

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR CHIRURGIE  
ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE  
LEITER: PROF. DR. M. NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ZELLULÄRE SENESZENZ MESENCHYMALER STAMMZELLEN UNTER  
OXIDATIVEM STRESSEINFLUSS

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Matthias Meyer

2011



AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR CHIRURGIE  
ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE  
LEITER: PROF. DR. M. NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ZELLULÄRE SENESZENZ MESENCHYMALER STAMMZELLEN UNTER  
OXIDATIVEM STRESSEINFLUSS

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Matthias Meyer

2011

Dekan:	Prof. Dr. med. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter Angele
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang Zink
Tag der mündlichen Prüfung:	09.08.2011

Meinen Großeltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Knorpeldefekte – Therapiemöglichkeiten .....	2
1.2. Replikative Seneszenz – Telomerhypothese der Zellalterung .....	4
1.3. Oxidativer Stress – der Ursprung allen Übels? .....	8
1.4. MSCs – neue Hoffnung im Tissue Engineering? .....	11
<b>2. Fragestellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1. Material .....	15
3.1.1. Geräte und Hilfsmittel .....	15
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien .....	17
3.1.3. Medien, Puffer und Lösungen .....	19
3.2. Biologisches Untersuchungsmaterial .....	23
3.3. Methoden .....	23
3.3.1. Zellbiologische Methoden .....	23
3.3.2. Bestimmung der letalen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Dosis .....	25
3.3.3. Seneszenznachweis mittels X-Gal-Färbung .....	25
3.3.4. Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Assay) .....	26
3.3.5. Analyse der Genexpression .....	35
3.3.6. Statistik .....	39
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1. Etablieren und Optimieren des TRF-Assay .....	40
4.1.1. Etablieren und Optimieren der DNA-Isolierungsmethode .....	40
4.1.2. Optimieren von Hybridisierung und Detektion .....	41
4.2. Viabilitätsbestimmung nach ansteigenden H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Dosen .....	42
4.3. Analyse der Zellproliferation .....	43
4.3.1. Analyse der Zellproliferation mesenchymaler Stammzellen .....	43
4.3.2. Analyse der Zellproliferation nach akutem Stress .....	45
4.3.3. Analyse der Zellproliferation unter chronischem Stress .....	46

4.4. Analyse der Zellmorphologie.....	47
4.5. Analyse der SA $\beta$ -Galactosidase Expression .....	49
4.6. Analyse der Telomerlänge .....	50
4.6.1. Telomerlänge zunehmend seneszenten mesenchymaler Stammzellen .....	50
4.6.2. Einfluss von akutem Stress auf die Telomerlänge junger und seneszenten MSCs .....	51
4.6.3. Einfluss von chronischem Stress auf die Telomerlänge zunehmend seneszenten MSCs .....	52
4.7. Analyse der Genexpression.....	54
4.7.1. Expression von TRF1 und TRF2.....	54
4.7.2. Expression von p21 .....	56
4.7.3. Expression von SIRT1 .....	57
4.7.4. Expression von XRCC5 .....	58
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>59</b>
5.1. Analyse der Zellproliferation .....	59
5.2. Analyse der Zellmorphologie.....	61
5.3. Analyse der $\beta$ -Galactosidase-Expression.....	62
5.4. Analyse der Telomerlänge .....	64
5.5. Analyse der Genexpression.....	67
5.6. Perspektiven .....	72
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>76</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>92</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	92
8.2. Danksagung .....	95
8.4. Erklärung zur Dissertation .....	96

## 1. Einleitung

Nach mehr als 250 Jahren intensiver Forschung gilt Hunters Erkenntnis von der schlechten Heilungstendenz des Gelenkknorpels noch immer<sup>1</sup>. Dabei gewinnen die degenerativen Gelenkerkrankungen besonders vor dem Hintergrund des demographischen Wandels zunehmend an Bedeutung. Laut dem statistischen Bundesamt leiden gegenwärtig ca. 18 Prozent der deutschen Bevölkerung an Arthrose. In Anbetracht der individuell teils erheblich eingeschränkten Lebensqualität<sup>2</sup> entstehen damit jährliche Gesundheitskosten von mehr als 7 Milliarden Euro (statistisches Bundesamt), ungeachtet der enormen sozioökonomischen Belastung unter anderem verursacht durch Krankheitstage und Verdienstausschlag<sup>3</sup>. Die wohl bedeutendsten Risikofaktoren für die Entwicklung degenerativer Gelenkerkrankungen sind hohes Alter und Übergewicht<sup>4</sup>. Folglich scheint ein weiterer Anstieg der sozioökonomischen Belastung durch Knorpelschäden um mehr als 25% im Zuge des demographischen Wandels bis 2020 durchaus realistisch<sup>5</sup>.

Entscheidend für die Stabilität des Gelenkknorpels ist die biosynthetische Aktivität der Chondrozyten, die der natürlichen Degradierung von Makromolekülen der extrazellulären Matrix entgegenwirken. Mit zunehmendem Alter kann eine adäquate Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix nicht mehr gewährleistet werden, was einerseits wohl den intrinsischen Alterungsprozess der Zellen widerspiegelt, andererseits auch mit dem Untergang von Chondrozyten, verursacht durch mechanischen und chemischen Stress im Gelenkknorpel, in Verbindung gebracht wird<sup>6</sup>.

Die therapeutischen Möglichkeiten bei Knorpeldefekten liefern bis dato keineswegs zufrieden stellende Ergebnisse<sup>7</sup>. Ein tief greifendes Verständnis dieser pathophysiologischen Vorgänge scheint essentiell für die Entwicklung neuer Therapieansätze und könnte damit ein wichtiger Baustein in der Bewältigung der volkswirtschaftlichen Herausforderung degenerativer Gelenkerkrankungen sein.



## 1.1. Knorpeldefekte – Therapiemöglichkeiten

In den vergangenen Jahrzehnten wurden vielfältige Behandlungsmöglichkeiten osteochondraler Defekte entwickelt.

So kann die arthroskopische Entfernung beschädigten Knorpelgewebes (Debridement) oftmals kombiniert mit einer Spülung des Gelenks (Lavage) eine vorübergehende Besserung der Gelenkschmerzen hervorrufen<sup>8-10</sup>. Untersuchungen zeigen, dass dies wohl vor allem auf eine Art postoperativen Placebo-Effekt zurückzuführen ist<sup>11</sup>.

Verfahren wie die Pridie Bohrung<sup>12</sup>, die Abrasionsarthroplastik<sup>13</sup> oder die Microfracture Technik<sup>14</sup> versuchen durch Penetration des subchondralen Knochens die Bildung eines Blutgerinnsels im Defekt zu induzieren und damit die Chondrogenese zu stimulieren. Abhängig von Alter und Aktivität des Patienten zeigte sich allerdings nach mehreren Monaten überwiegend degenerativ veränderter Faserknorpel im ehemaligen Knorpeldefekt<sup>13, 15-16</sup>.

Im Rahmen klinischer Studien wurde die autologe Transplantation von Perichondrium oder Periost zur Therapie von Knorpeldefekten eingesetzt. Dabei soll das chondrogene Potential der in beiden Geweben vorhandenen stammzellreichen Kambiumschicht genutzt werden. Auch wenn regelmäßig eine Bildung hyalinen Knorpels erreicht werden konnte, weisen die klinischen Ergebnisse eine breite Streuung auf<sup>17-19</sup>.

Die autologe osteochondrale Transplantation stellte eine weitere Methode zur Reparatur von Knorpeldefekten dar. Bei der Mosaikplastik nach Hangody wird der Defekt mit mehreren aus Minderbelastungszonen des Gelenks gewonnenen Knorpel-Knochenzylindern aufgefüllt<sup>20</sup>. Insbesondere in der Therapie kleiner und mittelgroßer Defekte liefert die Mosaikplastik klinisch und histologisch langfristig gute bis exzellente Ergebnisse, wobei im operierten Defekt hyalinartiger Knorpel und an der Entnahmestelle Faserknorpel nachgewiesen wurden<sup>21-22</sup>. Limitiert ist der osteochondrale Transfer einerseits durch die begrenzte Menge an gewinnbarem Transplantat, andererseits durch die fragliche Morbidität an den Entnahmestellen. So sind Studien zufolge auch so genannte Minderbelastungszonen teils erheblicher mechanischer Belastung ausgesetzt<sup>23</sup>.

Ein relativ neuer und viel versprechender Ansatz in der Therapie lokaler Knorpeldefekte ist die autologe Knorpelzelltransplantation<sup>24-25</sup>. Hierfür wird eine geringe Menge gesunden Knorpels aus einer Minderbelastungszone des

verletzten Gelenks entnommen, die Knorpelzellen enzymatisch aus der Matrix gelöst und *in vitro* vermehrt. In einem zweizeitigen Eingriff wird der Knorpeldefekt debridiert und mit einem von der medialen Tibiaseite entnommenen Periostlappen übernaht. In die neu geformte Defekthöhle werden schließlich die ausreichend amplifizierte Knorpelzellen implantiert. Nach Verlaufskontrollen von bis zu neun Jahren zeigten 80-90% dieser Transplantationen gute bis exzellente Ergebnisse<sup>25-26</sup>.

Bisher lediglich experimentell werden neben Chondrozyten auch Zellen mit chondrogenem Differenzierungspotential eingesetzt. So können beispielsweise aus dem Knochenmark gewonnene mesenchymale Progenitorzellen (MSCs) unter bestimmten Kulturbedingungen und Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 zu funktionellen Knorpelzellen differenzieren<sup>27</sup>.

Um die Viabilität der implantierten Zellen zu unterstützen, werden verschiedene Trägermatrizes, auch Scaffolds (engl. Gerüst) genannt, erprobt. Matrizes dienen dabei nicht nur der mechanischen und strukturellen Unterstützung des Implantats, sondern können auch als Träger von Wachstumsfaktoren fungieren oder selbst Faktoren enthalten, die eine Beschleunigung der Knorpelreparatur herbeiführen können. Letztlich stellen also Matrix, Zellen und Wachstumsfaktoren die drei Säulen des Tissue Engineerings dar.

Multiple Therapieansätze lokaler Knorpeldefekte, sowie zukünftige Behandlungsmöglichkeiten degenerativer Gelenkerkrankungen im Rahmen des Tissue Engineering beinhalten folglich alle eine erhebliche Vermehrung autologer Zellen *in vitro*<sup>28-29</sup>. Die meisten eukaryotischen Zellen besitzen jedoch nur ein begrenztes Teilungspotential und stellen nach einer bestimmten Anzahl vollzogener Zellteilungen ihr Wachstum ein. Dieses Phänomen wird als zelluläre oder auch replikative Seneszenz bezeichnet.

## 1.2. Replikative Seneszenz –

### Telomerhypothese der Zellalterung

Leonard Hayflick prägte bereits im Jahr 1961 den Begriff der Zellalterung unter dem Synonym der replikativen Seneszenz. In seinem in vitro Experiment stellte er fest, dass humane diploide Fibroblasten (HDFs) nach einer durchschnittlichen Anzahl von etwa 50 Zellverdopplungen (cumulative population doublings, CPDs) die Replikation unwiderruflich einstellen und in ein Stadium eintreten, indem sie zwar metabolisch aktiv bleiben, sich jedoch bezüglich Morphologie sowie multipler biochemischer und physiologischer Parameter von jungen, sich teilenden Zellen unterscheiden. Diese Beobachtungen wurden in diversen Experimenten mit Zellen verschiedenster Herkunft bestätigt. Im Vergleich zu ihren jungen Artgenossen weisen seneszente Zellen ein erhöhtes Volumen sowie eine größere Zelloberfläche auf<sup>30</sup>, akkumulieren Lipofuszin<sup>31</sup>, verfügen über kürzere Telomere<sup>32-33</sup>, zeigen eine veränderte Enzymaktivität<sup>34-35</sup> und unterscheiden sich in der Expression bestimmter Gene<sup>36-37</sup>. Doch welche Mechanismen führen zu diesen teils drastischen Veränderungen? Eine mögliche Antwort auf diese Frage liefert die Telomerbiologie.

Der Begriff Telomer (telos griech. Endteil) wurde bereits 1938 durch Muller geprägt, erst Mitte der 70er Jahre gelang es Blackburn am Beispiel des Wimperntierchens erstmals Telomer-DNA zu entschlüsseln<sup>38</sup>. Telomere sind nicht kodierende DNA-Protein-Komplexe an den Enden linearer Chromosomen eukaryotischer Lebewesen. Beim Menschen bestehen diese aus zahlreichen Abfolgen der Hexanukleotid-Sequenz TTAGGG sowie multipler telomer-assoziiierter Proteine und enden mit einem Überhang des 3'-Einzelstrangs<sup>39-40</sup>. Mit Hilfe der telomerspezifischen Proteine TRF1 und TRF2 (telomeric-repeat binding factor 1 und 2) kann sich dieser 3'-Überhang zurückfalten und in den Doppelstrang inserieren. TRF1 ermöglicht dabei das Zurückschlagen des DNA Doppelstranges<sup>41</sup>, während TRF2 die Insertion des 3'-Überhangs in den Doppelstrang vermittelt<sup>42</sup>. Es entsteht die typische Telomerstruktur, die so genannte t-loop, welche den 3'-Überhang vor Erkennung durch Exonukleasen schützt, den Zugang für das Telomer verlängernde Enzym Telomerase reguliert und mit Hilfe der TRF2-Untereinheit die End-zu-End Fusion der Chromosomen untereinander verhindert. Damit sind die telomerspezifischen

Proteine TRF1 und TRF2 verantwortlich für die Aufrechterhaltung der t-loop, fungieren als negative Regulatoren der Telomerlänge und schützen vor Apoptose. Weiterhin schützt TRF2 im Speziellen kritisch verkürzte Telomere und blockt durch „Verdecken“ beschädigter DNA-Abschnitte Zellreaktionen auf DNA-Schäden<sup>43</sup>.

Neben TRF1 und TRF2 scheinen eine ganze Reihe weiterer Proteine mit teils bekannten, teils unbekanntenen Funktionen am Telomer-Nukleoproteinkomplex beteiligt zu sein. Beispielsweise fungiert die ATP-abhängige DNA Helikase II Ku mit ihrer 80kDa Untereinheit XRCC5 als Reparaturprotein bei DNA-Doppelstrangbrüchen und stellt damit eine Verbindung zwischen DNA-Reparatursystem und Telomerkomplex her<sup>44</sup>.

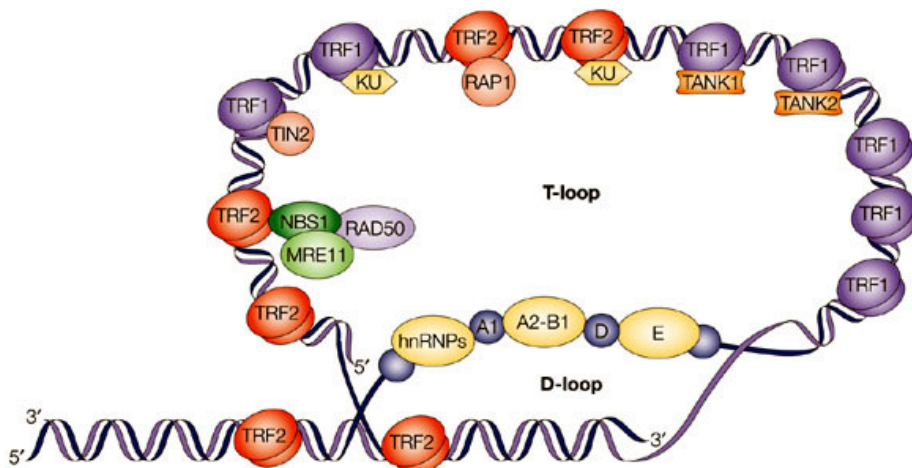


Abb. 1.1. Hypothetisches Modell der t-loop<sup>45</sup>.

Neben ihrer entscheidenden Rolle für die chromosomale Stabilität fungieren Telomere auch als Marker für die Anzahl der durchgemachten Zellteilungen. Diese Eigenschaft ergibt sich aus dem Mechanismus der semi-konservativen DNA-Replikation: bedingt durch die 5'-3' Leserichtung der DNA-Polymerase  $\delta$  kann nach Binden eines RNA-Primers nur der Führungsstrang kontinuierlich repliziert werden. Am so genannten Verzögerungsstrang binden dagegen mehrere RNA-Primer, an deren 3'-Ende die DNA-Polymerase  $\alpha$  komplementäre DNA-Stücke, auch als Okazaki-Fragmente bekannt, synthetisiert. Nach enzymatischer Entfernung der RNA-Primer werden die entstandenen Lücken durch die DNA-Polymerase  $\delta$  geschlossen. Am 5'-Ende des neu synthetisierten Stranges funktioniert dies jedoch nicht, da dort keine 3'OH-Bindungstelle zur Verfügung steht<sup>46</sup>.

Die Chromosomen junger, somatischer Zellen weisen eine durchschnittliche Telomerlänge von mehr als 9 Kilobasenpaaren (kbp) auf. In Keimbahn- und Tumorzellen hält das Enzym Telomerase die Telomerlänge konstant. In somatischen Zellen ist dieses Enzym jedoch meist unterdrückt und so verursacht das „Endreplikationsproblem“ dort einen Telomerverlust von 100-200 Basenpaaren (bp) pro Zellteilung<sup>47-48</sup>. Nach einer bestimmten Anzahl von Populationsverdopplungen wird eine kritische, für die DNA-Replikation nötige Länge (5-7,6 kbp) unterschritten, worauf die Zelle ihre Proliferation einstellt<sup>47, 49</sup>. Dieser Zellzyklusarrest wird auch als Hayflick-Limit oder Mortalitätsstadium 1 (M1) bezeichnet<sup>50-51</sup>.

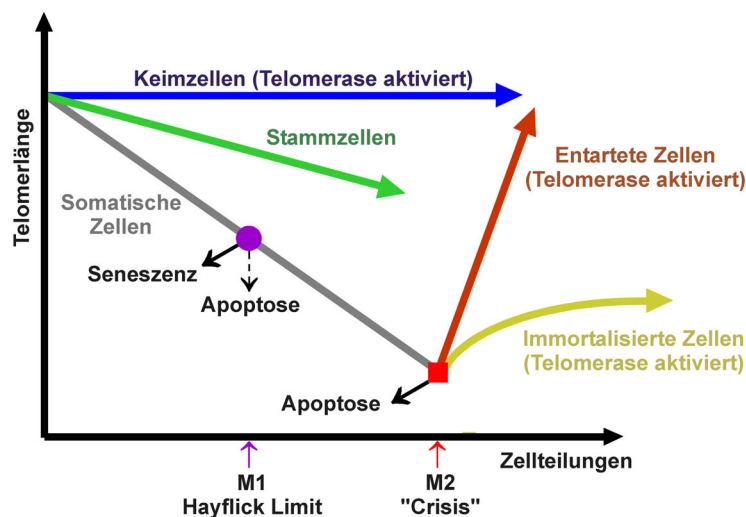


Abb. 1.2. Telomerhypothese der Zellalterung und Immortalisierung (modifiziert nach Rohde et al.)<sup>52</sup>.

Während humane Fibroblasten ein Hayflick-Limit von durchschnittlich 60 cpds<sup>53</sup> aufweisen, gelten Keimbahn- und Tumorzellen als potentiell unsterblich. Um den Preis weiterer Telomerverkürzungen sowie vermehrter Chromosomenschäden und Mutationen ermöglichen Transformationsereignisse somatischen Zellen im M1 Stadium weitere Mitosen. Dies hat jedoch den Tod der meisten Zellen zur Folge. Einige wenige Zellklone können vermutlich durch bestimmte genetische Veränderungen, wie zum Beispiel Telomerase-expression, das auch als „crisis“ bezeichnete Mortalitätsstadium 2 (M2) überwinden und so die Fähigkeit zu unbegrenztem Zellwachstum erwerben<sup>54</sup>. Unterschreitet die Telomerlänge das Hayflick-Limit, reichen die kurzen Telomerlängen für eine suffiziente Interaktion mit den spezifischen Telomer-

bindenden Proteinen nicht mehr aus und die t-loop kann nicht mehr gebildet werden<sup>55</sup>. Durch die ausbleibende Maskierung werden die Chromosomenenden als Doppelstrangbrüche erkannt und in Analogie zu DNA-Schäden anderer Gene die Expression von Tumorsuppressorgenen, wie dem multifunktionalen Transkriptionsfaktor p53, induziert<sup>56</sup>. p53 wiederum führt über die Induktion von p21 zur Aktivierung des Retinoblastom-Proteins Rb, was über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors E2F letztlich zum Zellzyklusarrest führt. p53 wird hauptsächlich mittels Dephosphorylierung und Deacetylierung reguliert. Beispielsweise inaktiviert der NAD-abhängige negative p53-Regulator Sirt1 durch Deacetylierung p53 und verhindert damit Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose<sup>57</sup>. Unabhängig von p53 kann Rb auch über p16 aktiviert werden. Zudem existieren wohl weitere, größtenteils unbekannte Signalwege, die von p53 ausgehend über mehrere Zwischenschritte einen Arrest des Zellzyklus zur Folge haben. Diese komplexen Zusammenhänge sind Gegenstand der aktuellen Forschung und bilden vermutlich das molekularbiologische Korrelat zu Hayflicks Phänomen der replikativen Seneszenz<sup>58</sup>.

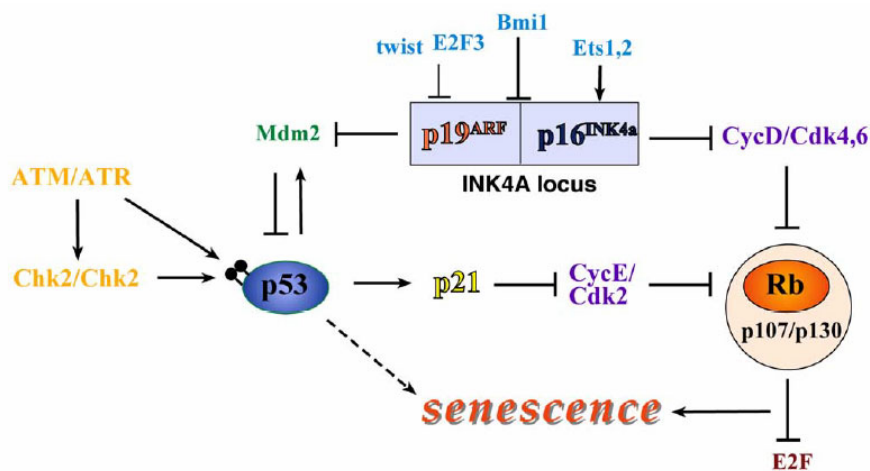


Abb. 1.3. Verschiede Signalwege enden in zellulärer Seneszenz<sup>58</sup>.

