-Komplex bei der homologen Rekombination zu stabilisieren.[57] In den Passagen mit Cyclinerhöhung ist also damit zu rechnen, dass mehr Zellen in die Synthesephase übertreten und dass ebenso vermehrt DNA-Reparatur stattfindet. Dies würde wiederum auf einen möglichen Gegenregulationsmechanismus auf auftretende DNA-Schäden hinweisen.

Gegenteilige Expressionsveränderungen sind bei den Passagen 7, 13, 15, 16, 24 zu verzeichnen. Hier sinkt die Cyclin D1-Expression, während die anderen Cycline wie etwa Cyclin B1 steigen. Cyclin B1 mediiert den Übergang von der G2 in die Mitosephase.[58] Das würde für eine vermehrte Zellteilung in diesen Passagen sprechen.

Die SNEV-Expression unterliegt Schwankungen und zeigt insgesamt einen Anstieg (Abbildung 10). Ein erster größerer Peak ist bei Passage 15 zu verzeichnen. Danach sinkt der Wert wieder ab um bei Passage 22 sein Maximum zu erreichen. Nach Passage 22 fällt die Expression wieder deutlich ab.

Da zum Ende der Kultur jedoch auch keine Telomeraseaktivität mehr feststellbar war und keine Vermehrung mehr stattfand, kann zu diesem Zeitpunkt vom Untergang der Kultur ausgegangen werden. Jeder Zellteilungsschritt verkürzt die Telomerlänge, was zum Fortschreiten des Alterungsprozesses führt.[42] Jedoch konnte im Modell mit Telomerase (TERT) - transgenen Mäusen gezeigt werden, dass auch Telomer-unabhängige Faktoren die proliferative Kapazität limitieren.[59] Ein Beispiel hierfür sind DNA-Schäden außerhalb der Telomere.[42]

Wenngleich im Comet-Assay nach einem initialen Gipfel kein nennenswerter Anstieg von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen detektiert werden konnte, deutet der massive Anstieg von SNEV bei Passage 22 auf eine Akkumulation von DNA-Schäden hin und könnte gleichbedeutend mit dem letzten Versuch sein, die erworbenen Schäden zu kompensieren. Die DNA ist in Folge von metabolischen Prozessen und exogenen Einflussfaktoren einem ständigen oxidativen Stress ausgesetzt. Zusätzlich bedeutet die Expansion des Transplantats in EmpfängerInnen beim Aufbau des allogenen Immunsystems einen großen Proliferationsstress mit der konsekutiven Akkumulation von ROS aus jedem

Zellzyklus, wodurch sich in weiterer Folge DNA-Schäden akkumulieren können.[60]

Zusammenfassend ist der Proliferationsstress, der auf transplantierte HSPZ wirkt, ein wichtiger Faktor im Alterungsprozess. Ausschlaggebend hierfür sind die Hinweise, dass die Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch DNA-Schäden dem HSPZ-Pool durch Apoptose beziehungsweise Nekrose verloren gehen könnten und die Proliferation zusätzlich durch die Verkürzung der Telomere der HSPZ vermindert werden könnte. Diese Prozesse bedingen wiederum eine Abnahme der Kapazität der HSPZ was im Laufe eines Lebens mit dem Transplantat zu negativen Auswirkungen besonders in den Pädiatrischen PatientInnen führen könnte. Würde man noch zusätzlich vor einer Stammzelltransplantation eine ex-vivo Expansion von Nabelschnurblut durchführen, würde der erhöhte Sauerstoffpartialdruck außerhalb des Körpers noch zu einer weiteren Erhöhung des oxidativen Stresses führen. Zwar könnte die ex-vivo Expansion von Nabelschnurblut ein Mittel sein um die Wahrscheinlichkeit eines suffizienten Engraftments des Transplantats zu erhöhen, der höhere Sauerstoffpartialdruck stellt aber eine zusätzliche schädliche Komponente zum Proliferationsstress dar. Somit könnte eine derartige Vorbehandlung zu einer Minderung der Proliferationskapazität und zu vorzeitigem Altern des neuen Hämatopoetischen Systems führen. Zusätzlich ist auch die mögliche Entstehung eines Tumors in Kulturbedingungen zu beachten.[61]

