

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

---

**Nachweis von Telomeraseaktivität und Telomerlängen  
in humanen mesenchymalen Stammzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Britta Austrup  
aus Gronau

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Götz  
Prof. Dr. med. A. Imhof

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Matthias Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Mesenchymale Stammzellen und Tissue Engineering.....	6
1.2 Telomere.....	9
1.2.1 Funktion und Aufbau der Telomere.....	9
1.2.2 Telomere und das <i>end replication problem</i> .....	10
1.2.3 Telomere und <i>replicative senescence</i> .....	12
1.3 Telomerase.....	12
1.3.1 Funktion der Telomerase.....	12
1.3.2 Telomeraseaktivität in immortalen Zellen.....	14
1.3.3 Telomeraseaktivität in Stammzellen und somatischen Zellen.....	15
1.3.4 hMSC und Telomeraseaktivität.....	15
1.4 Aufgabenstellung.....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1. Zellkultur.....	18
2.1.1 Zellen.....	18
2.1.2 Auftauen von hMSC.....	18
2.1.3 Zellkultivierung.....	19
2.1.4 Zellzählung.....	20
2.2. Molekularbiologische Untersuchungen.....	20
2.2.1 Messung der Telomeraseaktivität.....	20
2.2.1.1 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA.....	20
2.2.1.2 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA <sup>PLUS</sup> .....	24
2.2.2 Messung der Telomerlänge.....	27
2.2.2.1 DNA Isolation.....	27
2.2.2.2 Telo TAGGG Telomere Length Assay.....	28
2.3 Färbungen.....	33
2.3.1 Von Kossa.....	33
2.3.2 Alkalische Phosphatase Aktivität.....	33
2.4 Versuchsansätze.....	34
2.4.1 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC.....	35
2.4.2 Telomeraseaktivität hoch proliferierender hMSC.....	35
2.4.3 Telomeraseaktivität und Telomerlängen osteogen stimulierter hMSC.....	36

2.5 Materialien und Geräte.....	37
Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	37
Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien.....	38
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC.....	39
3.1.1 Proliferationsverhalten der hMSC.....	39
3.1.2 Nachweis der Telomeraseaktivität .....	40
3.1.3 Nachweis von Polymeraseinhibitoren.....	42
3.2 Telomeraseaktivität hoch proliferierender hMSC.....	43
3.3 Osteogene Stimulation von hMSC.....	44
3.3.1 Nachweis der osteogenen Differenzierung.....	44
3.3.2 Telomeraseaktivität osteogen differenzierender hMSC.....	45
3.3.3 Telomerlängen osteogen differenzierender hMSC.....	46
3.4 Abnahme der Telomerlänge durch Passagierung .....	47
3.5 Übersicht weiterer Versuchsergebnisse.....	48
3.5.1 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC.....	48
3.5.2 Telomeraseaktivität osteogen differenzierender hMSC.....	50
3.5.3 Telomeraseaktivität in hMSC und MG 63 (Osteosarkomzelllinie).....	52
3.5.4 Telomerlängen osteogen differenzierender hMSC.....	54
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>57</b>
4.1 Methodik.....	57
4.1.1 Zellen.....	57
4.1.2 Osteogene Differenzierung von hMSC.....	57
4.1.3 Messung der Telomeraseaktivität.....	58
4.1.4 Messung der Telomerlänge.....	60
4.2 Ergebnisse.....	61
4.2.1 Telomeraseaktivität und Telomerlänge konfluent kultivierter hMSC.....	61
4.2.2 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC.....	61
4.2.3 Telomeraseaktivität hoch proliferierender hMSC.....	62
4.2.4 Telomerlänge osteogen differenzierender hMSC.....	64
4.2.5 Telomeraseaktivität osteogen differenzierender hMSC.....	65
4.3 Diskussion neuerer Publikationen.....	67
4.3.1 Neoplastische Transformation mesenchymaler Stammzellen.....	67
4.3.2 Hypothese von der Tumorstammzelle.....	68

---

4.3.3 Bedeutung für die eigenen Ergebnisse.....	69
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	85
Danksagung.....	86
Lebenslauf.....	87

# 1. Einleitung

## 1.1 Mesenchymale Stammzellen und Tissue Engineering

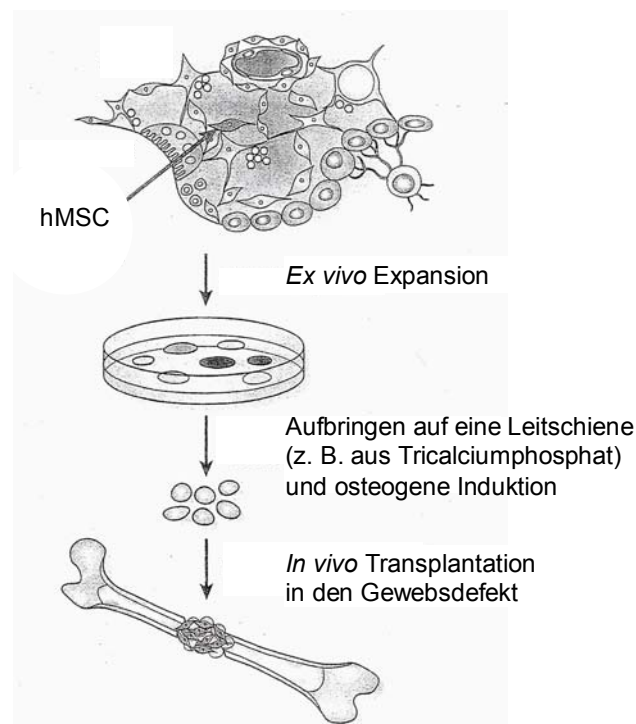
Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind definiert als pluripotente Zellen mit einer hohen Selbstreplikationsrate, die zu verschiedenen Zellen des Binde- und Stützgewebes wie z. B. Knochen, Knorpel, Fett, Sehne und Muskel differenzieren können (Caplan 1991). Während der Embryogenese existieren diese Zellen in zahlreichen Geweben. Aber auch aus dem Knochenmark erwachsener Organismen konnten Zellen isoliert werden, welche aufgrund ihrer Eigenschaften als hMSC bezeichnet werden (Pittenger et al. 1999). Allerdings hat sich gezeigt, dass sie keine homogene Zellpopulation bilden, sondern sich aus verschiedenen Subpopulationen zusammensetzen, die sich neben ihrer Morphologie in ihrem Proliferationsverhalten unterscheiden. Nach der *in vitro* Kultivierung von hMSC mit einer sehr niedrigen Zelldichte fanden sich neben spindelförmigen und großen flachen Zellen auch sog. RS (*rapidly self-renewing*) Zellen, die über ein höheres Selbstreplikations- und Differenzierungspotential als die Zellen der anderen Subpopulationen verfügten (Colter et al. 2001).

Inzwischen gibt es etablierte Verfahren, welche die Isolation und *ex vivo* Expansion sowie die Differenzierung von hMSC zu Knochen (Haynesworth et al. 1992, Jaiswal et al. 1997), Knorpel (Johnstone et al. 1998), Sehne (Young et al. 1998), Muskel (Wakitani et al. 1995), Fett (Sekiya et al. 2004), reifes Knochenmarkstroma (Majumdar et al. 1998) sowie einer Reihe weiterer Gewebe (Jiang et al. 2002) ermöglichen. Daher scheinen sie gut für das *Tissue Engineering* geeignet, dessen Ziel es ist, autogenen Gewebeersatz durch die Kombination von histogenen Zellen und biokompatiblen Trägermaterialien (Leitschienen) unter dem Einfluss spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren *in vitro* herzustellen (Bianco and Robey 2001).

Für das *Tissue Engineering* von Knochen werden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark isoliert, *ex vivo* expandiert und auf eine Leitschiene aufgebracht. Anschließend wird durch den Zusatz osteogen wirkender Substanzen (Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-phosphat) die Differenzierung der Zellen *in vitro* induziert (Jaiswal et al 1997). Diese verläuft über verschiedene Reifungsstufen bis hin zum reifen Osteoblasten, der die extrazelluläre

Matrix des Knochens bildet (Aubin 1998). Ein standardisiertes Verfahren zum Nachweis der osteogenen Differenzierung ist hierbei der Nachweis von Kalzium, welches von den Osteoblasten in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird. Ein weiteres Verfahren ist die Darstellung der extrazellulären Alkalischen Phosphatase Aktivität, welche während der osteogenen Differenzierung zunimmt. Die genaue Funktion dieses Enzyms ist noch nicht geklärt, es soll aber eine wichtige Rolle bei der Kalziumeinlagerung in die extrazelluläre Matrix spielen (Seibel 2000).

Durch die Adhäsion der hMSC an der Oberfläche der Leitschiene, ihre Proliferation und Differenzierung zu Gewebe bildenden Osteoblasten entsteht auf diese Weise *in vitro* ein dreidimensionales Knochenkonstrukt, welches zur Auffüllung und Regeneration in einen Gewebedefekt implantiert werden, der z. B. durch Trauma, Tumor oder eine kongenitale Fehlbildung entstanden ist (Schaefer et al. 2000, Risbud 2001). Erforderlich wird solch ein Gewebersatz immer dann, wenn ein Defekt so groß ist, dass der Organismus ihn auch unter optimalen Therapiebedingungen nicht selbst regenerieren kann (Cancedda et al. 2003).



**Abb. 1:** Tissue Engineering von Knochen (Bildquelle: Bianco and Robey, Nature 2001)

Die Vorteile gegenüber dem klassischen Gewebeersatz, der entweder durch autogenen Knochen (z. B. aus dem Beckenkamm), ein allogenes Transplantat oder durch die Implantation alloplastischer Materialien erfolgt, liegen darin, dass zum einem die Morbidität der Spenderstelle im Falle eines autogenen Ersatzes entfällt. Im Gegensatz zum allogenen Transplantat kommt es zu keiner Immunogenität, da der Knochen aus den eigenen Zellen des Patienten gezüchtet wird. Weiterhin lassen sich Komplikationen wie die Lockerung oder die Infektion durch Abriebpartikel vermeiden, die bei der Verwendung alloplastischer Materialien auftreten können (Schaefer et al. 2000). Allerdings müssen noch einige Fragen geklärt und die Technik des *Tissue Engineerings* optimiert werden, bevor dieses Verfahren routinemäßig in der Klinik am Menschen angewandt werden kann.

Ein Problem, das bis heute nicht gelöst werden konnte, ist die eindeutige Identifikation der mesenchymalen Stammzelle. Da bis heute kein spezifischer Marker bestimmt werden konnte (Bianco and Robey 2000, Conget and Minguell 1999), erfolgt ihre Identifikation bisher meistens nur indirekt über ihre Differenzierbarkeit zu verschiedenen mesenchymalen Geweben wie Knorpel, Knochen und Fett (Pittenger et al. 1999). Ein möglicher Ansatz zur direkten Identifikation der hMSC auf Einzelzellniveau könnte z. B. die Mehrfachfluoreszenz sein, bei der verschiedene Oberflächenantigene gleichzeitig auf einer Zelle dargestellt werden. Der Vorteil dieses Verfahrens wäre, dass die Zellen nicht erst im Nachhinein durch ihre Differenzierbarkeit sondern auf dem Niveau der Stammzelle identifiziert werden könnten (Schieker et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit, Stammzellen zu identifizieren könnte ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit sein, welche im Gegensatz dazu bei somatischen Zellen begrenzt ist (Weissman 2000). Ursächlich hierfür sind die Telomere, welche die Enden linearer Chromosomen bilden. Sie verkürzen sich bei jeder Zellteilung, wobei ein kritischer Verlust der Telomere zur Beendigung der Zellteilung führt (Harley et al. 1990, Harley 1991, Allsopp et al. 1995, Blackburn 2000). Ein Enzym, welches erstmals 1985 von Greider und Blackburn in *Tetrahymena thermophila* entdeckt wurde, ist die Telomerase (Greider and Blackburn 1985). Sie fügt neue telomerische DNA an die Enden der Chromosomen an und verhindert so ein Ende der Zellteilung (Morin 1989). Ob auch mesenchymale Stammzellen Telomeraseaktivität besitzen, welche die Identifikation dieser Zellen ermöglicht ist eine Frage, die in dieser Arbeit behandelt wird.



## 1.2 Telomere

### 1.2.1 Funktion und Aufbau der Telomere

Telomere sind besondere Strukturen an den Enden linearer Chromosomen in Form von DNA-Protein-Komplexen. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist es, die Integrität und Stabilität der Chromosomen zu bewahren. Sie schützen die Chromosomen vor Degradation (Abbau der DNA durch Endonukleasen), End-zu-End Fusionen mit anderen Chromosomen sowie vor Rekombinationen (Austausch von genetischem Material mit anderen Chromosomen). Ist dieser Schutz nicht gegeben, können die genannten Ereignisse zum Zellzyklusarrest, d. h. zur Beendigung der Zellteilung und zur Einleitung der Apoptose, dem programmierten Zelltod führen (Zakian 1995). Die Länge der Telomere hat zudem einen bedeutenden Einfluss auf das Replikationspotential einer Zelle, d. h. wie häufig sie sich teilen kann (Allsopp et al. 1995).

Die Länge der Telomere ist variabel. Neben interindividuellen Unterschieden, u. a. abhängig vom Alter eines Menschen, ist sie auch je nach Zellart unterschiedlich und beträgt in peripheren Blutleukozyten etwa 5 - 12 Kilobasenpaare (kbp) und in Keimbahnzellen etwa 10 - 15 kbp (Allshire et al. 1989, de Lange et al. 1990, Hastie et al. 1990, Allsopp et al. 1992, Vaziri et al. 1993, Vaziri et al. 1994). An die Telomere anschließend folgen zum Zentromer hin die subtelomerischen Regionen. Ein gängiges Verfahren zur Messung der Telomerlänge erfolgt in Form von *Terminal Restriction Fragments* (TRF), welche sich aus der telomerischen und subtelomerischen DNA zusammensetzen. Die Sequenz der subtelomerischen DNA ist variabel und reicht von Tandemwiederholungen bis hin zu verstreuten mittelrepetitiven Sequenzen (Pryde et al. 1997). Dahingegen ist die Sequenz der telomerischen DNA streng konserviert und bei fast allen Säugern inklusive des Menschen gleich. Sie setzt sich aus dem Guanin(G)-reichen Strang mit der repetitiven Sequenz 5'-TTAGGG-3' und dessen gegenläufigen, komplementären Cytosin(C)-reichen Strang mit der Sequenz 3'-AATCCC-5' zusammen (Moyzis et al. 1988, Meyne et al. 1989, de Lange et al. 1990). Am 3' Ende des G-reichen Stranges befindet sich zudem ein Überhang aus einigen hundert Nukleotiden (Henderson and Blackburn 1989, Wright et al. 1997). Damit der zelluläre DNA Reparaturapparat diesen nicht als beschädigten DNA Doppelstrang erkennt, bilden die Telomere eine höher geordnete Chromatinstruktur, die als *cap* bezeichnet wird. Hierbei formen die

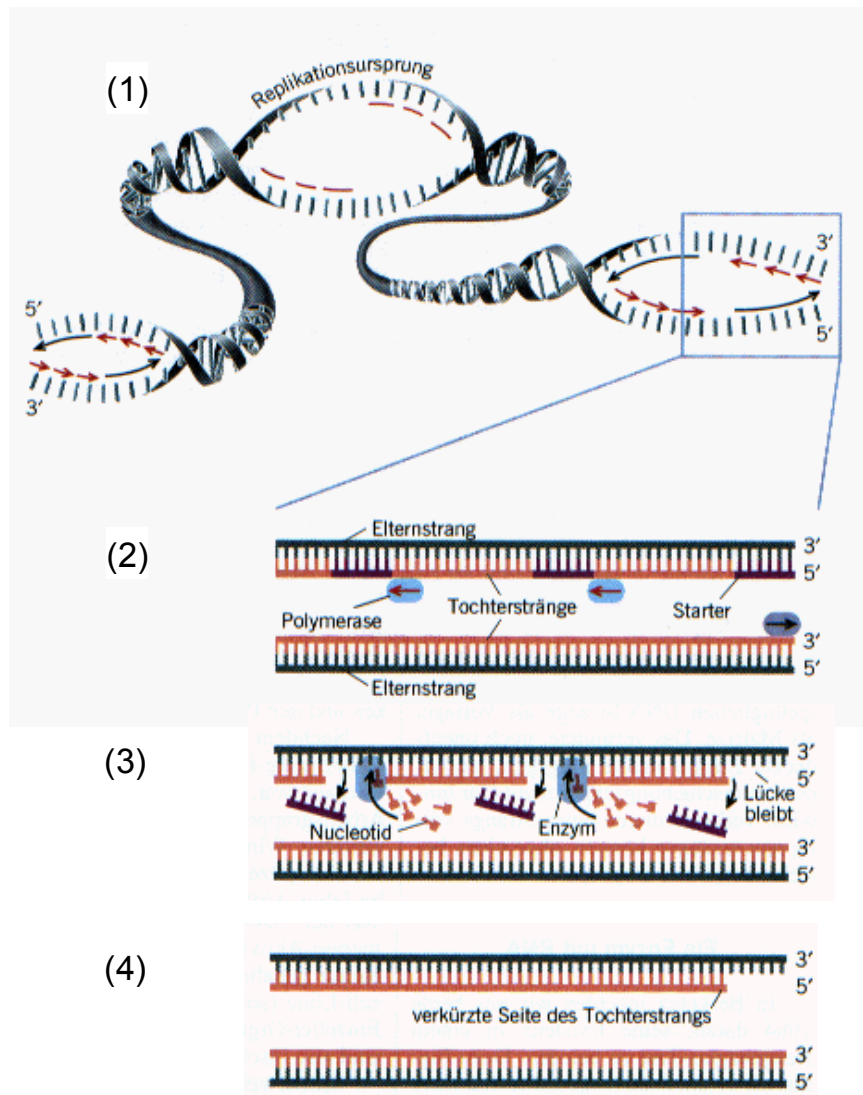
doppelsträngige telomerische DNA und die Telomer-bindenden Proteine eine große *telomere loop* (*t-loop*), in die sich der einzelsträngige 3' Überhang in Form einer kleineren *displacement-loop* (*d-loop*) einschlägt. Inwieweit eine solche *cap* geformt werden kann ist abhängig von der Integrität des 3' Überhangs, der Telomerlänge und den Telomer-bindenden Proteinen (de Lange 2002, Griffith et al. 1999, Ancelin et al. 2002, Karlseder et al. 2002, Goytisolo and Blasco 2002).

### 1.2.2 Telomere und das *end replication problem*

Vor jeder mitotischen Zellteilung muss die DNA der Zelle repliziert, d. h. verdoppelt werden. Dazu wird der DNA Doppelstrang nach und nach in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt und von der DNA Polymerase als Matrize verwendet. Diese stellt zwei neue Tochterstränge her, die zu dem jeweiligen parentalen Strang komplementär sind und mit ihm einen neuen DNA Doppelstrang bilden. Daher wird die DNA Replikation als semikonservativ bezeichnet (Meselson and Stahl 1958).

Sie weist einige Besonderheiten auf, die zur Formulierung des *end replication problems* geführt haben. Olovnikov und Watson entdeckten unabhängig voneinander, dass die Enden linearer Chromosomen nicht vollständig repliziert werden können (Olovnikov 1971, Olovnikov 1973, Watson 1972). Ursächlich hierfür ist zum einen, dass die DNA nur in eine Richtung von 5' nach 3' (unidirektional) repliziert werden kann. Die beiden Einzelstränge verhalten sich aber antiparallel zueinander. Während der Tochterstrang des parentalen C-reichen Strangs (syn. Leitstrang) in einem Stück von 5' nach 3' repliziert wird, kann der Tochterstrang des G-reichen Strangs (syn. Folgestrang) nur stückweise in Form kurzer DNA Sequenzen, sog. Okazaki-Fragmente synthetisiert werden, die anschließend miteinander verknüpft werden. Zudem benötigt die DNA Polymerase für jeden Synthesestart einen zum parentalen DNA Strang komplementären RNA Primer. Nachdem dieser sich an den zu replizierenden DNA Strang angelegt hat, stellt die DNA Polymerase den Tochterstrang her, indem sie komplementäre Nukleotide an den Primer anfügt. Hierbei werden für die Synthese des Folgestrangs mehrere Primer benötigt, da die DNA Polymerase für jedes Okazaki-Fragment neu am parentalen Strang andocken muss. Wenn die Replikation abgeschlossen ist, werden die RNA Primer entfernt und durch DNA ersetzt. Nur am 3' Ende des parentalen

Strangs kann die Lücke nicht mit Nukleotiden aufgefüllt werden, so dass jede Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomere am 5' Ende der neu gebildeten Chromosomen führt (Levy et al. 1992).



**Abb. 2:** DNA Replikation

Die DNA wird in die beiden parentalen Einzelstränge aufgetrennt (1). Der Folgestrang wird in Form von Okazaki-Fragmenten synthetisiert (rote Pfeile), für die jeweils ein Primer (Starter) erforderlich ist. Die Synthese des Leitstrangs erfolgt kontinuierlich (schwarzer Pfeil) (2). Anschließend werden die Primer entfernt und durch DNA ersetzt (3). Da die Lücke am 5' Ende des Tochterstrangs nicht mit Nukleotiden gefüllt werden kann, sind die Telomere der Tochterchromosomen verkürzt (4). (Bildquelle: FALK ev.)

### 1.2.3 Telomere und *replicative senescence*

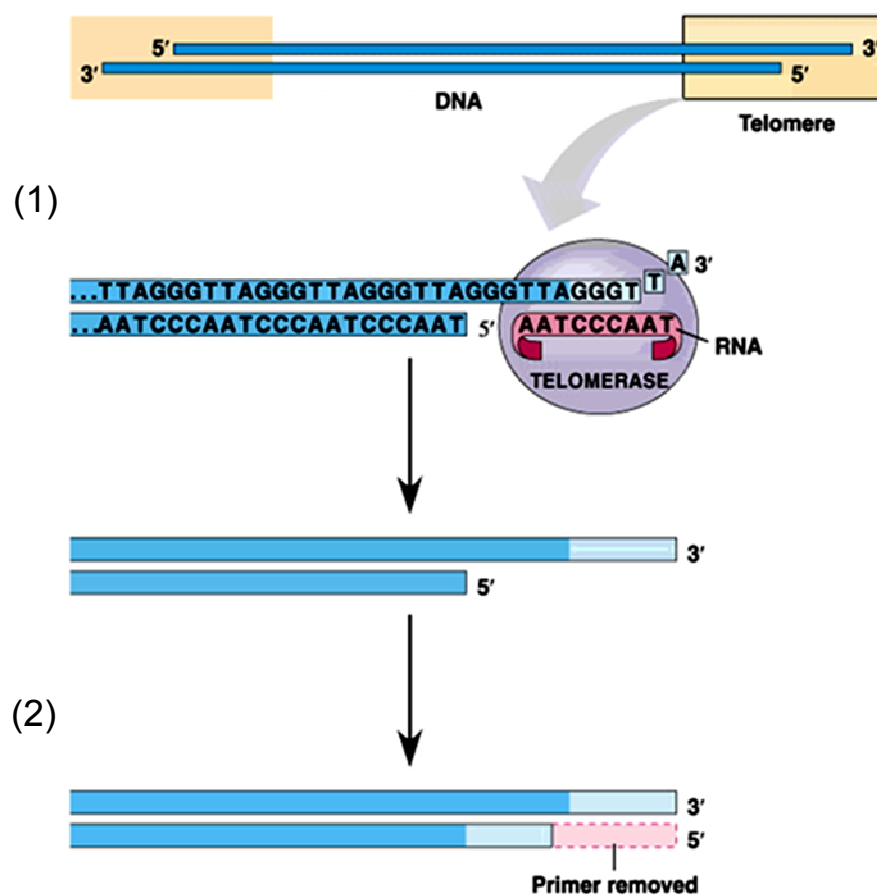
Unter *replicative senescence* versteht man den terminalen Zellzyklusarrest somatischer Zellen nach einer definierten Anzahl von Zellteilungen, auch bekannt als das *Hayflick limit* (Hayflick 1965). Die begrenzte Teilungsfähigkeit von Zellen wurde 1961 von Hayflick und Moorhead an *in vitro* kultivierten humanen Lungenfibroblasten beobachtet, welche nach etwa 50 *population doublings* (PD) aufhörten sich zu teilen (Hayflick and Moorhead 1961). Olovnikov stellte die Vermutung auf, dass hierfür die unvollständige Replikation der Chromosomen verantwortlich ist und ein kritischer Verlust von telomerischer DNA zur Beendigung der Zellteilung führt (Olovnikov 1973). Diese Theorie wurde 1990 von Harley et al. bestätigt, die nachweisen konnten, dass die Telomere *in vitro* kultivierter humaner Fibroblasten sich um durchschnittlich 50 Basenpaare (bp) je PD verkürzten, am ehesten erklärbar durch ihre inkomplette Replikation. Nach einem Verlust von durchschnittlich 2 kb telomerischer DNA beendeten die Zellen ihre Teilung (Harley et al. 1990). Aus diesem Grund betrachtet man die Telomere als die sog. *mitotic clock* (mitotische Uhr), da das Replikationspotential einer Zelle von der Länge ihrer Telomere abhängt. Sind die Telomere nach einer entsprechenden Anzahl von Zellteilungen auf eine kritische Länge verkürzt, hat die Zelle ihr *Hayflick limit* erreicht und tritt in einen dauerhaften Zellzyklusarrest über, der *cellular* oder *replicative senescence* (*senescence* = Alterung) genannt wird (Harley et al. 1990, Hastie et al. 1990, Lindsey et al. 1991). Dieser beinhaltet u. a. die Repression von Genen, welche die Proliferation der Zelle fördern und eine gesteigerte Expression von antiproliferativ wirkenden Genen. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus die Entstehung von Tumoren verhindern soll (Goldstein 1990, Smith and Pereira-Smith 1996).