Anfang der 90er Jahre assoziierte Harley die Telomerlänge erstmals mit einer Art biologischer Uhr, als er einen klaren Zusammenhang zwischen der Telomerlängenabnahme und der steigenden Anzahl durchgemachter Mitosen humaner Fibroblasten nachweisen konnte<sup>59</sup>. Zudem fand man eine signifikante Abhängigkeit der Replikationsfähigkeit von der Telomerlänge: Fibroblasten mit langen Ausgangstelomeren wiesen ein höheres Teilungspotential auf als

Fibroblasten mit kurzen Telomeren<sup>49</sup>. Auch in vivo konnten diese Ergebnisse nachvollzogen werden, für verschiedenste Gewebe konnte immer wieder ein direkter Zusammenhang zwischen dem kalendarischen Alter des Donors und der Telomerlänge festgestellt werden. Während Fibroblasten einen berechneten Telomerverlust von nur 15bp pro Jahr zu verzeichnen haben<sup>53</sup>, verlieren Chondrozyten etwa 22bp pro Jahr<sup>60</sup>. Selbst hämatopoetische Stammzellen können sich mit einem Verlust von 9bp pro Jahr dem biologischen Alterungsprozess nicht entziehen<sup>61</sup>. Auffällig bei all diesen Telomeranalysen war eine deutliche interindividuelle Varianz der Telomerlänge von bis zu 2 kbp. Zwillingsstudien verdeutlichten mit einer genetischen Determination von fast 80% den starken Einfluss der Vererbung auf die individuelle Telomerlänge<sup>62</sup>. Heutzutage geht die Forschung davon aus, dass die menschlichen Telomere für ein Lebensalter von 125 Jahren ausreichen würden<sup>63</sup>. Obwohl ein wichtiger Baustein, ist die Telomerbiologie offensichtlich nicht der einzige für die zelluläre Seneszenz verantwortliche Mechanismus. Beispielsweise wird oxidativem Stress eine wichtige Rolle im Alterungsprozess zugesprochen.

### **1.3. Oxidativer Stress – der Ursprung allen Übels?**

Als oxidativer Stress wird eine Stoffwechsellage bezeichnet, in der eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species oder ROS) gebildet wird beziehungsweise vorhanden ist. Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen, wie zum Beispiel das anionische Superoxidradikal  $\cdot\text{O}_2^-$ , Wasserstoffperoxid  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder das Hydroxylradikal  $\cdot\text{OH}^-$ , entstehen einerseits im Rahmen regulärer Stoffwechselfvorgänge innerhalb der Zelle – physiologische Quellen sind unter anderem die Mitochondrien, Peroxisomen, das Cytochrom P450 und viele andere zytosolische Enzymsysteme - andererseits können eine Reihe exogener Agenzien die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auslösen. Dazu gehören unter anderem ionisierende Strahlung, inflammatorische Zytokine und Umweltgifte. Unter physiologischen Bedingungen hält ein ausgefeiltes antioxidatives System bestehend aus einem enzymatischen Teil (Katalase, Superoxiddismutase) und einem nicht-enzymatischen Teil (Glutathion,

Vitamine A, C und E) das Gleichgewicht aufrecht. Kommt es zu einem Überwiegen der oxidativen Komponente, zu oxidativem Stress also, verursachen die reaktiven Sauerstoffverbindungen ungehindert Schäden an allen möglichen Zellstrukturen wie Proteinen, Lipiden und der DNA. Sollten diese Schäden durch intrazelluläre Reparatursysteme nicht oder nur unzureichend behoben werden, kommt es unter anderem zur Expression des Tumorsuppressorgens p53, was entsprechend dem Ausmaß der Schädigung über p21 und Rb einen seneszenzähnlichen Zellzyklusarrest oder gar die Apoptose zur Folge hat. Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ein Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies neben diesen unspezifischen Schädigungsmechanismen auch eine spezifische Aktivierung redoxsensitiver Signalwege zur Folge haben, die, einmal aktiviert, wiederum schädigende als auch protektive Effekte haben können<sup>64</sup>.

Oxidativer Stress wird heutzutage mit multiplen, teils altersassoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Neben ophthalmologischen Erkrankungen wie Katarakt<sup>65</sup>, neurologischen Krankheitsbildern wie Alzheimer<sup>66</sup>, Amyotrophe Lateralsklerose<sup>67</sup> und Parkinson<sup>68</sup> wurde oxidativem Stress auch bei Atherosklerose<sup>69</sup> und der chronischen Transplantatabstoßung<sup>70</sup> eine entscheidende Rolle in der Pathogenese nachgewiesen.

Den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Seneszenz stellte Packer bereits im Jahr 1977 her, als er feststellte, dass humane Fibroblasten unter erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck kultiviert, eine höhere Lebenserwartung haben<sup>71</sup>. Anders herum werden Zellen in Anwesenheit erhöhter Sauerstoffkonzentrationen schneller seneszent und weisen einen höheren Telomerverlust pro Zellverdopplung auf<sup>72</sup>. Darüber hinaus zeigten junge humane Fibroblasten, die mehrere Tage subletalen Dosen reaktiver Sauerstoffspezies ausgesetzt waren, ähnliche Veränderungen bezüglich Morphologie, Enzymaktivität und Genexpression wie ihre seneszenten Artgenossen<sup>73</sup>. Dieses Phänomen ist auch bekannt als Stress induzierte vorzeitige Seneszenz (stress induced premature senescence oder kurz SIPS). Nun drängt sich die Frage auf, ob SIPS gleichbedeutend mit der replikativen Seneszenz sei. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit beider Zustände könnte man dies durchaus annehmen, Chen konnte 2001 jedoch beweisen, dass die Seneszenzentwicklung humaner Fibroblasten unter akuten, subletalen



oxidativen Stressdosen im Gegensatz zur replikativen Seneszenz nicht mit einem signifikanten Telomerverlust einher geht<sup>74</sup>.

All diese Erkenntnisse über oxidativen Stress und seine Auswirkungen auf den menschlichen Organismus führten zu den stressbasierten Theorien bezüglich des Alterungsprozesses: Denham Harman postulierte bereits 1956 in visionärer Art und Weise seine „free-radical theory of ageing“, welche besagt, dass die Zelle aufgrund einer Akkumulation von freien Radikalen über die Zeit hinweg altert<sup>75</sup>. Über all die Jahre hinweg wurde diese Theorie mit dem Einsatz moderner molekularbiologischer Methoden zwar in Teilen modifiziert, blieb in ihrer Kernaussage jedoch erhalten. Kowald und Kirkwood erweiterten im Jahr 1997 Harmans Theorie in der „network theory of ageing“. Demnach führt eine Anhäufung von Defekten an den verschiedenen Zellstrukturen verbunden mit einer relativen Insuffizienz der endogenen Abwehrmechanismen zu den typischen Anzeichen der Zellalterung<sup>76</sup>. Untermuert wurde diese Theorie von diversen Studien, welche einerseits die Auswirkungen multipler Stressoren (UV-Licht<sup>77</sup>, Wasserstoffperoxid<sup>73</sup>, erhöhter Sauerstoffpartialdruck<sup>78</sup>, etc.) und protektiver Faktoren (Antioxidantien<sup>79</sup>, erniedrigter Sauerstoffpartialdruck<sup>80</sup>, etc.) auf die Seneszenzentwicklung von Zellen verschiedenster Herkunft untersuchten.

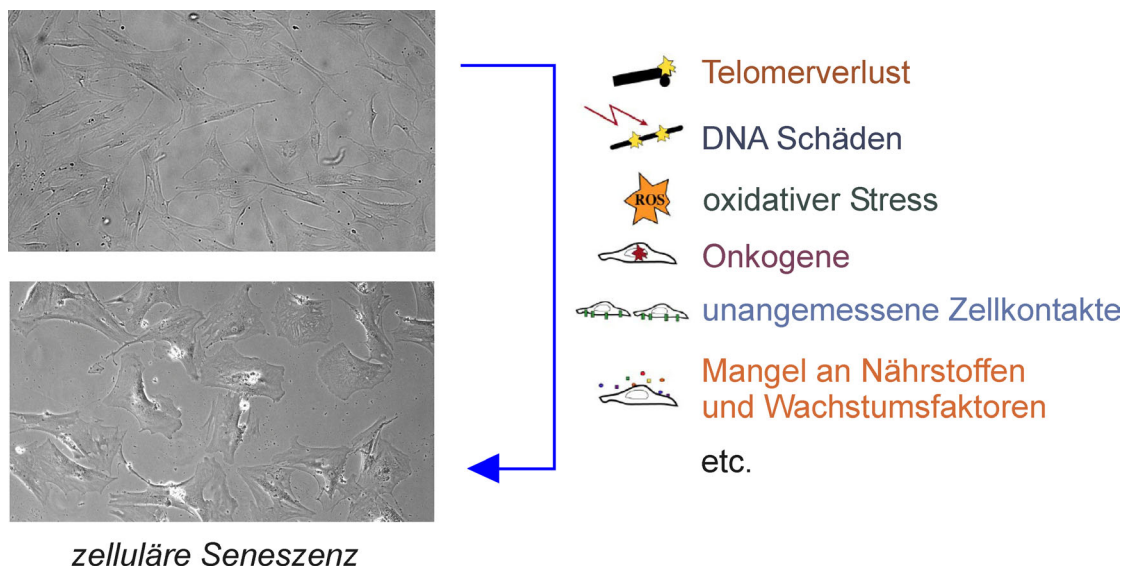


Abb. 1.4. Multifaktorielle Genese zellulärer Seneszenz (modifiziert nach Ben Porath et al.)<sup>58</sup>.

Demgegenüber stehen Theorien, die eher Veränderungen im Hormonhaushalt<sup>81</sup>, das Auftreten aberranter Proteine<sup>82</sup>, defekte Mitochondrien<sup>83</sup>, das

Fehlen von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren oder unzureichende Zellkontakte für das Auftreten zellulärer Seneszenz verantwortlich machen. Eine einheitliche, alles übergreifende Theorie der Zellalterung steht noch immer aus. Wie so vieles in der Wissenschaft muss der Alterungsprozess wohl als multifaktorielles Geschehen angesehen werden, worin eine Vielzahl von Faktoren ihren mehr oder weniger entscheidenden Beitrag zur Entwicklung des Phänomens Seneszenz leisten<sup>58</sup>.

Im Rahmen des Tissue engineering ist es Aufgabe der Forschung, neue Wege zu finden, um das Problem der zellulären Seneszenz bei der Zellvermehrung in vitro in den Griff zu bekommen.

#### **1.4. MSCs – neue Hoffnung im Tissue Engineering?**

Nachdem die Existenz mesenchymaler Zellen mit Stammzellcharakter im bunten Zellbild des Knochenmarks schon lange vermutet wurde, gelang es Friedenstein Ende der 80er Jahre erstmals so genannte Knochenmarks-fibroblasten zu isolieren und ihr Differenzierungspotential zu untersuchen<sup>84</sup>. In den darauf folgenden Jahren war diese Zellpopulation immer wieder Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten, was abhängig vom jeweiligen Untersucher zu vielfältigen Charakteristika und Bezeichnungen führte. Mittlerweile ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen (MSCs) nicht nur im Knochenmark, sondern auch in anderen Organen wie peripherem Blut<sup>85</sup>, der Synovialmembran<sup>86</sup>, Fettgewebe<sup>87</sup>, der Lunge<sup>88</sup>, der fetalen Leber<sup>89</sup> oder der Zahnpulpa<sup>90</sup> vorkommen und ursprungsabhängig ein vielfältiges Differenzierungspotential aufweisen<sup>91</sup>. MSCs aus dem Knochenmark können in verschiedene mesodermale Zelllinien wie Osteoblasten<sup>92</sup>, Adipozyten<sup>93</sup>, Tendinozyten<sup>94</sup>, Myozyten<sup>95</sup> und Chondrozyten<sup>27</sup> differenzieren. Womöglich können mesenchymale Stammzellen unter bestimmten Kulturbedingungen selbst in ekto- und entodermale Zellarten wie neuronale Zellen<sup>96</sup> und Hepatozyten<sup>97</sup> differenzieren, was in der Fachliteratur jedoch kontrovers diskutiert wird und weiterer Evaluation bedarf.

Dank ihrer vergleichsweise einfachen Isolierung und Kultivierung in vitro sowie ihrer multipotenten Differenzierungseigenschaften hielten MSCs über die letzten Jahre hinweg zunehmend Einzug in die klinische Anwendung. Die Hoffnung, MSCs würden aufgrund ihrer Stammzeleigenschaften ein

unbegrenzt Proliferationspotential aufweisen und damit die Lösung des Endreplikationsproblems darstellen, war jedoch leider vergebens. Ähnlich wie somatische Zellen erreichen MSCs in vitro abhängig vom Donoralter etwa 20 - 40 cpds<sup>98</sup>, zeigen dabei zunehmend Zeichen der Seneszenz<sup>98-99</sup> und weisen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen keine Telomeraseaktivität auf<sup>100-101</sup>. Im Jahr 2002 wurde eine noch primitivere multipotente adulte Progenitorzellpopulation (MAPCs) entdeckt, welche neben ihrer vielfältigen Differenzierungsfähigkeit in Zellen des Meso-, Ekto- und Entoderms<sup>102</sup> auch ein enormes Wachstumspotential bei konstanter Telomerlänge aufweist<sup>103</sup>. Möglicherweise existiert also eine äußerst seltene (ca. 1 von 10<sup>8</sup> isolierten MSCs) telomerasepositive Subpopulation der MSCs, die echten Stammzellcharakter aufweist und damit eine denkbare Lösung des Endreplikationsproblems darstellt. Ähnliche Eigenschaften konnten experimentell bei gewöhnlichen MSCs durch Transfektion und damit verbundener Überexpression des humanen telomerase reverse transcriptase gens (hTERT) erreicht werden<sup>100, 104</sup>. Unglücklicherweise führte dieser Eingriff in die Telomerbiologie der Zellen zu genetischer Instabilität und hatte mitunter die Transformation zur Folge<sup>105</sup>. Neue Ansätze beinhalten eine chemische bzw. molekularbiologische Stimulation der Telomeraseexpression um möglicherweise kontrolliert, also ohne das Risiko maligner Entartung, die Vorzüge telomerasepositiver MSCs nutzen zu können<sup>106</sup>.

Obwohl die klinisch-therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen sich bislang noch auf die Ebene klinischer Studien der Phase 1 beschränkt, lassen die bisherigen Ergebnisse auf eine vielversprechende Entwicklung hoffen. So konnten nach lokaler Applikation mesenchymaler Stammzellen bei großen Knochendefekten<sup>107-109</sup>, vaskulärer Ischämie in Folge von pAVK<sup>110</sup> bzw. KHK<sup>111-114</sup> oder chronischen Hautdefekten<sup>115</sup> teils spektakuläre Resultate erzielt werden. Die hypoimmunogenen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen ermöglichen neben der lokalen Implantation auch eine systemische Transplantation<sup>116-117</sup>. In Einzelfallstudien konnte der Verlauf bei Osteogenesis imperfecta<sup>118</sup> und aplastischer Anämie<sup>119</sup> positiv beeinflusst werden. Darüber hinaus besitzen MSCs in vitro<sup>120-121</sup> und in vivo<sup>122</sup> einen immunsuppressiven Effekt, was zu ihrer Anwendung in der Therapie der Graft-Versus-Host-Reaktion mit durchweg ermutigenden Ergebnissen führte<sup>123-128</sup>. Aufgrund der langen Persistenz transplanteder MSCs im Empfänger und der Fähigkeit zur

Expression exogener Proteine wie beispielsweise Faktor VIII machen MSCs außerdem zu einem potentiell Medium der Gentherapie<sup>129</sup>.

Neben ihrer Anwendung in Zell- und Gentherapie könnten mesenchymale Stammzellen auch viel versprechende Kandidaten für den Einsatz im Bereich des Tissue engineering darstellen<sup>130</sup>. In Kombination mit verschiedenen Scaffolds konnten in vitro große Mengen an Knochengewebe produziert werden<sup>131</sup>, welches in Einzelfällen bereits zur Rekonstruktion großer Defekte in vivo verwandt wurde<sup>132</sup>. Der Einsatz mesenchymaler Progenitorzellen speziell im Tissue engineering von Gelenkknorpel würde einige Vorteile mit sich bringen. MSCs eignen sich auf Grund ihrer osteochondralen Differenzierungspotenz und ihrer guten Amplifikationsmöglichkeiten gut zur Reparatur von Knochen-Knorpeldefekten<sup>133-134</sup>. Dank der einfacheren Entnahmemöglichkeit der Knochenmarkszellen muss das Gelenk des Patienten nicht für eine Entnahme von Knorpel zur Gewinnung von Chondrozyten zusätzlich geschädigt werden, weisen doch selbst so genannte Minderbelastungszonen im Gelenk bei normaler Bewegung teils signifikante Kontaktdrücke auf<sup>23, 135</sup>.

Obwohl die Anwendung mesenchymaler Stammzellen sprichwörtlich noch in den Kinderschuhen steckt, legen viele Forscher große Hoffnung in dieses Gebiet. Ein intensives Studium der Biologie dieser Knochenmarkszellen könnte der Schlüssel zu neuen, bahnbrechenden Therapien auf dem Gebiet der regenerativen Medizin sein<sup>136</sup>.

## 2. Fragestellung

Tissue Engineering beinhaltet eine ex vivo Expansion autologer Chondrozyten in Zellkulturen. Mesenchymale Stammzellen stellen aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen Gewinnung und ihren vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten eine interessante alternative Zellquelle dar. Bekanntlich verfügen mesenchymale Stammzellen entgegen ihres Stammzellcharakters jedoch nur über ein begrenztes Teilungspotential. Nach einer bestimmten Anzahl durchgemachter Mitosen treten sie in das Stadium der Seneszenz ein. Oxidativem Stress wird eine zentrale Rolle in der Genese des Phänomens der zellulären Seneszenz zugesprochen.

Ziel dieser Arbeit war es die Einflüsse von oxidativem Stress in chronischer und akuter Form auf die Zellbiologie mesenchymaler Stammzellen zu untersuchen. Dazu war vorerst die Etablierung des in der Fachwelt allgemein anerkannten  $H_2O_2$ -Modells notwendig. Anschließend sollten verschiedene Aspekte der Zellbiologie nach chronischer und akuter Stressexposition durchleuchtet werden:

- Einflüsse auf das Proliferationsverhalten
- Zellmorphologische Veränderungen
- Einflüsse auf die Telomerbiologie
- Expression telomerassoziierter Gene (TRF1, TRF2)
- Expression von DNA-Reparaturgenen (XRCC5)
- Expression bestimmter Regulatoren des Zellzyklus (p21, SIRT1)

Um die molekularbiologischen Untersuchungen im Tissue Engineering Labor zu ermöglichen, wurde folgende Methodik etabliert:

- Etablierung der  $\beta$ -Galactosidase Färbung
- Etablierung einer neuen Methode der DNA Isolierung
- Weiterentwicklung des TRF-Assay
- Etablierung von Primern für die rtPCR

Speziell im Hinblick auf die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten degenerativer Gelenkerkrankungen sowie traumatischer Knorpel- und Meniskusschäden sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Erkenntnisse über die Zellbiologie mesenchymaler Stammzellen gewonnen werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Geräte und Hilfsmittel

##### Allgemein genutzte Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank:	HERAcell 240	Heraeus, Hanau
Gefriertrockner: (Speed Vac)	Alpha RVC	Christ, Osterode
Geldokumentation:	UV-Photosystem	MWG Biotech
Gelelektrophorese:	Consort E834 (Elektrophoresegerät)	Peqlab, Erlangen
	EasyCast™ (Gelkammer 7x7 cm)	Peqlab, Erlangen
	SubCell GT (Gelkammer 15x15 cm)	BioRad, München
Heizofen:	Heraeus function line	Heraeus, Hanau
pH-Messgerät:	Labor-pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer:	Ultrospect 2000	Pharmacia Biotech
Reinraumwerkbank: (Laminar Flow)	M18	Schulz Lufttechnik GmbH
Taumler:	Polymax2040	Heidolph
Waage:	PM2000	Mettler, Gießen
Wärmeblock:	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad:	Wasserbad	Memmert
Wärmeplatte:	Medax	Nagel GmbH
Zentrifuge:	Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge/Vortex	Kisker, Steinfurt

**Zellbiologische Arbeiten**

Filter:	Sterilfilter 40 µm	Falcon, Heidelberg
Gefäße:	Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Newton, NC
	Falcon 15 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	Falcon 50 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	6-Well-Platten	Falcon, Heidelberg
	96-Well-Platten	Falcon, Heidelberg
Zellzählung:	Neubauer-Zählkammer	Marienfeld

**Telomer-Analytik (TRF-Assay)**

Spezielle Reaktionsgefäße:	Safe-Lock 1,5 ml (Eppendorf)	Eppendorf, Hamburg
	SafeSeal-Tips (DNase-, RNase-, pyrogenfrei)	Biozym Diagnostic GmbH
Southern Blot:	Nylon membrane, positively charged	Osmonics Inc.
Detektion:	Hyperfilm Amersham	Amersham Biosciences, Freiburg
	M35 X-OMAT Processor (Filmentwickler)	Kodak, Rochester, NY
	Kodak X-OMAT cassette	Kodak, Rochester, NY
	Telometric 1.2 (Software)	Fox Chace Cancer Center

**Analyse der RNA-Expression**

Spezielle Reaktionsgefäße:	Safe-Lock 1,5 ml (Eppendorf)	Eppendorf, Hamburg
	SafeSeal-Tips (DNase-, RNase-, pyrogenfrei)	Biozym Diagnostic GmbH
	LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim
PCR-Gerät:	LightCycler	Roche, Mannheim

### 3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

#### Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien

Borsäure		Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau		Sigma, Taufkirchen
DEPC		Sigma, Taufkirchen
EDTA		Sigma, Taufkirchen
Ethanol		Merck, Darmstadt
Formamid		Merck, Darmstadt
HCl 37%		Merck, Darmstadt
Maleinsäure		Sigma, Taufkirchen
MgCl <sub>2</sub>		Sigma, Taufkirchen
NaCl		Merck, Darmstadt
NaOH		Merck, Darmstadt
SDS		Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat		Sigma, Taufkirchen
Tris-Base		Roth, Karlsruhe
Tris-HCl		Merck, Darmstadt
Tween 20 (Polyoxy- ethylenesorbitanmonolaureat)		Sigma, Taufkirchen

#### Zellbiologische Arbeiten

Medium:	DMEM	Gibco, Karlsruhe
	FCS (nicht hitzeinaktiviert)	PAN, Aidenbach
	Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
	Hepes-Puffer	Gibco, Karlsruhe
Passage:	DPBS (pH 7,4)	Cambrex, Verviers, Belgien
	0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA	Gibco, Karlsruhe
Oxidativer Stress:	Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Viabilitätsprüfung:	Live/Dead Kit	Invitrogen, Darmstadt



**$\beta$ -Galactosidase-Nachweis**

Fixierung:	Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
	DPBS (pH 7,4)	Cambrex, Verviers, Belgien
Staining:	Bromo-chloro-indolyl- galactopyranosid (X-Gal)	Invitrogen, Darmstadt
	Zitronensäure	Merck, Darmstadt
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Merck, Darmstadt
	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Merck, Darmstadt

**Telomeranalytik (TRF-Assay)**

DNA-Isolierung und Restriktion:	High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim
	HinfI, 5000 U	New England Biolabs, Frankfurt
	NEBuffer 4	New England Biolabs, Frankfurt
	$\lambda$ -DNA	Roche, Mannheim
Gelelektrophorese:	Agarose	Sigma, Taufkirchen
	Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
	1 kb DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
	DIG Molecular Weight Marker II DNA	Roche, Mannheim
Hybridisierung und Detektion:	Telomersonde: (TTAGGG) <sub>7</sub> , 3'/5'- Digoxigenin-gelabelt	Roth, Karlsruhe
	N-Lauroylsarkosin	Sigma, Taufkirchen
	Blocking Powder	Merck, Darmstadt
	Anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
	CDP-Star, ready to use	Roche, Mannheim

**Analyse der RNA-Expression**

RNA-Isolierung:	RNAzol	Tel-Test, Inc., Friendsfield, Texas
	Chloroform	Merck, Darmstadt
	Isopropanol	Merck, Darmstadt
Gelelektrophorese:	Agarose	Sigma, Taufkirchen
	Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
	RNA-Sample-Loading- Buffer	Sigma, Taufkirchen
DNase Verdau:	DNA-free™ Kit	Ambion, Darmstadt
cDNA-Synthese:	Oligo(dT)	Roche, Mannheim
	dNTP	Roche, Mannheim
	SuperScript™ II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
PCR:	LightCycler FastStart DNA Master SYBR-Green I	Roche, Mannheim
	Primer für LightCycler- PCR: TRF1, TRF2, p21, SIRT1, XRCC, GAPDH	

**3.1.3. Medien, Puffer und Lösungen****Zellbiologische Arbeiten**

MSC-Medium	DMEM	Gibco
	FCS (nicht hitzeinaktiviert)	10%
	Penicillin/Streptomycin	1%
	Hepes-Puffer	1%

**Allgemein verwendete Puffer und Lösungen**

DEPC-Wasser:	DEPC	0,2%
	Aqua dest.	
10x TBE-Puffer:	Tris-Base	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA (pH 8,0)	0,2 mM
	DEPC-Wasser	
20x SSC (pH 7,0):	NaCl	3,0 M
	Tri-Na-Citrat	0,3 M
	DEPC-Wasser	
	20x SSC	10%
	DEPC-Wasser	
SDS 10% (pH 7,2):	SDS	10%
	DEPC-Wasser	
	Maleinsäure	100 mM
	NaCl	150 mM
	DEPC-Wasser	

 **$\beta$ -Galactosidase Nachweis**

Fixationslösung:	Formaldehyd 37%	10%
	DPBS (pH 7,4)	
X-Gal-Lösung:	X-Gal	200mg/ml
	DMF	
Zitronensäurelösung:	Zitronensäure	100mM
	Aqua bidest.	
Natriumphosphatlösung:	Dinatriumhydrogenphosphat	200mM
	Aqua bidest.	
Zitronensäure/ Phosphat-Puffer (pH 6,0):	Zitronensäurelösung	37%
	Natriumphosphatlösung	63%

Färbelösung:	X-Gal-Lösung	1mg/ml
	Zitronensäure/Phosphat-Puffer (pH 6,0)	40mM
	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	5mM
	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	5mM
	NaCl	150mM
	MgCl <sub>2</sub>	2mM
	Aqua bidest.	