4.1 Monosomie bei HSC14

HSC 14 konnte im Vergleich deutlich länger in Kultur gehalten werden (59 Wochen) (siehe Abbildung 15). Wie bei HSC07 ist auch bei HSC14 ein steiler Abfall des Wachstums (siehe Abbildung 16) und der gebildeten Kolonien im CFU-Assay (siehe Abbildung 17) in den ersten zwei Wochen zu beobachten. Der Primäre CFU-Assay zeigt jedoch deutliche Schwankungen, die Anzeichen einer gesteigerten Proliferation eines Zellklons darstellen könnten.

Zusätzlich wurde im Laufe der Kultivierung bei HSC14 eine Monosomie 7 festgestellt. Das Vorkommen einer Monosomie 7 ist charakteristisch für myeloide Erkrankungen wie dem Myelodysplastischen Syndrom oder einer akuten myeloischen Leukämie.[62],[63] Wenn eine Monosomie 7 bei diesen Erkrankungen vorliegt, kann von einer schlechteren Prognose ausgegangen werden.[63]

Thomay et al. konnten in einer Untersuchung ähnliche Beobachtungen feststellen: Eine Kultur (Long-Term-Culture von CD34+ Zellen) wies ab der sechsten Woche ebenfalls eine Monosomie 7 auf. Zudem konnten auch in anderen Kulturen chromosomale Schäden wie etwa Brüche in großer Anzahl festgestellt werden.[64]

Um die SNEV-Expression von HSC14 zu messen, wurde Beta-Actin als Referenzgen verwendet. Der Genlocus von Beta-Actin liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 [Ensembl Version 77 - <http://www.ensembl.org>], [65]. Wie sich später herausstellte, hat sich bei dieser Kultur eine Monosomie 7 entwickelt. Da dies wahrscheinlich zu einer verminderten Expression von Beta-Actin führt, sind die Daten mit Beta-Actin als house-keeping-gene nicht valide. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse nicht dargestellt.

Der Zeitpunkt der Entstehung der Chromosomenanomalie konnte nicht genau eruiert werden, da zu diesem Zeitpunkt kein Probenmaterial von früheren Passagen mehr zur Verfügung stand.

Jedoch kann durch das Expressionsmuster von Beta-Actin der Zeitpunkt des Chromosomenverlustes abgeschätzt werden. Beta-Actin ist ein hochkonserviertes Strukturprotein des Zytoskelettes und wird normalerweise in vielen verschiedenen

Gewebe des menschlichen Körpers relativ konstant exprimiert, weshalb es häufig als house-keeping-gene verwendet wird.[66]

Ab Passage 14 nimmt die Expression von Beta-Actin deutlich ab. Da das Beta-Actin-Gen auf Chromosom 7 liegt, könnte der Verlust des Chromosoms für die verminderte Expression ursächlich sein. Allerdings kommt es zwischen den Passagen 33 und 36 erneut zu einem Anstieg der Beta-Actin-Expression, welche danach wiederum absinkt.

Interessant ist der enge indirekt proportionale Zusammenhang zwischen Beta-Actin und Cyclin B1. Wird weniger Beta-Actin exprimiert, steigt die relative Expression von Cyclin B1 (siehe Abbildung 18).

Cyclin B1 wird normalerweise in geringem Maße exprimiert und akkumuliert nur während der G2-M-Phasen-Transition des Zellzyklus. In Tumorzellen können abnorm hohe Level an Cyclin B1 gefunden werden.[58]

Auch Beta-Actin wird in Malignomen hochreguliert gefunden und mitunter für die Tumorgenese beziehungsweise für ein erhöhtes Metastasierungspotenzial verantwortlich gemacht. So konnten bei PatientInnen mit akuter Leukämie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Werte an Beta-Actin gefunden werden, weshalb es auch einen Indikator für das Auftreten einer Leukämie darstellen könnte.[66]

Wenn aber angenommen wird, dass die verminderte Expression von Beta-Actin ein Indikator des Chromosomenverlustes ist, könnte nun sowohl die verminderte Beta-Actin-, als auch die erhöhte Cyclin B1-Expression auf eine exzessive Vermehrung eines aberranten Zellklons hindeuten. Bei HSC14 konnte dies in den Zeiträumen von Passage 14 bis 32 und von Passage 37 bis 46 beobachtet werden (siehe Abbildung 18).