## 1.3 Telomerase

### 1.3.1 Funktion der Telomerase

Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, das nach jeder Zellteilung wieder *de novo* synthetisierte Telomerasequenzen an die Enden der Chromosomen anfügt und so das Replikationspotential einer Zelle erhalten kann (Morin 1989). Sie setzt sich aus einer

katalytischen Untereinheit, der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) und einer RNA Untereinheit, der humanen Telomerase RNA (hTR) zusammen. Die RNA Komponente enthält eine Sequenz aus elf Nukleotiden, die komplementär zur Telomerasequenz ist (5'-CUAACCCUAAC-3'). Sie dient der reversen Transkriptase als Matrize, um TTAGGG-Sequenzen an das Ende des 3' Überhangs der Telomere anzufügen (Feng et al. 1995). Der komplementäre DNA Strang kann dann durch die DNA Polymerase verlängert werden. Auf diese Weise wird der Verlust von telomerischer DNA nach jeder Zellteilung wieder ausgeglichen.

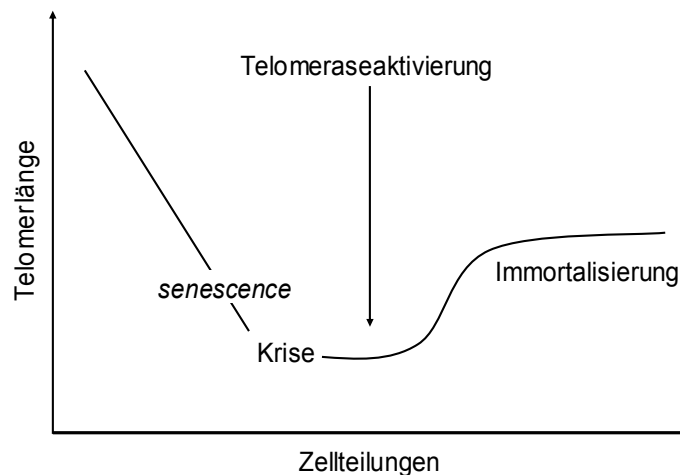


**Abb. 3:** Funktion der Telomerase

Die Telomerase fügt Nukleotide an das 3' Ende der DNA mit Hilfe ihrer RNA Matrize, deren Sequenz komplementär zur TTAGGG Sequenz ist, an (1). Die DNA Polymerase verlängert anschließend nach Andocken eines Primers den komplementären DNA Strang (2). Die neu gebildete telomerische DNA ist hier hellblau dargestellt (Bildquelle: Addison Wesley Longman Inc. 1999)

### 1.3.2 Telomeraseaktivität in immortalen Zellen

Etwa 85 % aller Tumorzellarten und immortalen Zelllinien weisen Telomeraseaktivität auf (Kim et al. 1994, Shay and Wright 1996). Diese Zellen umgehen durch bestimmte Transformationsprozesse die auf den Zellzyklusarrest folgende Apoptose. Durch die Aktivierung der Telomerase in der Zelle werden ihre Telomere wieder aufgebaut und sie erlangt eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit (Martens 2001).



**Abb. 4:** Immortalisierung somatischer Zellen

Normale somatische Zellen besitzen keine Telomeraseaktivität. Der Verlust von telomerischer DNA durch die Zellteilung führt zum Zellzyklusarrest (*senescence*). Durch Transformationsprozesse und Aktivierung der Telomerase kann die sog. Krise (bedingt durch die Instabilität der Telomere) überwunden werden. Die Telomere werden wieder aufgebaut und die Zellteilung kann fortgesetzt werden.

Wie die Telomeraseaktivität in Zellen reguliert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Man hat aber u. a. herausgefunden, dass die mRNA (*messenger RNA*) der Enzymuntereinheit der Telomerase (hTERT) in immortalen, Telomerase positiven Zellen exprimiert wird, während Zellen ohne Telomeraseaktivität keine hTERT mRNA aufweisen (Nakamura et al. 1997, Meyerson et al. 1997, Kilian et al. 1997). Im Gegensatz dazu wird die RNA Untereinheit der Telomerase (hTR) sowohl in Telomerase positiven als auch Telomerase negativen Zellen exprimiert (Avilion et al. 1996, Bestilny et al. 1996). Daher scheint die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) ein regulierender Faktor zu sein.

### 1.3.3 Telomeraseaktivität in Stammzellen und somatischen Zellen

Keimbahnzellen und embryonale Stammzellen besitzen eine hohe Telomeraseaktivität, durch die ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation erhalten bleibt (Wright et al. 1996, Thomson et al. 1998). Hämatopoetische Stammzellen (HSC), die als Vorläufer der myeloischen, lymphoiden und erythrozytären Zellreihen neben den mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark angesiedelt sind, weisen ebenfalls Telomeraseaktivität auf. Diese ist aber zu gering, um den Verlust von telomerischer DNA durch die Zellteilung wieder vollständig auszugleichen, weshalb HSC nur ein begrenztes Replikationspotential aufweisen (Vaziri et al. 1994). Allerdings steigt sie unter dem Einfluss spezifischer Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und Differenzierung der Zellen fördern, kurzzeitig an, um dann mit zunehmender Differenzierung der Zellen wieder abzufallen. Dabei ist in der Phase der erhöhten Telomeraseaktivität die Abnahme der Telomerlänge je PD geringer (Chiu et al. 1996, Engelhardt et al. 1997). Die meisten somatischen Zellen besitzen keine Telomeraseaktivität, weshalb ihre Teilungsfähigkeit begrenzt ist. Ausnahmen stellen neben peripheren Lymphozyten einige sich selbst erneuernde epitheliale Gewebe wie die Darmschleimhaut und die Epidermis dar, in deren Basalzellen geringe Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde (Hiyama et al. 1995, Hiyama et al. 1996, Härle-Bachor and Boukamp 1996).

### 1.3.4 hMSC und Telomeraseaktivität

Die Frage, ob auch mesenchymale Stammzellen Telomeraseaktivität besitzen, führte bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Publikation von Pittenger et al. wird beschrieben, dass *in vitro* kultivierte hMSC Telomeraseaktivität aufweisen und diese auch nach mehrfacher Passagierung der Zellen nicht verloren geht (Pittenger et al. 1999). Dieses Ergebnis ist allerdings zweifelhaft, da gleichzeitig auch in Fibroblasten, die allgemein als Telomerase negativ gelten, Telomeraseaktivität gemessen wurde (Zimmermann et al. 2003).

Von Banfi et al. untersuchte *in vitro* kultivierte hMSC wiesen keine Telomeraseaktivität auf. Sie stellten fest, dass sich die Telomere um etwa 50 - 100 bp je PD verkürzten und die Zellen nach 40 PD im Zellzyklusarrest endeten (Banfi et al. 2002).

Auch Zimmermann et al. konnten keine Telomeraseaktivität in hMSC nachweisen. Die von ihnen untersuchten Zellen besaßen mit durchschnittlich 18.7 PD ebenfalls nur ein begrenztes Replikationspotential (Zimmermann et al. 2003).

Vaziri und Benchimol hatten beschrieben, dass Zellen, in denen die Telomerase aktiviert wird, längere Telomere und eine größere Teilungsfähigkeit aufweisen als normale Zellen. Die Aktivierung der Telomerase erfolgte dabei über die ektope Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT), deren mRNA über einen retroviralen Vektor in die genomische DNA der Zellen integriert worden war (Vaziri and Benchimol 1998).

Shi et al. und Simonsen et al. haben dieses Verfahren an hMSC angewandt und das Proliferations- und Differenzierungspotential derart veränderter Zellen mit dem von nativen, Telomerase negativen hMSC verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Telomerase positiven hMSC längere Telomere und mit 80 bzw. 260 PD ein vielfach größeres Proliferationspotential besaßen als die normalen hMSC (32 bzw. 26 PD). Sie bewahrten dabei ihre Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung und bildeten zudem nach subkutaner Implantation in immundefiziente Mäuse mehr Knochen als die Kontrollzellen (Shi et al. 2002, Simonsen et al. 2002). Gronthos et al. konnten zudem nachweisen, dass hTERT transduzierte Telomerase positive hMSC eine höhere Expression Zellzyklus regulierender Gene aufweisen, welche die Proliferation der Zellen beschleunigen. Nach osteogener Induktion wiesen diese Zellen eine höhere Expression osteogen wirkender Gene auf als die normalen hMSC (Gronthos et al. 2003). Daher ist anzunehmen, dass die Telomerase neben dem Replikationspotential auch einen Einfluss auf das Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen hat.



## 1.4 Aufgabenstellung

Ziel der Versuche war zu ermitteln, ob hMSC in ihrer Eigenschaft als Stammzellen Telomeraseaktivität besitzen, durch die sie als solche identifiziert werden können. Hierzu wurden hMSC *in vitro* kultiviert und die Telomeraseaktivität unterschiedlich stark proliferierender hMSC gemessen. Neben konfluenten, d. h. sich nicht mehr teilenden hMSC wurden - in Abhängigkeit ihrer Zelldichte - sowohl proliferierende als auch hoch proliferierende hMSC auf ihre Telomeraseaktivität untersucht.

Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob durch die osteogene Differenzierung von hMSC die Telomeraseaktivität und Telomerlänge der Zellen beeinflusst wird. Hierzu wurden *in vitro* kultivierte, konfluente hMSC über drei Wochen osteogen stimuliert und zu mehreren Zeitpunkten die Telomeraseaktivität und Telomerlänge der Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten konfluente hMSC, die parallel dazu in Stammzellmedium ohne osteogene Zusätze weiter kultiviert wurden. Der Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte über die Darstellung der Kalziumdeposition und den Anstieg der extrazellulären Alkalischen Phosphatase Aktivität in den Zellen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zellen

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Cambrex (USA) bezogen. Diese waren durch Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm einer gesunden kaukasischen Spenderin (19 J.) gewonnen, mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend expandiert worden. Nachdem sie durch den Nachweis spezifischer Oberflächenantigene sowie ihre Fähigkeit, adipogen, chondrogen und osteogen zu differenzieren als mesenchymale Stammzellen charakterisiert worden waren, wurden sie in der 2. Passage kryokonserviert.

#### 2.1.2 Auftauen von hMSC

Die hMSC wurden im kryokonservierten Zustand geliefert. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad (37°C) erwärmt, bis die Zellsuspension zu etwa 90 % verflüssigt war. Anschließend wurde sie in ein 15 ml Falcon überführt, in 5 ml *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium* resuspendiert und zentrifugiert (600 x g, 5 min, RT). Nach Entnahme des Überstands wurden die Zellen erneut in Medium resuspendiert und gezählt. Danach wurden sie mit einer Dichte von 4800 bis 6000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturgefäßen angesetzt und im Brutschrank kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium zum Entfernen der nicht adhärenen Zellen gewechselt und die Kultivierung fortgesetzt.

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter der *Flow* durchgeführt. Medien und Trypsin/EDTA wurden bei 4°C gelagert und vor ihrer Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Das PBS x 1 (*phosphate buffered saline*) wurde bei Raumtemperatur unter der *Flow* aufbewahrt.

### 2.1.3 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken unter standardisierten Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C). Nach den Empfehlungen des Herstellers wurden die hMSC in *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium* (MSCGM) gezüchtet, welches sich aus *Mesenchymal Stem Cell Basalmedium* (MSCBM), 10% *Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement* (MCGS), 200 mM L-Glutamin und 25 U/ml Penicillin + 25 µg/ml Streptomycin (alle Fa. Cambrex) zusammensetzt. Gewechselt wurden die Medien alle drei bis vier Tage, wobei die verwendete Mediummenge je nach Zellkulturgefäß variierte (10 ml/75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (T75), 5ml/25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (T25), 2 ml/9.6 cm<sup>2</sup> well einer six-well Platte (alle Fa. Nunc)). Wenn die hMSC zu etwa 90% konfluent waren, wurden sie passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium aus dem Zellkulturgefäß entfernt und die Zellen mit PBS x 1 (ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Fa. GibcoBRL)) gewaschen (3 ml/T75, 2 ml/T25, 1 ml/well einer six-well Platte). Anschließend wurde Trypsin/EDTA Lösung (Fa. Cambrex) hinzu gegeben (2 ml, 1 ml bzw. 0.5 ml) und die Zellen für 5 min. bei RT inkubiert. Die Ablösung der Zellen von Gefäßboden wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und durch leichtes Beklopfen des Bodens unterstützt. Nach max. 15 min wurde das Trypsin/EDTA durch Zugabe von Medium (3 ml, 2 ml bzw. 1 ml) inaktiviert und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt. Nach dem Zentrifugieren (600 x g, 5 min, 25 °C) wurde der Überstand entfernt und die Zellen in Medium resuspendiert. Abschließend wurden sie gezählt und entweder je nach Versuchsansatz in neuen Zellkulturgefäßen weiterhin kultiviert oder für die molekularbiologischen Untersuchungen verarbeitet.

Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Jaiswal et al. (Jaiswal et al. 1997). Hierzu wurden dem MSCGM die sog. *Osteogenic Supplements* (OS) hinzugefügt und die Zellen, wenn sie zu etwa 90% konfluent waren, darin weiter kultiviert. Die *Osteogenic Supplements* setzen sich aus 100 nM Dexamethason, 10 mM β-Glycerophosphat und 0.05 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat (alle Fa. Sigma) zusammen.

### 2.1.4 Zellzählung

Für die Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand) verwendet. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Trypanblau 0.4 % (Fa. GibcoBRL) vermengt. Anschließend wurde soviel Zell-Farbstoff-Gemisch unter den Rand des Deckglases pipettiert, bis die Fläche unterhalb des Deckglases gerade vollständig benetzt war. Die vitalen, sich nicht anfärbenden Zellen in den vier Eckquadranten des Zählgitters wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und aus der Summe der vier Quadranten der Mittelwert gebildet. Aus der Multiplikation des Mittelwertes mit dem durch das Hinzufügen von Trypanblau entstandenen Verdünnungsfaktor 1.5 sowie dem vorgegebenen Kammerfaktor ( $1 \times 10^4$ ) errechnete sich die Konzentration in Zellzahl/ml:

$$\text{Zellzahl/ml Konzentration} = (\text{Summe der vier Quadranten}/4) \times 1.5 \times 10^4$$

## 2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

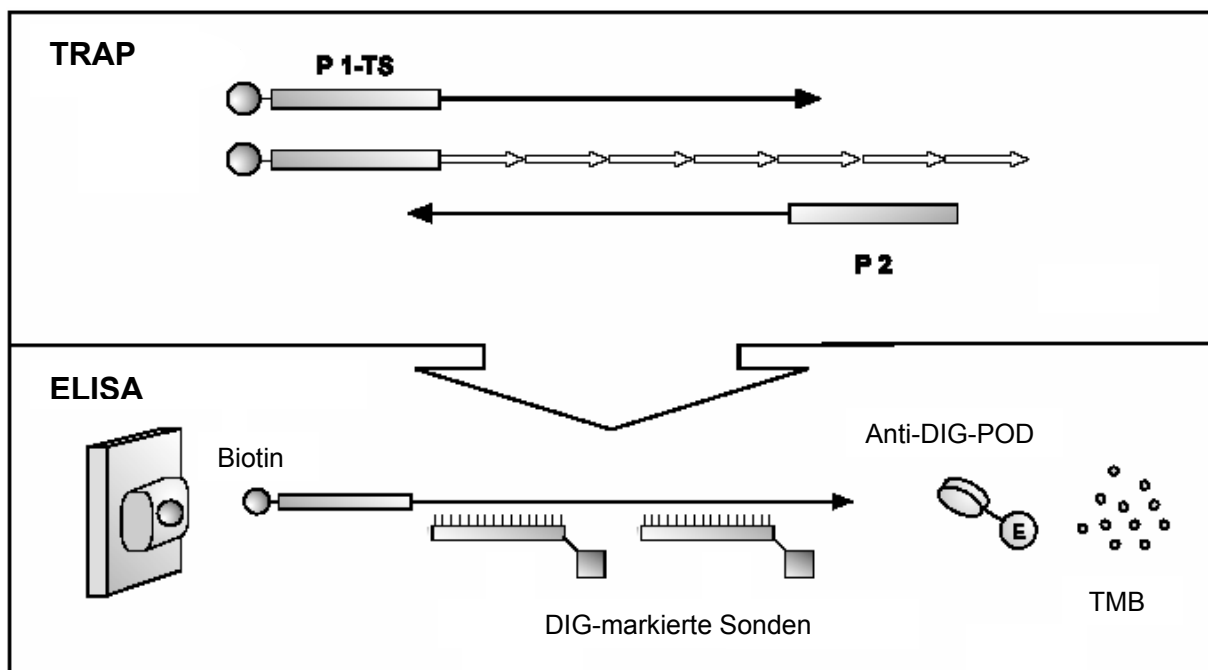
### 2.2.1 Messung der Telomeraseaktivität

Eine standardisierte Methode zum Nachweis von Telomeraseaktivität in Zellen beruht auf dem Prinzip des sog. *Telomeric Repeat Amplification Protocols* (TRAP), welches erstmals vor etwa zehn Jahren von Kim et al. beschrieben wurde (Kim et al. 1994).

#### 2.2.1.1 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA

Der *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA* (Fa. Roche, Cat. No. 1 854 666) setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen. Zunächst wird aus den zu untersuchenden Zellen ein Zellextrakt hergestellt, in dem Proteine wie die Telomerase enthalten sind. Dieser wird in der TRAP Reaktion eingesetzt, bei dem die Telomerase einen biotin-markierten Primer (P1-TS) mit der für sie spezifischen Sequenz  $(TTAGGG)_n$  verlängert - vergleichbar mit der Verlängerung der Telomere *in vivo*. Je höher die

Aktivität der Telomerase im Zellextrakt, desto mehr und längere Telomerasequenzen werden gebildet. In einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden diese dann durch einen zweiten biotin-markierten Primer (P2) und das Enzym Taq Polymerase vervielfältigt. Im nächsten Schritt werden die TRAP Produkte mittels ELISA (*Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay*) detektiert. Dazu werden sie mit einer Digoxigenin markierten Sonde, die komplementär zur Telomerasequenz ist, hybridisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Antikörper gegen Digoxigenin (DIG), an dem eine Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Diese setzt das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) um, wodurch es zu einer Färbung der Probe kommt. Durch die photometrische Messung der Lichtabsorption der Probe kann dann auf die Höhe der Telomeraseaktivität in den Zellen zurück geschlossen werden.



**Abb. 5:** Prinzip des Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA (Bildquelle: Protokoll des Herstellers)

### Zellextraktion

Zur Messung der Telomeraseaktivität in einer Zellpopulation wurde diese trypsiniert, in Medium resuspendiert und anschließend die Zellen gezählt. Für die Herstellung eines Zellextraktes wurde ein Aliquot mit  $2 \times 10^5$  Zellen in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert ( $3000 \times g$ , 10 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 200  $\mu\text{l}$  PBS x 1 gewaschen, erneut zentrifugiert ( $3000 \times g$ , 10

min, 4 °C) und das PBS wieder entfernt. Dann wurden die Zellen sorgfältig in 200 µl *Lysis reagent* (vorgekühlt auf Eis) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die lysierten Zellen zur Sedimentation des Zelldebris zentrifugiert (13000 x g, 20 min, 4 °C). Von dem Überstand wurden 150 µl Zellextrakt entnommen, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zum Einsatz in der TRAP Reaktion auf Eis gelagert (ca. 20 min).

### TRAP Reaktion

Von den hergestellten Zellextrakten wurde jeweils 1 µl -  $1 \times 10^3$  Zelläquivalenten entsprechend - in der TRAP Reaktion eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde ein Zellextrakt aus *293 cells*, i. e. immortalisierte Telomerase positive humane Nierenzellen, verwendet. Als Negativkontrolle dienten hitzeinaktivierte *293 cells* (65 °C, 20 min).

Zunächst wurden für jeden Zellextrakt 25 µl *Reaction mixture* x 2 (enthält Primer, Nukleotide und Taq Polymerase) in ein 0.2 ml PCR-Gefäß vorgelegt und je 1 µl Zellextrakt bzw. 1 µl Kontrolle sowie je 24 µl autoklaviertes H<sub>2</sub>O dest. hinzugefügt (Pipettierung auf Eis). Anschließend wurde die TRAP Reaktion im Peltier Thermal Cycler (Fa. Biozym) durchgeführt. Diese setzt sich aus der Primerelongation (30 min, 25 °C), während der die Telomerase die P1-TS Primer mit der für sie spezifischen TTAGGG-Sequenz verlängert, der Inaktivierung des Enzyms (5 min, 94 °C) sowie der anschließenden PCR, bei der die Telomeraseprodukte mittels der Taq Polymerase amplifiziert werden, zusammen. Die PCR umfasst 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 s, 94 °C), Anlagerung (30 s, 50 °C) und Polymerisation (30 s, 72 °C) sowie einem abschließenden Polymerisationsschritt (10 min, 72°C). Durch Absenken der Temperatur auf 4 °C wird die Reaktion beendet.

Danach wurden die Proben bis zur Durchführung des ELISA bei – 20 °C gelagert.