### Elektrophorese

1x TBE-Puffer	10x TBE-Puffer	10%
	DEPC-Wasser	
10x Ladungspuffer für DNA:	Bromphenolblau	0,41%
	Saccharose	67%
	DEPC-Wasser	

### Photometrie

TE Puffer	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1,0 mM
	DEPC-Wasser	

### DNA-Isolierung

Eluationslösung (pH 8,0):	NaOH	1 µM
	Aqua dest.	

### Southern Blot

Denaturierungslösung:	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
	DEPC-Wasser	
Neutralisierungslösung (pH 7,5):	Tris-Base	1,0 M
	NaCl	1,5 M
	DEPC-Wasser	

**Hybridisierung und Detektion**

Prähybridisierungslösung:	20x SSC	5x
	Blocking Powder	5%
	Formamid	50%
	N-Lauroylsarkosin	0,1%
	SDS 10%	0,02%
	DEPC-Wasser	
Hybridisierungslösung:	20x SSC	5x
	Blocking Powder	5%
	Formamid	50%
	N-Lauroylsarkosin	0,1%
	SDS 10%	0,02%
	Telomersonde	2,4 pmol/ml bzw. 31,8 ng/ml
	DEPC-Wasser	
Puffer 1:	20x SSC	10%
	SDS 10%	1%
	DEPC-Wasser	
Puffer 2:	20x SSC	10%
	DEPC-Wasser	
Puffer 3:	Maleinsäurepuffer	
	Tween 20	0,1%
Puffer 4 (pH 9,5):	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	DEPC-Wasser	
Puffer 5:	Blocking Powder	10%
	Maleinsäurepuffer	

## **3.2. Biologisches Untersuchungsmaterial**

Im Zuge autologer Knochen transplantationen vom Beckenkamm wurden ca. 40 ml Knochenmark aus dem Os illium aspiriert. Die Verwendung der Knochenmarksproben für dieses Experiment erfolgte nur nach Zustimmung der Patienten und wurde von einer Ethikkommission genehmigt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die MSCs von fünf männlichen Patienten im Alter zwischen 18 und 67 Jahren (MW  $\pm$  SD: 40,6  $\pm$  20,9 Jahre) untersucht.

## **3.3. Methoden**

### **3.3.1. Zellbiologische Methoden**

#### **3.3.1.1. Gewinnung und Kultivierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen**

Die Gewinnung humaner mesenchymaler Progenitorzellen erfolgte mittels Ficollgradient aus vom Beckenkamm gewonnenem Knochenmark (2 x 20 ml). Dabei wurden 20 ml Knochenmark mit 45 ml MSC-Medium (vgl. 3.1.3) versetzt und anschließend zentrifugiert (5 min bei 2000g, 25°C). Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgesaugt, auf einen Ficollgradient gegeben und erneut abzentrifugiert (15 min bei 2000g, 25°C). Ca. 16 ml der grautrüben „Interphase“ (1,073 g/ml) wurden abpipettiert, mit MSC-Medium auf 45 ml aufgefüllt und zentrifugiert (5 min bei 2000g, 25°C). Nach Verwerfung des Überstands wurde das Pellet in MSC-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde eine Zellzählung (vgl. 3.3.1.3) durchgeführt und je 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche ausgesät.

Die MSCs wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 15 ml MSC-Medium bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt.

Sobald die Zellen eine 90%-ige Konfluenz erreicht hatten erfolgte die Zellpassage. Nach Entfernung von Serumresten durch zweimaliges spülen der Zellkulturflaschen mit PBS wurden die Zellen 3 Minuten mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der vollständigen Ablösung der Zellen vom Boden der

Kulturflaschen, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in 50 ml Falkons überführt, abzentrifugiert (10 min bei 1000g, 25°C) und der Überstand verworfen. Schließlich wurden die Pellets in Medium resuspendiert und als 1:3 Split auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

### **3.3.1.2. Kultivierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen unter akutem und chronischem oxidativen Stress**

In den Versuchsteilen, in denen der Einfluss von oxidativem Stress auf das Wachstums- und Seneszenzverhalten der MSCs untersucht werden sollte, wurde MSC-Medium verwendet, das bestimmte Konzentrationen von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) enthielt.

Für den Versuchsteil, in dem die Zellen chronischem oxidativen Stress ausgesetzt wurden, enthielt das MSC-Medium 10  $\mu M$   $H_2O_2$ . Ein Medienwechsel erfolgte analog zur Kontrolle alle 3-4 Tage. In den Akutversuchen enthielt das MSC-Medium entweder 100 $\mu M$  oder 150 $\mu M$   $H_2O_2$ , wobei nach 2h Einwirkzeit ein Medienwechsel erfolgte. Die nötigen Verdünnungen für die speziellen Medien wurden vor Gebrauch aus einer 30%igen  $H_2O_2$ -Stammlösung frisch hergestellt. Ansonsten entsprachen die Kultivationsbedingungen und -methoden denen der ohne oxidativen Stress gezüchteten MSCs.

### **3.3.1.3. Bestimmung von Zellzahl und Zellproliferation**

Die Zellzahl wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Differenzierung toter und lebender Zellen wurde ein 5  $\mu l$  Aliquot mit Methylenblau auf 10  $\mu l$  aufgefüllt, in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die vier Zählquadrate ausgezählt.

Der Mittelwert (Z) aller vier Quadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (X), dem Volumen ( $10^4$ ) und der zum Resuspendieren verwendeten Mediummenge (V) in ml ergab die Gesamtzellzahl:  $N = Z \times X \times 10^4 \times V$

Die Zellpopulationsverdoppelungen (cpd) als Parameter für die Zellproliferation wurden mit folgender Formel berechnet:  $cpd = \log_{10}(N/N_0) \times 3,33$ , wobei N die Anzahl der Zellen am Ende des Experiments,  $N_0$  ihre Anzahl zu Beginn bezeichnen.

### 3.3.2. Bestimmung der letalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosis

Zur Bestimmung der letalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosis wurden MSCs auf 96-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert und mit MSC-Medium, welches jeweils unterschiedliche Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielt (0 µM, 10 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM) versetzt. Nach einer Einwirkzeit von 2 h wurde das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltige Medium durch normales Medium ersetzt. Nach 24 h erfolgte die Vitalitätsbestimmung mittels Live/Dead<sup>®</sup>-Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit 100 µl einer Färbelösung bestehend aus PBS, 0,75 ‰ Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) und 0,25 ‰ Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) versetzt. Der nicht fluoreszierende, zellmembranpermeable Calcein-AM wird im Zytoplasma lebender Zellen durch unspezifische Esterasen gespalten. Das dadurch entstehende Calcein ist in der Lage, Calciumionen zu komplexieren, was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert (ex/em ~495 nm/~515 nm). Der fluoreszierende Chelatkomplex kann die Zellmembran nicht penetrieren und ist kaum zytotoxisch. Durch das Fehlen aktiver zytoplasmatischer Esterasen bleibt die Fluoreszenz bei toten Zellen aus. Im Gegensatz zu Calcein-AM kann EthD-1 hingegen nur in Zellen mit beschädigten Membranen eindringen. Intrazellulär interkaliert es mit Nucleinsäuren und erfährt dabei eine 40-fache Steigerung der Fluoreszenz (ex/em 495nm/635nm). Die intakten Zellmembranen lebender Zellen stellen eine unüberwindbare Barriere für das Reagenz dar. Nach einer Inkubationsphase von 30 min wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines Computer-gestützten Fluoreszenz-Mikroskops dokumentiert. Analog wurde auch der Einfluss einer niedrigen, jedoch chronisch einwirkenden Stressdosis (10µM, siehe 3.3.1.2.) auf die Viabilität von MSCs untersucht.

### 3.3.3. Seneszenznachweis mittels X-Gal-Färbung

Das seneszenzspezifische Enzym β-Galactosidase wurde mittels X-Gal-Färbung nachgewiesen. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers. X-Gal (syn. BCIG bzw. Bromo-chloro-indolyl-galactopyranosid) ist eine organische Esterverbindung bestehend aus Galactose und einer Indolkomponente (5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol). Nach Esterspaltung durch die seneszenzspezifische β-Galactosidase wird die Indolkomponente im



Zytoplasma zu einem nicht wasserlöslichen blauen Indigofarbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo) oxidiert.

Für die Färbung wurden MSCs auf 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Nach zwei Waschschrinen mit PBS wurden die Zellen 3 - 5 Minuten mit Formaldehyd (3,7% in PBS) fixiert. Vor Zugabe von 1-2 ml/Well der auf 37°C vorgewärmten Färbelösung (s. 3.1.3.) wurden die fixierten Zellen wiederum zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die 6-Well-Platten luftdicht verschlossen und bei 37°C im Ofen inkubiert. Nach 15 h erreichte die Färbung ihr Maximum und konnte unter dem Lichtmikroskop beurteilt und dokumentiert werden.

### **3.3.4. Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Assay)**

#### **3.3.4.1. DNA-Isolierung und Bestimmung der DNA-Konzentration**

##### DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurden zwei Verfahren, das Extraktionsreagenz DNA STAT-60™ (Fa. Tel-Test, Inc.) sowie das High Pure PCR Template Preparation Kit® (Fa. Roche) getestet, wobei sich letzteres sowohl quantitativ als auch qualitativ als überlegen erwies. Die Anwendung der beiden Methoden erfolgte gemäß den Empfehlungen der Hersteller.

Hierfür wurden die Zellpellets bestehend aus ca.  $5 \times 10^5$  Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und 200 µl Binding Buffer sowie 40 µl Proteinase K zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen und 10-minütiger Inkubation bei 70°C im Thermocycler, Zugabe von 100 µl Isopropanol und gründlichem Mischen mit der Pipettenspitze wurden die Proben auf die Filter aufgetragen und abzentrifugiert (1 min bei 8000g, 25°C). Danach wurden 500 µl Inhibitor Removal Buffer zugegeben und erneut zentrifugiert (1 min bei 8000g, 25°C). Nach zwei Waschschrinen mit jeweils 500 µl Washing Buffer und Zentrifugation (jeweils 1 min bei 8000g, 25°C) wurde im Filter verbliebener Washing Buffer eliminiert. Für die Eluation wurden die Filter in sterile 1,5 ml Eppendorf Cups überführt. Daraufhin wurde die DNA in zwei Schritten mit insgesamt 250 µl (150 µl + 100 µl) der selbst hergestellten auf 70°C vorgewärmten Eluationslösung per Zentrifugation (jeweils 1 min bei 8000g, 25°C) eluiert. Um die für den HinfI-Verdau nötige hohe DNA-Konzentration zu

erhalten, wurden die Proben anschließend im Speed-Vac eingengt. Hierzu wurden die geöffneten Proben in der Vakuumzentrifuge bei 1000g, 25°C und 10 mbar für 2-3 Stunden bis zum Erreichen des gewünschten Volumens von 30-80 µl zentrifugiert.

#### Messen der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Da die Absorptionsspektrometrie nur im Bereich zwischen 0,1 und 1 OD (optische Dichte), entsprechend einer Nukleinsäurekonzentration von 5-50 µg pro ml, zuverlässige Ergebnisse liefert, wurden die Proben mit TE-Puffer 1:35 verdünnt. Anschließend wurde die Absorption in Einmalküvetten bei  $\lambda = 260$  nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Die DNA-Konzentration der Probe wurde aus dem Mittelwert der durchgeführten Doppelbestimmung berechnet.

Als Anhalt für die Reinheit der isolierten DNA diente der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  sowie der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{230}$ , die so genannten Ratios. Diese sollten bestenfalls über 1,8 liegen. Werte  $< 1,6$  deuten auf eine Kontamination der Probe mit Phenolresten oder Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 280$  nm bzw. 230 nm liegt, hin. Sollte die Ratio  $A_{260}/A_{280}$  größer als 2,1 sein könnte dies ein Hinweis für verbliebene RNA oder eine Denaturierung der DNA sein.

#### **3.3.4.2. Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde mit der Gelelektrophorese die Integrität der isolierten DNA bestimmt (s. Abb. 3.3.1.). Darüber hinaus diente sie zur Überprüfung der Vollständigkeit des Restriktionsverdau sowie zur Auftrennung der Restriktionsfragmente für den Southern Blot (s. Abb 3.3.3a.).

Für alle Anwendungen wurden Gele mit 0,8% Agarose in 1x TBE-Puffer verwendet.

Die Agarose wurde hierzu in 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle dreimal aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde das Gel mit 5µl Ethidiumbromid pro 100 ml Agarosegel versetzt und anschließend in einen horizontalen Gießrahmen mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Das Erstarren des Gels erfolgte zuerst bei Raumtemperatur, dann zur besseren Vernetzung im Kühlschrank. Das erstarrte Gel wurde in die mit Laufpuffer (1x

TBE-Puffer) gefüllte Gelkammer überführt, bevor es mit Proben beladen werden konnte.

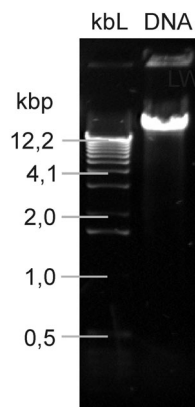
Die Proben wurden mit DEPC-Wasser zum benötigten Gesamtvolumen ergänzt und nach Zugabe von 20 Vol% Ladungspuffer in die Probenaschen pipettiert.

Als Längenstandard wurde ein Aliquot bestehend aus 1 µl der 1 kb DNA-Ladder, 7 µl DEPC-Wasser und 2 µl Ladungspuffer aufgetragen.

Die Elektrophoresebedingungen waren

100 V (6,67 V/cm) für 1,5-2 h bei analytischen Gelen (Überprüfung der DNA-Integrität und des Restriktionsverdaus)

60 V (4 V/cm) für 13 h bei Transferelektrophoren (Auftrennung der Restriktionsfragmente für den Southern Blot).



*Abb. 3.3.1.*

*Integritätsüberprüfung der DNA auf dem Agarosegel. Nicht degradierte DNA zeichnet sich durch eine singuläre Bande im Bereich über 12,2 Kilobasenpaaren aus.*

**kbL:** Kilobasenladder; **kbp:** Kilobasenpaare.

Im Anschluss wurde die DNA unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) detektiert. Ethidiumbromid interkaliert bevorzugt mit CG-Basenpaaren und emittiert unter UV-Bestrahlung Licht im Wellenlängenbereich von 500 nm bis 590 nm. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

### **3.3.4.3. Restriktion**

Nachdem die Integrität der isolierten DNA im Agarosegel überprüft wurde, erfolgte die Restriktion der hochmolekularen genomischen DNA mit HinfI gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

Das Restriktionsenzym HinfI, eine Endonuklease aus *Haemophilus influenzae* Rf, weist auf Grund seiner Erkennungssequenz 5'...G<sup>▼</sup>ANTC...3' zahlreiche Schnittstellen innerhalb des DNA-Doppelstrangs mit Ausnahme der Telomerregionen auf. Ein Verdau mit HinfI liefert folglich neben

ungeschnittenen Telomerenden (4-15 kbp) multiple kurze DNA-Fragmente, die elektrophoretisch von den langen Telomerfragmenten getrennt werden können.

Der Restriktionsansatz enthielt 10 µg DNA, 10 Vol% 10x NEBuffer 2 und wurde mit DEPC-Wasser zum Endvolumen von 50 µl ergänzt. Zum Start der Restriktion wurden schließlich 2 µl HinfI zugegeben.

Durch den Kontrollansatz wurde überprüft, ob eine ausreichende Enzymaktivität vorhanden war. Die Enzymmenge eines Aliquots aus dem Restriktionsansatz, welches ca. 500 ng DNA enthielt, sollte ausreichen um 500 ng λ-DNA zu verdauen.

Jeder Kontrollansatz enthielt folglich 2,5 µl aus dem betreffenden Restriktionsansatz, jeweils 2 µl λ-DNA und wurde mit 1x NEBuffer 2 zu einem Endvolumen von 12 µl ergänzt.

Zusammen mit einem Leerwert, der 2 µl λ-DNA und 10 µl 1x NEBuffer 2 enthielt, wurden die Restriktions- und Kontrollansätze bei 37°C für 12 h im Wärmeblock inkubiert.

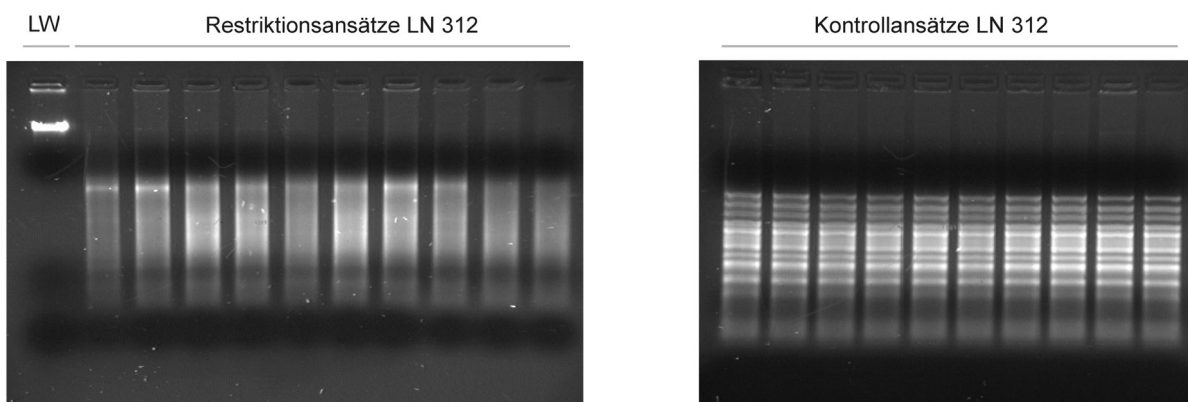


Abb. 3.3.2a.

*Im Gegensatz zur ungeschnittenen λ-DNA des Leerwerts (LW) zeichnet sich vollständig mit HinfI geschnittene DNA durch einen Schmier im niedermolekularen Bereich aus.*

Abb. 3.3.2b.

*Typisches Schnittmuster von mit HinfI verdauter λ-DNA aus dem Kontrollansatz.*

Die Vollständigkeit des HinfI-Verdauens wurde anschließend elektrophoretisch überprüft. Hierfür wurden 2,5 µl der jeweiligen Restriktionsansätze mit DEPC-Wasser zu je 12 µl Gesamtvolumen ergänzt. Die so erhaltenen Proben, die

Kontrollansätze und der Leerwert wurden mit jeweils 3  $\mu\text{l}$  Ladungspuffer versetzt und zusammen mit einem Markeransatz, der 1  $\mu\text{g}$  der 1 kb DNA-Ladder enthielt, auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen.

Die Kontrollansätze sollten nach 1,5-2 h bei 100V das typische Muster von mit HinfI verdauter  $\lambda$ -DNA und der Leerwert ungeschnittene hochmolekulare  $\lambda$ -DNA zeigen (s. Abb. 3.3.2a.). Bei den Restriktionsansätzen galt ein Schmier im Bereich  $< 4\text{ kbp}$  als Hinweis für den vollständigen Verdau (s. Abb. 3.3.2b.).

#### 3.3.4.4. Southern Blot

Mit Hilfe des von Edwin Southern entwickelten Verfahrens können DNA-Fragmente auf flexible Membranen übertragen und dort fixiert werden<sup>137</sup>.

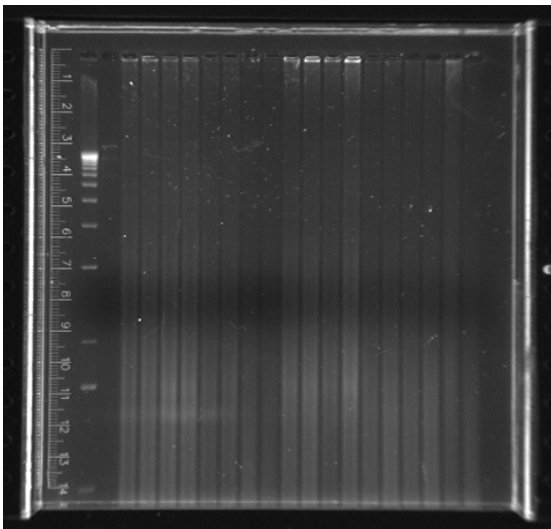


Abb. 3.3.3a.

Blotgel (LN 336) mit zwei Längenstandards und als „Schmier“ sichtbaren kurzen DNA-Fragmenten.

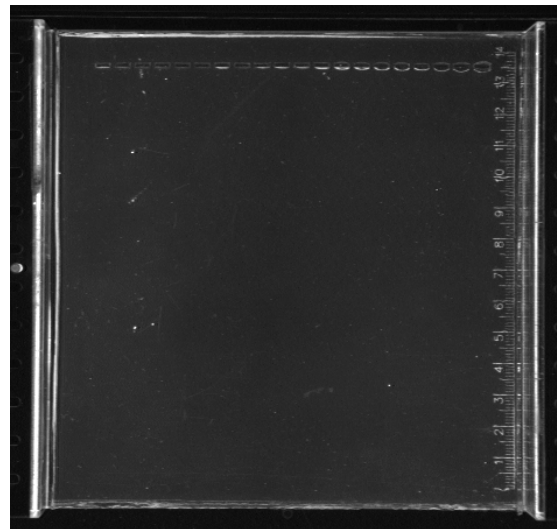


Abb. 3.3.3b.