Auffällig bei HSC 14 war zudem die sehr hohe Expression Cyclin D1. Die Abbildung 19 zeigt die Expression der Cycline bezogen auf Passage 3. Nach einer Woche stieg die Expression auf das 12,2-fache an, um sich bis Passage 26 im Bereich von 10,6 bis 15,7 zu bewegen. Danach sank der Wert wieder etwas ab und schwankte von Passage 27 bis 41 zwischen 7-fachen und 12,3-fachen

Expressionswerten. Bei Passage 44 stieg die Expression auf das 23,4-fache des Ausgangswertes und erreichte hier das Maximum.

Eine Fehlregulation in jedem Zwischenschritt der Retinoblastom-Kaskade kann onkogen wirken. Eine Überexpression von Cyclin D1 wurde in verschiedenen Malignomen wie etwa dem Astrozytom, dem kleinzelligem Bronchuscarzinom, dem Zervixcarzinom, verschiedenen Weichteiltumoren und vor Allem beim Mammacarcinom gefunden.[67]

Wenngleich die zweite Funktion von Cyclin D1 (in der DNA-Reparatur) kein onkogenes Potential vermuten lässt, könnte es dennoch entartete Zellen vor der Behandlung schützen indem es zum Beispiel die Reparatur der Strahlentherapie-induzierten DNA-Schäden initiiert.[56]

Cycline dienen zusammen mit den Cyclin-abhängigen-Kinasen als Checkpointproteine im Zellzyklus. Sowohl die Cycline B1 und D1, als auch Cyclin A werden in verschiedenen Malignomen hochreguliert was zu einer erhöhten Teilungsaktivität führt. Cycline werden, um von Proteasen degradiert werden zu können, ubiquitiniert. In einem ähnlichen Signalweg werden Antigene im Rahmen der spezifischen Abwehr präsentiert. Insofern ist es möglich, dass eine Fehlregulation des Cyclinabbaus eine Rolle bei der Entstehung von Malignomen spielt. Daher könnten sie auch als Ziele der Immuntherapie künftig von Interesse sein.[58]

4.2 Limitationen und Ausblick

Als Ausgangspunkt einiger Untersuchungen musste Passage 2 bzw. 3 gewählt werden. Da erst ab diesem Zeitpunkt Material in ausreichender Menge und Reinheit (CD34+) gewonnen werden konnte.

Innerhalb der Kultur kann nicht davon ausgegangen werden, dass das heterogene Zellgemisch einen synchronisierten Zellzyklus aufweist, wodurch die Erhebung der Cyclinexpression lediglich einen Querschnitt durch die Zellpopulationen darstellt.

Die vorliegenden Daten lassen zum jetzigen Zeitpunkt lediglich Vermutungen zu, welche sich auf die Beobachtungen während der einzelnen Zellkulturen stützen. Für eine Aussage mit ausreichend statistischer Aussagekraft ist es notwendig noch weitere Zellkulturen durchzuführen. Die Dauer des ausgewählten Versuchsaufbaus lässt es allerdings nicht zu, diese Zellkulturen noch in dieser Diplomarbeit zu bearbeiten.

Den Goldstandard für Untersuchungen zur proliferativen Kapazität beziehungsweise self-renewal von Hämatopoetischen Stammzellen stellt die serielle Transplantation im Mausmodell dar. Für den aktuellen Versuchsaufbau wäre diese allerdings, aufgrund der hohen Zellmengen, die dafür benötigt werden, nicht durchführbar und praktikabel.[37],[47]

Beim Expressionsvergleich in Abbildung 18 wurde für die Cyclin-Bestimmung GAPDH als house-keeping-gene verwendet. Die Expression von Beta-Actin wurde allerdings nur auf die Passage 3 normalisiert.