### Hybridisierung und ELISA

Die Proben und Reagenzien wurden vor ihrem Gebrauch auf Raumtemperatur (RT) erwärmt. Zunächst wurden jeweils 5 µl des TRAP Produktes und 20 µl *Denaturation reagent* in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 225 µl *Hybridization buffer* (enthält Telomerase-

spezifische DIG-markierte Sonden) hinzugefügt und alles kurz mit einem Vortexer vermischt. Je 100 µl einer Probe wurden dann in die wells einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte (MTP) überführt und inkubiert (120 min, 37 °C, Schüttler 300 UpM). Hierbei wurden die TRAP Produkte mit den DIG-markierten Sonden hybridisiert und über ihre Biotin-markierten Primer fest an das Streptavidin der MTP gebunden. Während dieser und aller folgenden Inkubationen wurde ein Verdunsten der Proben durch das Abdecken der wells mit einer Klebefolie verhindert. Nach der Hybridisierung wurden die wells dreimal mit jeweils 200 µl *Washing buffer* x 1 gewaschen und anschließend mit je 100 µl *Anti-DIG-POD working dilution* inkubiert (30 min, RT, Schüttler 300 UpM). Diese wurde hergestellt aus einer 1:50 Verdünnung von Anti-DIG-POD (mit Peroxidase gekoppelter polyklonaler Schafantikörper gegen Digoxigenin) mit *Conjugate dilution buffer*. Während der Inkubation wurden die DIG-markierten Sonden mit dem Antikörper markiert. Danach wurden die wells fünfmal mit jeweils 200 µl *Washing buffer* x 1 gewaschen und anschließend mit jeweils 100 µl *TMB substrate solution* inkubiert (20 min, RT, Schüttler 300 UpM). Die Proben, in denen das TMB Substrat durch die Peroxidase umgesetzt wurde, verfärbten sich hierbei blau. Durch Zugabe von jeweils 100 µl *Stop reagent* wurde der Substratumsatz beendet, wobei es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kam. Die photometrische Messung der Lichtabsorption der Proben erfolgte dann innerhalb der nächsten dreißig Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) mit dem *ELISA Reader* (Fa. Mikrotek, Deutschland).

### Auswertung

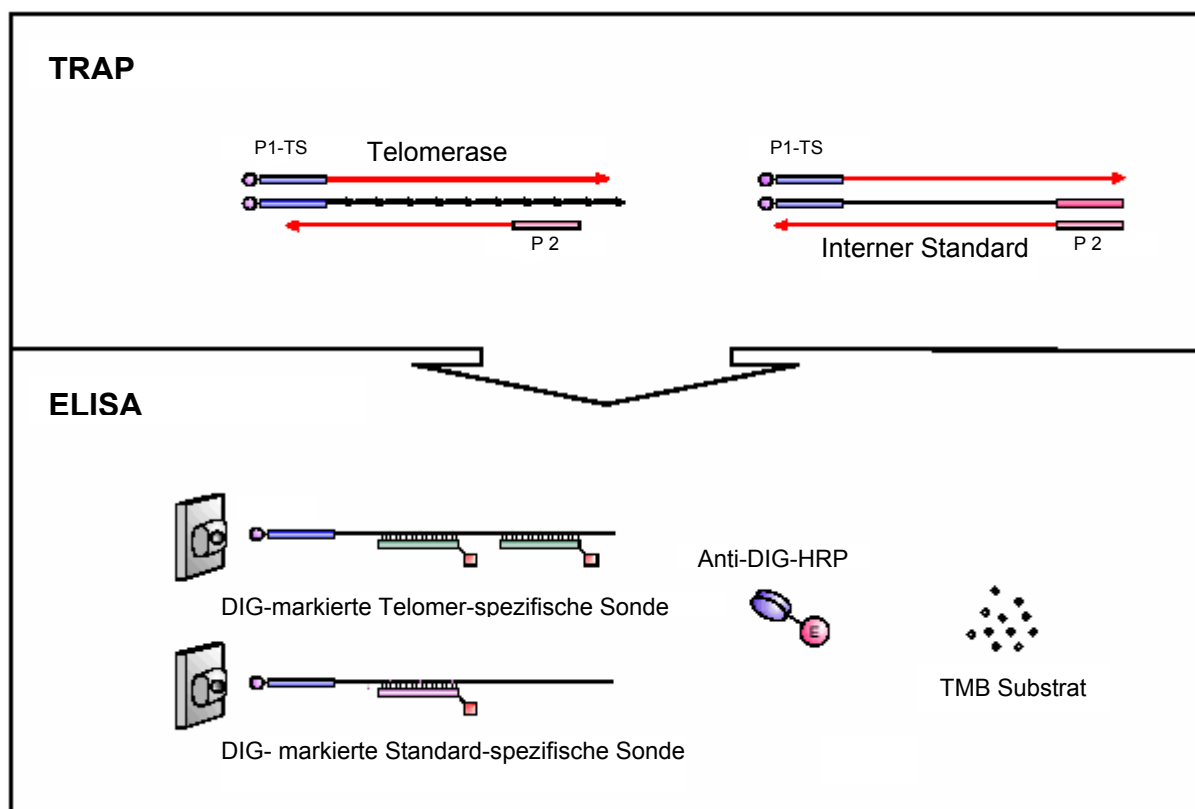
Für eine gültige Messung muss die Extinktion der Positivkontrolle  $> 1.5 (A_{450 \text{ nm}} - A_{620 \text{ nm}})$  und die Extinktion der Negativkontrolle  $< 0.25 (A_{450 \text{ nm}} - A_{620 \text{ nm}})$  sein.

Eine Probe gilt als Telomerase positiv, wenn ihre Extinktion minus der Extinktion der Negativkontrolle  $> 0.2 (A_{450 \text{ nm}} - A_{620 \text{ nm}})$  beträgt.

### 2.2.1.2 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>

Der Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Fa. Roche, Cat. No. 2 013 789) ist eine Weiterentwicklung des vorherigen Tests, der es ermöglicht DNA Polymerase Inhibitoren zu detektieren. Diese können, wenn sie in einem Zellextrakt enthalten sind, die Amplifikation der Telomeraseprodukte während der TRAP Reaktion stören und somit zu falsch negativen Ergebnissen bezüglich der Telomeraseaktivität führen. Um Inhibitoren aufzudecken, wird in der TRAP Reaktion ein Interner Amplifikationsstandard mitgeführt, der aus 216 bp langen DNA-Strängen besteht. Dieser wird wie die Telomeraseprodukte während der PCR durch die Taq Polymerase amplifiziert. Sollten Inhibitoren im Zellextrakt enthalten sein, so bleibt die Amplifikation der Telomeraseprodukte und des Internen Standards aus.

Wenn man zudem die Telomeraseaktivität in unterschiedlichen Mengen eines Zellextraktes misst (z. B. in  $1 \times 10^3$  und  $1 \times 10^2$  Zelläquivalenten), so würde die Extinktion der Proben und der Standards bei Vorhandensein von Inhibitoren mit abnehmender Menge des eingesetzten Zellextraktes - und somit auch der Inhibitoren - zunehmen.



**Abb. 6:** Prinzip des Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Bildquelle: Protokoll des Herstellers)



### Zellextraktion

Diese erfolgte auf die gleiche Weise wie beim *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA*.

### TRAP Reaktion

Von jedem hergestellten Zellextrakt wurden 1  $\mu\text{l}$  und 0.1  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^2$  Zelläquivalente) in der TRAP Reaktion eingesetzt. Als probenspezifische Negativkontrollen dienten 1  $\mu\text{l}$  und 0.1  $\mu\text{l}$  des gleichen, hitzeinaktivierten Zellextraktes (85 °C, 10 min). Die Positivkontrolle enthielt, vergleichbar mit einem Telomeraseprodukt, DNA-Matrizen mit der Sequenz (TTAGGG)<sub>8</sub> in einer Konzentration von 0.001 amol/ $\mu\text{l}$ .

Während der Pipettierung wurden die Proben und Reagenzien auf Eis gelagert.

Die Zellextrakte, probenspezifischen Negativkontrollen, 1  $\mu\text{l}$  Positivkontrolle und 1  $\mu\text{l}$  *Lysis reagent* wurden in 0.2 ml PCR-Gefäße pipettiert. Je 25  $\mu\text{l}$  *Reaction mixture* x 2 und 5  $\mu\text{l}$  Interner Standard wurden hinzugefügt und alle Proben mit 19  $\mu\text{l}$  bzw. 19.9  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem H<sub>2</sub>O dest. verdünnt. Anschließend wurde die TRAP Reaktion nach dem bereits beschriebenen Programm durchgeführt. Die TRAP Produkte wurden bis zur Durchführung des ELISA bei – 20 °C gelagert.

### Hybridisierung und ELISA

Für jedes TRAP Produkt wurden jeweils zwei 1.5 ml Reaktionsgefäße mit je 10  $\mu\text{l}$  *Denaturation reagent* vorgelegt. Diesen wurde je 2.5  $\mu\text{l}$  TRAP Produkt hinzugefügt und die Proben inkubiert (10 min, RT). Anschließend wurden jedem TRAP Produkt 100  $\mu\text{l}$  des Telomerase spezifischen Hybridisierungspuffers (enthält zur Telomerasequenz komplementäre DIG-markierte Sonde) bzw. 100  $\mu\text{l}$  des Internen Standard spezifischen Hybridisierungspuffers (enthält zum Internen Standard komplementäre DIG-markierte Sonden) zugesetzt. Anschließend wurden alle Proben kurz mit einem Vortexer durchmischt und jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer Probe nach dem vom Hersteller empfohlenen Pipettierschema in die wells einer Streptavidin beschichteten MTP überführt und inkubiert (120 min, 37 °C, Schüttler 300 UpM).

Alle weiteren Reaktionsschritte sowie die abschließende Absorptionsmessung erfolgten auf die gleiche Weise wie beim *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA*.

## Auswertung

Für die gültige Messung einer Probe darf die Extinktion ihrer Negativkontrolle nicht > 0.1 ( $A_{450\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}}$ ) sein. Die Extinktion der Positivkontrolle soll 0.2 – 0.5 ( $A_{450\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}}$ ) betragen.

Eine Probe gilt als Telomerase positiv, wenn ihre Extinktion abzüglich der Extinktion der Negativkontrolle mehr als zweimal so groß ist wie die Hintergrundaktivität.

Die Semiquantifikation der Telomeraseaktivität erfolgt als sog. Relative Telomerase Aktivität (RTA, Angabe in %). Hierzu wird die Extinktion der Probe mit der Extinktion der Positivkontrolle, die eine bekannte Menge an Telomerasequenzen enthält, ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{RTA} = \frac{(A_S - A_{S,0}) / A_{S,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0}) / A_{TS8,IS}} \times 100$$

$A_S$ : Absorption der Probe

$A_{S,0}$ : Absorption der Negativkontrolle

$A_{S,IS}$ : Absorption des Internen Standards der Probe

$A_{TS8}$ : Absorption der Positivkontrolle

$A_{TS8,0}$ : Absorption des *Lysis reagent*

$A_{TS8,IS}$ : Absorption des Internen Standards der Positivkontrolle

## 2.2.2 Messung der Telomerlänge

### 2.2.2.1 DNA Isolation

Zur Messung der Telomerlängen musste zunächst die genomische DNA aus den Zellen isoliert werden. Dazu wurde der *DNeasy Tissue Kit* (Fa. Qiagen) verwendet. Bei diesem Verfahren werden die Zellen lysiert und anschließend auf eine Säule (*Mini Column*) geladen, die eine DNA bindende Membran enthält. Nach dem Auswaschen aller übrigen Zellbestandteile mittels verschiedener Puffer wird die DNA mithilfe eines Elutionspuffers wieder aus der Membran gelöst und die Menge an isolierter DNA photometrisch bestimmt.

Im Rahmen der Versuche wurden  $1.5 - 3 \times 10^5$  Zellen einer Zellpopulation zur Herstellung einer DNA Probe verwendet. Dazu wurde ein entsprechendes Aliquot der Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen zentrifugiert (1800 UpM, 5 min, RT). Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet in 200 µl PBS x 1 resuspendiert. Dann wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer hinzugegeben, die Probe gevortext und anschließend im Wasserbad inkubiert (10 min, 70 °C). Nach Zugabe von 200 µl Ethanol und gründlichem Vortexen wurde der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes auf eine Säule gegeben und zentrifugiert (8000 UpM, 1 min, RT). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gestellt. Nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wurde die Säule erneut zentrifugiert (8000 UpM, 1 min, RT) und in einem frischen Auffanggefäß platziert. Anschließend wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben und diese nochmals zentrifugiert (13 000 UpM, 3 min, RT). Zum Auswaschen der DNA wurde die Säule in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gestellt, 200 µl AE-Puffer direkt auf die Membran pipettiert und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule zentrifugiert (8000 UpM, 1 min, RT) und anschließend der DNA Gehalt des Durchlaufs photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Biophotometer, Fa. Eppendorf). Durch verschiedene vom Gerät gemessene Ratios konnten Rückschlüsse auf die Reinheit einer Probe gezogen werden. Bis zur Messung der Telomerlänge wurden die Proben bei – 20 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Telo TAGGG Telomere Length Assay

Der *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Fa. Roche, Cat. No. 2 209 136) erlaubt die Darstellung der durchschnittlichen Telomerlänge einer Zellpopulation in Form von *Terminal Restriction Fragments* (TRF). Diese bestehen aus der telomerischen und subtelomerischen DNA, welche sich zur Chromosomenmitte (Zentromer) hin an die Telomere anschließt. Gewonnen werden die TRF durch den Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen, welche die nicht-telomerische DNA in niedermolekulare Fragmente zerschneiden, während die Telomere und die subtelomerische Region intakt bleiben. Die DNA wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Dann werden die TRF mit einer DIG-markierten Telomer spezifischen Sonde hybridisiert und anschließend mittels Chemilumineszenz Detektion auf einer Filmfolie sichtbar gemacht.

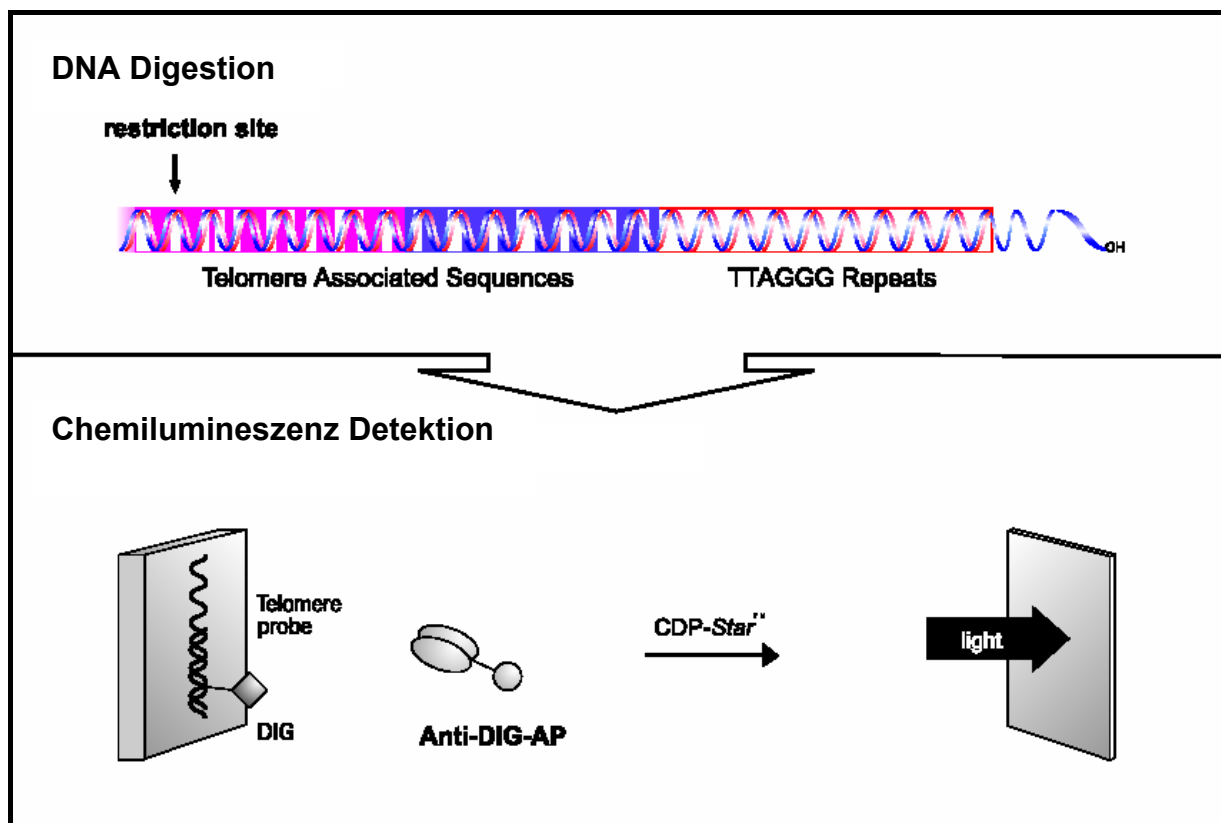


Abb. 7: Prinzip des Telo TAGGG Telomere Length Assay (Bildquelle: Protokoll des Herstellers)

### DNA Digestion

Je 1 µg DNA einer Probe wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und je nach Konzentration der isolierten DNA nuklease-freies H<sub>2</sub>O dest. hinzu gegeben oder die Probe mittels Lyophilisation auf ein Volumen von 17 µl eingeengt. Als Kontrollen dienten je 1 µg *Control DNA low* und *Control DNA high* (genomische DNA aus immortalisierten Zellen mit einer durchschnittlichen TRF-Länge von 3.9 kbp bzw. 10.2 kbp). Die Proben und Kontrollen wurden mit je 2 µl *Digestion buffer* x 10 und 1 µl Restriktionsenzymen (0.5 µl *Hinf* I + 0.5 µl *Rsa* I) versetzt und inkubiert (120 min, 37 °C). Beendet wurde die DNA Digestion durch Zugabe von je 4 µl *Gel electrophoresis loading buffer* x 5 (enthält Bromphenolblau) und kurzes Zentrifugieren der Proben.

### Gelelektrophorese

Zunächst wurde ein etwa 11 x 9 cm großes Agarosegel 0.6 % aus 0.6 g Agarose MP (Fa. Roche) und 100 ml TAE-Puffer x 1 hergestellt. Während das Gel aushärtete, wurden 4 µl DIG *Molecular weight marker*, 12 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O dest. und 4 µl *Gel electrophoresis loading buffer* x 5 in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß miteinander vermischt, 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Der Molekulargewichtsmarker enthält DNA-Fragmente mit einer Länge von 81 bp bis 21266 bp. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer x 1 platziert und die Proben, Kontrollen und der Marker in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer anliegenden Spannung von 60 Volt. Sie wurde beendet, wenn das den Proben zugesetzte Bromphenolblau etwa 10 cm weit gewandert war (Dauer ca. 4 ¼ h). Im Anschluss daran wurde das Gel in eine Plastikschiene mit 50 ml 0.25 M HCl-Lösung gelegt und solange inkubiert (Schüttler 200 UpM, RT), bis das Bromphenolblau eine gelbbraune Farbe aufwies (5 - 10 min). Dann wurde es zweimal mit je 50 ml H<sub>2</sub>O dest. gespült und für 2 x 15 min mit je 50 ml *Denaturation solution* inkubiert (Schüttler 200 UpM, RT). Nach zwei weiteren Spülungen mit H<sub>2</sub>O dest. wurde das Gel für 2 x 15 min mit je 50 ml *Neutralization solution* behandelt (Schüttler 200 UpM, RT) und anschließend noch einmal mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. Abschließend wurde das Gel in 50 ml SSC x 20 gelegt, bis der Southern Blot vorbereitet war.

### *Hergestellte Puffer:*

*TAE x 1: 0.04 M Tris-Acetat, 0.001 M EDTA, pH 8.0*

*SSC x 20: 3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0*

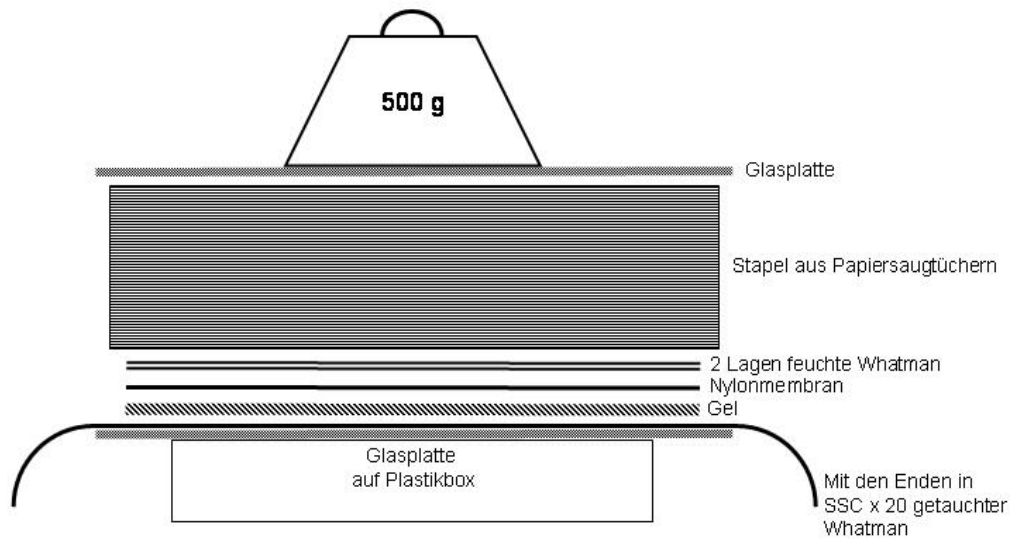
*Denaturation solution: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl*

*Neutralization solution: 0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.5*

### Southern Blot

Der Southern Blot erfolgte mittels Kapillartransfer und wurde - mit einigen improvisatorischen Veränderungen - nach den Empfehlungen von Maniatis et al. (Maniatis et al. 1982) durchgeführt. Dazu wurde eine leere Pipettenspitzenbox mittig in eine Wanne (25 x 15 x 5 cm) gestellt und darauf eine Glasplatte (20 x 15 cm) gelegt. Über die Glasplatte wurde ein trockenes *Whatman* Filterpapier (3 mm) ausgebreitet, dessen Enden bis auf den Boden der Plastikwanne reichten und das in seiner Breite der des Gels entsprach. Auf das Filterpapier wurde das Gel mit der Unterseite nach oben platziert. Darauf kam eine auf die Größe des Gels zugeschnittene positiv beschichtete Nylonmembran (Fa. Roche), auf welche die DNA transferiert werden sollte. Darüber wurden zwei ebenso große in SSC x 20 getränkte *Whatman* Filterpapiere (3 mm) gelegt und das Ganze mit einem Stapel Papiersaugtücher bedeckt, der mit einer zweiten Glasplatte und einem Gewicht von etwa 500 g beschwert wurde. Dann wurde die Wanne mit SSC x 20 gefüllt, so dass das unterste, trockene *Whatman* Filterpapier den Puffer langsam aufsaugen konnte. Um zu verhindern, dass die Saugtücher direkt mit dem Filterpapier in Berührung kamen, wurden die offenen Seiten der Wanne mit Parafilm abgedichtet.

Der Southern Transfer erfolgte über Nacht (ca. 12 Stunden). Am nächsten Morgen wurde die DNA durch UV-Crosslinking (2 min, 120 mJ) auf der Membran fixiert und diese anschließend in einer Plastikschaale kurz mit 50 ml SSC x 2 gewaschen.



**Abb.8:** Schematische Darstellung des Blotaufbaus

### Hybridisierung und Chemilumineszenz Detektion

Zunächst wurden zwei Hybridisierungskolben und 2 x 10 ml *DIG Easy Hyb* auf 42 °C vorgewärmt.

Zur Prähybridisierung wurde die Membran nach dem Waschen mit SSC x 2 in einen der Hybridisierungskolben eingelegt und unter Rotation mit 10 ml *DIG Easy Hyb* im Hybridisierungsofen inkubiert (45 min, 42 °C). Kurz vor Ende der Prähybridisierung wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet, indem 2 µl *Telomere probe* (i. e. Telomer spezifische Sonde) zu den übrigen 10 ml *DIG Easy Hyb* hinzufügt und gut miteinander vermischt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Prähybridisierungslösung abgossen und die Membran mit der Hybridisierungslösung im Ofen inkubiert (180 min, 42 °C).