Nach vollständigem Southern Blot waren keine Signale mehr detektierbar.

Aus den Restriktionsansätzen wurden jeweils 4  $\mu\text{g}$  DNA entsprechend 20  $\mu\text{l}$  Probenvolumen mit 5  $\mu\text{l}$  Ladungspuffer zu einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  ergänzt und auf ein 0,8%iges Agarosegel (200 ml) aufgetragen, welches zudem zwei Markeransätze aufwies. Zur Reproduzierbarkeit des Gellaufs wurden in jedem Blotgel zwei Längenstandards, die 1-kb-Ladder und der DIG-Molecular Weight Marker mitgeführt. Der eine Längenstandard enthielt 1  $\mu\text{l}$  der 1 kb DNA-Ladder, 11  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser sowie 3  $\mu\text{l}$  Ladungspuffer, der andere 5  $\mu\text{l}$

des DIG Molecular Weight Marker II, 7  $\mu$ l DEPC-Wasser sowie 3  $\mu$ l Ladungspuffer. Nach Auftrennen der Proben bei 60 V für 13 h wurde die 1 kb DNA-Ladder zur Kontrolle unter UV-Licht detektiert (s. Abb. 3.3.3a.).

Zur Verbesserung der Transfereffizienz langer DNA-Fragmente (>5 kbp), wurde die im Gel enthaltene DNA in 200 ml 250 mM HCl 10 min depurinisiert. Anschließend wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser gespült. Um die für die Hybridisierung notwendigen DNA-Einzelstränge zu erhalten, wurde das Gel 30 min in 200 ml Denaturalisierungslösung gegeben, kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend 30 min mit 200 ml Neutralisierungslösung behandelt. Schließlich wurde das Gel für 10 Minuten in 200 ml 20x SSC äquilibriert.

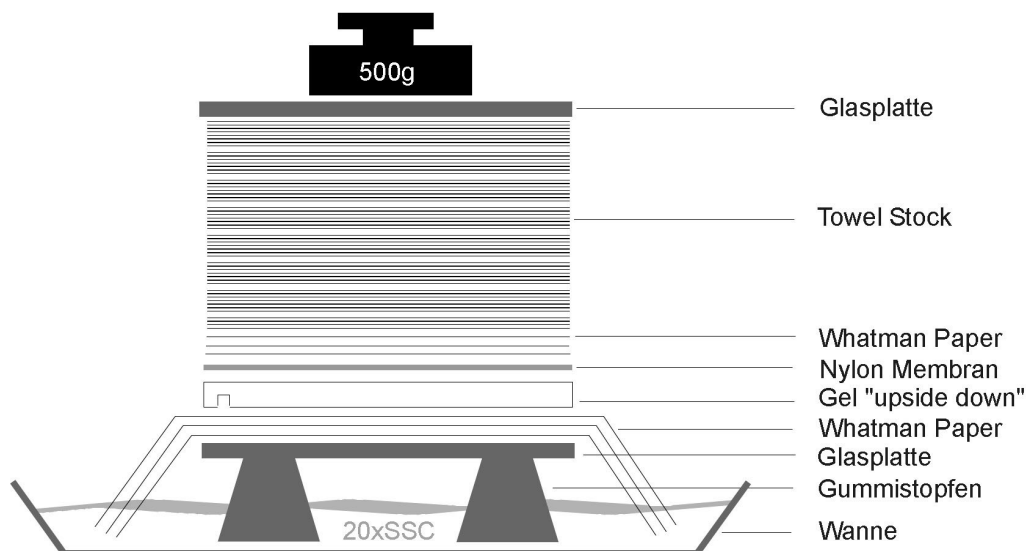


Abb. 3.3.4. Aufbau des Southern Blots.

Um den Transfer der DNA auf die Nylonmembran zu ermöglichen, wurde mit 3 Whatman 3MM Paper eine „Brücke“ über einen Wick gelegt, der sich in einer Wanne mit 20x SSC befand. Darauf wurde das Gel upside down gelagert und anschließend die auf die Größe des Gels zugeschnittene Nylonmembran und 3 Whatman 3MM Paper aufgelegt. Jede dieser Schichten schloss sich luftblasenfrei an die jeweils darunter befindliche Schicht an und wurde mit 20x SSC befeuchtet. Schließlich wurde ein Towel Stock und eine Glasplatte aufgelegt und mit ca. 500 g möglichst gleichmäßig beschwert.

Nach 12 h wurde das Blotten beendet. Zur Überprüfung der Bloteffizienz wurden die Ethidiumbromid-enthaltenden Gele vor und nach dem Southern

Blot unter UV-Licht visualisiert. Vor dem Blot waren die kurzen Restriktionsfragmente sichtbar, nach vollständigem Transfer der DNA auf die Nylonmembran waren keine Signale mehr erkennbar (s. Abb. 3.3.3b.).

Schließlich wurde die Membran 10 min in 200 ml 2x SSC gewaschen, zwischen zwei Sheets Whatman paper gelegt und noch in feuchtem Zustand zur DNA-Fixierung 30 min bei 120°C im Ofen gebacken.

### 3.3.4.5. Hybridisierung

Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurden jeweils 10 ml Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösung verwendet. Im Gegensatz zur Prähybridisierungslösung enthielt die Hybridisierungslösung 2,4 pmol/ml frisch denaturierte Telomer-Sonde. Zur Denaturierung wurde ein 24 pmol Sonde enthaltendes Aliquot mit DEPC-Wasser zu 50 µl ergänzt, 5 min bei 55°C im Wärmeblock inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Prähybridisierung, Hybridisierung und die folgenden Waschschrte wurden mit Hilfe einer Eigenkonstruktion bestehend aus Taumler, Heizplatte und Thermoisolierung aus Pappe und Styropor durchgeführt (s. Abb. 3.3.5.). Dazu wurden die Membranen mit der benötigten Lösung einzeln in Folie eingeschweißt und in der Hybridisierungskammer platziert.

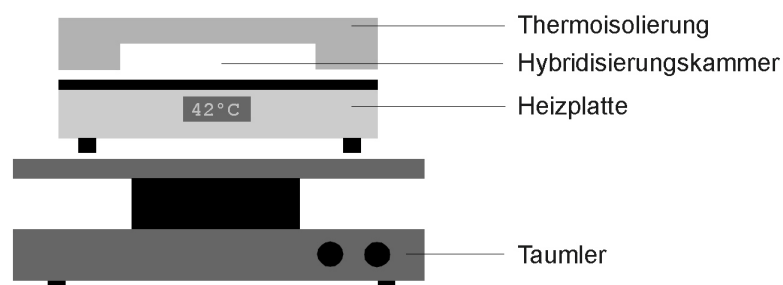


Abb. 3.3.5. Aufbau der Hybridisierungsvorrichtung.

Die Prähybridisierung für mindestens 30 min bei 42°C diente dem Äquilibrieren der Nylonmembran. Nach Austausch der Prähybridisierungs- gegen die auf 42°C vorgewärmte Hybridisierungslösung wurde mindestens 15-16 h bei 42°C unter ständiger Bewegung hybridisiert.

Zur Lösung möglicher Fehlpaarungen der Sonde, wurden die Membranen im Anschluss zweimal jeweils 15 min bei 42°C mit 2x SSC/0,1% SDS gewaschen. Danach folgten zwei je 5-minütige Waschschriffe in 2x SSC und Maleinsäurepuffer/0,1% Tween jeweils bei Raumtemperatur.

#### **3.3.4.6. Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente**

Um möglichst alle unbesetzten Bindungsstellen für den Antikörper zu maskieren und so ein günstiges Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund zu erzielen, wurden die Membranen mindestens 30 min in einer 1%-igen Blockierungslösung bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Aus selbigem Grund wurde auch der Antikörper 1:10000 in 1%-iger Blockierungslösung verdünnt. Die Membranen wurden mit 10 ml der Antikörper-Lösung in eine Folie eingeschweißt und mindestens 30 min unter Bewegung inkubiert. Überschüssiges Antikörperkonjugat wurde daraufhin durch zwei jeweils 15-minütige Waschschriffe in Maleinsäurepuffer/0,1% Tween bei Raumtemperatur entfernt.

Da zur Umsetzung des Chemilumineszenzsubstrates ein alkalischer pH-Wert erforderlich ist, wurden die Membranen 2 min in einem alkalischen Reaktionspuffer (Puffer 4, pH 9,5) äquilibriert. Anschließend wurde mit Hilfe eines handelsüblichen Sprühkopfs 10 Hübe entsprechend ca. 1 ml CDP-Star®-Lösung auf jeder Membran gleichmäßig verteilt, die Membranen mit dem Chemilumineszenzsubstrat einzeln in Folien eingeschweißt und 5 min im Dunkeln inkubiert.

Laut Hersteller erreicht das CDP-Star®-Signal bereits nach wenigen Minuten sein Maximum und bleibt darauf über mehrere Stunden konstant. Nach Entfernen des überschüssigen Substrates durch Einlegen der Membranen in neue Folien erfolgte die Filmexposition in Filmkassetten bei Raumtemperatur, wobei die Expositionszeiten zwischen 15 s und 4 min lagen.

#### **3.3.4.7. Auswertung und Berechnung der mittleren Restriktionsfragmentlängen**

In dieser Arbeit wurde die Blots mit einer Methode ausgewertet, die auf der Integration der Fläche unter der Kurve beruht<sup>138</sup>. Um die quantitative Überbewertung langer Restriktionsfragmente infolge Bindung mehrerer Sonden-



moleküle auszugleichen wurde zusätzlich eine Wichtung der Messwerte durchgeführt.

Die eingescannten Filme wurden densitometrisch ausgewertet (s. Abb. 3.3.6.). Mit Hilfe des Programmes *Telometric 1.2* (Fox Chace Cancer Center) wurde die mittlere Telomerlänge in einer Doppelbestimmung auf verschiedenen Blots ermittelt.

Folgende Maßnahmen trugen im Rahmen der Auswertung ebenfalls zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit bei. Um eine eventuelle Inhomogenität der Gele oder des Gellaufs auszugleichen wurde auf jedem Gel ein mit Digoxigenin gelabelter Längenstandard (DIG-Molecular Weight Marker II) mitgeführt. Weiterhin wurde für jeden Blot ein spezifisches Hintergrundsignal bestimmt, das gleichmäßig über die ganze Spur der Probe abgezogen wurde. Sowohl die Auswertung der Proben über die gesamte Länge und Spurbreite der Signale des Blots als auch die Tatsache, dass alle Blots auf einmal und von der gleichen Person ausgewertet wurden, trugen zur Standardisierung des Auswerteverfahrens bei<sup>139</sup>.

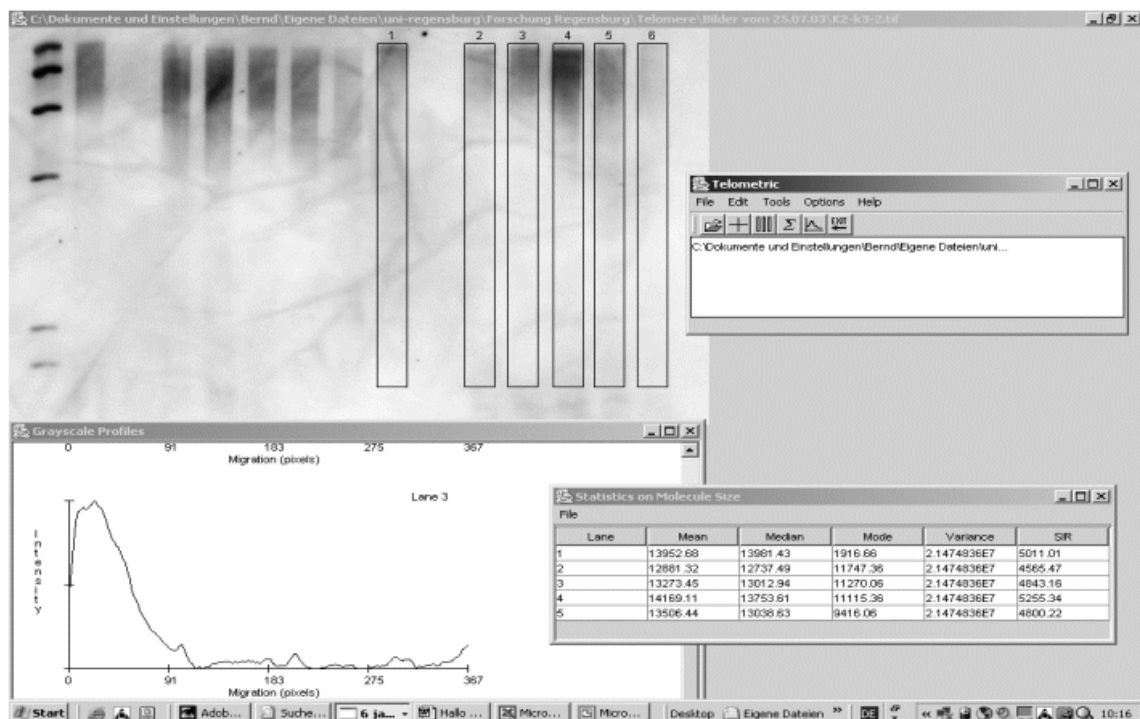


Abb. 3.3.6. Beispiel der Auswertung eines Southern Blots mit Hilfe des Programmes *Telometric 1.2* (Fox Chace Cancer Center)<sup>139</sup>

### **3.3.5. Analyse der Genexpression**

#### **3.3.5.1. RNA-Isolierung, DNase Verdau und Bestimmung der RNA-Konzentration**

##### RNA-Isolierung

In dieser Arbeit erfolgte die RNA-Isolierung mit Hilfe der weit verbreiteten RNAzol<sup>®</sup>-Methode. Um mögliche Änderungen der Genexpression durch das Abtrypsinieren zu vermeiden, wurde die RNA dabei direkt aus den Zellkulturflaschen isoliert.

Hierfür wurden die Zellkulturflaschen mit 10 ml PBS gespült und gründlich abgesaugt. Darauf wurden 2 ml RNAzol<sup>®</sup> in der Zellkulturflasche gut verteilt, die Zellen zusätzlich mit frischen Zellschabern vom Boden abgelöst und die Zellsuspension durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 2-ml-Einmalpipette homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat gleichmäßig auf zwei Eppendorf-Cups (A- und B-Probe) verteilt, 100 µl (0,1 VT) Chloroform hinzugefügt und 15 s per Hand stark geschüttelt. Durch eine 15-minütigen Zentrifugation bei 12.000g und 4°C bildeten sich zwei Phasen, von denen die untere blaue organische Phenol-Chloroform-Phase Proteine und DNA enthielt, während sich in der oberen farblosen wässrigen Phase die RNA befand. Aus dieser Phase wurden ca. 500 µl abpipettiert und mit dem gleichen Volumen (1 VT) Isopropanol durch mehrmaliges Aufziehen in der Pipettenspitze vermischt. Anschließend wurden die Proben mindestens 45 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie 15 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert und die Überstände entfernt wurden. Zur Reinigung der RNA wurden die Pellets in 800 µl 75%-igem Ethanol durch Vortexen resuspendiert. Nach einer 8-minütigen Zentrifugation bei 7500g wurden die Überstände entfernt, die RNA maximal 90 min luftgetrocknet und schließlich in 16 µl DEPC-Wasser gelöst.

##### DNase Verdau

Um eventuell verbliebene DNA-Reste zu eliminieren, wurden die Proben im Anschluss an die Isolierung einem DNase Verdau mittels DNA-free<sup>™</sup> Kit zugeführt. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

Zu den 16 µl Probevolumen wurden jeweils 2 µl 10x DNase I Buffer und 2 µl rDNase I hinzugefügt. Nach einem 30-minütigen Verdau bei 37°C erfolgte die Zugabe von 5 µl frisch resuspendiertem DNase Inactivation Reagent, worauf

die Proben zwei Minuten unter gelegentlichem Vortexen bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 10000g abzentrifugiert und der die RNA enthaltende Überstand in ein neues Cup überführt.

#### Messen der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

Da die Absorptionsspektrometrie nur im Bereich zwischen 0,1 und 1 OD (optische Dichte), entsprechend einer Nukleinsäurekonzentration von 5-50 µg pro ml, zuverlässige Ergebnisse liefert, wurden die Proben mit TE-Puffer 1:35 verdünnt. Anschließend wurde die Absorption in Einmalküvetten bei  $\lambda = 260$  nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Die DNA-Konzentration der Probe wurde aus dem Mittelwert der durchgeführten Doppelbestimmung berechnet.

Als Anhalt für die Reinheit der isolierten DNA dienten der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  sowie der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{230}$ , die so genannten Ratios. Diese sollten bestenfalls über 1,8 liegen. Werte  $< 1,6$  deuten auf eine Kontamination der Probe mit Phenolresten oder Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 280$  nm bzw. 230 nm liegt, hin. Eine Ratio  $A_{260}/A_{280}$  größer als 2,1 könnte ein Hinweis für eine Denaturierung der RNA sein.

#### **3.3.5.2. Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung wurden in der Gelelektrophorese Integrität und Reinheit der isolierten RNA überprüft.

Hierfür wurden Gele mit 0,8% Agarose in 1x TBE-Puffer verwendet (Herstellung siehe 3.3.4.2.).

Die 2 µl Probevolumen wurden mit 6,5 µl DEPC-Wasser zu 8 µl ergänzt und 10 min bei 65°C erhitzt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Nach 2-minütigem Kühlen auf Eis, wurden 1,5 µl RNA-Sample-Loading-Buffer zugegeben und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Laut Hersteller enthält der spezielle Ladungspuffer Formalin zur Inaktivierung von RNasen und Formamid zur Stabilisierung der RNA-Einzelstränge.

Die Elektrophoresebedingungen waren 100 V (6,67 V/cm) für 1,5-2 h.

Die Detektion der RNA erfolgte im UV-Licht. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert bevorzugt neben CG-Basenpaaren und wird durch Bestrahlung mit

UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) zur Emission von Licht ( $\lambda = 500\text{-}590 \text{ nm}$ ) angeregt, was zur Dokumentation photographiert wurde (s. Abb. 3.3.7.)

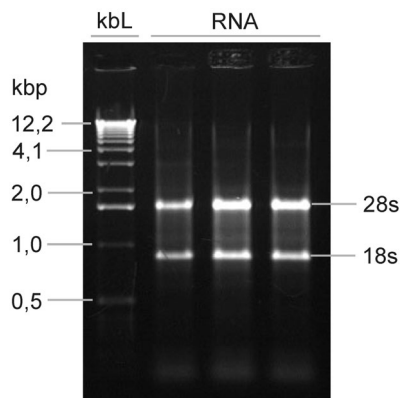


Abb. 3.3.7. Nicht degradierte RNA zeigte nach gelelektrophoretischer Auftrennung typischerweise die 18s- und die 28s-Bande.

**kbL:** Kilobasenladder; **kbp:** Kilobasenpaare.

### 3.3.5.3. cDNA-Herstellung

Um die Genexpression im Light-Cycler analysieren zu können, mussten die RNA-Proben in cDNA transkribiert werden. Zur cDNA-Synthese wurde das Enzym SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> benutzt, eine aus *E.coli* isolierte reverse Transkriptase, die das *pol* Gen des *Moloney Murine Leukemia Virus* enthält<sup>140-141</sup>. Dieses Enzym synthetisiert cDNA-Einzelstränge mit einer Länge von bis zu 12,3 kbp.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Doppelansatz, wobei pro Ansatz 2 µg RNA eingesetzt wurden.

Zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen wurden DEPC-Wasser, der Primer Oligo(dT) sowie die Nukleotide ATP, TTP, GTP und CTP (dNTPs) stets in Portionen à 10 µl aliquotiert.

Ein 2 µg RNA enthaltendes Aliquot wurde zusammen mit 1 µl Oligo(dT) sowie 1 µl dNTPs mit Wasser auf 12 µl ergänzt, 5 min bei 65°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurde den Proben auf Eis 4 µl 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) und 2 µl 0,1 M DTT hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 42°C erhitzt und 1 µl reverse Transkriptase (SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase) zugegeben. Nach einer Inkubation für 1 Stunde bei 42°C, wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

Die beiden Reaktionsansätze wurden gepoolt und die cDNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt (vgl. 3.3.2.1).

### 3.3.5.4. PCR

Die PCR wurde unter Verwendung spezifischer Primer für die humanen Proteine TRF1 (5'- AAT GAA GGC AGC GGC AAA AG -3' und 5'- AGT TAC CGC AGA CTG TTT GTC -3'), TRF2 (5'- AGG CAG CTA CGG AAT CCT C -3' und 5'- GGG CTG AAC TTT CGT TTT CAT CT -3'), p21 (5'- CCT GTC ACT GTC TTG TAC CCT -3' und 5'- GCG TTT GGA GTG GTA GAA ATC T -3'), XRCC5 (5'- GAC GTG GGC TTT ACC ATG AGT -3' und 5'- TCA GTG CCA TCT GTA CCA AAC -3'), SIRT1 (5'- CGC TGG CCG ACA ACT TGT A -3' und 5'- CAT GTG AGG CTC TAT CCT CCT -3') und GAPDH (5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C -3' und 5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3') im Light-Cycler® gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt.

Ein 20 µl Ansatz bestand aus 2 µl Probe, die 0,5 µg cDNA enthielt, und 18 µl Master-Mix. Abhängig von der optimalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration fiel die Zusammensetzung des Master-Mix von Primer zu Primer unterschiedlich aus (s. Tab.3.3.1.).

	TRF1	TRF2	P21	XRCC5	SIRT1	GAPDH
Primer	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
FastStart	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl (4mM)	1,6 µl (3mM)	1,6 µl (3mM)	1,6 µl (3mM)	0,8 µl (2mM)	1,6 µl (3mM)
H <sub>2</sub> O	13,2 µl	14 µl	14 µl	14 µl	14,8 µl	14 µl

Tab.3.3.1.: Zusammensetzung der unterschiedlichen Master-Mixe.

Für die Negativkontrolle wurde anstatt der cDNA-Probe 2 µl Wasser zugegeben. Nach Hinzufügen des Fast Starts, wurden die Ansätze in einer Dunkelbox weiterbearbeitet und schließlich als Dreifachbestimmung zusammen mit Standardansätzen im Light-Cycler® analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Pfaffl-Methode<sup>142</sup>.

### **3.3.6. Statistik**

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS® 17.0 for Windows verwendet.

Mit der Methode der linearen Regression und der Korrelationsanalyse nach Pearson wurden Zusammenhänge zwischen zwei Messgrößen untersucht. Um mögliche statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen festzustellen, wurde der T-Test angewandt. Die Kontrolle der Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit einem Signifikanzniveau nach Lilliefors und dem Shapiro-Wilk-Test.

Bei einem  $p < 0,05$  wurde die Korrelation bzw. der Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen als signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Etablieren und Optimieren des TRF-Assay

Die Bestimmung der Telomerlänge mittels TRF-Assay ist eine technisch anspruchsvolle und zeitaufwändige Methode<sup>139</sup>. Aufgrund der Tatsache, dass etwaige Fehler erst im Chemilumineszenzsignal auf dem Röntgenfilm sichtbar werden, war es unerlässlich die im Regensburger Tissue Engineering Labor bereits etablierte Methode weiterzuentwickeln und durch spezielle Kontrollschritte zu validieren. Ein ganz erhebliches Problem in der Etablierung des TRF-Assays war die große Menge an benötigter DNA.