Das Vorkommen von chromosomalen Schäden, sowohl in unseren Untersuchungen, als auch in Studien anderer Arbeitsgruppen, impliziert die Notwendigkeit von zytogenetischen Analysen in jeder weiteren ex-vivo-Kultivierung von Hämatopoetischen Stammzellen.

Zur Detektion von DNA-Schäden könnte künftig gamma-H2AX verwendet werden. H2AX ist eine Variante des Histons H2A. Im Falle eines Doppelstrangbruchs wird (zum Teil ATM und ATR vermittelt) dieses Histon phosphoryliert und wird dann als gamma-H2AX bezeichnet. Wenngleich mit der Messung von gamma-H2AX nur auf die Anzahl von Doppelstrangbrüchen rückschließen lässt und

Einzelstrangbrüche unberücksichtigt bleiben, liefert die Möglichkeit des FACS mit der Verwendung eines Anti-gamma-H2AX-Antikörpers ein hohes Maß an Standardisierbarkeit.[68] Außerdem könnten DNA-Schäden in verschiedenen Zellsubtypen unterschieden werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] A. Marciniak-Czochra, T. Stiehl, and W. Wagner, "Modeling of replicative senescence in hematopoietic development," *Aging*, vol. 1, no. 8, p. 723, 2009.
- [2] M. R. Rose, *Evolutionary Biology of Aging*. New York: Oxford University Press, 1994.
- [3] M. R. Rose, T. Flatt, J. L. Graves, L. F. Greer, D. E. Martinez, M. Matos, L. D. Mueller, R. J. Shmookler Reis, and P. Shahrestani, "What is Aging?," *Front. Genet.*, vol. 3, 2012.
- [4] I. Glauche, L. Thielecke, and I. Roeder, "Cellular aging leads to functional heterogeneity of hematopoietic stem cells: a modeling perspective: Aging-related heterogeneity of HSCs," *Aging Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 457–465, Jun. 2011.
- [5] F. Zhou, Q. Shen, and F. X. Claret, "Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 94, no. 3, pp. 423–429, Sep. 2013.
- [6] S. Ghaffari, "Oxidative Stress in the Regulation of Normal and Neoplastic Hematopoiesis," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 11, pp. 1923–1940, Nov. 2008.
- [7] A. V. Ergen and M. A. Goodell, "Mechanisms of hematopoietic stem cell aging," *Exp. Gerontol.*, vol. 45, no. 4, pp. 286–290, Apr. 2010.
- [8] I. Beerman, W. J. Maloney, I. L. Weissmann, and D. J. Rossi, "Stem cells and the aging hematopoietic system," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, no. 4, pp. 500–506, Aug. 2010.
- [9] C. Kollman, "Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age," *Blood*, vol. 98, no. 7, pp. 2043–2051, Oct. 2001.
- [10] J. H. F. Falkenburg and E. H. Warren, "Graft versus Leukemia Reactivity after Allogeneic Stem Cell Transplantation," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 17, no. 1, pp. S33–S38, Jan. 2011.