Danach wurde sie in eine Plastikschiene gelegt und für 2 x 5 min mit je 50 ml *Stringent wash buffer I* gewaschen (Schüttler 200 UpM, RT). Währenddessen wurden der zweite Hybridisierungskolben und 2 x 10 ml *Stringent wash buffer II* auf 50 °C vorgewärmt. Anschließend wurde die Membran für 2 x 15 min mit jeweils 10 ml *Stringent wash buffer II* bei 50 °C im Hybridisierungsofen umspült. Im Anschluss daran wurde sie wieder in die Plastikschiene gelegt und mit 100 ml *Washing buffer x 1* gewaschen (5 min, Schüttler 200 UpM, RT). Dann wurde sie mit 50 ml *Blocking solution x 1* inkubiert (30 min, Schüttler 200 UpM, RT) und währenddessen die Anti-

DIG-POD *working solution* hergestellt. Dazu wurden 50 ml *Blocking solution* x 1 mit 5 µl Anti-DIG-AP (mit Alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen DIG) versetzt und die Membran darin inkubiert (30 min, Schüttler 200 UpM, RT). Hierbei band der Antikörper an die mit der telomerischen DNA hybridisierten DIG-markierten Sonden. Nach 2 x 15 min Waschen mit je 100 ml *Washing buffer* x 1 (Schüttler 200 UpM, RT) wurde die Membran mit 100 ml *Detection buffer* x 1 inkubiert (5 min, Schüttler 200 UpM, RT). Dann wurde sie mit der DNA Seite nach oben auf eine Glasplatte gelegt und die Reste des *Detection buffer* x 1 mit Hilfe eines Papiertuches von den Rändern der Membran aus aufgesogen. Anschließend wurden rasch etwa 20 Tropfen *Substrate solution* (enthält das Chemilumineszenzsubstrat CDP-*Star*) auf die Membran gegeben und diese für 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Hierbei setzte die Alkalische Phosphatase das CDP-*Star* um, wodurch Photonen emittiert wurden.

Danach wurde die Membran luftdicht in eine glatte Klarsichtfolie verpackt, mit der DNA Seite nach oben in eine Filmkassette gelegt und mit Klebeband fixiert. Innerhalb der nächsten 30 bis 60 min wurden dann in der Dunkelkammer mehrere Filmfolien für die Dauer von einer bis zu sieben Minuten mit der Photonen emittierenden Membran belichtet und anschließend entwickelt.

#### *Hergestellte Puffer:*

*Stringent wash buffer I: SSC x 2, 0.1 % SDS*

*Stringent wash buffer II: SSC x 0.2, 0.1 % SDS*

#### Auswertung

Die *Terminal Restriction Fragments* (TRF) sind als schwarzer Schmier auf dem Film erkennbar. Dessen höchste Dichte ist der Bereich, der die durchschnittliche TRF Länge einer Probe widerspiegelt. Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker, der DNA Fragmente bekannter Länge enthält, kann die durchschnittliche TRF Länge einer Probe direkt abgelesen werden.



## 2.3 Färbungen

### 2.3.1 Von Kossa

Die von Kossa Färbung ist ein standardisiertes Verfahren zum Nachweis der osteogenen Differenzierung von hMSC, mit dem die Kalziumdeposition der Zellen in die extrazelluläre Matrix dargestellt wird.

Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur, die einzelnen Reagenzien wurden in einer Menge von etwa 2 ml/well verwendet. Zunächst wurde das Medium aus dem well entfernt und die Zellen mit Methanol 98 % fixiert (15 min). Anschließend wurde H<sub>2</sub>O dest. auf die Zellen gegeben (20 min). Unter Lichtausschluss wurden sie dann mit Silbernitratlösung 5 % inkubiert (5 min). Nach zweimaligem Spülen mit H<sub>2</sub>O dest. erfolgte anschließend die Inkubation mit Pyrogallollösung 1 % (5 min). Durch Zugabe von Natronlauge 5 % wurde die Kalziumfärbung fixiert (4 min) und danach die Zellen mit (alkalischem) Leitungswasser gewaschen (1 min). Nach kurzem Spülen mit H<sub>2</sub>O dest. wurden anschließend die Zellkerne mit May-Grünwald-Lösung gefärbt (10 min). Zum Schluss wurden die Zellen noch einmal mit H<sub>2</sub>O dest. gespült. Für die lichtmikroskopische Beurteilung der Färbung wurden die Zellen in H<sub>2</sub>O dest. belassen. Die kalziumhaltigen Stellen stellten sich tiefschwarz dar, während das Zytoplasma eine rötliche und die Zellkerne eine bläuliche Färbung aufwiesen.

### 2.3.2 Alkalische Phosphatase Aktivität

Die Alkalische Phosphatase ist ein u. a. am Knochenstoffwechsel beteiligtes Enzym. Seine Aktivität nimmt in osteogen differenzierenden hMSC im Vergleich zu nativen hMSC, welche nur eine geringe Enzymaktivität aufweisen, zu. Daher wird die histochemische Darstellung der Alkalischen Phosphatase Aktivität neben der von Kossa Färbung regelmäßig zum Nachweis der osteogenen Differenzierung von hMSC verwendet.

Die Färbung erfolgte unter Verwendung des *Alkaline Phosphatase Kits* (Fa. Sigma, Procedure No. 85). Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass die Alkalische Phosphatase von dem angebotenen Substrat Naphtol AS-MX Phosphat Naphtol AS-MX abspaltet. Dieses verbindet sich mit einem Diazoniumsalz (*Fast Violet B Salt*)

und fällt als unlösliches Pigment an den Stellen aus, an denen Alkalische Phosphatase Aktivität vorhanden ist. Die Färbung erfolgte wie die von Kossa Färbung bei Raumtemperatur. Das Medium wurde aus dem well entfernt und die Zellen mit Fixierlösung behandelt (30 s). Nach dem Waschen mit H<sub>2</sub>O dest. (45 s) wurden sie unter Lichtausschluss mit der Färbelösung inkubiert (30 min). Daraufhin wurden die Zellen nochmals mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen (2 min) und anschließend die Zellkerne mit *Mayer`s Hematoxylin Solution* gefärbt (10 min). Danach wurden die Zellen mit (alkalischem) Leitungswasser gewaschen (2 min) und abschließend mit H<sub>2</sub>O dest. bedeckt. Bei der mikroskopischen Beurteilung stellten sich die Bereiche, an denen die Alkalische Phosphatase das Substrat umgesetzt hatte, rot dar. Die Zellkerne waren blau gefärbt.

*Herstellung von Reagenzien:*

*Fixierlösung: Citrate Concentrate Solution 1:50 mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnen und zwei Volumen davon mit drei Volumen Aceton verdünnen*

*Färbelösung: Inhalt einer Fast Violet B Kapsel in 48 ml H<sub>2</sub>O dest. lösen und 2 ml Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution hinzugeben*

## 2.4 Versuchsansätze

### 2.4.1 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC

HMSC der 6. Passage wurden in einem Doppelansatz in zehn 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Fa. Nunc) mit einer Dichte von etwa 2670 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und in *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium* (MSCGM, Fa. Cambrex) kultiviert. An den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 nach Ansatz der Zellkulturen wurde die Telomeraseaktivität der Zellen mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* (Fa. Roche, Cat. No. 2 013 789) gemessen. Dazu wurden an den Auswertetagen je zwei Zellkulturflaschen trypsiniert, die Zellen gezählt und aus jeweils 2 x 10<sup>5</sup> Zellen einer Zellkulturflasche ein Zellextrakt hergestellt. Von den beiden Zellextrakten wurden dann jeweils 1 µl (1 x 10<sup>3</sup> Zelläquivalente) und 0.1 µl (1 x 10<sup>2</sup> Zelläquivalente) in der TRAP-Reaktion eingesetzt. Die TRAP Produkte wurden bis zum Abschluss der Zellkultur bei – 20 °C gelagert und anschließend in zwei aufeinander folgenden ELISA auf Telomeraseaktivität getestet.

### 2.4.2 Telomeraseaktivität hoch proliferierender hMSC

Der im Folgenden beschriebene Versuch wurde von Frau Dr. rer. nat. Hülya Gülkan durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mir freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

HMSC der 8. bzw. 9. Passage wurden mit 10 - 20 Zellen/cm<sup>2</sup> in 12-well Platten (Fa. Nunc) ausgesät und vier bis sechs Tagen in MSCGM kultiviert. Anschließend wurden sie durch Passagieren 1:7 verdünnt. Nach weiteren vier bis sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen trypsiniert, gepoolt und mittels des *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* (Fa. Roche, Cat. No. 2 013 789) auf Telomeraseaktivität untersucht. Hierbei wurden von jedem Zellextrakt 1 µl (1 x 10<sup>3</sup> Zelläquivalente), 0.1 µl (1 x 10<sup>2</sup> Zelläquivalente) und 0.01 µl Zellextrakt (10 Zelläquivalente) in der TRAP Reaktion eingesetzt.

### 2.4.3 Telomeraseaktivität und Telomerlängen osteogen stimulierter hMSC

HMSC der 5. Passage wurden mit 5730 Zellen/cm<sup>2</sup> in zwölf six-well Platten (Fa. Nunc) ausgesät und bis zur Konfluenz in MSCGM kultiviert. Anschließend wurden die Zellen drei Wochen weiterkultiviert, wobei ein Teil der Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium (MSCGM + 100 nM Dexamethason, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat und 0.05 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat) und die übrigen Zellen weiterhin mit MSCGM ernährt wurden (Kontrollgruppe). Die Telomeraseaktivität wurde mit dem *Telo TAGG Telomerase PCR ELISA* (Fa. Roche, Cat. No. 1 854 666) und die Telomerlängen mit dem *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Fa. Roche, Cat. No. 2 209 136) bestimmt, wobei für jede Messung jeweils die Zellen zweier wells gepoolt wurden. Die Telomeraseaktivität und Telomerlängen wurden in beiden Gruppen an den Tagen 7, 14 und 21 nach Beginn der osteogenen Stimulation sowie in der Kontrollgruppe zusätzlich an Tag 0 gemessen. Während in der Kontrollgruppe die Zellen für alle Auswertetage einfach angesetzt wurden, wurde bei den osteogen differenzierenden Zellen für die Tage 7 und 14 ein doppelter und für den Tag 21 ein vierfacher Zellansatz gewählt, da wir vermuteten, dass mit zunehmender Differenzierung der Zellen die DNA Ausbeute abnehmen könnte (mündliche Mitteilung von Dr. Peter Neth). Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde an den Tagen 7, 14 und 21 aus beiden Gruppen je ein well nach von Kossa gefärbt. In einem zweiten well wurde die Alkalische Phosphatase Aktivität der Zellen unter Verwendung des *Alkaline Phosphatase Kits* (Fa. Sigma, Procedure No. 85) histochemisch dargestellt.

## 2.5 Materialien und Geräte

**Tabelle 1:** Verbrauchsmaterialien und Geräte

<b>Materialien und Geräte</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage 0.01 - 120 g	770-12	Kern, Deutschland
Analysenwaage 0.5 - 4100 g	GJ-4100-2M	Kern, Deutschland
Brutschrank	Inkubator IG 150	Jouan, Frankreich
ELISA Reader	MPP 3408 T	Mikrotek, Deutschland
ELSA Reader Software	MikroWin 2000	Mikrotek, Deutschland
Falcons	15 ml, 50 ml	Nürnbrecht, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Hybridizer HB-1000	UVP, USA
Küvetten	Uvette	Eppendorf, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiovert S 100	Zeiss, Deutschland
Lyofuge	RC 10-10	Jouan, Frankreich
Multifunktionszentrifuge	BR 4 i	Jouan, Frankreich
Neubauer-Zählkammer	0.0025 cm <sup>2</sup> , 0.100 mm	Brand, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	230 mm	Brand, Deutschland
PCR-Gefäße	0.2 ml	Eppendorf, Deutschland
Peltier Thermal Cycler	PTC-200	Biozym, Deutschland
pH-Meter	inolab pH Level 1	WTW GmbH, Deutschland
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Deutschland
Pipetten (10 - 1000 µl)	Pipettman	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen mit Filter	10, 20, 200, 1000 µl	Biozym, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipettus-akku	Hirschmann, Deutschland
Reaktionsgefäße	1.5 ml	Eppendorf, Deutschland
Serologische Pipetten	2, 5, 10, 25 ml	Nürnbrecht, Deutschland
Shaker	Rotomax 120	Heidolph, Deutschland
Sterilbank	Biohit	Antares, Deutschland
Sterilisator (Autoklav)	Zirbus LTA 400	Apparate- u. Maschinenbau GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Deutschland
UV-Crosslinker	BLX-254	Vilber Lourmat, Frankreich

**Fortsetzung von Tabelle 1:** Verbrauchsmaterialien und Geräte

Vortexer	G-560 E	Scientific Ind. Inc., USA
Wärmeschrank	EB 53	Jouan, Frankreich
Wasserbad	10 12	GFL, Deutschland
Whatman	3 mm Filterpapier	Whatman, Deutschland
Zellkulturgefäße	T 75, T 25, six-wells	Nalge Nunc Int., USA
Zentrifuge	CT 4 22	Jouan, Frankreich

**Tabelle 2:** Reagenzien und Chemikalien

<b>Reagenz/ Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton 99.5 %	Merck, Deutschland
Agarose MP	Roche, Deutschland
Eisessig	Merck, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Deutschland
Ethylendiamidtetraacetat 99 % (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol 98 %	Merck, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 10 N	Merck, Deutschland
PBS x 1	Sigma-Aldrich, Deutschland
Pyrogallollösung 1%	Sigma-Aldrich, Deutschland
Salzsäure (HCl) 2 N	Merck, Deutschland
Silbernitratlösung 5 %	Sigma-Aldrich, Deutschland
SDS 20 %	Roth, Deutschland
Trisbase	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Deutschland

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC

##### 3.1.1 Proliferationsverhalten der hMSC

In einem Doppelansatz (A und B) wurden hMSC der 6. Passage in zehn 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit je  $2 \times 10^5$  Zellen (2667 Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät. Nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen Kultivierung in Stammzellmedium wurden jeweils die Zellen zweier Zellkulturflaschen geerntet und die Zellen unter Verwendung von Trypanblau mit dem Hämocytometer gezählt. Die Berechnung des *Cumulative Population Doubling Levels* (CPDL) der Zellen von der Aussaat bis zum Zeitpunkt des Trypsinierens erfolgte nach der Formel:  $\log N / \log 2$ , wobei  $N = \text{Zellzahl zum Zeitpunkt der Messung} / \text{Zellzahl bei Aussaat}$ .

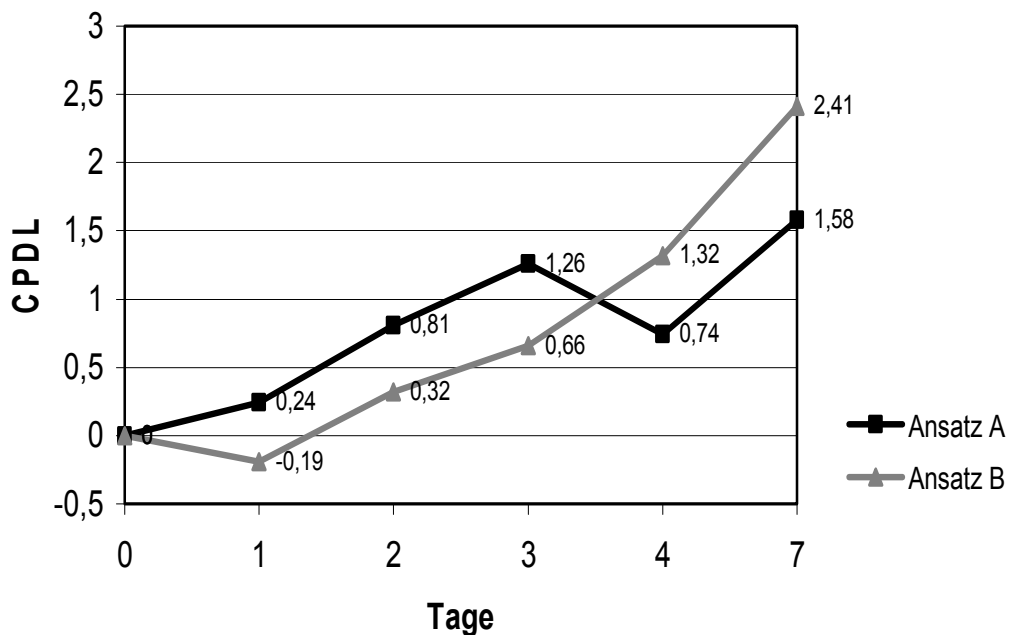


Abb. 10: Proliferationsverhalten der hMSC

### 3.1.2 Nachweis der Telomeraseaktivität

Die Messung der Telomeraseaktivität erfolgte mithilfe des *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* (Fa. Roche). Von jeder Probe wurden jeweils  $1 \times 10^3$  und  $1 \times 10^2$  Zelläquivalente auf Telomeraseaktivität hin untersucht. Die Zellen wurden als Telomerase positiv gewertet, wenn  $\Delta A$  der Probe ( $= A_{\text{Probe}} - A_{\text{Negativkontrolle}}$ ) mehr als zweimal so hoch war wie die Hintergrundaktivität ( $A_{\text{Lysisreagenz}}$ ). Die Relative Telomeraseaktivität (RTA) der Zellen im Verhältnis zur Positivkontrolle ( $= 100\%$ ) wurde nach der unter 2.2.1.2 angegebenen Formel berechnet (s. S. 26).

Tag	Zelläquivalente	$\Delta A / (A_{\text{Lysisreagenz}} \times 2)$	RTA [%]
1	$10^3$	0.00	0.0
	$10^2$	0.76	2.8
2	$10^3$	0.06	0.6
	$10^2$	- 0.08	
3	$10^3$	0.03	0.4
	$10^2$	0.98	7.7
4	$10^3$	0.05	0.4
	$10^2$	- 0.03	
7	$10^3$	- 0.01	
	$10^2$	- 0.04	

**Tabelle 3:** Telomeraseaktivität proliferierender hMSC (Ansatz A)

$$\Delta A = A_{\text{Probe}} - A_{\text{Negativkontrolle}}$$

$$A_{\text{Lysisreagenz}} = \text{Hintergrundaktivität}$$

$$\text{RTA} = \text{Relative Telomeraseaktivität (Positivkontrolle} = 100\%)$$

*Probe ist Telomerase positiv, wenn  $\Delta A / (A_{\text{Lysisreagenz}} \times 2) > 1$*



Tag	Zelläquivalente	$\Delta A / (A_{\text{Lysisreagenz}} \times 2)$	RTA [%]
1	$10^3$	<b>2.29</b>	<b>15.3</b>
	$10^2$	<b>5.24</b>	<b>25.8</b>
2	$10^3$	0.03	0.4
	$10^2$	- 0.01	
3	$10^3$	0.16	0.3
	$10^2$	*	
4	$10^3$	- 0.02	
	$10^2$	*	
7	$10^3$	- 0.01	
	$10^2$	0.05	

\* ungültige Messung

**Tabelle 4:** Telomeraseaktivität proliferierender hMSC (Ansatz B)

$$\Delta A = A_{\text{Probe}} - A_{\text{Negativkontrolle}}$$

$$A_{\text{Lysisreagenz}} = \text{Hintergrundaktivität}$$

RTA = Relative Telomeraseaktivität (Positivkontrolle = 100 %)

*Probe ist Telomerase positiv, wenn  $\Delta A / (A_{\text{Lysisreagenz}} \times 2) > 1$*

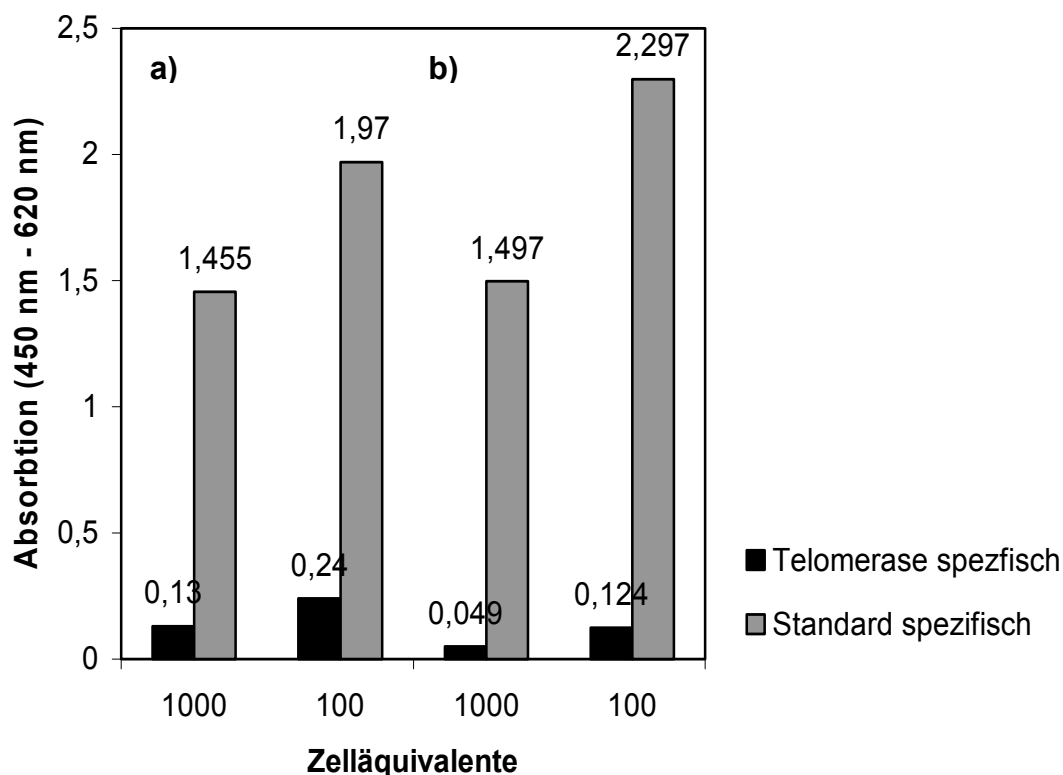
Im Ansatz A (s. Tab. 3, S. 40) war in keinem der Zellextrakte  $\Delta A$  mehr als zweimal so hoch wie die Hintergrundaktivität ( $A_{\text{Lysisreagenz}}$ ). Somit waren alle Proben Telomerase negativ.

Im Ansatz B (s. Tab. 4) war Telomeraseaktivität in hMSC am Tag 1 nach Aussaat nachweisbar ( $\Delta A / (A_{\text{Lysisreagenz}} \times 2) > 1$ ), wobei in  $1 \times 10^2$  Zelläquivalenten eine höhere Aktivität gemessen wurde als in  $1 \times 10^3$  Zelläquivalenten ( $\Delta A / (A_{\text{Lysisreagenz}} \times 2) = \mathbf{5.24}$  bzw. **2.29**). Es handelte sich um die hMSC, die nach einem Tag eine geringere Dichte aufwies als am Tag der Aussaat (CPDL – 0.19, s. S. 39). Alle übrigen Proben waren Telomerase negativ.

### 3.1.3 Nachweis von Polymeraseinhibitoren

Zum Nachweis von Polymeraseinhibitoren, welche die Amplifikation der Telomeraseprodukte während der PCR stören und somit zu einer geringeren Extinktion bzw. einem falsch negativen Ergebnis bezüglich der Telomeraseaktivität der Probe führen können, wurde die Telomeraseaktivität in unterschiedlichen Konzentrationen des Zellextraktes einer Probe gemessen. Wenn sowohl das Telomerase spezifische Signal als auch das Interne Standard spezifische Signal einer Probe mit abnehmender Menge des eingesetzten Zellextraktes zunahm, waren Polymeraseinhibitoren im Zellextrakt enthalten.

Dies konnte deutlich in zwei (Tag 1, Ansatz B und Tag 3, Ansatz A) und tendenziell in drei weiteren (Ergebnisse nicht dargestellt) der insgesamt zehn Proben beobachtet werden.