#### 4.1.1. Etablieren und Optimieren der DNA-Isolierungsmethode

Diesbezüglich wurden neben der effektiven aber zeitaufwändigen Phenol-Chloroform Standardmethode<sup>139</sup> zwei weitere Methoden zur DNA-Isolierung getestet: Die DNA-STAT 60<sup>TM</sup>-Methode der Firma Tel-test Inc. und das High Pure PCR Template Preparation Kit<sup>®</sup> von Roche<sup>®</sup>.

Die DNA-STAT 60<sup>TM</sup>-Methode basiert auf einem monophasischen Reagenz welches ähnlich wie RNAzol<sup>®</sup> aus einer chaotropischen Komponente zur Zelllyse und einer phenolfreien Extraktionskomponente besteht. Besonders reizvoll an dieser Methode schien die mögliche DNA-Extraktion aus der im Zuge der RNA-Isolierung entstandenen organischen Phase (siehe 3.3.5.1), welche gewöhnlich mit der darin enthaltenen DNA komplett verworfen wird. Mit dieser so genannten reversen Extraktion wäre es also möglich, RNA und DNA aus der gleichen Zelle zu gewinnen, was durch die eingesparte Zellkultur eine erhebliche Minderung von Zeitaufwand und Kosten mit sich brächte. Trotz dieser viel versprechenden Aussicht war die DNA-STAT 60<sup>TM</sup>-Methode aufgrund geringer Ausbeute und mangelnder Reinheit ungeeignet für den TRF-Assay und wurde zu Gunsten der Säulchenmethode der Firma Roche<sup>®</sup> aufgegeben.

Aufgrund der guten Ausbeute, des geringen Zeitaufwands und der wesentlich höheren Reinheit der isolierten DNA stellte sich das High Pure PCR Template Preparation Kit<sup>®</sup> von Roche<sup>®</sup> als beste der getesteten Methoden dar (siehe 3.3.4.1.). Zur Optimierung der Methode wurden verschiedene Zellzahlen pro

Säulchen getestet, wobei sich bei einer Zellzahl von 500.000 pro Säulchen die beste Ausbeute zeigte. Durchschnittlich ließen sich aus 500.000 MSCs und einem Säulchen etwa 10-15 µg DNA gewinnen. Die Integrität der isolierten DNA wurde in der Gelelektrophorese validiert. Neben der standardmäßigen photometrischen Probenvermessung wurde die Reinheit der Proben zusätzlich mittels Picodrop™ überprüft.

#### **4.1.2. Optimieren von Hybridisierung und Detektion**

Auch in der Hybridisierung und Detektion der DNA Fragmente konnten einige Teilschritte optimiert werden. So wurde anstatt eines Hybridisierungsofens eine Eigenkonstruktion aus Taumler, Heizplatte und Wärmeisulationsmaterial (s. Abb. 3.3.5.) verwendet. Damit konnten nicht nur logistische Probleme umgangen werden, durch das nun erforderliche Einschweißen der Membranen in Plastiktüten war zudem eine wesentlich geringere Menge an Reaktionslösungen notwendig, was wiederum die mitunter erheblichen Kosten für Sonde und Reagenzien reduzierte.

Zu Beginn der Etablierungsphase des TRF-Assays wurde das zur Detektion notwendige Chemilumineszenzsubstrat gleichmäßig per Pipette auf den Membranen verteilt. Trotz eingehender Sorgfalt fiel nach Entwicklung des Röntgenfilms stets eine relativ inhomogene Verteilung des Signals auf. Versuchsweise wurde das Chemilumineszenzsubstrat mit einem handelsüblichen Sprühkopf aufgetragen. Im Vergleich zur Standardmethode zeigte sich nach Entwicklung eine wesentlich höhere Homogenität des Chemilumineszenzsignals.



## 4.2. Viabilitätsbestimmung nach ansteigenden $H_2O_2$ -Dosen

Zur annähernden Bestimmung der letalen  $H_2O_2$ -Dosis wurden MSCs für 2 Stunden ansteigenden  $H_2O_2$ -Dosen (0  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 250  $\mu M$ , 500  $\mu M$ ) ausgesetzt. Nach einer Regenerationsphase von 24 h erfolgte die Viabilitätsbestimmung mittels Live/Dead<sup>®</sup>-Kit. Das Zytoplasma lebender Zellen erschien dabei unter dem Fluoreszenzmikroskop grün, während sich die Zellkerne toter oder beschädigter Zellen rot färbten.

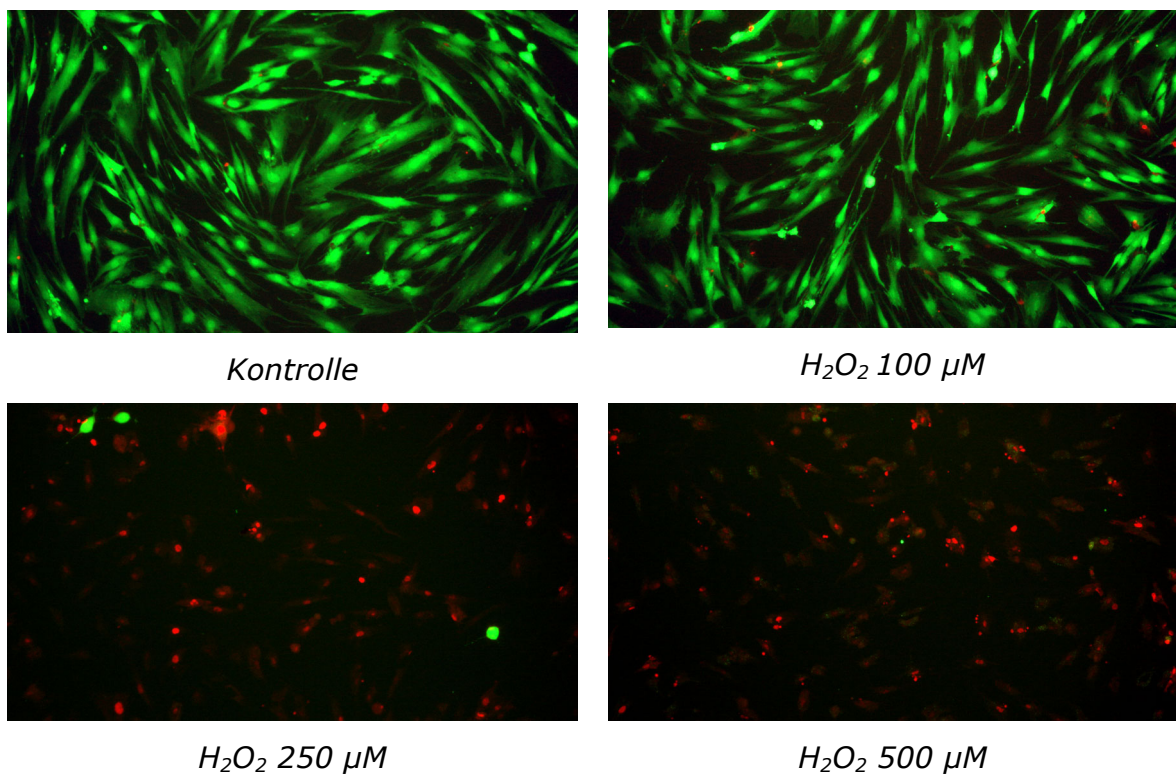
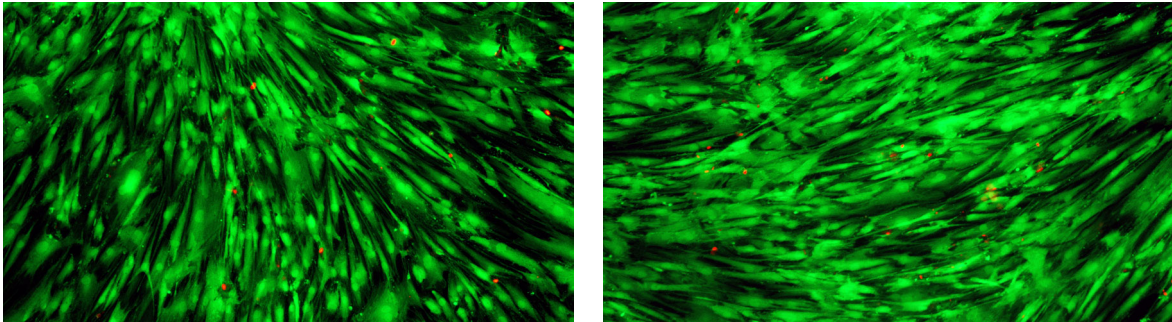


Abb. 4.2.1. Viabilität mesenchymaler Stammzellen (LN 527-2) 2h nach akuter Exposition mit ansteigenden  $H_2O_2$ -Dosen. Fluoreszenzmikroskop; 10.000-fache Vergrößerung;

Die Anzahl beschädigter Zellen war bei einer  $H_2O_2$ -Konzentration von 100  $\mu mol/l$  im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig erhöht. Dagegen blieben bei einer Konzentration von 250  $\mu mol/l$  nur vereinzelt Zellen am Leben. Die Konzentration von 500  $\mu mol/l$  war für alle MSCs letal. Der Versuch wurde mit MSCs verschiedener Spender wiederholt. Obwohl in den einzelnen Primärzellkulturen durchaus interindividuelle Unterschiede bezüglich der  $H_2O_2$ -Empfindlichkeit imponierten, blieben nach einer Exposition mit 100  $\mu mol/l$   $H_2O_2$

so gut wie alle Zellen am Leben, während eine Dosis von 250  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  fast ausnahmslos den Zelluntergang zur Folge hatte.



*Kontrolle*

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu\text{M}$  chronisch*

*Abb. 4.2.2. Viabilität mesenchymaler Stammzellen (LN 511-2) nach chronischer Exposition mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Fluoreszenzmikroskop; 10.000-fache Vergrößerung;*

Um den Einfluss einer chronischen Stressexposition auf die Viabilität von MSCs zu überprüfen, wurden Zellen eine Woche mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  enthaltendem Medium kultiviert. Ein einmaliger Medienwechsel erfolgte nach 3 Tagen. Nach 7 Tagen wurde die Viabilität mittels Live/Dead<sup>®</sup>-Kit bestimmt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich eine lediglich geringfügig erhöhte Anzahl beschädigter oder toter Zellen in der chronischem Stress ausgesetzten Gruppe.

### **4.3. Analyse der Zellproliferation**

#### **4.3.1. Analyse der Zellproliferation mesenchymaler Stammzellen**

Für diesen Versuchsteil wurden fünf Primärzellkulturen von verschiedenen Spendern über 5 – 8 Passagen kultiviert. Die Populationsverdopplungen der einzelnen Primärzellkulturen wurden, wie in 3.3.1.3. beschrieben, bestimmt und gegen die Kultivierungsdauer in Tagen aufgetragen.

Auffällig war das interindividuell abweichende Proliferationsverhalten der einzelnen Primärzellkulturen. Während beispielsweise LN 312 nach 5 Passagen das Wachstum einstellte und damit nur auf insgesamt 5,42 kumulative Populationsverdopplungen kam, erreichte LN 531 über 8 Passagen 19,66

Populationsverdopplungen. Die geringste Proliferationsgeschwindigkeit wies LN 585 mit 5,34 cpd/100 Tage auf, während LN 531 mit 10,75 cpd/100 Tagen eine mehr als doppelt so hohe Proliferationsgeschwindigkeit erreichte. Das individuelle Proliferationsverhalten war dabei unabhängig vom Alter des Spenders.

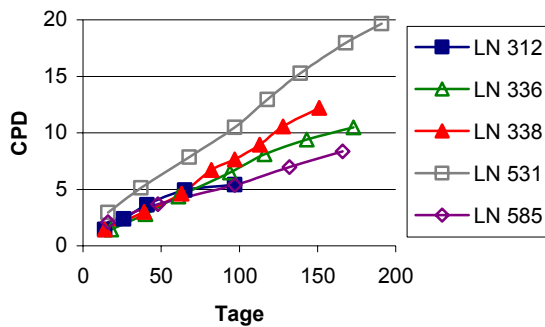


Abb. 4.3.1.a.

Vergleich des Proliferationsverhaltens von 5 verschiedenen MSC Primärkulturen.

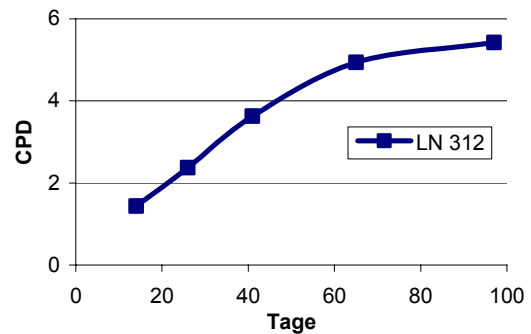


Abb. 4.3.1.b.

Typisches Proliferationsverhalten mesenchymaler Stammzellen am Beispiel der Primärzellkultur LN 312.

Insgesamt erreichten die MSCs eine durchschnittliche Proliferationsgeschwindigkeit von 8,08 cpds in 100 Tagen bei einem mittels Regressionsanalyse ermittelten Bestimmtheitsmaß von 0,77. Die Korrelationsanalyse nach Pearson lieferte für die Kontrollgruppe einen Korrelationskoeffizient von 0,881, woraus sich eine signifikante Korrelation zwischen der kumulativen Populationsverdopplung und der Kultivierungsdauer ergab ( $p < 0,001$ ).

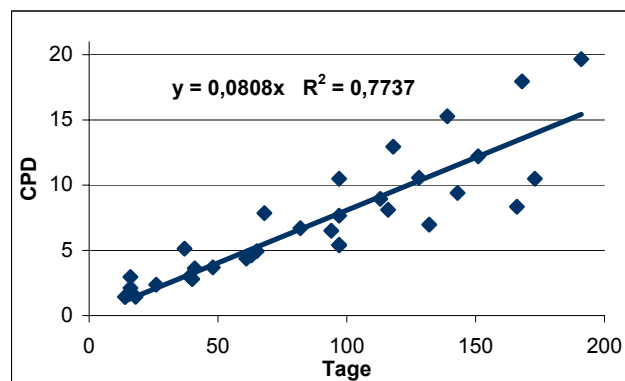


Abb. 4.3.2. Proliferationsverhalten mesenchymaler Stammzellen.

### 4.3.2. Analyse der Zellproliferation nach akutem Stress

Hierfür wurden zwei MSC Primärzellkulturen von unterschiedlichen Spendern in jeweils eine Kontrollgruppe und eine akute Gruppe aufgeteilt. In der akuten Gruppe erfolgte die Exposition mit einer subletalen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosis ( $150 \mu\text{mol/l}$ ) für 2h. Nach einer Regenerationsphase von 24 h wurden die Zellen 1:3 gesplittet und für 4 Wochen kultiviert.

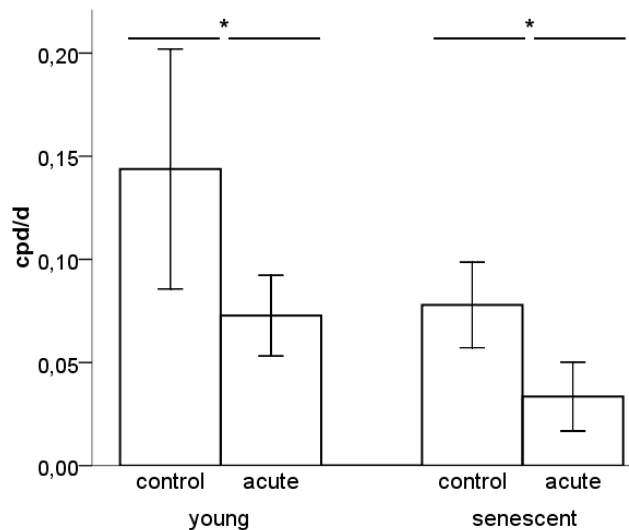


Abb. 4.3.3. Proliferationsgeschwindigkeit junger und alter mesenchymaler Stammzellen nach akuter Stressexposition im Vergleich zur Kontrolle.

Der Versuch wurde jeweils mit jungen und präseneszenten MSCs durchgeführt. Zur Analyse der Zellproliferation wurden wiederum die Populationsverdopplungen gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen. Bei jungen mesenchymalen Stammzellen zeigte sich ein Rückgang der Proliferationsgeschwindigkeit nach akuter Stressexposition von 13,98 cpd/100d auf 6,42 cpd/100d. Bei alten MSCs fiel der Proliferationsgeschwindigkeitsabfall von 7,79 cpd/100d auf 3.34 cpd/100d sogar noch höher aus. Insgesamt zeigte sich bei jungen und alten MSCs ein signifikanter Abfall der Proliferationsgeschwindigkeit nach akuter Stressexposition ( $p = 0,04$ ).

### 4.3.3. Analyse der Zellproliferation unter chronischem Stress

Es wurden fünf Primärzellkulturen von unterschiedlichen Spendern in jeweils eine Kontrollgruppe und eine Gruppe unter chronischem Stress aufgeteilt und über 5 - 8 Passagen kultiviert. Die Populationsverdopplungen wurden wiederum gegen die Kultivierungsdauer in Tagen aufgetragen.

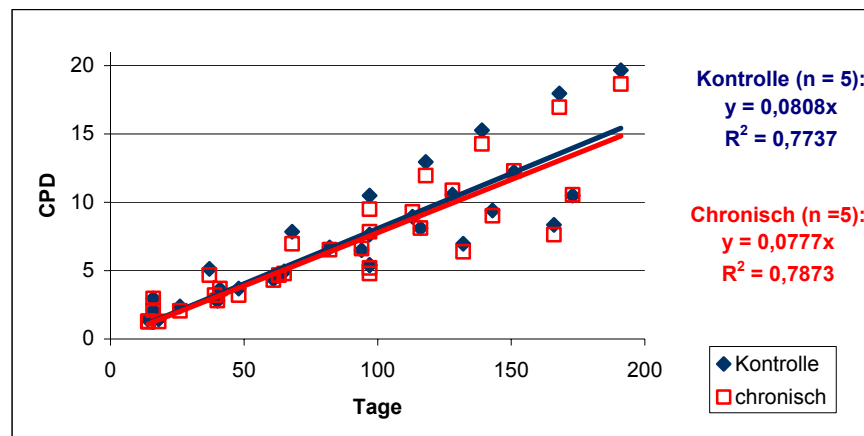


Abb. 4.3.4. Vergleich des Proliferationsverhaltens von Kontrollgruppe und chronischer Gruppe; **n**: Anzahl; **R<sup>2</sup>**: Bestimmtheitsmaß; **y = mx**: Gleichung der Regressionsgeraden;

Nach 5 – 8 Passagen erreichten die Kontrollgruppen 5,42 – 19,66 kumulative Populationsverdopplungen (cpd) während die unter chronischem Stress kultivierten MSCs auf 5,20 bis 18,66 Populationsverdopplungen kamen. Mit 8,08 cpd/100 Tagen lag die Proliferationsgeschwindigkeit der Kontrollgruppe geringfügig höher als die der chronischen Gruppe mit 7,77 cpd/100 Tagen. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die chronische Gruppe betrug 0,79, gegenüber 0,77 in der Kontrollgruppe.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Proliferationsgeschwindigkeiten von Kontrolle und chronischer Stress Gruppe ( $p = 0,148$ ).

Die Korrelationsanalyse nach Pearson lieferte für die Kontrollgruppe einen Korrelationskoeffizient von 0,881 und für chronische Gruppe von 0,889, woraus sich für beide Zellarten eine signifikante Korrelation zwischen der kumulativen Populationsverdoppelung und der Kultivierungsdauer ergab ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4. Analyse der Zellmorphologie

Die Morphologie junger mesenchymaler Stammzellen wird als spindelförmig und fibroblastenähnlich beschrieben. Charakteristisch ist also ein relativ heller, ovaler Zellkern mit deutlichem Nukleolus, ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum sowie multiple zytoplasmatische Ausläufer zur Ausbildung von Zellkontakten. Mit zunehmender Seneszenz fallen typische morphologische Veränderungen wie eine progrediente Abflachung der Zelleiber, Größenzunahme, Verlust der Zellausläufer und die Akkumulation zytoplasmatischer Einschlusskörperchen auf<sup>136</sup>.