-
- [11] S. Heidegger, M. R. M. van den Brink, T. Haas, and H. Poeck, "The Role of Pattern-Recognition Receptors in Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation," *Front. Immunol.*, vol. 5, Jul. 2014.
- [12] N. Kekre and J. H. Antin, "Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist," *Blood*, vol. 124, no. 3, pp. 334–343, Jul. 2014.
- [13] C. Urban, M. Benesch, P. Sovinz, S. Sipurzynski, H. Lackner, E. Müller, and W. Schwinger, "Alternative donor HSCT in refractory acquired aplastic anemia - Prevention of graft rejection and graft versus host disease by immunoablative conditioning and graft manipulation: Alternative donor HSCT in refractory aplastic anemia," *Pediatr. Transplant.*, vol. 16, no. 6, pp. 577–581, Sep. 2012.
- [14] M. de Lima, J. McMannis, A. Gee, K. Komanduri, D. Couriel, B. S. Andersson, C. Hosing, I. Khouri, R. Jones, R. Champlin, S. Karandish, T. Sadeghi, T. Peled, F. Grynspan, Y. Daniely, A. Nagler, and E. J. Shpall, "Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 41, no. 9, pp. 771–778, May 2008.
- [15] W. Saber, S. Opie, J. D. Rizzo, M.-J. Zhang, M. M. Horowitz, and J. Schriber, "Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia," *Blood*, vol. 119, no. 17, pp. 3908–3916, Apr. 2012.
- [16] K. K. Ballen, E. Gluckman, and H. E. Broxmeyer, "Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond," *Blood*, vol. 122, no. 4, pp. 491–498, Jul. 2013.
- [17] V. Rocha, E. Gluckman, and on behalf of the Eurocord-Netcord registry and European Blood and Marrow Transplant group, "Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors," *Br. J. Haematol.*, vol. 147, no. 2, pp. 262–274, Oct. 2009.
- [18] E. J. Shpall, R. Quinones, R. Giller, C. Zeng, A. E. Baron, R. B. Jones, S. I.

Bearman, Y. Nieto, B. Freed, N. Madinger, and others, "Transplantation of ex vivo expanded cord blood," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 8, no. 7, pp. 368–376, 2002.

[19] E. Gluckman, H. A. Broxmeyer, A. D. Auerbach, H. S. Friedman, G. W. Douglas, A. Devergie, H. Esperou, D. Thierry, G. Socie, and P. Lehn, "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling," *N. Engl. J. Med.*, vol. 321, no. 17, pp. 1174–1178, Oct. 1989.

[20] A. Ruggeri, G. Sanz, H. Bittencourt, J. Sanz, A. Rambaldi, F. Volt, I. Yakoub-Agha, J. M. Ribera, L. Mannone, J. Sierra, M. Mohty, C. Solano, S. Nabhan, W. Arcese, E. Gluckman, M. Labopin, and V. Rocha, "Comparison of outcomes after single or double cord blood transplantation in adults with acute leukemia using different types of myeloablative conditioning regimen, a retrospective study on behalf of Eurocord and the Acute Leukemia Working Party of EBMT," *Leukemia*, vol. 28, no. 4, pp. 779–786, Apr. 2014.

[21] M. de Lima, I. McNiece, S. N. Robinson, M. Munsell, M. Eapen, M. Horowitz, A. Alousi, R. Saliba, J. D. McMannis, I. Kaur, P. Kebriaei, S. Parmar, U. Popat, C. Hosing, R. Champlin, C. Bollard, J. J. Mollndrem, R. B. Jones, Y. Nieto, B. S. Andersson, N. Shah, B. Oran, L. J. N. Cooper, L. Worth, M. H. Qazilbash, M. Korbling, G. Rondon, S. Ciurea, D. Bosque, I. Maewal, P. J. Simmons, and E. J. Shpall, "Cord-Blood Engraftment with Ex Vivo Mesenchymal-Cell Coculture," *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 24, pp. 2305–2315, Dec. 2012.

[22] L. Metheny, P. Caimi, and M. de Lima, "Cord Blood Transplantation: Can We Make it Better?," *Front. Oncol.*, vol. 3, 2013.

[23] D. Weisdorf, "Which donor or graft source should you choose for the strongest GVL? Is there really any difference," *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 26, no. 3, pp. 293–296, Sep. 2013.

[24] M. Soufizomorrod, M. Soleimani, A. Hajifathali, M. M. Mohammadi, and S. Abroun, "Expansion of CD133+ Umbilical Cord Blood Derived Hematopoietic Stem Cells on a Biocompatible Microwells," *Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res.*, vol. 7, no. 1, p. 9, 2013.