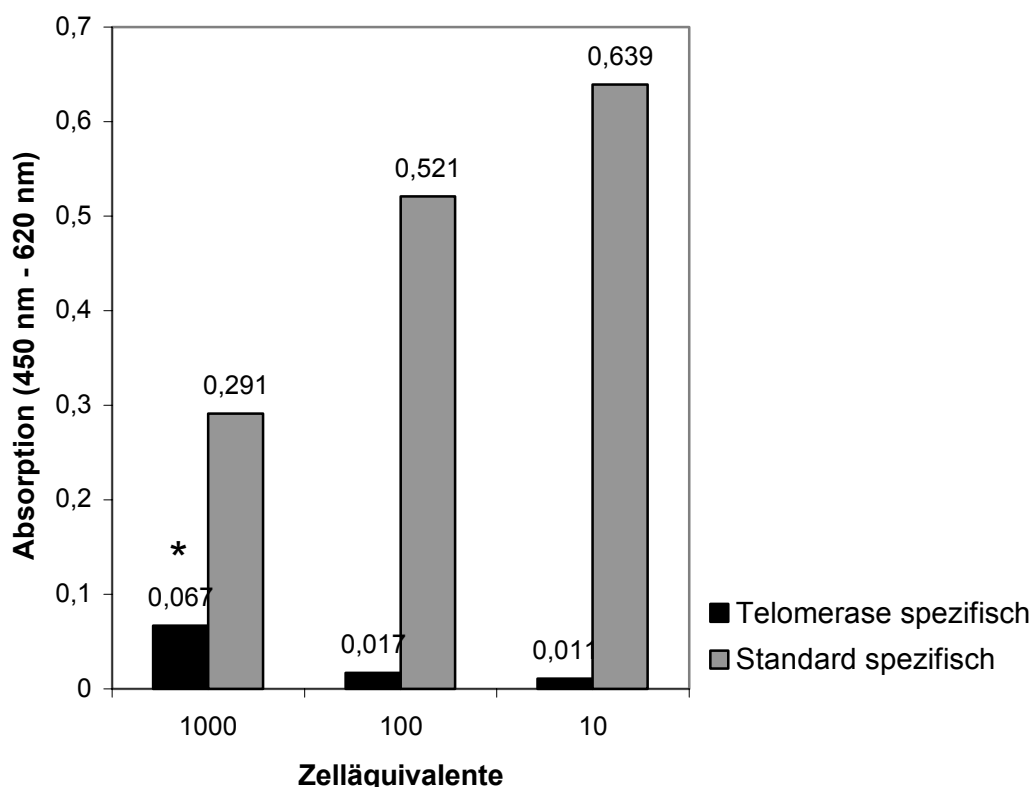


**Abb. 11:** Nachweis von Polymeraseinhibitoren. Unter a) Extinktionen Telomerase positiver hMSC (Tag 1, Ansatz B). Unter b) Extinktionen Telomerase negativer hMSC (Tag 3, Ansatz A). In beiden Proben steigen sowohl das Telomerase spezifische als auch das Standard spezifische Signal mit abnehmender Menge des eingesetzten Zellextraktes ( $1 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^2$  Zelläquivalente) an.

### 3.2 Telomeraseaktivität hoch proliferierender hMSC

HMSC der 8. bzw. 9. Passage wurden mit 10 - 20 Zellen/cm<sup>2</sup> in 12-well Platten ausgesät und nach 4 bis 6 Tagen durch Passagieren 1:7 verdünnt. Die Zellen wurden nach 4 bis 7 Tagen geerntet, gepoolt und mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* (Fa. Roche) auf Telomeraseaktivität untersucht.

In den hMSC der 9. Passage war Telomeraseaktivität nachweisbar, wohingegen der Zellextrakt, der aus Zellen in der 10. Passage hergestellt wurde, keine Telomeraseaktivität aufwies. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die hMSC der 9. Passage zuvor niemals konfluent als 40 %, während die hMSC der 10. Passage zuvor mindestens einmal zu mehr als 50 % konfluent gewesen waren. Nach Messung der Telomeraseaktivität in 1 x 10<sup>3</sup>, 1 x 10<sup>2</sup> und 10 Zelläquivalenten ergab sich kein Hinweis für Polymeraseinhibitoren in den Zellextrakten.



**Abb. 12:** Extinktionen hoch proliferierender hMSC der 9. Passage in unterschiedlichen Mengen Zellextrakt. In 1 x 10<sup>3</sup> Zelläquivalenten ist Telomeraseaktivität nachweisbar (\*). Mit zunehmender Verdünnung nimmt das Telomerase spezifische Signal bis unter die Nachweisgrenze für Telomeraseaktivität ab. Hinweise für das Vorhandensein von Polymeraseinhibitoren im Zellextrakt liegen nicht vor.

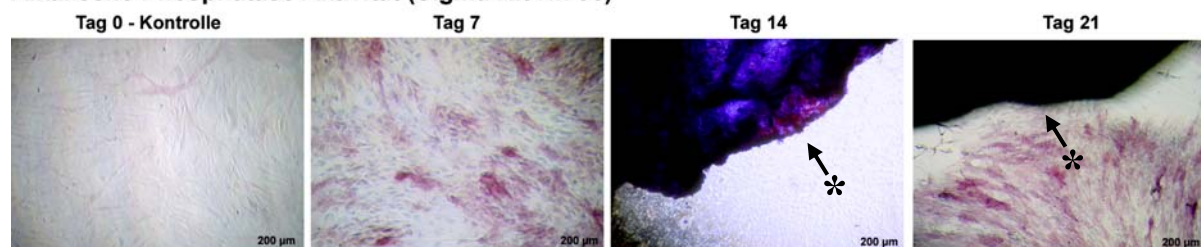
### 3.3 Osteogene Stimulation von hMSC

Es wurden hMSC der 5. Passage bis zur Konfluenz in Stammzellmedium kultiviert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium und die übrigen Zellen als Kontrollen in Stammzellmedium über drei Wochen weiter kultiviert.

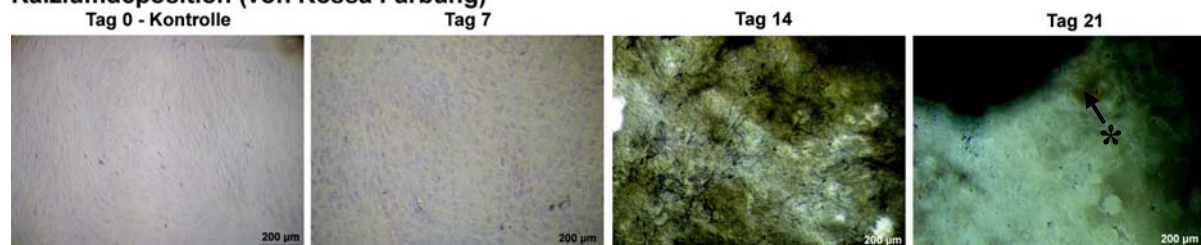
#### 3.3.1 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Während der dreiwöchigen osteogenen Stimulation war eine deutliche Zunahme der Alkalischen Phosphatase Aktivität der Zellen zu beobachten. Die Kontrollen wiesen nur eine geringe Aktivität auf, die sich nicht veränderte. Besonders gut zu beobachten war die Zunahme der Aktivität am Tag 7, als die Zellen sich noch nicht vom Boden abgelöst hatten. Die Ablösung der osteogen stimulierten hMSC mit Bildung sog. *bone nodules* trat regelmäßig nach zehn bis elf Tagen auf, wohingegen die Kontrollen bis zum Ende des Versuchs adhärent blieben. Die Kalziumdeposition der osteogen stimulierten hMSC war ab Tag 14 deutlich erkennbar.

#### Alkalische Phosphatase Aktivität (Sigma Kit Nr. 85)



#### Kalziumdeposition (von Kossa Färbung)



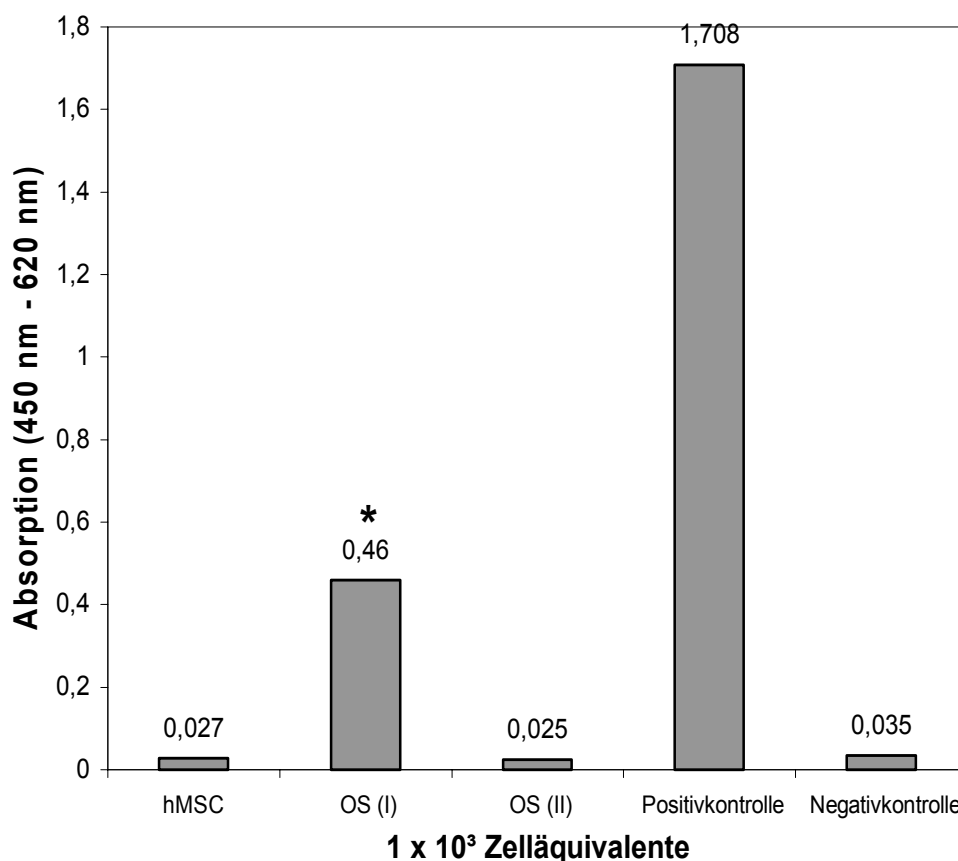
\* *bone nodules*

**Abb. 13:** Darstellung von Alkalischer Phosphatase Aktivität und Kalziumdeposition in den Kontrollen an Tag 0 und in den osteogen stimulierten hMSC an den Tagen 7, 14 und 21. Stellen mit Alkalischer Phosphatase Aktivität sind rot-violett gefärbt. Die Kalziumdeposition der osteogen differenzierenden Zellen ist schwarz dargestellt (ab Tag 14).

### 3.3.2 Telomeraseaktivität osteogen differenzierender hMSC

Für die Messung der Telomeraseaktivität wurde *der Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA* (Fa. Roche) verwendet. Die einfach angesetzten Kontrollen (unstimulierte hMSC) wurden an den Tagen 0, 7, 14 und 21 untersucht. Die Messungen in den osteogen stimulierten Zellen erfolgten an den Tagen 7 und 14 in einem doppelten und am Tag 21 in einem vierfachen Zellkulturansatz. Die Zellen galten als Telomerase positiv, wenn ihre Extinktion minus der Extinktion der Negativkontrolle größer als 0.2 ( $A_{450\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}}$ ) war.

In den Kontrollen konnte zu keinem Zeitpunkt Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In den osteogen stimulierten hMSC wies einer von zwei Ansätzen an Tag 14 deutliche Telomeraseaktivität auf ( $\Delta A_{OS(I)} = 0.425$ ). Alle übrigen osteogen stimulierten Zellkulturansätze waren Telomerase negativ.

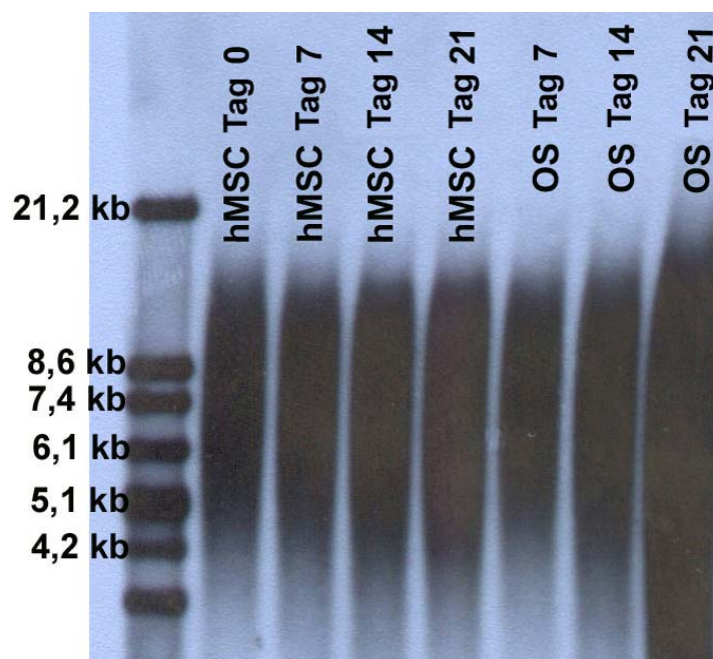


**Abb. 14:** Nachweis von Telomeraseaktivität in einer von zwei Proben an Tag 14 der osteogenen Differenzierung:  $\Delta A_{OS(I)} (= 0.46 - 0.035) = 0.425$ .

### 3.3.3 Telomerlängen osteogen differenzierender hMSC

Die Messung der Telomerlängen erfolgte in Form von *Terminal Restriction Fragments* (TRF) mit dem *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Fa. Roche). Jeweils 1 µg DNA einer Probe wurde für die Messung eingesetzt. Die Kontrollen wurden wiederum in einem einfachen und die osteogen stimulierten hMSC an Tag 7 und 14 in einem doppelten bzw. an Tag 21 in einem vierfachen Versuchsansatz auf ihre Telomerlänge hin untersucht.

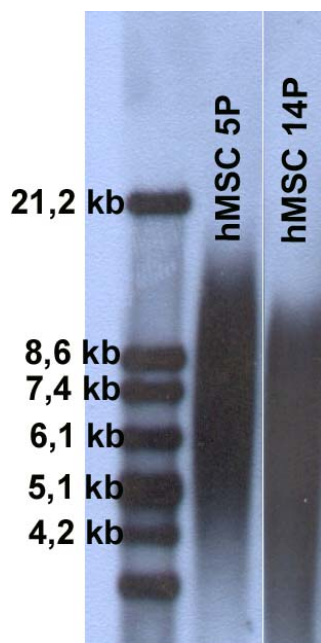
Die Telomerlänge der Kontrollen (*hMSC Tag 0* bis *hMSC Tag 21*) betrug etwa 7.5 kb und veränderte sich während der dreiwöchigen Kultivierung nicht. In den osteogen stimulierten hMSC (*OS Tag 7* bis *OS Tag 21*) konnten beim Vergleich mit den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen der Telomerlänge festgestellt werden. Die osteogene Differenzierung der Zellen hatte somit keinen Einfluss auf ihre Telomerlänge.



**Abb. 15:** Die Telomere der Kontrollen (*hMSC Tag 0* bis *hMSC Tag 21*) blieben während der dreiwöchigen konfluenten Kultivierung gleich. Die osteogene Stimulation der Zellen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Telomerlänge (*OS Tag 7* bis *OS Tag 21*).

### 3.4 Abnahme der Telomerlänge durch Passagierung

Es wurde die Telomerlänge seneszenten hMSC der 14. Passage mit der von hMSC der 5. Passage verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Telomere der höher passagierten Zellen um etwa 2 kb verkürzt hatten. Bei einer Zellteilungsrate von etwa 40 PD entspricht dies einer Abnahme der Telomerlänge um  $40 \pm 10$  bp pro Zellteilung.

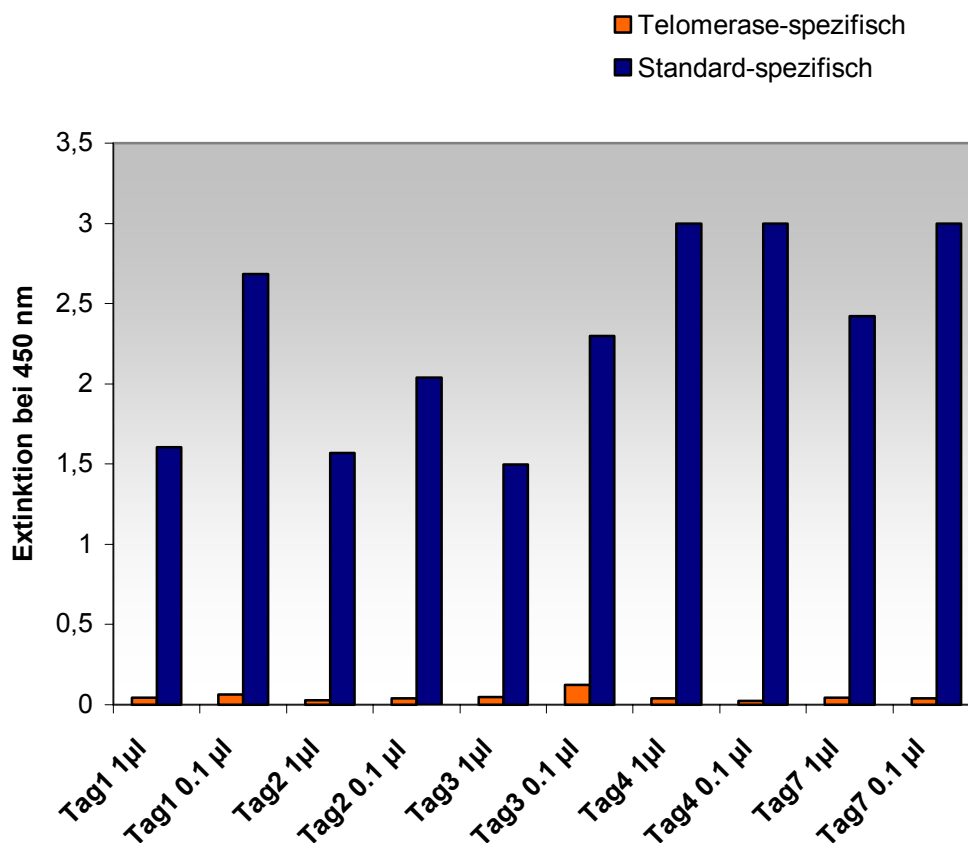


**Abb. 16:** Abnahme der Telomerlänge von hMSC durch Passagierung

### 3. 5 Übersicht weiterer Versuchsergebnisse

#### 3.5.1 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC

##### Ansatz A



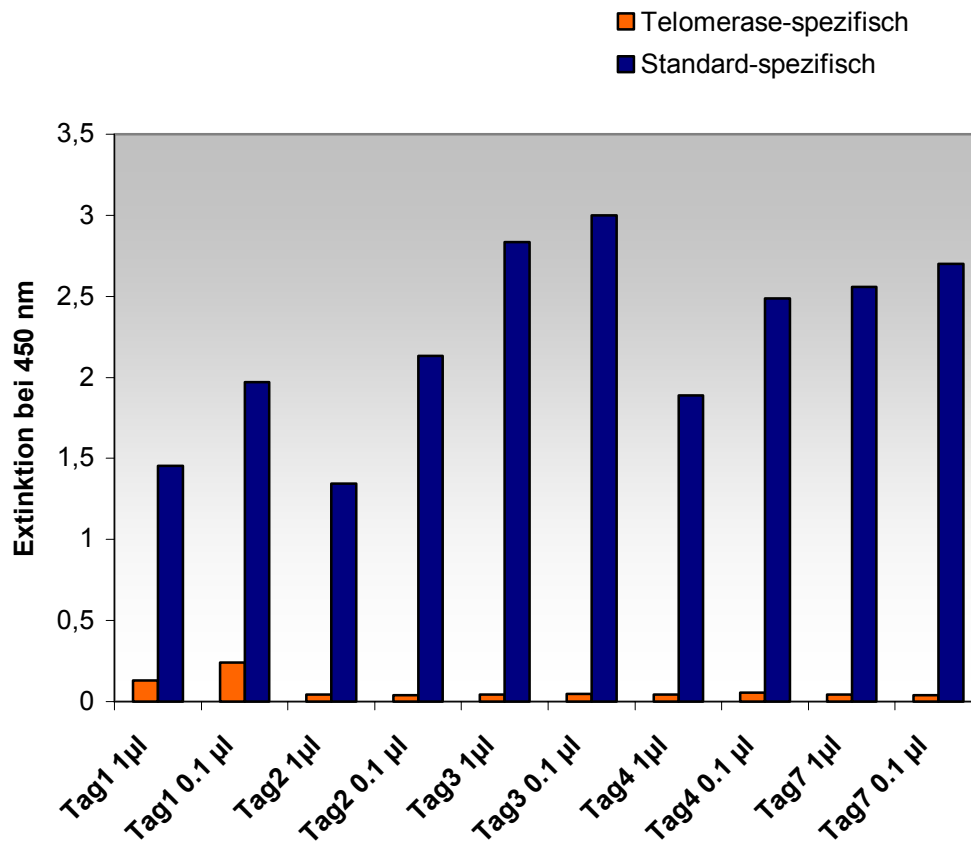
	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 7	
Zellextrakt	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl
Telomerase-spezifisch	0.045	0.062	0.029	0.041	0.049	0.124	0.038	0.024	0.043	0.040
Standard-spezifisch	1.604	2.682	1.568	2.037	1.497	2.297	>3.0	>3.0	2.421	>3.0

**Abb. 17:** Grafische und tabellarische Darstellung der gemessenen Extinktionen aus je 1 µl und 0.1 µl Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^2$  Zelläquivalente) proliferierender hMSC (Ansatz A).

In drei von fünf Proben nehmen die Extinktionen des Telomerase- und des Standard-spezifischen Signals mit abnehmender Menge Zellextrakt zu.

Alle gemessenen Proben waren Telomerase negativ (gemessen mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>*, Fa. Roche).