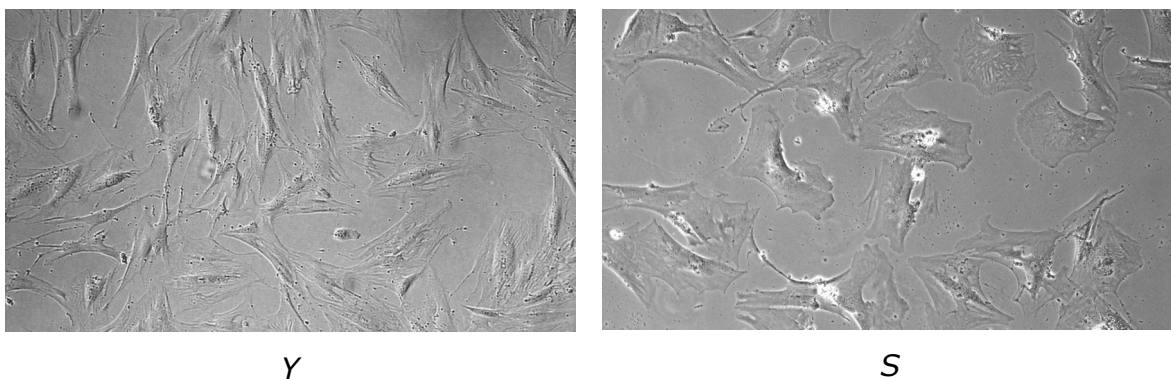
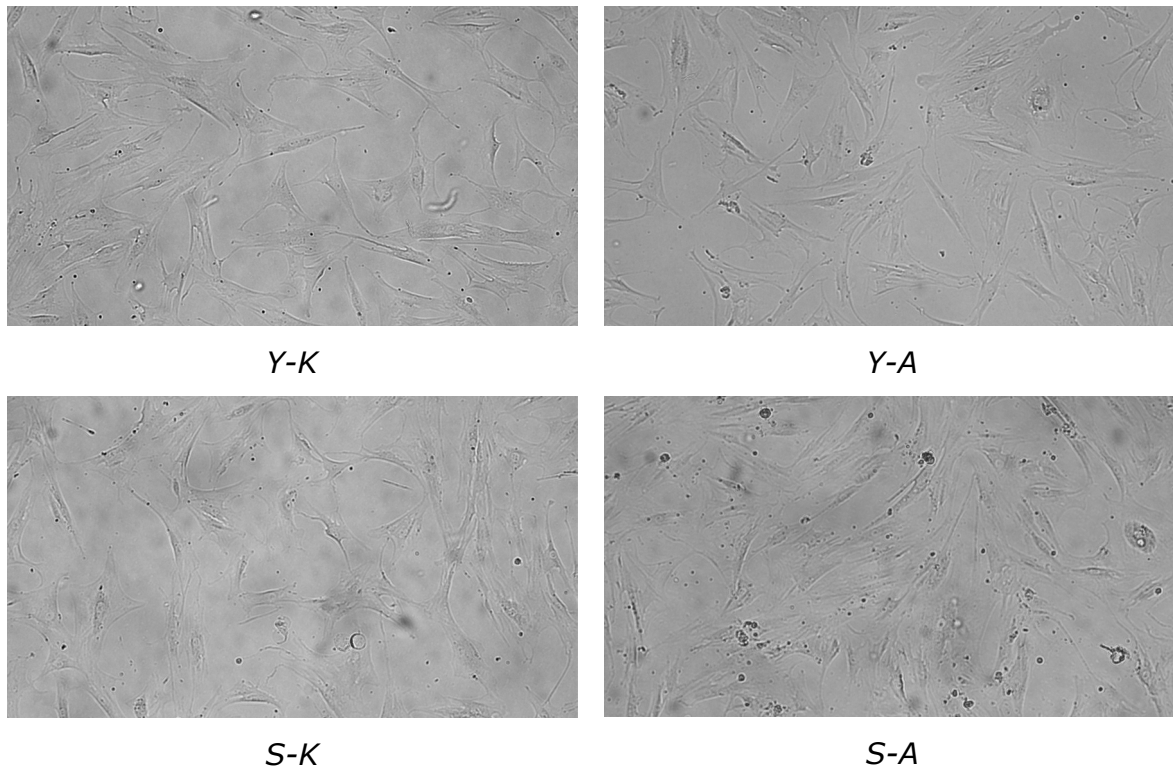


Abb. 4.4.1. Typische Morphologie junger (Y) und seneszenten (S) MSCs. Beim seneszenten Phänotyp fallen abgeflachte Zelleiber, Größenzunahme, Verlust der Zellausläufer und die Akkumulation zytoplasmatischer Einschlusskörperchen auf. Y: LN 531-2 K; S: LN 312-6 K; 10.000-fache Vergrößerung mit Phasenkontrast

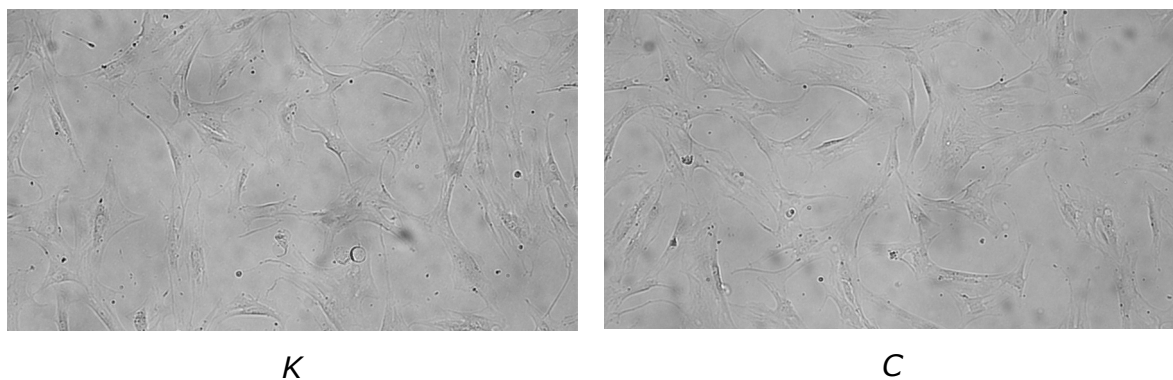
Nach Exposition junger MSCs mit subletalen  $H_2O_2$ -Dosen (100  $\mu M$  bzw. 150  $\mu M$ ) zeigten sich mit einer tendentiellen Vergrößerung und Verplumpung der Zelleiber ebenfalls seneszenztypische morphologische Veränderungen. Das Auftreten seneszenztypischer morphologischer Veränderungen nach akuter Stresseinwirkung konnte in allen Primärzellkulturen nachvollzogen werden, die Ausprägung der Veränderungen war jedoch interindividuell sehr unterschiedlich. Präsenescente MSCs zeigten nach akuter  $H_2O_2$ -Exposition wesentlich ausgeprägtere Veränderungen als junge Zellen.





*Abb. 4.4.2. Vergleich der Morphologie junger und präseneszenten MSCs nach akuter Stresseinwirkung mit der Kontrollgruppe. In den Akut-Gruppen fallen seneszenztypische Veränderungen mit altersabhängiger Ausprägung auf. Y-K/A: LN 531-3 Kontrolle/Akut; S-K/A: LN 531-8 Kontrolle/Akut; 10.000-fache Vergrößerung;*

Nach chronischer Exposition mit niedrigen  $H_2O_2$ -Dosen ( $10 \mu\text{mol/l}$ , alle 3-4d) zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe wenig bis keine Unterschiede in der Ausprägung der seneszenztypischen Morphologie.



*Abb. 4.4.3. Vergleich der Morphologie unter chronischem Stress kultivierter MSCs mit der Kontrollgruppe. Es fallen kaum morphologische Unterschiede auf. K/C: LN 531-8 Kontrolle/Chronisch; 10.000-fache Vergrößerung;*

## 4.5. Analyse der SA $\beta$ -Galactosidase Expression

Das seneszenzspezifische Enzym  $\beta$ -Galactosidase wurde mittels X-Gal-Färbung nachgewiesen. Dabei färbten sich  $\beta$ -Galactosidase positive Zellen durch eine im Substrat enthaltene Indigo-Komponente blau. Erwartungsgemäß zeigten junge Zellen nur eine marginale  $\beta$ -Galactosidase-Expression (< 10 %). Dagegen waren bei seneszenten MSCs mehr als 80 % der Zellen  $\beta$ -Galactosidase-positiv. Bei jungen MSCs nach akutem Stresseinfluss konnte ähnlich wie bei den seneszenten Artgenossen in über 70% der Zellen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei MSCs, die unter chronischem Stresseinfluss kultiviert wurden, tendentiell eine leicht erhöhte  $\beta$ -Galactosidase-Expression (> 90%).

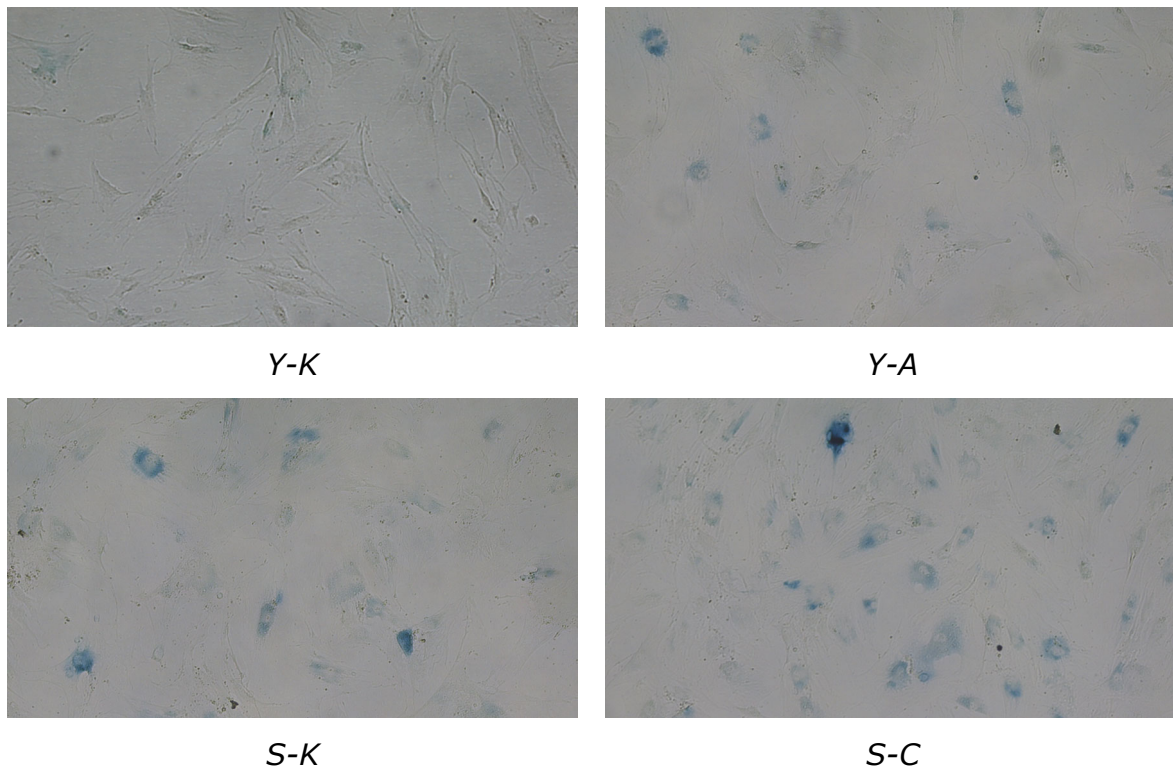


Abb. 4.5.1. Vergleich der  $\beta$ -Galactosidase-Expression junger MSCs (Y-K), junger MSCs nach akuter Stresseinwirkung (Y-A), seneszenten MSCs (S-K) und präseneszenten MSCs kultiviert unter chronischer Stresseinwirkung (S-C). Y-K/A: LN 531-3 Kontrolle/Akut; S-K/C/A: LN 531-8 Kontrolle/Chronisch; 10.000-fache Vergrößerung;



## 4.6. Analyse der Telomerlänge

### 4.6.1. Telomerlänge zunehmend seneszenten mesenchymaler Stammzellen

Um die Telomerlänge von insgesamt fünf über 5 bis 8 Passagen kultivierten MSC-Primärkulturen zu analysieren, wurden 33 DNA-Proben, die die in 4.1.1. festgelegten Kriterien der Reproduzierbarkeit erfüllten, mittels TRF-Assay analysiert. Dabei wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte der berechneten MSC-Telomerlängen als Funktion der Zellpopulationsverdopplungen aufgetragen.

Die mittleren TRF-Längen zu Beginn der Kulturen lagen zwischen 12,6 kbp und 10,4 kbp (MW  $\pm$  SD: 12037 bp  $\pm$  1351 bp). Die Telomerlängen nahmen über die gesamte Versuchszeit im Mittel um etwa 2,1 kbp (MW  $\pm$  SD: 2090 bp  $\pm$  990 bp) pro Populationsverdoppelung auf Werte zwischen 8,1 kbp und 10,4 kbp (MW  $\pm$  SD: 9947 bp  $\pm$  1030 bp) ab.

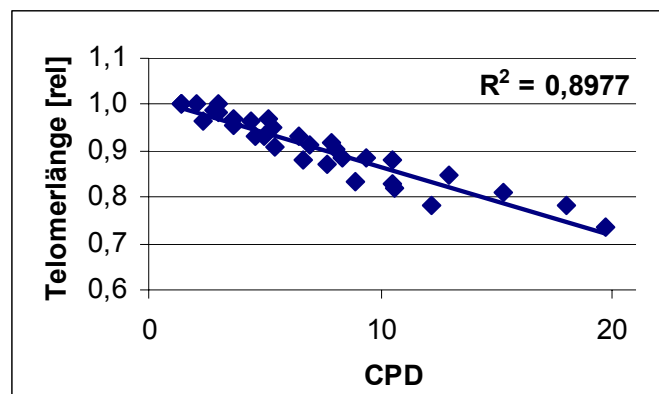


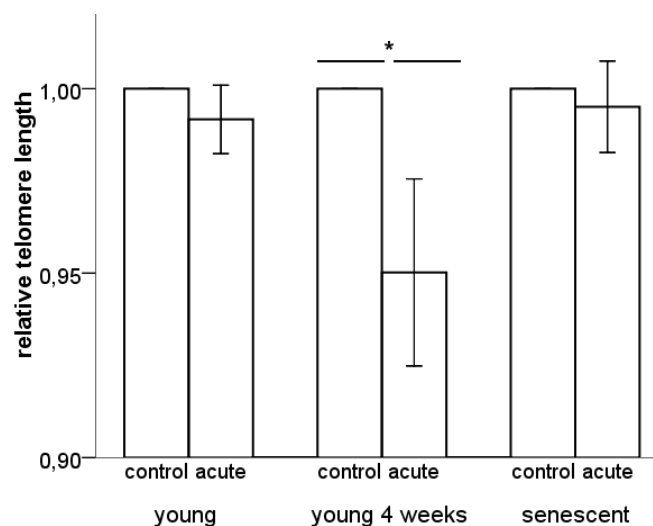
Abb. 4.6.1. Relative Telomerlänge zunehmend seneszenten MSCs.  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß.

Da die Heterogenität der Ausgangstelomerlängen der einzelnen Primärzellkulturen den Vergleich der Telomerlängenabnahme erschwerte, wurden die gemessenen absoluten Restriktionsfragmentlängen auf die Anfangslänge der jeweiligen Zelllinie bezogen und die so erhaltenen relativen Telomerlängen gegen die Populationsverdoppelungen aufgetragen (Abb. 4.6.1b.). Mittels linearer Regressionsanalyse ergab sich eine mittlere Telomerverkürzung um ca. 1,84 % der Ausgangslänge pro Populationsverdoppelung, wobei das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  0,90 betrug. Der nach Pearson

ermittelte Korrelationskoeffizient  $r$  ergab 0,947, was eine signifikante Korrelation zwischen der Telomerverkürzung und der Populationsverdoppelung bedeutete ( $p < 0,001$ ).

#### 4.6.2. Einfluss von akutem Stress auf die Telomerlänge junger und seneszenten MSCs

Um den Einfluss von akutem Stress auf die Telomerlänge zu analysieren, wurden konfluente junge und seneszente Zellen aus fünf verschiedenen Primärzellkulturen für 2h mit 100  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (LN312, 336, 338) bzw. 150  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (LN531, 585) inkubiert und nach 24h (LN312, 336, 338) bzw. 4 Wochen (LN531, 585) wurden DNA-Proben entnommen und mittels TRF-Assay analysiert.



#### 4.6.2. Relative Telomerverkürzung junger und präseneszenten mesenchymaler Stammzellen 24h und 4 Wochen nach akuter oxidativer Stresseinwirkung.

Nach 24 h zählte die mittlere Telomerlänge in der Kontrollgruppe 11,2 kbp bei jungen und 9,6 kbp bei präseneszenten Zellen gegenüber 11 kbp bzw. 9,5 kbp in den Akutgruppen, was einer relativen Telomerverkürzung von 2 % bei jungen und 1 % bei präseneszenten MSCs entspricht. Damit war die Telomerverkürzung 24 h nach akuter Stresseinwirkung sowohl bei jungen ( $p = 0,098$ ) als auch bei seneszenten ( $p = 0,239$ ) MSCs nicht signifikant.

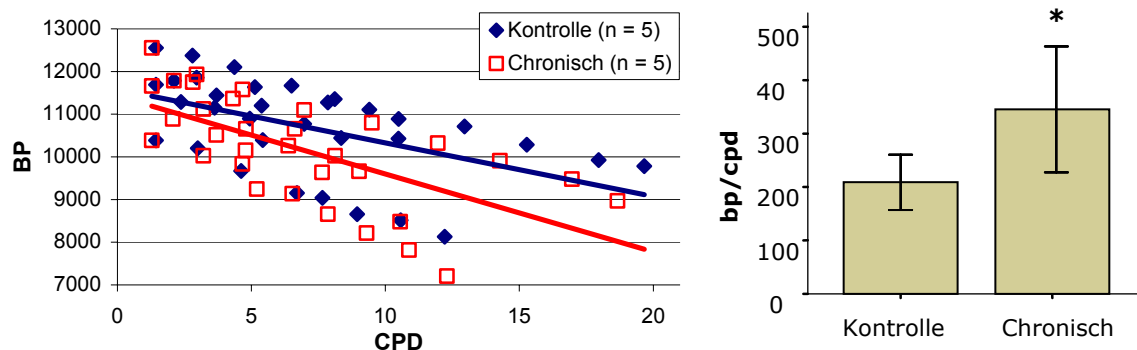
Nach 4 Wochen hatten sich die Telomere der Kontrollgruppe von durchschnittlichen 11,2 bp auf 10,3 bp verkürzt. Die mittlere Telomerlänge in

der Akut-Gruppe hingegen betrug 9,6 bp. Dies entspricht einer signifikanten Telomerverkürzung der Akutgruppe sowohl im Vergleich zur 24h-Kontrolle ( $p = 0,012$ ) als auch im Vergleich zur Kontrolle nach 4 Wochen ( $p = 0,039$ ). Die relative Telomerverkürzung der Akutgruppe im Vergleich zur Kontrolle nach 4 Wochen betrug 6 % und war mit einem p-Wert von 0,034 ebenfalls signifikant.

#### 4.6.3. Einfluss von chronischem Stress auf die Telomerlänge zunehmend seneszenter MSCs

Zur Analyse des Einflusses von chronischem oxidativen Stress auf mesenchymale Stammzellen wurden fünf Primärzellkulturen in jeweils eine Kontrollgruppe und eine chronische Gruppe gesplittet und bis zur Seneszenz kultiviert. Bei ansonsten identischen Kulturbedingungen enthielt das Medium der chronischen Gruppe eine Wasserstoffperoxidkonzentration von  $10 \mu\text{M}$ . Die DNA-Probenentnahme erfolgte bei Passage. Insgesamt wurden in Kontroll- und chronischer Gruppe jeweils 33 Proben entnommen und in einem Doppelansatz mittels TRF-Assay analysiert.

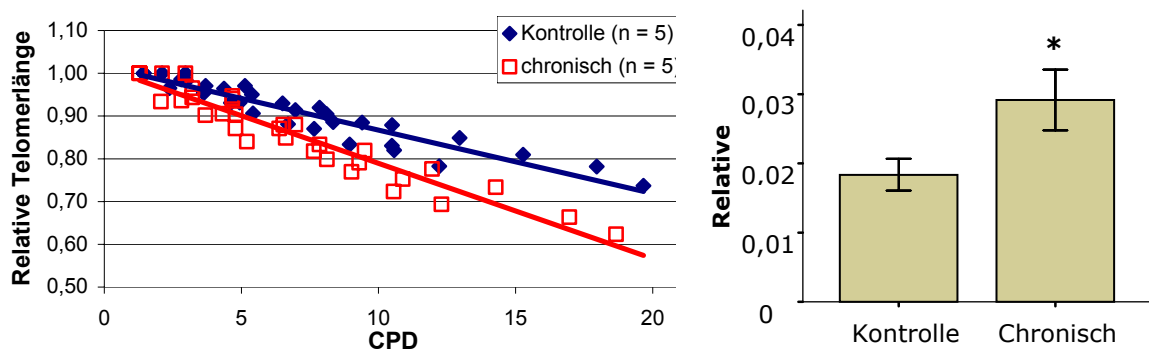
Am Anfang der Kultivierung lagen die mittleren TRF-Längen in beiden Gruppen zwischen 12,6 kbp und 10,4 kbp (MW  $\pm$  SD:  $12037 \text{ bp} \pm 1351 \text{ bp}$ ). Die Telomere verkürzten sich über die gesamte Versuchsdauer auf Telomerlängen zwischen 10,4 kbp und 8,1 kbp (MW  $\pm$  SD:  $9947 \text{ bp} \pm 1030 \text{ bp}$ ) in der Kontrollgruppe gegenüber 9,6 kbp und 7,2 kbp (MW  $\pm$  SD:  $8861 \text{ bp} \pm 1042 \text{ bp}$ ) in der chronischen Gruppe. Für die Kontrollgruppe betrug die mittlere Verkürzung 208 bp pro Populationsverdopplung, während sie sich für die chronische Gruppe auf etwa 345 bp pro Populationsverdopplung belief.



4.6.3. Absolute Telomerverkürzung mesenchymaler Stammzellen unter chronischem oxidativen Stress im Vergleich zur Kontrolle;  $n$ : Anzahl.

Die um durchschnittlich 137 bp höhere mittlere Telomerverkürzung pro kumulativer Populationsverdopplung war mit einem p-Wert von 0,013 signifikant. Die Korrelationsanalyse nach Pearson ergab die Koeffizienten -0,342 für Kontroll- und -0,615 für chronische Gruppe weshalb sowohl für Kontrollgruppe ( $p = 0,026$ ) als auch für chronische Gruppe ( $p < 0,0001$ ) von einer statistisch signifikanten Korrelation zwischen mittlerer Telomerverkürzung und kumulativer Populationsverdopplung ausgegangen werden kann.

Die relativ inhomogenen Ausgangstelomerlängen erschweren die Beurteilung der Telomerverkürzung. Daher wurden die gemessenen absoluten Restriktionsfragmentlängen auf die Anfangslänge der jeweiligen Primärzellkultur bezogen und die so erhaltenen relativen Telomerlängen gegen die Populationsverdopplungen aufgetragen.



#### 4.6.4. Relative Telomerverkürzung mesenchymaler Stammzellen unter chronischem oxidativen Stress im Vergleich zur Kontrolle. ; **n**: Anzahl.

Mittels linearer Regressionsanalyse ergab sich in der Kontrollgruppe eine relative Telomerverkürzung um ca. 1,8 % der Ausgangslänge pro Populationsverdoppelung, wobei das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  0,90 betrug. Die Zellen der chronischen Gruppe lagen dagegen mit einer relativen Telomerverkürzung von ca. 2,9 % bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2$  0,92 hochsignifikant über der Kontrolle ( $p = 0,001$ ).

Die Korrelationsanalyse nach Pearson ergab Koeffizienten von -0,946 für die Kontrolle und von -0,957 für die chronische Gruppe, weshalb für beide Gruppen von einer statistisch signifikanten Korrelation zwischen mittlerer Telomerverkürzung und kumulativer Populationsverdopplung ( $p < 0,001$ ) ausgegangen werden kann.

## 4.7. Analyse der Genexpression

Zur Analyse der Genexpression nach akuter Stresseinwirkung wurden konfluente junge und präsenescente Zellen aus fünf verschiedenen Primärzellkulturen für 2h mit 100  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  (LN312, 336, 338) bzw. 150  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  (LN531, 585) inkubiert. Im Anschluss wurde das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -haltige Medium durch normales MSC-Medium ersetzt. Nach 1, 3, 6, 12 und 24h wurde RNA isoliert und mittels PCR die Expression der Gene TRF1, TRF2, XRCC, p21 und SIRT1 bestimmt, die Kontrolle wurde unmittelbar vor Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entnommen.

Die im Folgenden dargestellten Diagramme zeigen die relative Expression bezogen auf die Kontrolle, normiert auf das housekeeping gene GAPDH.

### 4.7.1. Expression von TRF1 und TRF2

Die Expression des telomerspezifischen Proteins TRF1 war bei jungen, mesenchymalen Stammzellen im Zeitraum von 3 bis 24h nach akuter Einwirkung subletaler  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosen signifikant um 30 bis 50 % erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Bei seneszenten MSCs dagegen war die Expression nach 3h im Vergleich zum Ausgangswert noch unverändert, während sich im Zeitraum von 6 bis 24h ein hoch signifikanter Expressionsabfall von 50 bis 70 % zeigte ( $p < 0,01$ ).

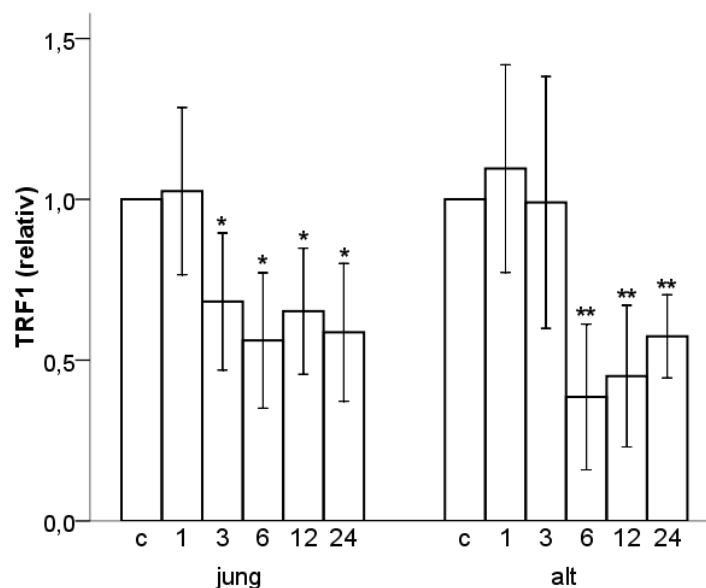


Abb. 4.7.1. Relative TRF1-Expression junger und seneszenten MSCs nach akuter Einwirkung subletaler  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosen.