-
- [25] S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick, "Hematopoiesis: A Human Perspective," *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 2, pp. 120–136, Feb. 2012.
- [26] H. Ema, Y. Morita, and T. Suda, "Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells," *Exp. Hematol.*, vol. 42, no. 2, pp. 74–82.e2, Feb. 2014.
- [27] S. Doulatov, F. Notta, K. Eppert, L. T. Nguyen, P. S. Ohashi, and J. E. Dick, "Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 7, pp. 585–593, Jul. 2010.
- [28] C. M. Baum, I. L. Weissman, A. S. Tsukamoto, A.-M. Buckle, and B. Peault, "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, no. 7, pp. 2804–2808, 1992.
- [29] J. S. Nielsen and K. M. McNagny, "Novel functions of the CD34 family," *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. 24, pp. 4145–4145, Dec. 2008.
- [30] T. Jaatinen, H. Hemmoranta, S. Hautaniemi, J. Niemi, D. Nicorici, J. Laine, O. Yli-Harja, and J. Partanen, "Global Gene Expression Profile of Human Cord Blood-Derived CD133⁺ Cells," *Stem Cells*, vol. 24, no. 3, pp. 631–641, Mar. 2006.
- [31] E. Laurenti and J. E. Dick, "Molecular and functional characterization of early human hematopoiesis: Profiling human stem and progenitor cells," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1266, no. 1, pp. 68–71, Aug. 2012.
- [32] S. Zimmermann and U. M. Martens, "Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells," *Cell Tissue Res.*, vol. 331, no. 1, pp. 79–90, Jan. 2008.
- [33] C. E. Schuller, K. Jankowski, and K. L. Mackenzie, "Telomere length of cord blood-derived CD34⁺ progenitors predicts erythroid proliferative potential," *Leukemia*, vol. 21, no. 5, pp. 983–991, 2007.
- [34] K. N. Mahajan and B. S. Mitchell, "Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 19, pp. 10746–10751, 2003.
- [35] L. Wan and J. Huang, "The PSO4 Complex Associates with RPA and Modulates the Activation of ATR," *J. Biol. Chem.*, Jan. 2014.
-

-
- [36] A. Maréchal, J.-M. Li, X. Y. Ji, C.-S. Wu, S. A. Yazinski, H. D. Nguyen, S. Liu, A. E. Jiménez, J. Jin, and L. Zou, "PRP19 Transforms into a Sensor of RPA-ssDNA after DNA Damage and Drives ATR Activation via a Ubiquitin-Mediated Circuitry," *Mol. Cell*, vol. 53, no. 2, pp. 235–246, Jan. 2014.
- [37] E. Schraml, R. Voglauer, K. Fortschegger, M. Sibilica, I. Stelzer, J. Grillari, and K. Schauenstein, "Haploinsufficiency of SNEV Causes Defects of Hematopoietic Stem Cells Functions," *Stem Cells Dev.*, vol. 17, no. 2, pp. 355–366, Apr. 2008.
- [38] K. Ito, A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T. W. Mak, and T. Suda, "Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells," *Nature*, vol. 431, no. 7011, pp. 997–1002, Oct. 2004.
- [39] K. Naka, T. Muraguchi, T. Hoshii, and A. Hirao, "Regulation of Reactive Oxygen Species and Genomic Stability in Hematopoietic Stem Cells," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 11, pp. 1883–1894, Nov. 2008.
- [40] Z. Tothova and D. G. Gilliland, "FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 2, pp. 140–152, Aug. 2007.
- [41] Z. Tothova, R. Kollipara, B. J. Huntly, B. H. Lee, D. H. Castrillon, D. E. Cullen, E. P. McDowell, S. Lazo-Kallanian, I. R. Williams, C. Sears, S. A. Armstrong, E. Passegué, R. A. DePinho, and D. G. Gilliland, "FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress," *Cell*, vol. 128, no. 2, pp. 325–339, Jan. 2007.
- [42] H. Geiger and K. L. Rudolph, "Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment," *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 7, pp. 360–365, Jul. 2009.
- [43] Dr.med. Christian Rehnolt, "Etablierung von Methoden zu Erhebung von Daten über das Altern hämatopoetischer Stammzellen in einem Langzeitexpansionsmodell," Medizinische Universität Graz, 2012.
- [44] S. Wright, U. Steinwandel, and P. Ferrari, "Citrate anticoagulation using ACD solution A during long-term haemodialysis: Citrate haemodialysis,"

Nephrology, vol. 16, no. 4, pp. 396–402, May 2011.