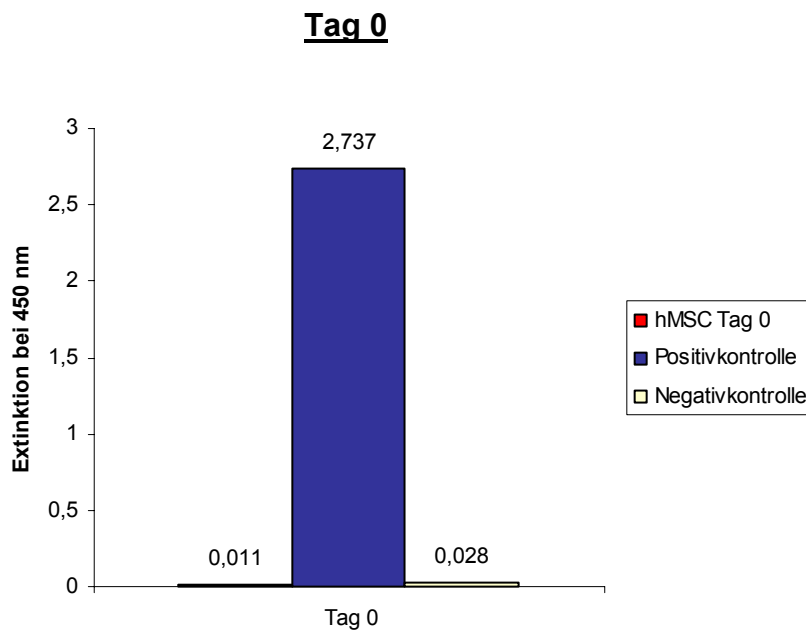


**Ansatz B**

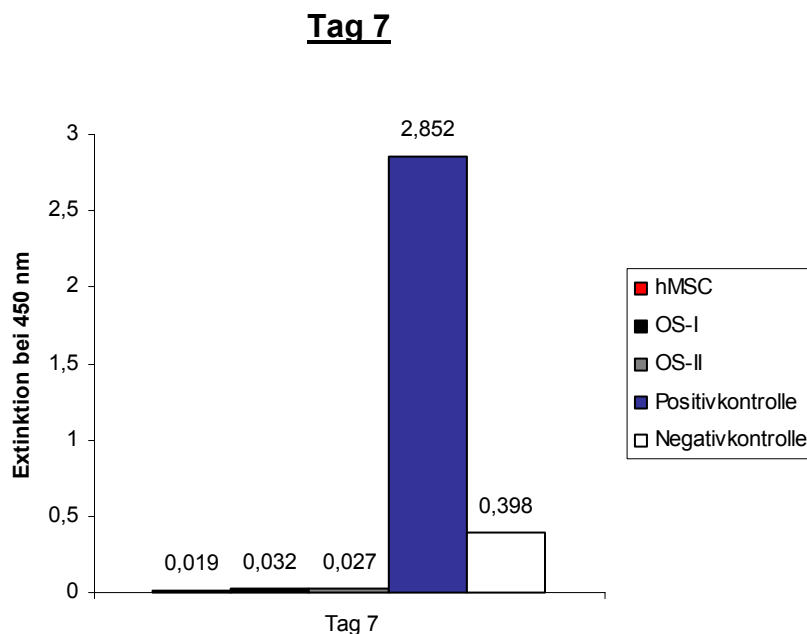
Zellextrakt	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 7	
	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl	1 µl	0.1 µl
<b>Telomerase-spezifisch</b>	0.130	0.240	0.042	0.041	0.043	0.049	0.042	0.054	0.042	0.038
<b>Standard-spezifisch</b>	1.455	1.970	1.345	2.134	2.834	>3.0	1.888	2.487	2.559	2.701

**Abb.18:** Grafische und tabellarische Darstellung der gemessenen Extinktionen aus je 1 µl und 0.1 µl Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^2$  Zelläquivalente) proliferierender hMSC (Ansatz B). Nachweis von Telomeraseaktivität in hMSC Tag 1, wobei das Telomerase- und Standard-spezifische Signal mit abnehmender Menge Zellextrakt zunehmen. Alle übrigen Proben waren Telomerase negativ.

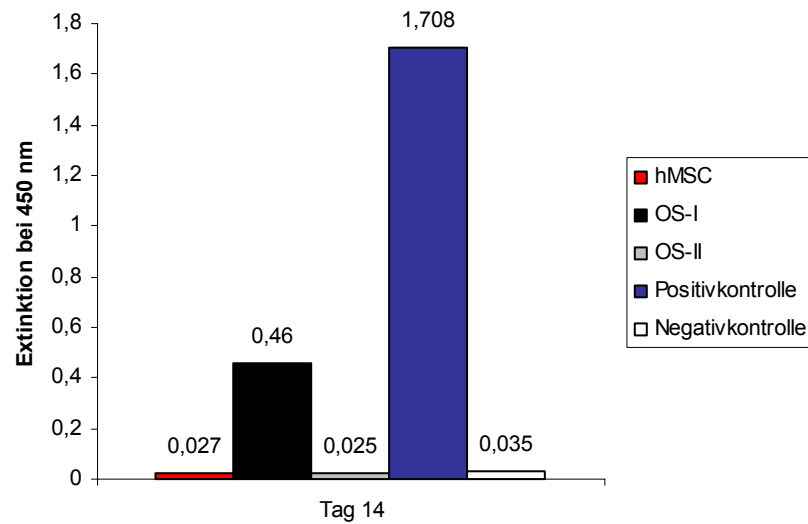
### 3.5.2 Telomeraseaktivität osteogen differenzierender hMSC



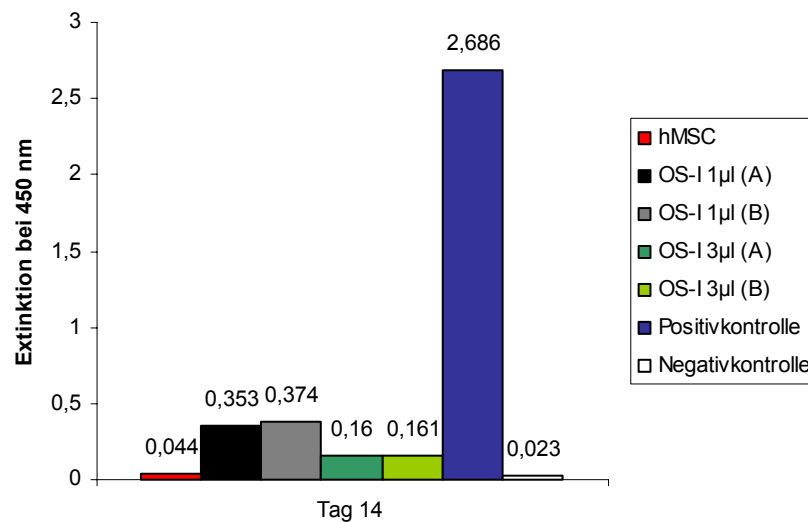
**Abb. 19:** Kein Nachweis von Telomeraseaktivität in 1  $\mu$ l Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  Zelläquivalente) konfluenter hMSC (6. P.), die drei Wochen in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium kultiviert wurden (gemessen mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA*, Fa. Roche).



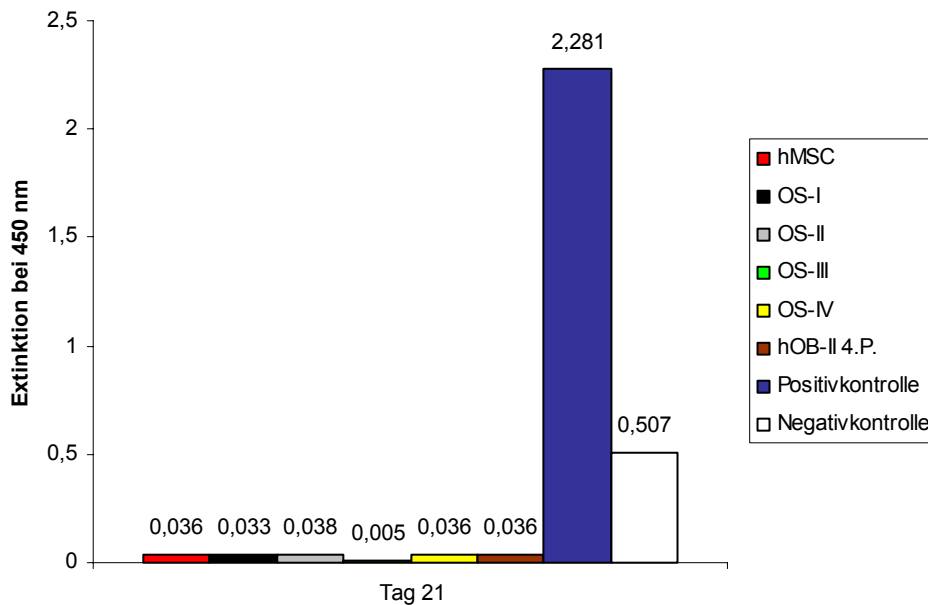
**Abb.20:** Kein Nachweis von Telomeraseaktivität in 1  $\mu$ l Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  Zelläquivalente) der Kontrolle (hMSC) und der sieben Tage in osteogenem Differenzierungsmedium kultivierten hMSC (Doppelansatz OS-I und OS-II). Darüber hinaus Negativkontrolle (i. e. hitzeinaktivierte Positivkontrolle) zu hoch ( $> 0,25$ ), daher Messung ungültig.

**Tag 14****1. Messung**

**Abb. 21:** Nachweis von Telomeraseaktivität in 1  $\mu$ l Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  Zelläquivalente) in einem von zwei Ansätzen der osteogen differenzierenden hMSC (OS-I).

**2. Messung**

**Abb. 22:** In einer 2. Messung wurde die Telomeraseaktivität der Telomerase positiven Probe OS-I erneut bestimmt. Neben 1  $\mu$ l Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  Zelläquivalente) wurden auch 3  $\mu$ l Zellextrakt ( $3 \times 10^3$  Zelläquivalente) jeweils in einer Doppelwertbestimmung (A und B) in der TRAP Reaktion eingesetzt. Hierbei konnte erneut Telomeraseaktivität in 1  $\mu$ l Zellextrakt nachgewiesen werden, während die Extinktion der Probe aus 3  $\mu$ l Zellextrakt unterhalb der Nachweisgrenze für Telomeraseaktivität lag.

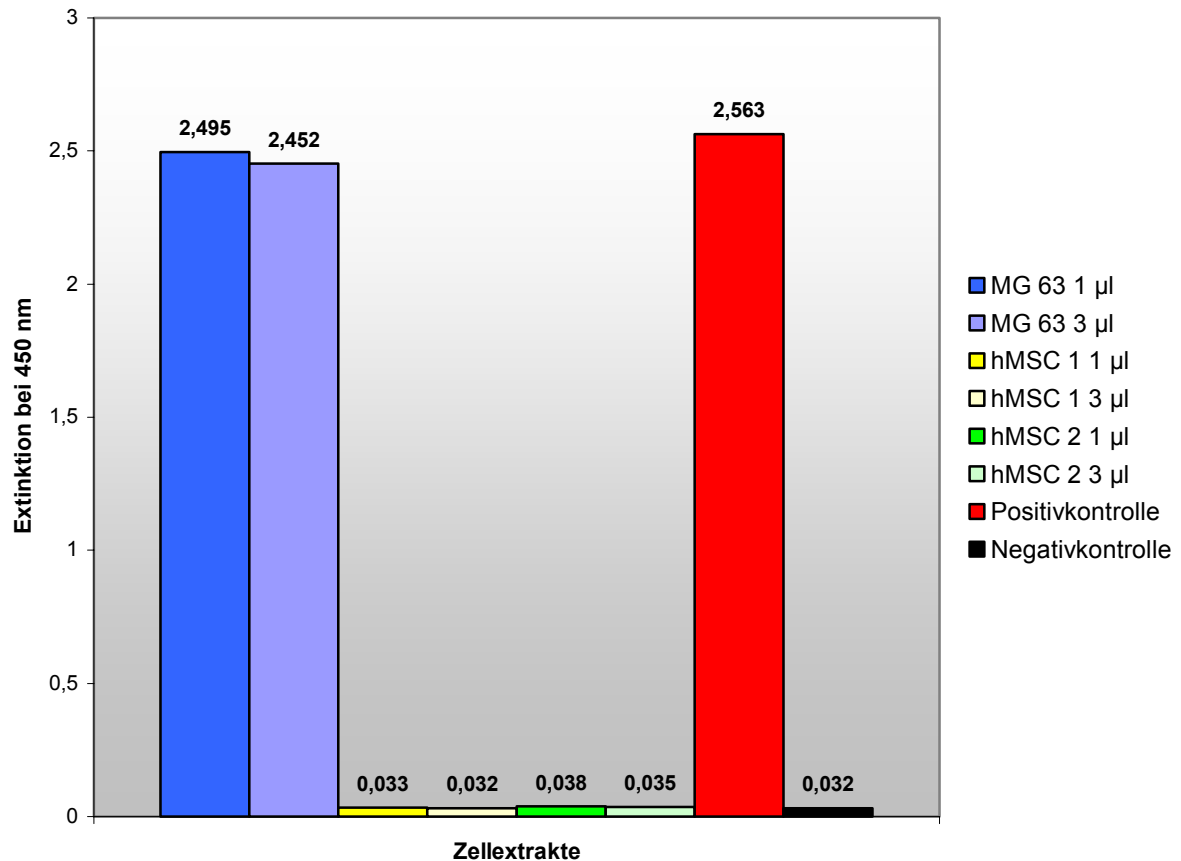
**Tag 21**

**Abb. 23:** Kein Nachweis von Telomeraseaktivität in jeweils 1  $\mu\text{l}$  Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  Zelläquivalente) der vier Zellkulturansätze von drei Wochen lang osteogen differenzierten hMSC (OS-I bis OS-IV). Auch in 1  $\mu\text{l}$  Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  Zelläquivalente) humaner Osteoblasten der 4. Passage (hOB-II 4. P.) war keine Telomeraseaktivität nachweisbar. Darüber hinaus Negativkontrolle zu hoch, daher Messung ungültig.

### 3.5.3 Telomeraseaktivität in hMSC und MG 63 (Osteosarkomzelllinie)

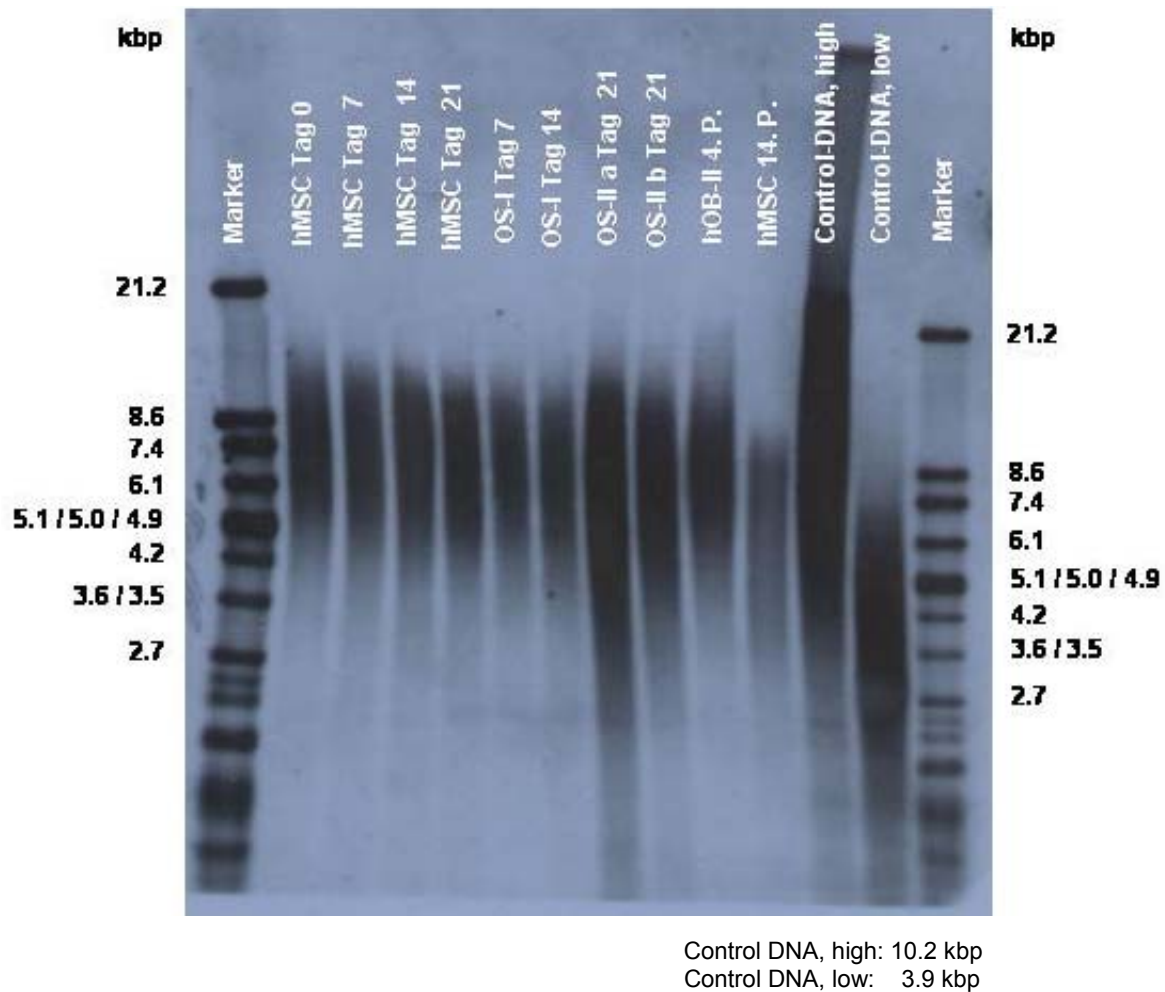
Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse der Telomeraseaktivitätsmessung mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR Elisa* (Fa. Roche) durch die Menge des eingesetzten Zellextraktes beeinflusst werden.

Es wurden aus einer Zellkultur subkonfluenten hMSC, 3. P. mehrere Zellextrakte nach Protokoll des Herstellers hergestellt und die Telomeraseaktivität zweier Zellextrakte (1 und 2) in jeweils 1  $\mu\text{l}$  und 3  $\mu\text{l}$  Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  bzw.  $3 \times 10^3$  Zelläquivalente) mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA* gemessen. Zum Vergleich wurde die Telomeraseaktivität von - bekanntermaßen - Telomerase positiven MG 63 Zellen, 161. P. (humane Osteosarkomzelllinie, ATCC, USA) in 1  $\mu\text{l}$  und 3  $\mu\text{l}$  Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  bzw.  $3 \times 10^3$  Zelläquivalente) gemessen.

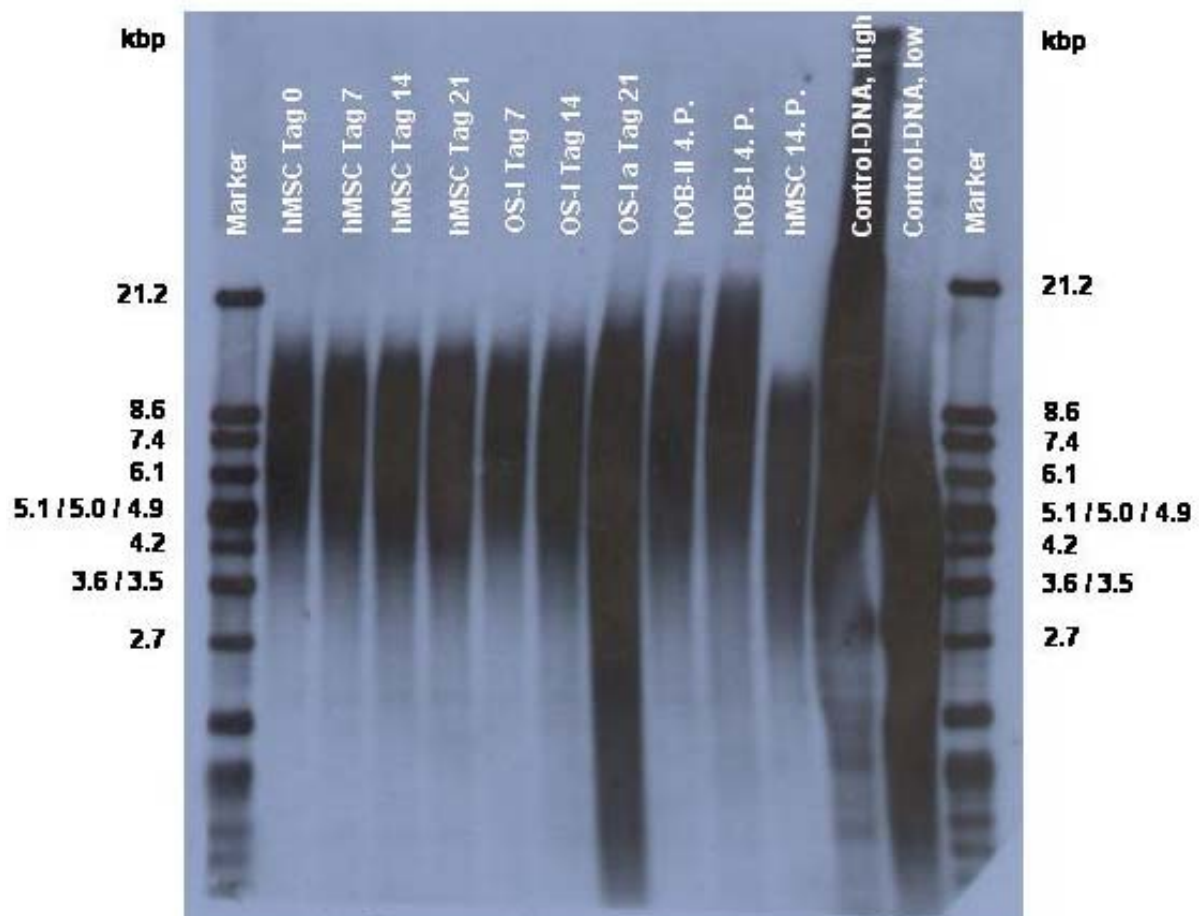


**Abb. 24:** MG 63 Zellen waren deutlich Telomerase positiv, während in den hMSC keine Telomeraseaktivität nachweisbar war. Im Gegensatz zu den osteogen differenzierenden hMSC Tag 14 (s. Abb. 21 und 22) war bei den MG 63 Zellen kein wesentlicher Unterschied im Ergebnis bei der Telomeraseaktivitätsmessung in 1 µl bzw. 3 µl Zellextrakt nachweisbar. In einem weiteren Versuch wurden MG 63 Zellen mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Verdünnung des Zellextraktes das Telomerase- und Standard-spezifische Signal nicht zunehmen, d. h. es ergaben sich keine Hinweise für das Vorhandensein von Polymeraseinhibitoren im Zellextrakt (Versuche von Dr. rer. nat. Hülya Gülkan, Ergebnisse nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu konnten in proliferierenden hMSC Polymeraseinhibitoren nachgewiesen werden (s. Abb. 11), welche zu falsch niedrigen Messergebnissen geführt haben könnten.