Die Expression von TRF2 stieg bei jungen MSCs nach einer Stunde auf das 1,5-fache an und blieb bis 24h nach akuter Stresseinwirkung tendenziell erhöht. Der Expressionsanstieg war jedoch lediglich in der Messung nach 3h signifikant ( $p = 0,022$ ). Bei seneszenten MSCs zeigte sich nach 3h ein hochgradig signifikanter Anstieg der Expression auf das 1,6-fache ( $p = 0,006$ ). An den übrigen Messpunkten war die Expression im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig verändert.

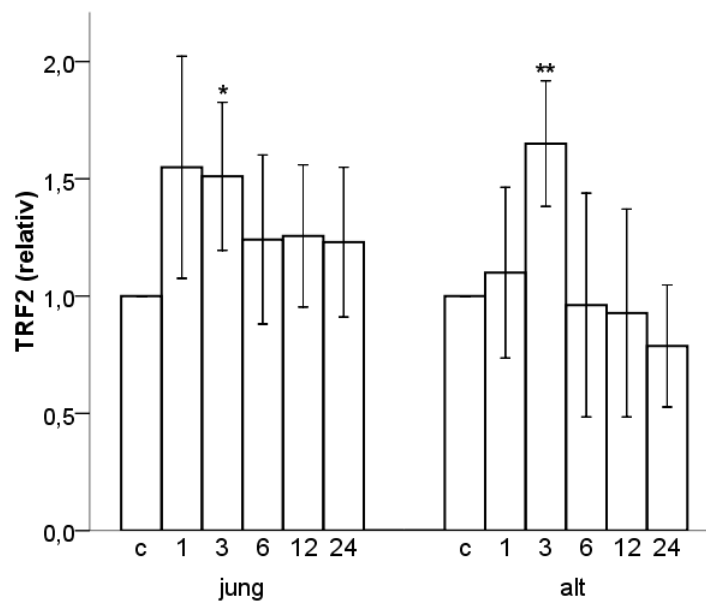


Abb. 4.7.2. Relative TRF2-Expression junger und seneszenter MSCs nach akuter Einwirkung subletaler  $H_2O_2$ -Dosen.

Der Expressionsverlauf von TRF1 und TRF2 stimmte in den einzelnen Gruppen jeweils überein und war unabhängig von den verschiedenen Stressedosen.

#### 4.7.2. Expression von p21

Bezüglich der Expression von p21 bei jungen mesenchymalen Stammzellen zeigte sich in der Messung eine Stunde nach akuter Stresseinwirkung ein signifikanter Anstieg auf das 2,6-fache ( $p = 0,015$ ). Im Zeitraum zwischen 3 und 24h war die Expression im Vergleich zum Ausgangswert größtenteils unverändert. Bei seneszenten MSCs war der Expressionsanstieg nach einer Stunde um das 4-fache hochgradig signifikant ( $p = 0,005$ ), zeigte sich nach 3h tendenziell rückläufig und normalisierte sich schließlich auf den Ausgangswert. Der Expressionsverlauf stimmte in den einzelnen Gruppen jeweils überein. In den Primärzellkulturen LN 531 und LN 585 ( $150 \mu\text{M } H_2O_2$ ) war die Expression tendenziell höher.

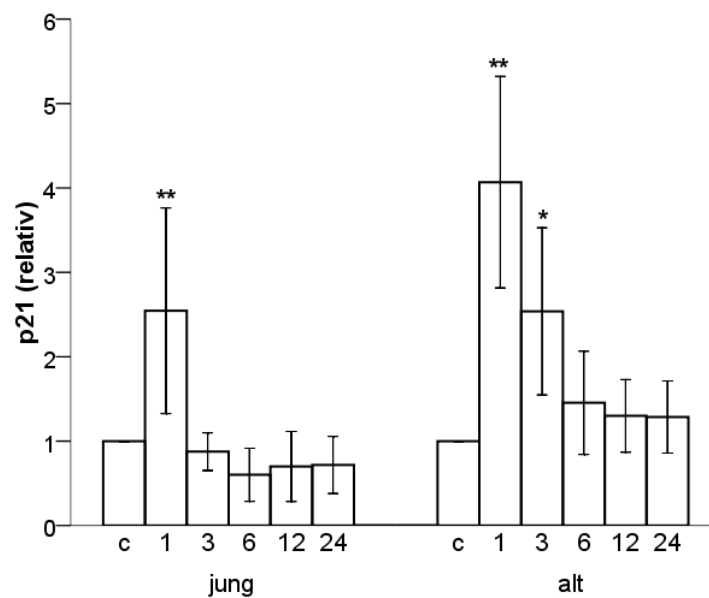


Abb. 4.7.3. Relative p21-Expression junger und seneszenten MSCs nach akuter Einwirkung subletaler  $H_2O_2$ -Dosen;  $n$ : Anzahl;

### 4.7.3. Expression von SIRT1

Bezüglich der Expression des negativen p53-Regulators SIRT1 zeigte sich bei jungen MSCs bereits eine Stunde nach akuter Stressexposition ein hochsignifikanter Anstieg auf das Doppelte ( $p = 0,009$ ). Im Zeitraum von 3 bis 24h nach akuter Stressexposition war die SIRT1-Expression rückläufig und normalisierte sich nach 24h auf das Niveau des Ausgangswertes. Dabei blieb die Expression auch nach 3 und 6h noch signifikant erhöht. Bei seneszenten MSCs war der Expressionsverlauf grundsätzlich ähnlich. Der hochsignifikante Anstieg nach einer Stunde fiel hier sogar noch höher aus als bei jungen MSCs (2,8-fach,  $p = 0,008$ ). Obwohl tendenziell rückläufig, blieb die Expression von SIRT1 im Zeitraum von 3 bis 24h im Vergleich zum Ausgangswert durchweg signifikant erhöht. Der Expressionsverlauf von SIRT1 nach akuter Stressexposition war bei den einzelnen Primärzellkulturen ähnlich und zeigte keine Abhängigkeit von den verschiedenen angewendeten Stressdosen.

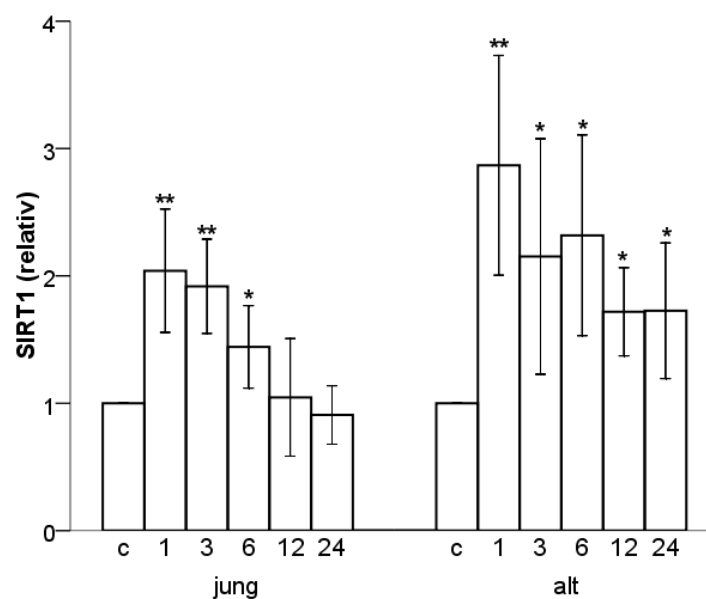


Abb. 4.7.5. Relative SIRT1-Expression junger und seneszenten MSCs nach akuter Einwirkung subletaler  $H_2O_2$ -Dosen;  $n$ : Anzahl;



#### 4.7.4. Expression von XRCC5

Die Expression des telomerassoziierten DNA-Reparaturgens XRCC5 stieg nach akuter Stressexposition bei jungen MSCs kontinuierlich an und erreichte nach 12h mit dem 1,6-fachen Ausgangswert ihr Maximum. Aufgrund der hohen Standardabweichung waren die Ergebnisse jedoch nicht signifikant.

Bei den seneszenten MSCs zeigte sich ein grundsätzlich ähnlicher Verlauf. Der Expressionsanstieg nach 12h war diesmal signifikant ( $p = 0,04$ ). Der Verlauf der XRCC5-Expression nach akuter Stressexposition war bei den einzelnen Primärzellkulturen ähnlich. Bei LN 531 und LN 585 ( $150 \mu\text{M } H_2O_2$ ) war die Expression tendenziell höher

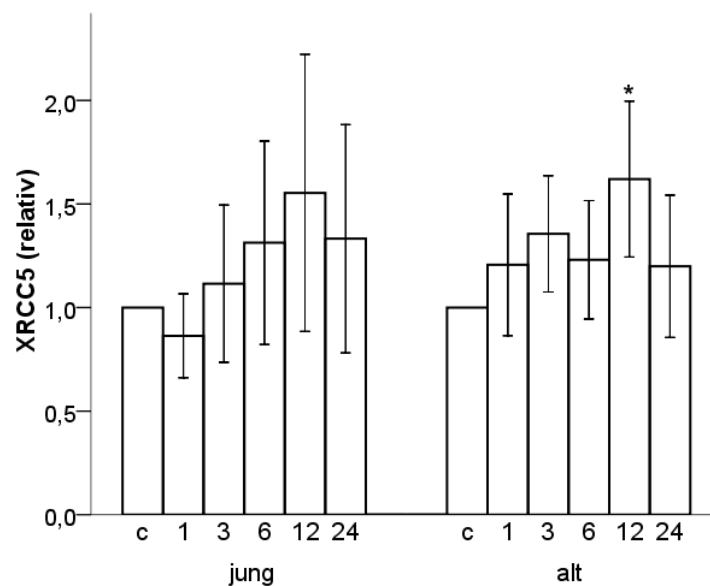


Abb. 4.7.4. Relative XRCC5-Expression junger und seneszenten MSCs nach akuter Einwirkung subletaler  $H_2O_2$ -Dosen; **n**: Anzahl;

## 5. Diskussion

### 5.1. Analyse der Zellproliferation

Dank ihrer vergleichsweise einfachen Isolierung und Kultivierung, sowie ihrer multipotenten Differenzierungseigenschaften hielten MSCs über die letzten Jahre hinweg zunehmend Einzug in die klinische Anwendung. Die Annahme, MSCs würden, wie embryonale Stammzellen<sup>143</sup>, ein unbegrenztes Proliferationspotential aufweisen und damit die Lösung des Endreplikationsproblems darstellen, bestätigte sich jedoch nicht. Ähnlich somatischen Zellen erreichen MSCs in vitro etwa 20 - 40 cpds<sup>98, 144-146</sup> und zeigen dabei schon lange vor Erreichen des Hayflick-Limits zunehmend seneszenzbedingte, phänotypische Veränderungen, wie beispielsweise eine abnehmende Proteinsynthese, ein verändertes Ansprechen auf Wachstumsfaktoren oder eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit<sup>98, 147-149</sup>.

Im Jahr 2002 wurde eine noch primitivere multipotente adulte Progenitorzellpopulation (MAPC) entdeckt, welche neben ihrer vielfältigen Differenzierungsfähigkeit in Zellen des Meso-, Ekto- und Entoderms<sup>102</sup> auch ein enormes Wachstumspotential bei konstanter Telomerlänge aufweist<sup>103</sup>. Möglicherweise existiert also eine äußerst seltene (ca. 1 von  $10^8$  isolierten MSCs) telomerasepositive Subpopulation der MSCs, die echten Stammzellcharakter aufweist und damit eine denkbare Lösung des Endreplikationsproblems darstellt.

Die Kultur von MSCs kann, abhängig von ihrem in vitro Alter, in drei Phasen unterteilt werden. Einem Abschnitt schnellen Zellwachstums (1-50% der Lebensspanne) folgt eine Periode reduzierten Wachstums (50-80% der Lebensspanne), welche wiederum in eine Phase gekennzeichnet durch Wachstumsstopp und seneszenzente Zellen übergeht. An Hand morphologischer, biochemischer und molekularer Charakteristika werden Phase I-Zellen als jung und Phase III-Zellen als seneszent betrachtet<sup>150</sup>.

Unter den in dieser Arbeit gegebenen Versuchsbedingungen erzielten die MSCs eine Proliferationsgeschwindigkeit von 8,08 cpd in 100 Tagen, und kamen damit insgesamt auf eine im Vergleich zu den Literaturdaten (20 - 40 cpd) relativ geringe mittlere Zellvermehrung von 11,23 cpd. In dieser Arbeit konnte allerdings die Proliferationsphase zwischen Isolation und primärer Kryo-

konservierung der MSCs aus organisatorischen Gründen nicht erfasst werden. Folglich ging die erste Passage der Primärzellkulturen nicht in die Statistik ein, was möglicherweise eine Erklärung für die abweichende Datenlage sein könnte. Das in der Literatur beschriebene 3-phasige Wachstumsverhalten konnte größtenteils nachvollzogen werden. Dabei konnte keine signifikante Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Patientenalter ermittelt werden. Angenommen, die in vitro Proliferationsgeschwindigkeit der Primärzellkulturen wäre unabhängig vom Patientenalter, würde fortgeschrittenes Alter zumindest hinsichtlich der Expansionsgeschwindigkeit kein Hindernis für das Tissue engineering darstellen. Die meisten Autoren konstatieren jedoch einen Rückgang der Proliferationsgeschwindigkeit humaner mesenchymaler Stammzellen mit zunehmendem Alter des Spenders<sup>145-146</sup>. Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten unter anderem abweichende Bedingungen bei Probenentnahme, Aufarbeitung, Isolation und Zellkultur, sowie die individuelle Patientenauswahl sein. Um genauere Aussagen über eine mögliche Altersabhängigkeit des Proliferationsverhaltens zu treffen, wäre zudem eine höhere Probandenzahl von Nöten gewesen.

Bezüglich des Proliferationsverhaltens von MSCs unter oxidativer Stressexposition existieren nur wenige Literaturdaten. Der physiologische Sauerstoffgehalt in den meisten Geweben des menschlichen Körpers entspricht ca. 3%. Unter Raumluft sind menschliche Zellen dem wesentlich höherem Sauerstoffgehalt von 20% ausgesetzt, was über diverse chemische und biologische Reaktionen zu einer Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt. Versuche mit humanen diploiden Fibroblasten (HDF), die einerseits unter Raumluft andererseits unter physiologischem Sauerstoffgehalt kultiviert wurden, zeigten, dass diejenigen, die unter erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck kultiviert wurden, ihr Gegenüber bis zum Erreichen der Seneszenz um bis zu 20 kumulative Populationsverdoppelungen übertrafen<sup>71, 79, 151-152</sup>. Im Jahr 2004 konnten diese Ergebnisse auch bezüglich Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen bestätigt werden<sup>152</sup>. Offensichtlich scheinen erhöhte Sauerstoffkonzentrationen in vitro also eine proliferationshemmende Wirkung zu haben. Die mannigfaltigen Einflüsse reaktiver Sauerstoffspezies auf die Zellbiologie unterliegen intensiver Forschung. Ein gut etablierter Ansatz zur Simulation oxidativer Stresseinwirkung in vitro ist das Wasserstoffperoxidmodell. Chen zeigte 2001, dass somatische Zellen nach vorübergehender

Inkubation mit subletalen Wasserstoffperoxiddosen signifikant langsamer proliferieren als die unbehandelte Kontrollgruppe<sup>74</sup>, was wenige Jahre später auch für Chondrozyten bestätigt wurde<sup>153</sup>. In unseren Versuchen zeigte sich nach akuter Exposition der mesenchymalen Stammzellen mit subletalen Wasserstoffperoxiddosen ebenfalls ein signifikanter Abfall der Proliferationsgeschwindigkeit um gut die Hälfte des Kontrollwerts<sup>154</sup>. Die ebenfalls untersuchten Chondrozyten stellten die Proliferation sogar komplett ein<sup>155</sup>. Dies steht im Einklang mit Literaturwerten bezüglich somatischer Zellen und untermauert damit weiter die Theorie der proliferationshemmenden Wirkung subletaler Stressdosen.

Bezüglich des Proliferationsverhaltens von Zellen unter chronischer, niedrig dosierter Wasserstoffperoxidexposition existieren keine Referenzwerte. In unseren Experimenten unterschied sich das Proliferationsverhalten der MSCs unter chronischem, niedrig dosiertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einfluss nur unwesentlich von der Kontrollgruppe<sup>154</sup>. Dies konnte ebenfalls für Chondrozyten bestätigt werden<sup>155</sup>. Vermutlich war die gewählte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dosis (10 µM) trotz chronischer Applikation zu gering um die anti-oxidative Zellabwehr zu überfordern und damit einen Abfall des Proliferationsindex nach sich zu ziehen<sup>154</sup>.

## 5.2. Analyse der Zellmorphologie

Ähnlich wie Fibroblasten besitzen junge, mesenchymale Stammzellen spindelförmige Zelleiber mit multiplen zytoplasmatischen Ausläufern zur Ausbildung von Zellkontakten. Weitere morphologische Charakteristika sind ein heller, ovaler Zellkern mit deutlichem Nukleolus und ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum. Mit zunehmender Kulturdauer verlieren die Zellen jedoch ihre spindelförmige Konfiguration: die Zelleiber flachen ab, nehmen an Größe zu, Zellausläufer gehen verloren und zytoplasmatische Einschlusskörperchen akkumulieren<sup>136, 145</sup>. Laut den Untersuchungen von Baxter aus dem Jahr 2004 zeigen MSCs von älteren Spendern in vitro keine spindelförmige Morphologie, während MSCs von jungen Spendern bei Kulturbeginn die typische spindelförmige Morphologie ausbilden und diese im Laufe der Zellkultur nach und nach verlieren<sup>145</sup>. Offensichtlich ist das Auftreten dieser morphologischen Veränderungen also unter anderem mit dem

Phänomen der replikativen Seneszenz assoziiert<sup>35, 50, 145</sup>. Die Literaturdaten konnten in unseren Versuchen größtenteils nachvollzogen werden. Die spindelförmige, fibroblastenähnliche Morphologie der jungen MSCs wich mit steigender Kulturdauer einer Verplumpung der Zelleiber mit Akkumulation zytoplasmatischer Einschlusskörperchen<sup>154</sup>.

In den 90er Jahren gelang es durch Anwendung verschiedener Stressoren, den seneszenten Phänotyp unabhängig von der Zellreplikation zu erzeugen: Nach Exposition mit subletalen Stressdosen bildeten die untersuchten Zelltypen, unabhängig vom in vitro Alter, eine seneszenzähnliche Morphologie aus<sup>72-73, 156-157</sup>. Auch in dieser Arbeit zeigten die MSCs, nach akuter Einwirkung subletaler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosen, typische morphologische Zeichen der Seneszenz<sup>154</sup>, was demnach im Einklang mit der Fachliteratur steht. Über die Auswirkungen von chronischem Stress auf die Zellmorphologie existieren nur wenige Daten. In diesem Experiment hatte chronischer Stress lediglich marginale morphologische Auswirkungen, was in Analogie zum Proliferationsverhalten der chronischen Gruppe, wohl auf die angewendete, sehr niedrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosis zurückzuführen ist<sup>154</sup>. Ähnliche morphologische Veränderungen nach akutem und chronischem Stresseinfluss konnten ebenfalls bei den untersuchten Chondrozyten beobachtet werden<sup>155</sup>. Offensichtlich ist die seneszenztypische Morphologie nicht nur Merkmal der replikativen Seneszenz, sondern tritt auch im Rahmen stressinduzierter Seneszenz (SIPS) auf.

### 5.3. Analyse der $\beta$ -Galactosidase-Expression

Dimri entdeckte Mitte der neunziger Jahre bei der Untersuchung von Hautbiopsien älterer Patienten, dass verschiedene Zelltypen im Stadium der zellulären Seneszenz das Enzym  $\beta$ -Galactosidase exprimieren und entwickelte einen Ansatz, diese bei einem pH-Wert von 6 histochemisch zu detektieren<sup>35</sup>. Dabei exprimierten lediglich seneszente Zellen, nicht jedoch junge Zellen das Enzym. Weiterhin zeigte sich auch bei Zellen in vivo ein altersabhängiger Anstieg der  $\beta$ -Galactosidaseexpression<sup>35</sup>. Seither dient die SA- $\beta$ -Galactosidase-Färbung als weit verbreiteter Biomarker für zelluläre Seneszenz sowohl in vitro als auch in vivo. Dabei ist, um eine artifizielle Färbung bei zu hoher Konfluenz der Zellkulturen zu vermeiden, besonders auf eine explizite Anwendung des Assays mit subkonfluenten Zellkulturen vergleichbarer Dichte zu achten<sup>158</sup>.

Severino konstatierte im Jahr 2003 eine Zunahme der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität humaner diploider Fibroblasten in höheren Passagen, konnte dabei jedoch keine Abhängigkeit vom Alter des Spenders feststellen<sup>159</sup>. Obwohl der  $\beta$ -Galactosidasenachweis als verlässlicher Marker für die Seneszenz subkonfluenter in vitro Zellkulturen gilt, scheint seine Anwendung in vivo umstritten<sup>159-160</sup>.

Die Rolle der SA- $\beta$ -Galactosidase im Rahmen der zellulären Seneszenz ist bislang noch unklar. Hierzu existieren mehrere Theorien, die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität unter anderem in Zusammenhang mit lysosomaler Dysfunktion<sup>161</sup>, dem RAS-Signalweg<sup>162</sup>, dem p53-Signalweg oder dem p16/Rb-Signalweg<sup>163</sup> stellen. Einen weiteren Hinweis auf die Rolle des Enzyms in der Zellbiologie lieferte die Erkenntnis, dass eine erhöhte  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nicht nur in Folge replikativer Seneszenz auftritt, sondern auch Teil des Phänomens der stressinduzierten Seneszenz (SIPS) ist. So zeigten junge HDFs nach wiederholter Exposition mit subletalen Dosen des Oxidationsmittels tert-Butylhydroperoxid (t-BHP) im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Aktivität der SA- $\beta$ -Galactosidase<sup>157</sup>. Dabei konnte sogar ein direkter Zusammenhang zwischen seneszenztypischer Morphologie und erhöhter  $\beta$ -Galactosidaseaktivität festgestellt werden<sup>164</sup>. Diese Ergebnisse wurden von mehreren Studien mit verschiedenen Zelltypen und Stressoren, unter anderem Wasserstoffperoxid, bestätigt<sup>164-165</sup>.