[45] A. Gajkowska, T. Oldak, M. Jastrzevska, E. K. Machaj, J. Walewski, E. Kraszewska, and Z. Pojda, "Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods.," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 53–52, 2006.

[46] L. E. Purton and D. T. Scadden, "Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 263–270, 2007.

[47] J. M. Kröpfl, I. Stelzer, H. Mangge, K. Pekovits, R. Fuchs, N. Allard, L. Schinagl, P. Hofmann, G. Dohr, S. Wallner-Liebmann, W. Domej, and W. Müller, "Exercise-Induced Norepinephrine Decreases Circulating Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Colony-Forming Capacity," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, p. e106120, Sep. 2014.

[48] R. Fuchs, I. Stelzer, C. M. P. Drees, C. Rehnolt, E. Schraml, A. Sadjak, and W. Schwinger, "Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells," *Cell Biol. Int.*, vol. 36, no. 1, pp. 113–117, Jan. 2012.

[49] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, Oct. 1985.

[50] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.

[51] R. M. Cawthon, "Telomere measurement by quantitative PCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 10, pp. e47–e47, 2002.

[52] P. Eliasson and J.-I. Jönsson, "The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be," *J. Cell. Physiol.*, vol. 222, no. 1, pp. 17–22, Jan. 2010.

[53] M. J. Morgan, Y.-S. Kim, and Z. Liu, "TNF α and reactive oxygen species in

necrotic cell death,” *Cell Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 343–349, Mar. 2008.

[54] S. J. Morrison, K. R. Prowse, P. Ho, and I. L. Weissman, “Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential,” *immunity*, vol. 5, no. 3, pp. 207–216, 1996.

[55] J. Zhang and Z. Ju, “Telomere, DNA damage, and oxidative stress in stem cell aging,” *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, vol. 90, no. 4, pp. 297–307, Dec. 2010.

[56] J. Bartek and J. Lukas, “DNA repair: Cyclin D1 multitasks,” *Nature*, vol. 474, no. 7350, pp. 171–172, Jun. 2011.

[57] S. Jirawatnotai, Y. Hu, W. Michowski, J. E. Elias, L. Becks, F. Bienvenu, A. Zagozdzon, T. Goswami, Y. E. Wang, A. B. Clark, T. A. Kunkel, T. van Harn, B. Xia, M. Correll, J. Quackenbush, D. M. Livingston, S. P. Gygi, and P. Sicinski, “A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers,” *Nature*, vol. 474, no. 7350, pp. 230–234, Jun. 2011.

[58] A. M. Egloff, “Cyclin B1 and Other Cyclins as Tumor Antigens in Immunosurveillance and Immunotherapy of Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 6–9, Jan. 2006.

[59] R. C. Allsopp, G. B. Morin, J. W. Horner, R. DePinho, C. B. Harley, and I. L. Weissman, “Effect of TERT over-expression on the long-term transplantation capacity of hematopoietic stem cells,” *Nat. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 369–371, 2003.

[60] T. Yahata, T. Takanashi, Y. Muguruma, A. A. Ibrahim, H. Matsuzawa, T. Uno, Y. Sheng, M. Onizuka, M. Ito, S. Kato, and K. Ando, “Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells,” *Blood*, vol. 118, no. 11, pp. 2941–2950, Sep. 2011.

[61] D. J. Prockop and A. Keating, “Relearning the Lessons of Genomic Stability of Human Cells During Expansion in Culture: Implications for Clinical Research,” *STEM CELLS*, vol. 30, no. 6, pp. 1051–1052, Jun. 2012.

[62] S. J. Corey, M. D. Minden, D. L. Barber, H. Kantarjian, J. C. Y. Wang, and A. D. Schimmer, “Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell

diseases,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 2, pp. 118–129, Feb. 2007.

[63] A. D. Trobaugh-Lotrario, M. Kletzel, R. R. Quinones, L. McGavran, M. A. Proytcheva, S. P. Hunger, J. Malcolm, D. Schissel, E. Hild, and R. H. Giller, “Monosomy 7 associated with pediatric acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS): successful management by allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT),” *Bone Marrow Transplant.*, vol. 35, no. 2, pp. 143–149, Jan. 2005.