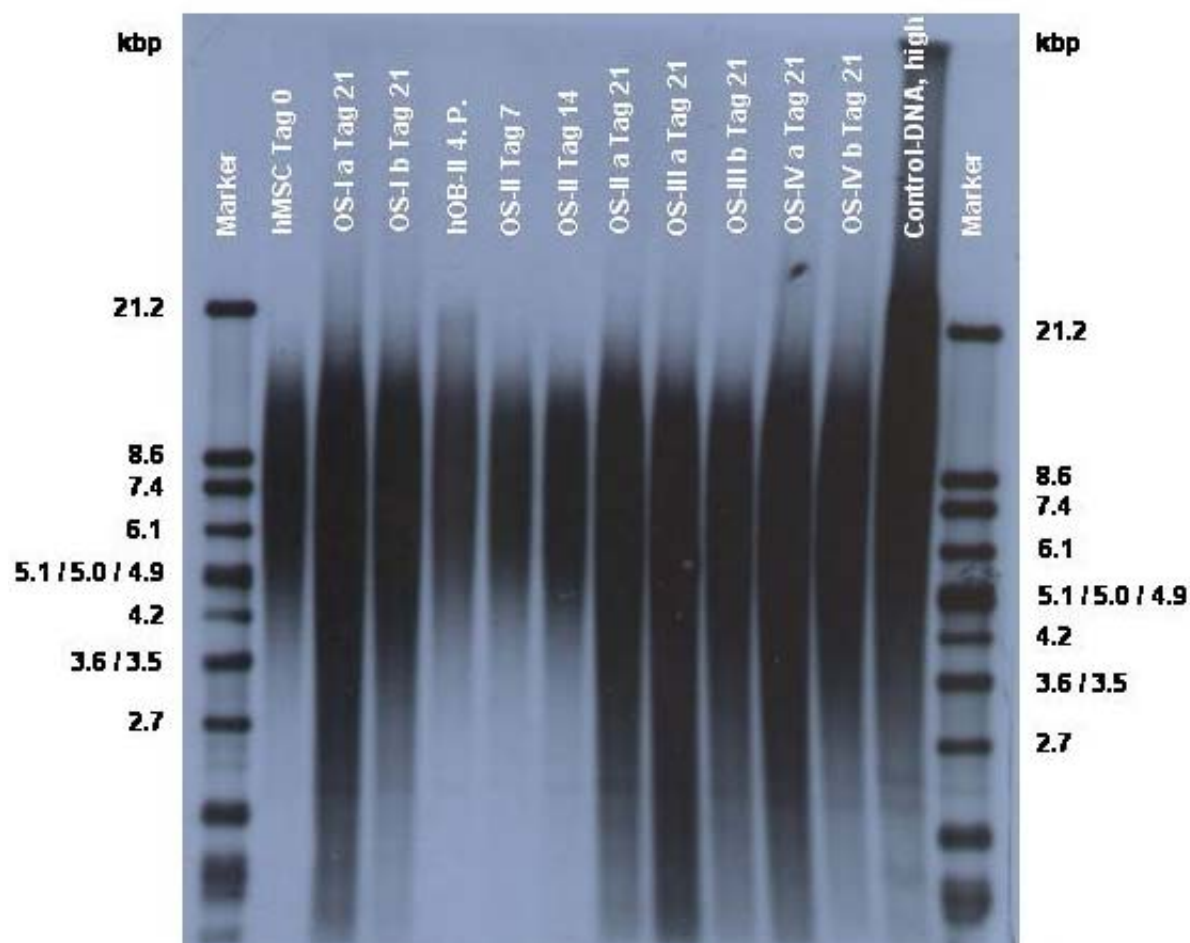
### 3.5.4 Telomerlängen osteogen differenzierender hMSC



**Abb. 25:** Messung der Telomerlänge mit dem *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Fa. Roche). Vergleich von hMSC (6. P.), die bis zu 21 Tage in Stammzellmedium kultiviert wurden (hMSC Tag 0 - Tag 21) mit 7, 14 und 21 Tage osteogen differenzierenden hMSC (OS Tag 7 - Tag 21). hMSC Tag 0 bis Tag 21 wiesen keine sichtbare Veränderung der Telomerlänge auf. Bei der scheinbaren Zunahme der Telomerlänge an Tag 21 der osteogen differenzierenden hMSC handelt es sich wohl um ein Artefakt. Die Proben OS-II a Tag 21 und OS-II b Tag 21 stammen aus einem Zellkulturansatz, bei dem die DNA in zwei aufeinander folgenden Elutionen isoliert wurde. Die verschieden breiten Signale sind a. e. auf eine unterschiedliche Reinheit der Proben, i. e. Verhältnis von DNA/RNA zurückzuführen (optimal 1.8 - 2.0): 1. Elution:  $2.49_{(260\text{nm}/280\text{nm})}$ , 2. Elution:  $1.49_{(260\text{nm}/280\text{nm})}$ . Der Vergleich von hMSC (6. P.) mit hMSC (14. P.) zeigt eine deutliche Abnahme der Telomerlänge von durchschnittlich 7.5 kbp auf etwa 5.5 kbp (s. auch nächste Abbildung).



**Abb. 26:** Telomerlängenmessung weiterer Proben ohne eindeutige Unterschiede zwischen konfluent kultivierten und osteogen differenzierenden hMSC. Erneut breiteres Signal bei den osteogen differenzierenden hMSC an Tag 21 (OS-I a Tag 21). Ursächlich hierfür ist a. e., dass mehr als 1  $\mu\text{g}$  dsDNA aufgetragen wurden (DNA/RNA Ratio: 2.60).  
 Noch einmal bestimmt wurde die Telomerlänge seneszenten hMSC, 14. Passage mit deutlicher Abnahme der Telomerlänge im Vergleich zu den hMSC in der 6. Passage.



**Abb. 27:** Telomerlängenmessung der restlichen Proben. Zwischen den einzelnen Proben der osteogen differenzierenden hMSC an Tag 21 (OS-I Tag 21 bis OS-IV Tag 21) sind keine eindeutigen Unterschiede nachweisbar. Die geringen Varianzen sind, wie bereits beschrieben, wohl auf die unterschiedliche Reinheit der Proben zurückzuführen. Der Vergleich von OS-II Tag 7, OS-II Tag 14 und OS-III b Tag 21 zeigt am ehesten, dass die osteogene Differenzierung der Zellen keine - zumindest mit diesem Verfahren nicht nachweisbare - Veränderung der Telomerlänge bewirkt.



## 4. Diskussion

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 Zellen

Im Knochenmarkstroma sind viele verschiedene Zellarten angesiedelt. Neben den mesenchymalen Stammzellen enthält es u. a. die Zellen aus der hämatopoetischen Reihe, Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Osteoblasten (Castro-Malaspina et al. 1984, Wang and Wolf 1990). Der Anteil der mesenchymalen Stammzellen im Knochenmarkstroma ist dabei mit 1 - 20 pro  $1 \times 10^5$  mononukleärer Zellen gering (Gronthos and Simmons 1996) und ein optimales, standardisiertes Verfahren zur Isolation und *in vitro* Anreicherung der hMSC existiert nicht. Die gängigsten Verfahren führen zu Zellgemischen, die außer den osteogenen Zellen auch noch andere Zellen enthalten (Jonsson et al. 1999). Da sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch Lymphozyten geringe Telomeraseaktivität besitzen (Vaziri et al. 1994, Hiyama et al. 1995), wäre die Gefahr groß, dass die Versuchsergebnisse durch eine Verunreinigung mit diesen Zellen verfälscht würden. Aus diesem Grund und um die Ergebnisse der einzelnen Versuche leichter miteinander vergleichen zu können (alle Versuche mit Zellen desselben Spenders) wurden kommerziell erhältliche hMSC verwendet, die vom Hersteller nach einem etablierten Verfahren isoliert wurden und einen hohen Anteil an mesenchymalen Stammzellen gewährleisten (Pittenger et al. 1999).

#### 4.1.2 Osteogene Differenzierung von hMSC

Für die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* spielt neben der Dichte der Zellen zum Zeitpunkt der Induktion der Einsatz von verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren eine wichtige Rolle. Zu den wirkungsvollsten Faktoren zählen Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-phosphat. Die genaue Wirkungsweise der einzelnen Faktoren ist zum Teil noch unerforscht. Für Dexamethason, ein synthetisches Glukokortikoid, konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass es die Alkalische Phosphatase

Aktivität der Zellen steigert, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Mineralisation der extrazellulären Matrix spielt (Cheng et al. 1994, Pereira et al. 2002). Insbesondere in Kombination mit  $\beta$ -Glycerophosphat, das als Phosphatdonor dient, konnte eine verstärkte Mineralisation beobachtet werden (Maniatopoulos et al. 1988, Bellows et al. 1992). Ascorbinsäure ist ein wasserlösliches Vitamin mit antioxidativen Eigenschaften, das als Kofaktor an vielen biologischen Reaktionen beteiligt ist, unter anderem an der Hydroxylierung von Kollagen I, dem Hauptbestandteil der organischen extrazellulären Matrix (Bellows et al. 1986, Arrigoni and De Tullio 2002). Die von uns gewählten Konzentrationen der Zusätze (100 nM Dexamethason, 10 nM  $\beta$ -Glycerophosphat und 0.05 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat) gehen auf eine Arbeit von Jaiswal et al. zurück, welche unter diesen Bedingungen eine optimale osteogene Differenzierung der hMSC nachweisen konnten. Belegt wurde die Differenzierung unter anderem durch die veränderte Morphologie und erhöhte Alkalische Phosphatase Expression der Zellen sowie ihre Synthese von mineralisierter extrazellulärer Matrix (Jaiswal et al. 1997).

#### 4.1.3 Messung der Telomeraseaktivität

Erstmals 1989 wurde Telomeraseaktivität in menschlichen immortalisierten Krebszellen, den sogenannten HeLa Zellen, nachgewiesen (Morin 1989). Das Problem bei dem damals verwendeten Nachweisverfahren war, dass große Mengen Gewebe bzw. Zellen erforderlich waren. Durch die Entwicklung des *Telomeric Repeat Amplification Protocols* (TRAP) von Kim et al. 1994 wurde es möglich, auch kleine Proben und Proben mit niedriger Telomeraseaktivität zu untersuchen, da durch die Amplifikation der Telomeraseprodukte in der PCR der Test sehr viel sensitiver geworden war (Kim et al. 1994). Für die Detektion und Quantifizierung der amplifizierten TRAP Produkte wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Das gängigste ist neben dem ELISA die Polyacrylamid Gelelektrophorese, bei der die TRAP Produkte durch Autoradiografie oder Fluoreszenz in Form einer spezifischen 6 bp Leiter dargestellt und anschließend mittels Densitometrie quantifiziert werden können. Die Detektion und Quantifizierung der TRAP Produkte mit dem ELISA erfolgt durch ihre Hybridisierung mit spezifischen Sonden, gegen die ein Enzym-gekoppelter

Antikörper gerichtet wird, und anschließendem Substratumsatz durch das Enzym, der dann photometrisch bestimmt werden kann.

Für die Untersuchung der osteogen differenzierenden hMSC wurde der *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA* (Fa. Roche) verwendet. Dieser bot bei gleicher Sensitivität wie ein TRAP mit anschließender Gelelektrophorese und Autoradiografie den Vorteil, dass keine radioaktiven Reagenzien verwendet werden mussten. Nachteilig an diesem Test war, dass er keinen internen Standard zum Nachweis von Polymerase Inhibitoren enthielt (Wu et al. 2000). Um diese mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurde daher für die Untersuchung der proliferierenden und hoch proliferierenden hMSC der *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* (Fa. Roche) verwendet, der die Detektion von Polymerase Inhibitoren erlaubt. Ein weiterer Vorteil dieses Tests ist, dass er durch die Berechnung der Relativen Telomeraseaktivität (RTA) auch eine semiquantitative Aussage ermöglicht, während mit dem *Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA* in erster Linie nur eine qualitative Aussage zulässig ist (Telomeraseaktivität nachweisbar oder nicht nachweisbar).

Der ELISA ist ein sehr sensitives Verfahren, hat aber im Vergleich zur Gelelektrophorese den Nachteil, dass die TRAP Produkte nicht direkt durch die typische 6 bp Leiter visualisiert werden können. Zudem sind einige Fehlerquellen zu beachten, die zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen können (Meeker and Coffey 1997). Ursachen für falsch negative Ergebnisse sind: inadäquate Behandlung und Lagerung der Probe; Inaktivierung der Telomerase durch Kontamination der Probe mit Nukleasen, welche die RNA Untereinheit der Telomerase zerlegen; Inhibierung der PCR durch Polymerase Inhibitoren im Zellextrakt (Hiyama et al. 1996, Califano et al. 1996) sowie die Heterogenität der Probe, d. h. das Vorliegen eines Gemischs aus Telomerase positiven und negativen Zellen. Mögliche Ursachen für falsch positive Ergebnisse sind: Kontamination der Probe mit Telomerase positivem Material oder amplifizierten TRAP Produkten; ungenaues Arbeiten, z. B. ungenügendes Waschen der Wells zwischen den Detektionsschritten oder zu lange Inkubation mit dem TMB Substrat; und als weitere mögliche Fehlerquelle die PCR Amplifikation von extendierten Primer-Dimeren. Die Extension von Primer-Dimeren kann durch die Verwendung von Primern verhindert werden, die über einen so genannten Anker, bestehend aus ein 6 bp langen nicht telomerischen Sequenz, verfügen (Kim and Wu 1997). Dennoch lassen sich nicht

alle Fehlerquellen ausschalten, so dass die Interpretation der Ergebnisse mit Vorsicht erfolgen muss.

#### 4.1.4 Messung der Telomerlänge

Der *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Fa. Roche) beruht auf einem Standardverfahren zur Messung der Telomerlänge, der Southern Hybridisierung und anschließenden Chemilumineszenz Detektion von *Terminal Restriction Fragments* (TRF). Diese Methode weist einige Beschränkungen bezüglich der Interpretation der Messergebnisse auf. Zum einen wird immer nur die durchschnittliche TRF Länge einer ganzen Zellpopulation gemessen, weshalb Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen einer Probe nicht ermittelt werden können. Durch ein neueres Verfahren, der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) konnte aber nachgewiesen werden, dass sowohl die Telomere in den einzelnen Zellen einer Zellpopulation als auch innerhalb einer Zelle unterschiedlich lang sind (Lansdorp et al. 1996, Londono-Vallejo et al. 2001). Unterschiede zwischen einzelnen Proben allerdings können mit der Southern Hybridisierung ebenso gut beurteilt werden wie mit der FISH-Technik (De Pauw et al. 1997). Weiterhin ist zu beachten, dass sich die *Terminal Restriction Fragments* sowohl aus telomerischer DNA als auch aus subtelomerischer DNA zusammensetzen, deren Länge auf etwa 2.5 - 4 kbp geschätzt wird (de Lange et al. 1995). Daher entspricht die gemessene durchschnittliche TRF Länge nicht der Länge der Telomere *in vivo*. Dennoch werden in den meisten Publikationen die Begriffe TRF-Länge und Telomerlänge synonym verwendet. So auch in der vorliegenden Arbeit.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Telomeraseaktivität und Telomerlänge konfluent kultivierter hMSC

Mehrere Arbeitsgruppen, die das Replikations- und Differenzierungspotential von hMSC untersucht haben, konnten keine Telomeraseaktivität in den Zellen nachweisen. Die Telomere dieser *in vitro* kultivierten hMSC verkürzten sich um etwa 50 - 100 bp pro Zellteilung. Mit etwa  $30 \pm 10$  Zellteilungen besaßen die Zellen zudem nur ein begrenztes Replikationspotential (Zimmermann et al. 2003, Simonsen et al. 2002, Shi et al. 2002). Diesen Ergebnissen steht im Wesentlichen nur eine Veröffentlichung von Pittenger et al. gegenüber, in welcher der Nachweis von Telomeraseaktivität in *in vitro* kultivierten hMSC in der 12. Passage beschrieben wird (Pittenger et al. 1999).

Bei der Untersuchung konfluent kultivierter hMSC sowohl der 5. Passage wie der 14. Passage haben auch wir keine Telomeraseaktivität in den Zellen nachweisen können. Die durchschnittliche TRF-Länge betrug etwa 7.5 kb und nahm von der 5. bis zur 14. Passage um etwa 2 kb ab. Dies entspricht einer Verkürzung der Telomere um  $40 \pm 10$  bp pro Zellteilung (s. Abb. 16, S. 47) und ist mit der unvollständigen Replikation der Chromosomen bei der Zellteilung zu erklären. Indirekt ist es ein Hinweis dafür, dass diese Zellen keine oder höchstens nur eine geringe Telomeraseaktivität unterhalb der Nachweisgrenze besitzen, die nicht ausreicht, die Länge der Telomere aufrecht zu erhalten.

### 4.2.2 Telomeraseaktivität proliferierender hMSC

Das Wissen, dass nicht nur Stammzellen und immortale Zellarten, sondern auch einige somatische, sich selbst regenerierende Gewebe Telomeraseaktivität aufweisen, führte zu der Annahme, dass Telomerase *in vivo* dort aktiviert wird, wo sie für die Proliferation und den Erhalt eines Gewebes erforderlich ist (Belair et al. 1997, Rubin 2002). Hiernach müsste im Vergleich zu konfluent kultivierten, sich nicht mehr teilenden hMSC in proliferierenden hMSC eher Telomeraseaktivität nachweisbar sein. Daher haben wir in einem weiteren Versuchsansatz hMSC der 6. Passage im Stadium der Proliferation auf Telomeraseaktivität getestet. Hierbei konnten wir in

einer von zwei Zellpopulationen an Tag 1 nach Aussaat deutliche Telomeraseaktivität nachweisen (s. Tabelle 4, S. 41). Es handelte sich um die Zellpopulation, die zum Zeitpunkt der Messung eine geringere Dichte aufwies als am Tag der Aussaat (CPDL - 0.19, s. Abb. 10, S. 39). Alle übrigen, länger kultivierten Zellpopulationen wiesen keine Telomeraseaktivität auf. Allerdings geben die Messungen der Telomeraseaktivität in unterschiedlichen Mengen Zellextrakt ( $1 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^2$  Zelläquivalente) Hinweise darauf, dass in ihnen Polymeraseinhibitoren enthalten waren, die zu falsch niedrigen Ergebnissen geführt haben könnten (s. Abb. 11, S. 42). Somit scheint die Proliferation der Zellen einen Einfluss auf die Aktivierung der Telomerase auszuüben. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen sind auch Chiu et al. und Engelhardt et al. gekommen, die einen kurzfristigen Anstieg der Telomeraseaktivität in hämatopoetischen Stammzellen beobachteten, welche unter den Einfluss spezifischer Proliferations- und Differenzierungsfaktoren kultiviert worden waren (Chiu et al. 1996, Engelhardt et al. 1997).

#### 4.2.3 Telomeraseaktivität hoch proliferierender hMSC

Colter et al. haben durch die Kultivierung von hMSC mit einer sehr geringen Dichte eine Subpopulation von hMSC identifizieren können, die als RS (*rapidly self-renewing*) Zellen bezeichnet werden (Colter et al. 2001). Diese unterscheiden sich durch ihre sehr geringe Größe, ihre hohe Replikationsrate und ein größeres Differenzierungspotential von den bereits identifizierten Subpopulationen, i. e. spindelförmige und große flache Zellen (Mets and Verdonk 1981).

Nach hoch verdünnter Kultivierung von hMSC ( $10 - 20$  Zellen/cm<sup>2</sup>) konnten wir Zellen isolieren, die von ihrer Morphologie und ihrem Replikationsverhalten her den RS Zellen entsprachen. Bei der Messung der Telomeraseaktivität in diesen Zellen konnten wir in einer Probe (hMSC der 9. Passage) Telomeraseaktivität nachweisen. Eine weitere untersuchte Probe (hMSC in der 10. Passage) war Telomerase negativ. Der Unterschied zwischen diesen beiden Proben war, dass die Telomerase positiven hMSC der 9. Passage im Gegensatz zu den Zellen der 10. Passage bis zum Zeitpunkt der Messung niemals konfluent als 40 % gewesen waren, wohingegen die Telomerase negativen Zellen mindestens einmal zu mehr als 50 % konfluent gewesen waren. Wenn hMSC *in vitro* mit hoher Dichte kultiviert werden, entwickelt

sich schon nach wenigen Passagen eine homogene Zellpopulation, die im Laufe der Zeit ihr Differenzierungspotential einbüßt (Krebsbach et al. 1997, Bianco et al. 2001). Im Gegensatz dazu weisen frühe Passagen und hMSC, die mit niedriger Dichte kultiviert werden, drei morphologisch unterschiedliche Subpopulationen auf, von denen die RS Zellen über das höchste Replikations- und Differenzierungspotential verfügen. Es wird daher vermutet, dass sie die frühesten Progenitoren in der Gruppe der hMSC darstellen. Werden die hMSC weiter kultiviert, nimmt der Anteil an RS Zellen ab und es treten mehr spindelförmige und große flache Zellen mit einem geringeren Differenzierungspotential auf (Colter et al. 2001).

Diese Ergebnisse könnten erklären, wieso wir Telomeraseaktivität in proliferierenden und hoch proliferierenden hMSC, nicht aber in konfluenten hMSC, welche eine homogene Zellpopulation aus vorwiegend spindelförmigen Zellen bilden, nachweisen konnten: Die Kultivierung der Zellen mit höherer Dichte könnte zu einer Abnahme bzw. zum Verlust Telomerase positiver RS Zellen zugunsten differenzierterer, Telomerase negativer Subpopulationen von hMSC geführt haben. Dies würde auch die Abnahme der Telomere von *in vitro* kultivierten hMSC erklären, die in der Regel bei einer Konfluenz von etwa 90 % passagiert werden und überwiegend spindelförmige Zellen aufweisen. Da mit dem Southern Blot immer nur die durchschnittliche Telomerlänge einer ganzen Zellpopulation gemessen wird, würde der Einfluss einiger weniger Telomerase positiver hMSC unentdeckt bleiben. Auch Zimmermann et al., welche unter Verwendung des gleichen Testverfahrens wie wir keine Telomeraseaktivität in hMSC nachweisen konnten, wollen die Existenz einiger weniger Telomerase positiver Zellen in hMSC Zellpopulationen nicht ausschließen (Zimmermann et al. 2003).

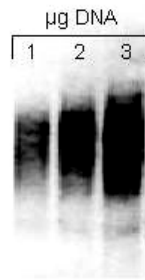
Zu der Frage, ob und in welchem Maße die Telomeraseaktivität der hoch proliferierenden hMSC ausreicht, um ihre Telomere nach der Zellteilung wieder aufzubauen, können wir keine Aussage treffen. Auch können wir nicht sagen, ob sie über ein größeres Differenzierungspotential als die üblicherweise für die osteogene Differenzierung verwendeten hMSC verfügen. Die Ergebnisse von Colter et al. aber, welche ein größeres Differenzierungspotential von RS Zellen nachweisen konnten (Colter et al. 2001) und Versuche mit gentechnisch veränderten Telomerase positiven hMSC (Shi et al. 2002, Simonsen et al. 2002) lassen zumindest vermuten, dass hoch proliferierende, Telomerase positive hMSC auch über ein höheres Differenzierungspotential verfügen.

#### 4.2.4 Telomerlänge osteogen differenzierender hMSC

Es wurden hMSC der 5. Passage über drei Wochen osteogen differenziert und ihre Telomeraseaktivität und Telomerlängen mit der von konfluent kultivierten, nicht stimulierten hMSC der gleichen Passage verglichen. Die unstimulierten hMSC wiesen zu keinem Zeitpunkt Telomeraseaktivität auf. Auch ihre Telomerlänge veränderte sich während der dreiwöchigen Weiterkultivierung im Stadium der Konfluenz nicht (s. Abb. 15, S. 46). Durch den fehlenden Nachweis von Telomeraseaktivität und dem Wissen, dass sich hMSC im Stadium der Konfluenz nicht weiter teilen, lässt sich erklären, dass die Telomere konfluenter hMSC eine konstante Länge beibehalten.

Bei der Auswertung der Telomerlängenmessung der osteogen differenzierenden hMSC war ein breiteres Signal der TRF an Tag 21 im Vergleich zu den unstimulierten hMSC und den über kürzere Zeit stimulierten hMSC auffällig (s. Abb. 15, S. 46). Dieses könnte als eine leichte Zunahme der durchschnittlichen Telomerlänge interpretiert werden. Dagegen spricht allerdings, dass wir nur in einer von zwei Proben an Tag 14 der osteogenen Stimulation Telomeraseaktivität nachweisen konnten. Alle übrigen osteogen differenzierenden Zellpopulationen waren Telomerase negativ. Daher ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem breiteren TRF-Signal um eine tatsächliche Zunahme der durchschnittlichen Telomerlänge handelt. Eine wahrscheinlichere Ursache für dieses Ergebnis ist, dass bei der Messung fälschlicherweise mehr als die vorgesehenen 1 µg DNA eingesetzt wurden. Dies geht aus dem Protokoll des *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Fa. Roche) hervor, in dem dargestellt ist, wie die Sensitivität des Tests mit zunehmender Menge an aufgetragener DNA abnimmt. Eine größere DNA Menge führt zu einer Verbreiterung des Signals, vergleichbar mit unseren eigenen Ergebnissen (vgl. Abb. 28, S. 65 mit Abb. 15, S. 46). Daher kommen wir zu dem Schluss, dass die osteogene Differenzierung der hMSC zu keiner signifikanten Veränderung der Telomerlänge geführt hat.