[64] K. Thomay, A. Schienke, B. Vajen, U. Modlich, A. Schambach, W. Hofmann, B. Schlegelberger, and G. Göhring, “Chromosomal Instability and Telomere Shortening in Long-Term Culture of Hematopoietic Stem Cells: Insights from a Cell Culture Model of RPS14 Haploinsufficiency,” *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 142, no. 1, pp. 14–20, 2014.

[65] P. Flicek, M. R. Amode, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S. Hunt, N. Johnson, T. Juettemann, A. K. Kahari, S. Keenan, E. Kulesha, F. J. Martin, T. Maurel, W. M. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, M. Pignatelli, B. Pritchard, E. Pritchard, H. S. Riat, M. Ruffier, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, S. J. Trevanion, A. Vullo, S. P. Wilder, M. Wilson, A. Zadissa, B. L. Aken, E. Birney, F. Cunningham, J. Harrow, J. Herrero, T. J. P. Hubbard, R. Kinsella, M. Muffato, A. Parker, G. Spudich, A. Yates, D. R. Zerbino, and S. M. J. Searle, “Ensembl 2014,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, pp. D749–D755, Jan. 2014.

[66] C. Guo, S. Liu, J. Wang, M.-Z. Sun, and F. T. Greenaway, “ACTB in cancer,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 417, pp. 39–44, Feb. 2013.

[67] A. Deshpande, P. Sicinski, and P. W. Hinds, “Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective,” *Oncogene*, vol. 24, no. 17, pp. 2909–2915, Apr. 2005.

[68] F. Bouquet, C. Muller, and B. Salles, “Report The Loss of γ H2AX Signal is a Marker of DNA Double Strand Breaks Repair Only at Low Levels of DNA Damage,” *Cell Cycle*, vol. 5, no. 10, pp. 1116–1122, 2006.

6 Anhang

6.1 Reagenzien, Medien und Puffer

Elektrophoresepuffer Comet-Assay

- 12,4g NaOH
- 372mg EDTA
- Ad 1000ml ddH₂O

pH-Wert: 10

Lysepuffer Comet-Assay

- 142g NaCl
- 37,2g Na₂EDTA 2H₂O
- 1,2g Trizma Base
- 8g NaOH
- Ad 1000ml ddH₂O

Kurz vor Verwendung wurde noch 1% Triton X-100 hinzugefügt

Neutralisationspuffer Comet-Assay

- 48,5 g TRIS
- ad 1000ml ddH₂O

Einstellung des pH-Werts auf 7,4 mit rauchender Salzsäure

Low-Melting Agarose

- 1g Low-Melting Agarose (LE) - BMA
- ad 100ml ddH₂O

Normal-Melting Agarose

- 1g Normal-Melting Agarose (ME) - Promega
- ad 100ml ddH₂O

Lösen bei 100°C

Calcium- und Magnesium-freier Phosphatpuffer (CMF-PBS)

- | | |
|-------------|------------------------------------|
| • 8g | NaCl |
| • 0,3g | KCl |
| • 2g | Glucose-Monohydrat |
| • 91,4g | Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat |
| • 0,02g | Kaliumdihydrogenphosphat |
| • ad 1000ml | ddH ₂ O |

pH-Wert 7,4**Acid-Citrat-Dextrose Lösung A**

- | | |
|-------------|-----------------------|
| • 7,3g | Citrat |
| • 24,5g | Natriumcitratdihydrat |
| • 22g | Dextrosemonohydrat |
| • ad 1000ml | ddH ₂ O |

pH-Wert 5,1**Stammzellmedium**

- | | |
|---------|--------------------------------|
| • 100ml | FBS (10%) |
| • 1ml | Stem Cell Factor (50ng/ml) |
| • 1ml | Flt3/Flk2 (50ng/ml) |
| • 1ml | Interleukin 6 (10ng/ml) |
| • 1ml | TPO (10ng/ml) |
| • 896ml | CMF-PBS mit Phenolrot versetzt |