**Abb. 28:** Breite des TRF-Signals in Abhängigkeit der aufgetragenen DNA Menge  
(Bildquelle: Protokoll des Telo TAGGG Telomere Length Assay)

#### 4.2.5 Telomeraseaktivität osteogen differenzierender hMSC

Keimbahnzellen, embryonale Stammzellen und viele Tumorzellarten weisen Telomeraseaktivität auf, während die meisten somatischen Gewebe einschließlich der Knochen bildenden Osteoblasten keine Telomeraseaktivität besitzen (Kim et al. 1994, Wright et al. 1996, Thomson et al. 1998, Yudoh et al. 2001). Untersuchungen embryonaler Gewebe haben gezeigt, dass die Telomeraseaktivität in diesen Geweben mit zunehmender Differenzierung der Zellen abnimmt (Wright et al. 1996). Auch immortale, Telomerase positive Tumorzellen weisen einen Verlust der Telomeraseaktivität auf, wenn ihre terminale Differenzierung induziert wird (Sharma et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte mit gentechnisch veränderten, Telomerase positiven hMSC nachgewiesen werden, dass diese im Vergleich zu nativen, Telomerase negativen hMSC ein deutlich höheres Differenzierungspotential besitzen (Shi et al. 2002, Simonsen et al. 2002). Gronthos et al. haben zudem festgestellt, dass derart veränderte hMSC höhere Level an Osteoblast-assoziierten Markern wie CBFA 1, Osterix und Osteocalcin aufweisen. Sie vermuten daher, dass die Telomerase die Balance der Zellen zwischen Proliferation und Differenzierung in Richtung eines höheren Differenzierungspotentials beeinflusst (Gronthos et al. 2003). Wir konnten in den osteogen differenzierenden Zellen im Gegensatz zu den unstimulierten hMSC in einer von zwei Proben an Tag 14 Telomeraseaktivität nachweisen (s. Abb. 14, S. 45). Daraus ließe sich vermuten, dass die Differenzierung zu einer Aktivierung der Telomerase geführt haben könnte. Diese Schlussfolgerung ist jedoch nicht zulässig, da die Telomeraseaktivität in dieser Zellpopulation nur zu

einem einzigen Zeitpunkt gemessen wurde. Wir wissen nicht, ob diese Zellen nicht schon vor ihrer Differenzierung Telomeraseaktivität besaßen. Der fehlende Nachweis von Telomeraseaktivität in den übrigen osteogen differenzierten Zellpopulationen spricht ebenfalls dagegen. Allerdings kann solch eine Aktivierung auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Denn in hämatopoetischen Stammzellen z. B. konnte ein kurzfristiger Anstieg der Telomeraseaktivität unter dem Einfluss von Proliferations- und Differenzierungsfaktoren beobachtet werden (Chiu et al. 1996, Engelhardt et al. 1997). Dennoch finden sich in der Literatur bisher keine Hinweise darauf, dass die osteogene Stimulation von hMSC zu einer Aktivierung der Telomeraseaktivität führt. Nur der umgekehrte Fall, nämlich dass durch die Aktivierung der Telomerase das Differenzierungspotential von hMSC gesteigert wird, konnte bisher belegt werden (Shi et al. 2002, Simonsen et al. 2002).

## 4.3 Diskussion neuerer Publikationen

### 4.3.1 Neoplastische Transformation mesenchymaler Stammzellen

Nach Transduktion von hMSC mit dem Gen für hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase), der enzymatischen Untereinheit, welche die Aktivität der Telomerase beeinflusst, konnte ein deutlich höheres Proliferations- und osteogenes Differenzierungspotential dieser Zellen im Vergleich zu nativen hMSC *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Eine Tumorbildung war auch nach zwei bis sechs Monaten nach subkutaner Injektion der Zellen in immundefiziente Mäuse nicht nachweisbar (Shi et al. 2002, Simonsen et al. 2002). Da für das Tissue Engineering eine längere *ex vivo* Expansion von hMSC zur Gewinnung ausreichender Zellzahlen erforderlich ist, welcher das limitierte Proliferations- und Differenzierungspotential derart kultivierter Zellen gegenüber stehen, schien die Verwendung von transduzierten hMSC eine elegante Lösung für dieses Problem zu sein.

Es gibt aber neuere Studien, in denen die neoplastische Transformation von hTERT-transduzierten hMSC nach Langzeitkultivierung (> 200 PD) *in vitro* sowie deren Tumorbildung *in vivo* nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse nachgewiesen werden konnte (Serakinci et al. 2004, Burns et al. 2005).

Darüber hinaus beschreiben Rubio et al. die spontane neoplastische Transformation von hMSC, welche aus Fettgewebe isoliert und nach sechs- bis achtwöchiger *ex vivo* Expansion für vier bis fünf Monate *in vitro* kultiviert worden waren. Derart transformierte Zellen wiesen u. a. chromosomale (Trisomie, Tetraploidie und/oder Chromosomen-Rearrangement) und morphologische (von spindelförmigen zu kleinen, kompakten Zellen) Veränderungen auf. Nach ihrem Verlust der Kontaktinhibition und durch ihre Fähigkeit zum Wachstum in semisolidem Agar, beides Eigenschaften, welche für Tumorzellen charakteristisch sind (Milyavsky et al. 2003), wurden sie als TMCs bezeichnet. Diese wiesen im Gegensatz zu den Kontrollzellen eine deutliche Telomeraseaktivität auf. Nach i. v. Infusion der TMCs in immundefiziente Mäuse konnte nach vier bis sechs Wochen in nahezu allen Organen eine Tumorbildung nachgewiesen werden (Rubio et al. 2005).

Auch Wang et al. haben eine Subpopulation von hMSC, welche aus Knochenmark isoliert worden waren, identifizieren können, welche sich morphologisch und phenotypisch von den übrigen hMSC unterschied. Zudem wiesen sie, ähnlich denen

von Rubio et al. beschriebenen Zellen, chromosomale Veränderungen sowie eine hohe Telomeraseaktivität auf und bildeten Tumore in immundefizienten Mäusen. Wang et al. haben über den Ursprung dieser Zellen zwei Theorien: 1) sie stellen eine Subpopulation von hMSC dar, welche während der *in vitro* Kultivierung transformierten oder 2) diese Zellen waren bereits im Knochenmark des Spenders in geringer Zahl präexistent und wurden durch die *in vitro* Kultivierung vermehrt (Wang et al. 2005).

### 4.3.2 Hypothese von der Tumorstammzelle

Aufgrund ihrer Ähnlichkeiten, wie zum Beispiel der Fähigkeit zur Selbstreplikation, hat sich das Konzept von der Tumorstammzelle („*cancer stem cell*“) entwickelt, welches besagt, dass Stammzellen den Ursprung für die Entwicklung von Tumorzellen bilden (Reya et al. 2001, Marx et al. 2003).

Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl bei den hämatologischen Erkrankungen als auch bei den soliden Tumoren die jeweiligen Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen (Passegue et al. 2003, Keith 2004). So konnten zum Beispiel aus Biopsien von Brust- und Gehirntumoren Subpopulationen isoliert werden, welche die Eigenschaften von Stammzellen besitzen (Al-Hajj et al. 2003, Hemmati et al. 2003, Singh et al. 2003). Wang et al. haben fetale neuronale Progenitorzellen mit dem Gen für hTERT transduziert und eine neoplastische Transformation der Zellen mit dem Verlust des normalen diploiden Karyotyps und der Kontaktinhibition sowie die neu gewonnene Fähigkeit zur Bildung von Neuroblastom-ähnlichen Tumoren in Mäusen beobachtet (Wang et al. 2004).

Auch in Osteosarkomen konnte eine kleine Subpopulation sich selbst erneuernder Osteosarkomzellen nachgewiesen werden, welche neben Markergenen embryonaler Stammzellen auch mehrere Oberflächenantigene mesenchymaler Stammzellen aufwiesen (Gibbs et al. 2005).

Miura et al. konnten die spontane maligne Transformation und Tumorgenese von aus Knochenmark isolierten murinen mesenchymalen Stammzellen nachweisen. Nach längerer *ex vivo* Expansion transformierten diese Zellen spontan zu immortalen Zellen, welche *in vivo* Fibrosarkome bildeten. Die Transformation der Zellen war mit einer Akkumulation von Chromosomenabnormalitäten, dem Anstieg der

Telomeraseaktivität und einer erhöhten Expression von c-myc, einem Onkogen, verbunden. Innerhalb dieser Tumoren konnten Tumorprogenitorzellen nachgewiesen werden, welche *in vitro* Zellhaufen und nach erneuter i. v. Infusion Fibrosarkome *in vivo* bildeten (Miura et al. 2006).

#### **4.3.3 Bedeutung für die eigenen Ergebnisse**

Diese und andere Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass auch mesenchymale Tumoren aus transformierten Stammzellen hervorgehen. Welche Ereignisse genau zur neoplastischen Transformation der Zellen führen, ist noch nicht vollständig geklärt. Zumindest scheint aber auch die Aktivierung der Telomerase eine wesentliche Rolle bei der Immortalisierung der Zellen zu spielen.

Daher muss zunächst untersucht werden, ob die von uns nachgewiesenen Telomerase positiven hMSC (RS Zellen) neben einem höheren Replikations- und Differenzierungspotential nicht auch über ein größeres Transformationspotential verfügen, bevor sie für das Tissue Engineering von Knochen eingesetzt werden können.

## 5. Zusammenfassung

Für das Tissue Engineering von Knochen aus humanen mesenchymalen Stammzellen ist eine längere *ex vivo* Expansion der Zellen erforderlich, da der Anteil der hMSC im Knochenmark mit einer pro  $10^5$  bis  $10^6$  mononukleärer Zellen sehr gering ist. Während der erforderlichen *in vitro* Kultivierung bilden die hMSC homogene Zellpopulationen aus überwiegend spindelförmigen Zellen, welche nur ein begrenztes Replikationspotential und mit zunehmender Kulturdauer einen Verlust ihres Differenzierungspotentials aufweisen. Die begrenzte Zellteilungsrate wird darauf zurückgeführt, dass die Zellen keine Telomeraseaktivität aufweisen und der Verlust von telomerischer DNA mit jeder Zellteilung schließlich zum dauerhaften Zellzyklusarrest führt. Bei einem Vergleich von unterschiedlich hoch passagierten hMSC konnten wir eine derartige Verkürzung der Telomere von  $40 \pm 10$  Basenpaaren pro Zellteilung nachweisen.

Durch Kultivierung von hMSC mit einer sehr geringen Dichte hat man herausgefunden, dass diese nicht aus einer homogenen Zellpopulation, sondern aus mindestens drei verschiedenen Subpopulationen bestehen. Von diesen weisen die kleinen runden, sog. RS (*rapidly self-renewing*) Zellen im Vergleich zu den spindelförmigen und großen flachen Zellen das größte Replikations- und Differenzierungspotential auf. Es wird daher vermutet, dass sie die frühesten Vorläuferzellen der mesenchymalen Zellreihe darstellen. Durch hoch verdünnte Kultivierung konnten wir hoch proliferierende hMSC isolieren, welche morphologisch den RS Zellen entsprachen. Diese Zellen waren im Gegensatz zu den konfluent kultivierten, vorwiegend spindelförmigen hMSC in einer von zwei untersuchten Proben Telomerase positiv. Proliferierende hMSC wiesen ebenfalls Telomeraseaktivität auf, wobei Polymerase Inhibitoren die Ergebnisse der Messungen falsch negativ beeinflusst haben könnten. Somit scheint die Kultivierung insofern einen Einfluss auf die Telomeraseaktivität von hMSC zu haben, als dass mit zunehmender Dichte der Zellen der Anteil an Telomerase positiven RS Zellen zugunsten der anderen Subpopulationen verloren geht.

Das osteogene Differenzierungspotential der hMSC scheint ebenfalls von der Telomeraseaktivität der Zellen abhängig sein, da sowohl RS Zellen als auch gentechnisch veränderte, Telomerase positive hMSC über ein größeres Differenzierungspotential verfügen. Wir haben konfluente hMSC osteogen

differenziert und die Telomeraseaktivität und Telomerlänge mit der von unstimulierten hMSC verglichen. Hierbei war in einer Probe der osteogen stimulierten hMSC Telomeraseaktivität nachweisbar. Dass allerdings die osteogene Stimulation zu einer Aktivierung der Telomerase geführt hat, kann lediglich vermutet werden. Veränderungen der Telomerlänge durch die osteogene Differenzierung waren nicht nachweisbar. Die unstimulierten hMSC wiesen keine Telomeraseaktivität auf und ihre Telomerlänge veränderte sich während der dreiwöchigen Kultivierung nicht.

Inwieweit hoch proliferierende Telomerase positive hMSC über ein größeres Differenzierungspotential als konfluent kultivierte hMSC verfügen, kann mit den durchgeführten Versuchen nicht beantwortet werden, aber andere Arbeitsgruppen konnten ein größeres Differenzierungspotential zum einen von RS Zellen, zum anderen von gentechnisch veränderten, Telomerase positiven hMSC nachweisen. Daher kann zumindest vermutet werden, dass die von uns gefundenen Telomerase positiven hMSC neben einem höheren Replikations- auch über ein größeres Differenzierungspotential verfügen. Um dies zu verifizieren, müssen weitere Zellkulturversuche unternommen werden. Parallel dazu sollte das Transformationspotential der Zellen untersucht werden. Die Identifizierung der einzelnen Prozesse, welche zur neoplastischen Transformation führen, ist hierbei zwingend erforderlich.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3983-3988
2. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND (1989): Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* 17:4611-4627
3. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB et al. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10114-10118
4. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB (1995): Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220:194-200
5. Ancelin K, Brunori M, Bauwens S, Koering CE, Brun C, Ricoul M et al. (2002): Targeting assay to study cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol Cell Biol* 22:3474-3487
6. Arrigoni O, De Tullio MC (2002): Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* 1569:1-9
7. Aubin JE (1998): Bone Stem Cells. *J Cell Biochem Suppl* 30/31:73-82
8. Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW (1996): Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* 56:645-650



9. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda C, Quarto R (2002): Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 8:901-910
10. Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, Reznikoff CA (1997): Telomerase activity: A biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13677-13682
11. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME (1986): Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38:143-154
12. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1992): Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* 17:15-29
13. Bestilny LJ, Brown CB, Miura Y, Robertson LD, Riabowol KT (1996): Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res* 56:3796-3802
14. Bianco P, Robey PG (2000): Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105:1663-1668
15. Bianco P, Robey PG (2001): Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414:118-121
16. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001): Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192
17. Blackburn EH (2000): Telomere states and cells fates. *Nature* 408:53-56
18. Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P, Rygaard J, Schroder HD, Kassem M (2005): Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term

- cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 65:3126-3135
19. Califano J, Ahrendt SA, Meisinger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D (1996): Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 56:5720-5722
  20. Cancedda R, Dozin B, Gianonni P, Quarto R (2003): Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 22:81-91
  21. Caplan AI (1991): Mesenchymal stem cells; *J Orthop Res* 9:641-650
  22. Castro-Malaspina H, Ebell W, Wang S (1984): Human bone marrow fibroblast colony-forming units (CFU-F). *Prog Clin Biol Res* 154:209-236
  23. Cheng S-L, Yang JW, Rifas L, Zhang S-F, Avioli LV (1994): Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134:277-285
  24. Chiu C-P, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE et al. (1996): Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* 14:239-248
  25. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001): Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Cell Biol* 98:7841-7845
  26. Conget PA, Minguell JJ (1999): Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181:67-73
  27. de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE (1990): Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10: 518-527

28. de Lange T (1995): Telomere dynamics and genome instability in human cancers. In *Telomeres*, pp. 265-293, Cold Spring Harbour Laboratory, New York
29. de Lange T (2002): Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532-540
30. De Pauw ESD, Verwoerd NP, Duinkerken N, Willemze R, Raap AK, Fibbe WE, Tanke HJ (1998): Assessment of telomere length in hematopoietic interphase cells using in situ hybridization and digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 32:163-169
31. Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MAS (1997): Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 90:182-193
32. Feng J, Funk WD, Wang S-S, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu C-P et al. (1995): The RNA component of human telomerase. *Science* 269:1236-1241
33. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA (2005): Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7:967-976
34. Goldstein S (1990): Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249:1129-1133
35. Goytisolo FA, Blasco MA (2002): Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene* 21:584-591
36. Greider CW, Blackburn EH (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405-413

37. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999): Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514
38. Gronthos S, Simmons PJ (1996): The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother* 5:15-23
39. Gronthos S, Chen S, Wang C-Y, Robey PG, Shi S (2003): Telomerase accelerates osteogenesis fo bone marrow stromal cells by upregulation of CBFA1, osterix and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 18:716-722
40. Härle-Bachor C, Boukamp P (1996): Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6476-6481
41. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460
42. Harley CB (1991): Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256:271-282
43. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868
44. Hayflick L, Moorhead PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
45. Hayflick L (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-636
46. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992): Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88

47. Hemmati HD, Nakono I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003): Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15178-15183
48. Henderson ER, Blackburn EH (1989): An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* 9:345-348
49. Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N, Kodama T, Shay JW, Yokoyama T (1996): Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 9:453-458
50. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek AM et al. (1995): Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155:3711-3715
51. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997): Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295-312
52. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49
53. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998): In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272
54. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O (1999): Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta Orthop Scand* 70:365-373
55. Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T (2002): Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295:2446-2449

56. Keith WN (2004): From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia. *Oncogene* 23:5092-5094
57. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK et al. (1997): Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6:2011-2019
58. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM et al. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cell lines and cancer. *Science* 266:2011-2015
59. Kim NW, Wu F (1997): Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol. *Nucleic Acids Res* 25:2595-2597
60. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG (1997): Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 63:1059-1069
61. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little M-T, Dirks RW et al. (1996): Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5:685-691
62. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992): Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225:951-960
63. Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ (1991): In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 256:45-48
64. Londono-Vallejo JA, DerSarkissian H, Cazes L, Thomas G (2001): Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res* 29:3164-3171

65. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998): Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176:57-66
66. Maniatis T et al. (1982): In *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York
67. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH (1988): Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254:317-330
68. Martens UM (2001): Telomeres and Telomerase. *Biomedical Progress* 14:37-41
69. Marx J (2003): Cancer research: Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 301:1308-1310
70. Meeker AK, Coffey DS (1997): Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry (Mosc.)* 62:1323-1331
71. Meselson M, Stahl FW (1958): The replication of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 23:9-12
72. Mets T, Verdonk G (1981): In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 16:81-89
73. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD et al. (1997) : hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-795
74. Meyne J, Ratcliff RL, Moyzis RK (1989): Conservation of the human sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7049-7053

75. Milyavsky M, Shats I, Erez N, Tang X, Senderovich S, Meerson A, Tabach Y, Goldfinger N, Ginsberg D, Harris CC, Rotter V (2003): Prolonged culture of telomerase-immortalized fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 63:7147-7157
76. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S (2006): Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24:1095-1103
77. Morin GB (1989): The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529
78. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD et al. (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6622- 6626
79. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB; Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J et al. (1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955-959
80. Olovnikov AM (1971): Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201:1496-1499
81. Olovnikov AM (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41:181-190
82. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11842-11849



83. Pereira RC, Delany AM, Canalis E (2002): Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone* 30:685-691
84. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147
85. Pryde FE, Gorham HC, Louis EJ (1997): Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* 7:822-828
86. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111
87. Risbud M (2001): Tissue engineering: implications in the treatment of organ and tissue defects. *Biogerontology* 2:117-125
88. Rubin H (2002): The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotech* 20:675-681
89. Rubio D, Garcia-Gastro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005): Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65:3035-3039
90. Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, Stark GB (2000): Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung. *Chirurg* 71:1001-1008
91. Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W, Milz S (2004). The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J Anat* 204:133-139
92. Seibel MJ (2000): Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int Suppl* 6:18-29

93. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui J-G, Prockop DJ (2004): Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* 19:256-264
94. Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, Abdallah B, Schroder H, Jensen TG, Kassem M (2004): Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23:5095-5098
95. Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA et al. (1995): Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12343-12346
96. Shay JW, Wright WE (1996): Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 8:66-71
97. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, Wang C (2002): Bone formation by human postnatal bone marrow stromal cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 20:587-591
98. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SIS et al. (2002): Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20:592-596
99. Smith JR, Pereira-Smith OM (1996): Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273:63-67
100. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821-5828
101. Thompson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cells derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147

102. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB (1993): Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52:661-667
103. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1994): Evidence for an mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9857-9860
104. Vaziri H, Benchimol S (1998): Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of the telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8:279-282
105. Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995): Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerv* 18:1417-1426
106. Wang QR, Wolf NS (1990): Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution. *Exp Hematol* 18: 355-359
107. Wang Y, Bai Y, Li X, Hu Q, Lin C, Xiao Z, Liu Y, Xu J, Shen L, Li L (2004): Fetal human neuronal progenitors can be the target for tumor transformation. *Neuroreport* 15:1907-1912
108. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK (2005): Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7:509-519
109. Watson JD (1972): Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239:197-201
110. Weissman IL (2000): Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157-168

111. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Bryd W, Shay JW (1996): Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18:173-179
112. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW (1997): Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11:2801-2809
113. Wu Y-Y, Hruszkewycz AM, Delgado RM, Yang A, Vortmeyer AO, Moon Y-W et al. (2000): Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. *Clin Chim Acta* 293:199-212
114. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998): Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *J Orthop Res* 16:406-413
115. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T(2001): Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shortening and replicative senescence in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16:1453-1464
116. Zakian VA (1995): Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270:1601-1607
117. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM (2003): Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17:1146-1149

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CPDL	<i>Cumulative Population Doubling Level</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DIG	Digoxigenin
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>
G	Guanin
hMSC	<i>human mesenchymal Stem Cell</i>
HSC	<i>Hematopoetic Stem Cell</i>
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
hTR	humane Telomerase RNA
kbp	Kilobasenpaare
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSCGM	<i>Mesenchymal Stem Cell Growth Medium</i>
MTP	Mikrotiterplatte
OS	<i>Osteogenic Supplements</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PD	<i>Population Doubling</i>
POD	Peroxidase
RNA	<i>Ribonucleid Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RTA	Relative Telomeraseaktivität
T	Thymidin
T 25	25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche
T 75	75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRAP	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
TRF	<i>Terminal Restriction Fragment</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben.

Zunächst einmal gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler für die Überlassung des Themas und für seine aufmunternden Worte (Stichwort: SPD Mäuse).

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. Matthias Schieker danken, der mich als mein Betreuer und Leiter der *Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen* bis zur letzten Minute unterstützt hat.

Eben solcher Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Hülya Gülkan, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Frau Claudia Geißler möchte ich mich für die praktische Unterweisung und wertvollen Tipps bedanken, die sie mir für die Arbeiten im Labor gegeben hat.

Herrn Dr. rer. nat. Peter Neth danke ich für die Unterstützung bei der Beantwortung technischer und wissenschaftlicher Fragen.

Nicht zu vergessen Herrn Dr. med. Michael Stengele und alle anderen Kollegen und Mitarbeiter im Labor für ihre Hilfsbereitschaft und Kameradschaft.

Meinen Eltern danke ich für alles was ich bin und was ich ohne sie nie geschafft hätte.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Britta Austrup
Wohnort	48683 Ahaus, Hindenburgallee 15
Geburtsdatum	05.09.1977
Geburtsort	Gronau
Familienstand	ledig

### Schulbildung

06/1996	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Clemens-Brentano Gymnasium in Dülmen
---------	---

### Hochschulbildung

05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Studiums der Humanmedizin am 12.05.2004
04/2003 – 03/2004	Praktisches Jahr
Orthopädie	Orthopädische Klinik und Poliklinik – Klinikum Großhadern Klinikum der Universität München
Chirurgie	Städtisches Krankenhaus München – Neuperlach Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität München
Innere Medizin	Medizinische Klinik – Innenstadt Klinikum der Universität München

- 09/2002                      Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 08/1999 – 10/2001        Famulaturen in den Bereichen Chirurgie, Gynäkologie  
und Allgemeinmedizin
- 03/2000                      Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 03/1999                      Ärztliche Vorprüfung
- 11/1996 – 05/2004        Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

### **Dissertation**

- 10/2000 – 10/2004        „*Nachweis von Telomeraseaktivität und Telomerlängen in  
humanen mesenchymalen Stammzellen*“  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler  
Experimentelle Arbeit in der *Arbeitsgruppe Tissue  
Engineering Knochen* ([www.agtek.de](http://www.agtek.de)) an der  
Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt  
Klinikum der Universität München

### **Ärztliche Tätigkeiten**

- seit 12/2004                Assistenzärztin auf dem Gebiet der Allgemein Chirurgie im  
Marienkrankenhaus Ahaus
- 10/2004                      Erteilung der Ärztlichen Approbation durch die Regierung  
von Oberbayern am 01.10.2004