Bezüglich der  $\beta$ -Galactosidasaktivität bei mesenchymalen Stammzellen unter replikativer oder stressinduzierter Seneszenz existieren nur wenige Daten. Stenderup bestätigte im Jahr 2003 die Zunahme der Enzymaktivität in höheren Passagen, konnte jedoch analog zu humanen diploiden Fibroblasten keine Abhängigkeit vom Alter des Spenders feststellen<sup>98</sup>. Die in dieser Arbeit festgestellte signifikante Steigerung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in vitro gealterter MSCs im Vergleich zu ihren jungen Artgenossen<sup>154</sup> steht demnach in Einklang mit den Literaturdaten. Auch in Versuchen mit Chondrozyten konnten der Aktivitätsanstieg nachvollzogen werden<sup>155</sup>. Aufgrund der marginalen Ausgangsaktivität der  $\beta$ -Galactosidase in allen untersuchten Primärkulturen, bei teilweise deutlich divergierendem Spenderalter, besteht weiterhin kein Hinweis auf eine Altersabhängigkeit der Enzymexpression in vivo. Bezüglich des Einflusses von oxidativem Stress auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen ist nur wenig bekannt.

Größtenteils konnten die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse vor allem bezüglich humaner diploider Fibroblasten nach Stressexposition nachvollzogen werden. So hatte die akute Exposition mit einer subletalen  $H_2O_2$ -Dosis in allen untersuchten Primärzellkulturen einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität zur Folge<sup>154</sup>. Dagegen hatte niedrig dosierter, chronischer Stresseinfluss wenig bis keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität<sup>154</sup>. Analog zu den lediglich marginalen Veränderungen bezüglich Morphologie und Proliferationsverhalten in der chronischen Gruppe könnte dies ebenfalls auf die angewendete, niedrige  $H_2O_2$ -Dosis zurückzuführen sein. Die vorhandenen Daten legen einen direkten Zusammenhang zwischen Zellteilungsrate und Enzymaktivität nahe. Ein Anstieg der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität könnte folglich weniger als Marker für telomerassozierte, replikative Seneszenz, sondern eher als Zeichen für Wachstumsstopp interpretiert werden, egal ob stressinduziert oder in Folge replikativer Seneszenz<sup>154, 158, 166</sup>. Die molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen Seneszenz und  $\beta$ -Galactosidase sind bis dato unklar und bleiben weiterhin Gegenstand der Forschung.

#### **5.4. Analyse der Telomerlänge**

Die Telomerlänge wird im Allgemeinen als eine Art "biologische Uhr" oder „Replikometer“ betrachtet, da sie auf die Anzahl durchgemachter Mitosen Rückschluss gibt. Der erstmals von Hayflick hergestellte Zusammenhang zwischen Mitose, Zellproliferation und Telomerverlust gilt im Grundsatz bis heute<sup>30</sup>. Diverse Studien belegen eine konstante Abnahme der Telomerlänge somatischer Zellen in direkter Abhängigkeit von der Anzahl durchgemachter Zellteilungen. Der Mechanismus der semi-konservativen DNA-Replikation in Kombination mit fehlender Telomeraseaktivität somatischer Zellen resultiert bei jeder Mitose in einem konstanten Telomerverlust. Eine Telomerverkürzung auf Werte unterhalb einer kritischen Grenze stellte sich dabei als verlässlicher Indikator für das Auftreten von Zellzyklusarrest und Seneszenz heraus<sup>30, 53, 167</sup>. Damit im Einklang steht die Erkenntnis, dass ausreichende Telomeraseaktivität das Auftreten replikativer Seneszenz verhindert<sup>32</sup>. Der replikative Telomerverlust wird als Regulator des Zellüberlebens und als protektiver Mechanismus in der Kanzerogenese angesehen<sup>168</sup>. Im Zuge der Telomerverkürzung, kommt

es zu einem Verlust des, für die Bildung der t-loop wichtigen, 3'-Überhangs<sup>169-170</sup>. Ohne schützende t-loop, werden die freien Chromosomenenden von DNA-Reparatursystemen als Doppelstrangbrüche erkannt. In Folge des vermeintlichen DNA-Schadens kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die hauptsächlich zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 führen. Dies hat wiederum, vermittelt durch p21 und Rb, oder möglicherweise auch direkt, die zelluläre Seneszenz zur Folge<sup>58</sup>.

Den Telomeren wäre aber unrecht getan, würde man sie nur als einfache „Zähler der Zellreplikation“ bezeichnen. Viel mehr scheint die Telomerlänge ein engmaschig kontrollierter, überaus potenter Regulationsmechanismus der Zellbiologie zu sein<sup>171 172</sup>. Von Zglinicki entdeckte, dass eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks bei Fibroblasten (HDF) beschleunigte Telomerverkürzung und die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps zur Folge hat. Dabei blieben die Zellen trotz Hyperoxie in der Lage zu proliferieren, allerdings mit geringerer Geschwindigkeit als unter normalen Kulturbedingungen<sup>72</sup>. Weitere Erkenntnisse über Telomerveränderungen unter oxidativem Stress lieferten die Versuche von Chen, der HDFs subletalen Dosen von Wasserstoffperoxid aussetzte. Sowohl einmalige Exposition mit 150  $\mu\text{M}$ , als auch zweimalige Exposition mit 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  innerhalb einer Woche hatte zwar den Zellzyklusarrest und die Entwicklung eines seneszenten Phänotyps, jedoch keinen signifikanten Telomerverlust zur Folge<sup>74</sup>. Offensichtlich existiert also ein telomerunabhängiger, Stress induzierter Seneszenzmechanismus, auch SIPS (stress induced premature senescence) genannt. Ergebnisse anderer Studien untermauern die Existenz telomerunabhängiger Seneszenzmechanismen. Beispielsweise entwickeln telomerasepositive Embryonalzellen des syrischen Hamsters, trotz konstanter Telomerlänge im Zuge wiederholter Zellreplikation dennoch das Phänomen der Seneszenz<sup>173</sup>. Duan bestätigte Chens Ergebnisse und erweiterte den Versuch um eine Gruppe mit prolongierter, niedrig dosierter Stressexposition im Abstand von 3 Tagen. Unter chronischer Exposition mit 10 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  proliferierten die HDFs langsamer als unter Normalbedingungen und entwickelten, bei signifikant erhöhtem Telomerverlust, nach wenigen Wochen den seneszenten Phänotyp<sup>165</sup>.

In unseren Versuchen wurden mesenchymale Stammzellen und Chondrozyten ebenfalls regelmäßig niedrig dosierten Wasserstoffperoxid Dosen ausgesetzt. Im Einklang mit den Literaturdaten bezüglich Fibroblasten<sup>165</sup> zeigte sich dabei



im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ein signifikant höherer Telomerverlust<sup>154</sup>. Nach akuter subletaler Wasserstoffperoxidexposition lies sich dagegen kein Telomerverlust detektieren<sup>154</sup>, was wiederum entsprechende Literaturdaten bezüglich Fibroblasten<sup>74</sup> bestätigt. Nach anschließender Kultivierung der stressexponierten Zellen zeigte sich jedoch ein signifikant erhöhter Telomerverlust im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe<sup>154</sup>. Offensichtlich ist die stressinduzierte Telomerverkürzung also an Zellreplikation geknüpft. In Folge des akuten Stresseinflusses zeigten MSCs und Chondrozyten neben erhöhter  $\beta$ -Galactosidasexpression, erniedrigter Zellproliferationsrate auch morphologische Zeichen der Seneszenz. Niedrig dosierte chronische Stressexposition führte dagegen nicht zu signifikanten seneszenztypischen Veränderungen<sup>154-155</sup>. Obwohl der Zusammenhang zwischen oxidativem Stresseinfluss und Telomerverlust bewiesen scheint, sind die zellbiologischen Vorgänge diesbezüglich noch unklar. Folgende Mechanismen werden mit Telomerverlust nach oxidativer Stressexposition in Verbindung gebracht.

In erster Linie werden DNA-Strangbrüche als direkte Folge des oxidativen Schadens für die Telomerverkürzung verantwortlich gemacht. Zudem scheinen Telomere im Vergleich zur übrigen DNA anfälliger gegenüber oxidativem Stress zu sein, was auf eine besondere Affinität reaktiver Sauerstoffspezies gegenüber guaninreichen Sequenzen zurückzuführen ist<sup>174</sup>. In Folge des oxidativen Stresseinflusses kann es nicht nur zur Purin- bzw. Pyrimidin-oxidation, sondern auch zur Deletion einzelner Basen oder ganzer Nukleotide kommen. Eine mögliche Replikationsblockade durch alterierte Basen und Nukleotide könnte folglich ein weiterer Mechanismus des stressinduzierten Telomerverlusts sein<sup>175</sup>. Darüber hinaus existieren Hinweise, dass eine aus Basen- und Nukleotiddeletionen resultierende DNA-Sequenzänderung zu einer Abnahme der Bindungsaffinität der telomerprotektiven Proteine TRF1 und TRF2 führt<sup>176</sup>. Neben dem eigentlichen oxidativen Schaden scheint auch das variable Ansprechen der zelleigenen DNA-Reparatursysteme ein wichtiger Faktor im Entstehen und vor allem Bestehen oxidativer Telomerschäden zu sein. Kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen scheint die betroffene Zelle die Proliferation zu Gunsten der DNA-Reparatur einzustellen<sup>165</sup>. DNA-Einzelstrangbrüche dagegen werden nur unzureichend repariert und haben damit einen verstärkten Telomerverlust zur Folge<sup>175</sup>. Der Zusammenhang zwischen

Telomerregion und Regulation des Zellzyklus konnte bereits in vielerlei Hinsicht hergestellt werden. Funktionsuntüchtige Telomere sind zweifellos in der Lage, Zellzyklusarrest und Seneszenz zu induzieren<sup>177</sup>. Dabei scheint das Phänomen der replikativen Seneszenz weniger eine einfache Funktion der Telomerlänge, sondern vielmehr ein Ergebnis der vielfältigen Wechselwirkungen zwischen oxidativen Schäden und antioxidativen Abwehrmechanismen zu sein<sup>167, 172, 175, 178</sup>. Gemäß dem gegenwärtigen Verständnis des replikativen Alterungsprozesses beinhalten Zellpassage, oxidativer Stresseinfluss, Radiatio oder Mutagene alle die Entstehung gewisser DNA-Schäden und führen folglich über den gleichen, p53-vermittelten Signalweg zur Seneszenz<sup>165, 177</sup>. Dies wiederum unterstützt die "free radical theory of ageing"<sup>75</sup>, welche den Alterungsprozess auf eine Anhäufung oxidativer DNA-Schäden zurückführt.

Der durchschnittliche Telomerverlust humaner mesenchymaler Stammzellen *in vitro* wird in der Literatur, im Einklang mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten, mit 200-300 Basenpaaren pro Zellpopulationsverdopplung angegeben. Der absolute und relative Telomerverlust mesenchymaler Stammzellen war dabei größer als in somatischen Zellen<sup>154-155, 179</sup>. Zweifellos verursachen Zellkultur und -passage oxidativen Stress und beeinflussen damit negativ die Telomerlänge. Folglich können nicht nur replikative Zellalterung und das Endreplikationsproblem für die *in vitro* detektierten Telomerverkürzungsraten verantwortlich gemacht werden. Viel mehr sollten diese auch als Marker für oxidativen Stresseinfluss und das Auftreten konsekutiver DNA-Schäden interpretiert werden. Es muss angenommen werden, dass die *in vitro* festgestellten Telomerverkürzungsraten höher ausfallen als dies *in vivo* tatsächlich der Fall ist.

## 5.5. Analyse der Genexpression

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf die Expression bestimmter telomerassoziierter Gene und Regulatoren des Zellzyklus. Die telomerassozierten Proteine TRF1 und TRF2 sind für die Bildung der t-loop verantwortlich. Dabei ermöglicht TRF1 das Zurückschlagen der Telomere<sup>41</sup>, während TRF2 die Insertion des 3'-Überhangs

in den DNA-Doppelstrang vermittelt<sup>42</sup>. Weiterhin kontrollieren TRF1 und TRF2 den Zugang des telomerverlängernden Enzyms Telomerase und fungieren daher als negative Regulatoren der Telomerlänge<sup>180-181</sup>. Molekularbiologische Studien zeigten, dass bei fehlender Expression von TRF1 eine Telomerverlängerung resultiert, das Fehlen von TRF2 dagegen führt zum partiellen Verlust des 3'-Überhangs, chromosomaler Instabilität und End-zu-End Fusion<sup>55, 182</sup>.

In unseren Versuchen führte die akute Einwirkung von oxidativem Stress zu einem signifikanten Rückgang der TRF1-Expression sowohl bei jungen als auch bei präseneszenten MSCs. Die Expression von TRF2 war bei jungen und präseneszenten MSCs 3 Stunden nach akuter Stresseinwirkung signifikant erhöht, im Gegensatz zum TRF1-Abfall jedoch nicht in einem physiologisch relevantem Ausmaß. Insgesamt waren die Expressionslevel für TRF1 und TRF2 bei jungen und präseneszenten MSCs auf vergleichbarem Niveau<sup>154</sup>. Die Expressionsveränderungen von TRF1 und TRF2 nach akutem Stresseinfluss konnten für junge und präseneszente Chondrozyten nachvollzogen werden<sup>155</sup>. Man könnte annehmen, dass eine vermehrte TRF-Expression die Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress erhöht und damit einen protektiven Faktor gegenüber Seneszenz und Apoptose darstellt. In der Tat wirkt sich eine Überexpression von TRF2 angesichts stressinduzierter Apoptose protektiv aus<sup>183</sup>. Andererseits wurde gezeigt, dass MSCs nach oxidativem Stresseinfluss trotz ausreichender Expression von TRF2 und nur leicht reduzierter Expression von TRF1 in ein seneszenzähnliches Stadium eintreten<sup>154</sup>, was mit veröffentlichten Daten bezüglich Chondrozyten<sup>155</sup> und Magenkarzinomzellen<sup>184</sup> im Einklang steht.

Oxidativer Stresseinfluss kann durch Deletion einzelner Basen oder ganzer Nukleotide die Telomersequenz verändern und damit die Sequenz-spezifische Bindung von TRF1 und TRF2 in beträchtlichem Ausmaß stören<sup>176</sup>. Ein Mangel an gebundenem TRF verhindert die Ausbildung der t-loop. Ohne t-loop sind die Telomere dem Abbau durch Exonukleasen und der End-zu-End Fusion mit anderen Chromosomen ausgesetzt<sup>43</sup>. Die freien Chromosomenenden werden von DNA-Reparatursystemen als Doppelstrangbrüche erkannt. Trotz ausreichender TRF-Expression werden Signalwege aktiviert, die in Apoptose und Seneszenz enden<sup>185-186</sup>. Da kurze Telomere über weniger gebundenes TRF verfügen, reagieren sie empfindlicher auf unterschiedliche Stressoren<sup>175</sup>.

Eine verbesserte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress, DNA-Schäden und Genomveränderungen – offensichtlich die Hauptverursacher der Seneszenz – würde den Stammzellen ermöglichen, ihren Beitrag zur Geweberegeneration in vivo und in vitro zu verbessern. Von jungen mesenchymalen Stammzellen würde man, im Vergleich zu älteren, eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress erwarten. Die Signalwege, über die oxidativer Stress seine zelluläre Wirkung entfaltet, sind Gegenstand intensiver Forschung. Neben dem direkt verursachten Schaden durch Oxidation zellulärer Komponenten wie DNA, Proteine und Lipide<sup>187-188</sup>, können reaktive Sauerstoffspezies auch direkt als Second Messenger in die Regulation spezifischer Signalwege eingreifen<sup>189</sup>. Untersuchungen zeigten, dass oxidativer Stresseinfluss in der Kultur humaner diploider Fibroblasten zu einem Anstieg der Expression von p21 führt<sup>74</sup>. Dies legt nahe, dass oxidativer Stress analog zu beschädigten Telomeren Seneszenz am ehesten über den p53 → p21 → Rb Signalweg induziert. Oxidativer Stress, DNA-Schäden und ungeschützte Telomere lösen allesamt Signalwege aus, die zu einer Phosphorylierung, Acetylierung und Stabilisation von p53 führen. Das aktivierte Tumorsuppressorprotein fungiert als Transkriptionsfaktor und vermittelt seinen zytostatischen Effekt unter anderem durch Induktion des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21<sup>58</sup>.

Im Vergleich zu bereits veröffentlichten Ergebnissen bezüglich somatischer Zellen, fällt der Expressionsanstieg von p21 nach oxidativer Stresseinwirkung bei mesenchymalen Stammzellen weniger drastisch aus. Während die Expressionslevel bei MSCs nach einem postexpositionellem Maximum sowohl bei jungen als auch bei präseneszenten Zellen rapide auf das Ausgangsniveau zurückfielen<sup>154</sup>, blieben diese bei Chondrozyten<sup>155</sup> und somatischen Zellen<sup>165</sup> über den beobachteten Zeitraum hinweg signifikant erhöht. Dies könnte auf eine höhere Widerstandsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen gegenüber oxidativem Stress hinweisen<sup>154</sup>.

Der Mensch verfügt über insgesamt sieben Proteine aus der Familie der Sirtuine. Diese teilen sich eine katalytische Untereinheit mit Sir2<sup>190-191</sup> (silent information regulator 2), einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylase<sup>192</sup>, die in niedrig entwickelten Eukaryoten die Überlebensdauer moduliert. Ein Aktivitätsanstieg von Sir2 erhöht in Organismen wie *Caenorhabditis elegans* die Überlebensdauer<sup>193</sup>. Das nukleare Protein SIRT1 ist Sir2 unter den Sirtuinen

sequentiell am ähnlichsten<sup>194</sup> und soll die Reaktion auf oxidativen Stress in menschlichen Zellen, unter anderem durch Regulation von p53, modulieren können<sup>57, 195-196</sup>. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass p53 sowohl in vitro als auch in vivo ein Substrat für die Deacetylase SIRT1 darstellt<sup>197</sup>. SIRT1 kann p53 durch Deacetylierung deaktivieren<sup>198</sup> und so das Überleben nach akuter Stressexposition begünstigen<sup>195-196</sup>. Als Apoptoseinhibitor und begünstigender Faktor der Zellproliferation könnte eine gesteigerte SIRT1-Aktivität für MSCs ein wirkungsvoller Mechanismus sein, mit ungünstigen Wachstumsverhältnissen umzugehen<sup>154</sup>.

In unseren Versuchen zeigte sich bei jungen MSCs nach oxidativer Stresseinwirkung ein signifikanter Expressionsanstieg von SIRT1, welcher jedoch innerhalb von 24h komplett rückläufig war. Dagegen war die SIRT1-Expression bei präseneszenten MSCs über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg signifikant erhöht<sup>154</sup>. Entsprechend der Theorie, dass SIRT1 einen negativen Regulator von p53 darstellt, könnte SIRT1 durch Hemmung des p53 → p21 → Rb Signalwegs Seneszenz und Apoptose in Folge von oxidativer Stresseinwirkung verhindern. Der Expressionsanstieg nach akuter Stressexposition war in unseren Versuchen mit präseneszenten Chondrozyten im Vergleich weniger ausgeprägt<sup>155</sup>, was wiederum für eine erhöhte Stressresistenz mesenchymaler Stammzellen sprechen könnte<sup>154</sup>.

Ein weiterer wichtiger Überlebensfaktor bezüglich oxidativer Stresseinwirkung ist das zelluläre DNA-Reparatursystem. Während DNA-Einzelstrangbrüche oft nur unzureichend repariert werden und damit zu verstärktem Telomerverlust führen<sup>175</sup>, scheinen betroffene Zellen bei DNA-Doppelstrangbrüchen die Proliferation zu Gunsten der DNA-Reparatur einzustellen<sup>165</sup>. Eine Erkennung und Reparatur von solch schwerwiegenden DNA-Schäden scheinen essentiell, da bereits ein einzelner nicht reparierter Doppelstrangbruch zur Induktion des Zelltodes ausreichen kann und fehlerhaft reparierte Doppelstrangbrüche zu Mutationen oder dem Verlust größerer Chromosomenabschnitte führen können. In eukaryoten Zellen werden Doppelstrangbrüche entweder über homologe Rekombination oder mit Hilfe nicht homologer Verknüpfung freier DNA-Enden (NHEJ) repariert<sup>199</sup>. Für NHEJ wird in menschlichen Zellen die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) benötigt, ein Enzym bestehend aus einer katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs) und einer Ku-Untereinheit, welche DNA-Enden bindet<sup>200-201</sup>. Ku defiziente Zellen reagieren aufgrund gestörter

Fähigkeiten zur Doppelstrangbruchreparatur empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung und vielen anderen Stressoren<sup>199-201</sup>. Da Ku in der Lage ist, spezifisch an eine Vielzahl von DNA-Strukturen zu binden, unter anderem an glatte DNA-Enden, 3'- und 5'-Überhänge und Haarnadel-DNA. Möglicherweise stellt Ku also den primären Sensor für beschädigte chromosomale DNA dar<sup>201-202</sup>. Nach Bindung von Ku an einen Doppelstrangbruch wird die katalytische Untereinheit der DNA-PK aktiviert, welche durch ihre Funktion als Proteinkinase wiederum Veränderungen in der Chromatinstruktur bewirken und/oder die Aktivität anderer DNA-Reparatursysteme regulieren könnte. Weiterhin schützt Ku die freien Chromosomenenden vor exzessivem Abbau durch Exonukleasen und ermöglicht die exakte Positionierung der gebrochenen DNA-Enden zur anstehenden Reparatur<sup>203</sup>. In diesem Zusammenhang scheint sich Ku auch telomerprotektiv auszuwirken. Tatsächlich führt ein Verlust von Ku zu gesteigertem Telomerverlust und vermehrter End-zu-End Fusion von Chromosomen<sup>204</sup>.

Ku selbst ist ein Heterodimer bestehend aus den beiden Untereinheiten Ku70 und Ku80. Das untersuchte Gen XRCC5 kodiert für die 83 kDa messende Untereinheit Ku80<sup>205</sup>. Proliferierende Zellen zeigen für gewöhnlich eine hohe XRCC5 Expression, um die notwendige DNA-Reparatur in Folge der Replikation zu ermöglichen. Eine abnehmende Expression von XRCC5 weist dagegen auf einen ausgeprägten DNA Schaden hin und kündigt die bevorstehende Apoptose an<sup>206</sup>. In unseren Versuchen zeigte sich nach akuter Stressexposition sowohl bei jungen als auch bei alten MSCs eine Expressionssteigerung von XRCC5<sup>154</sup>. Diese Ergebnisse konnten auch für junge und präseneszente Chondrozyten nachvollzogen werden<sup>155</sup>. Die Expressionsverläufe könnten darauf hinweisen, dass MSCs und Chondrozyten dazu in der Lage sind, die Kapazität ihrer DNA-Reparatursysteme nach subletaler zellulärer Stresseinwirkung zu erhöhen<sup>154-155</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid eine Aktivierung der für DNA-Schäden und DNA-Reparatur verantwortlichen Gene, repräsentiert durch p21, SIRT1 und XRCC5<sup>154</sup>. Es ist anzunehmen, dass diese Gene die Zellproliferation temporär unterbrechen, um die Reparatur der beschädigten DNA zu ermöglichen<sup>165</sup>. Während die Richtung der Genexpressionsveränderung bei jungen und präseneszenten MSCs identisch war, fiel der relative Expressionsanstieg bei präseneszenten MSCs teilweise sogar

deutlicher aus<sup>154</sup>. Im Gegensatz zu älteren Fibroblasten, denen eine verringerte Aktivität der DNA-Reparatursysteme nachgewiesen wurde<sup>164</sup>, könnte dies auf eine verbesserte Widerstandsfähigkeit gegenüber DNA Schäden und eine höhere DNA-Reparaturkapazität adulter MSCs hinweisen. Während die p21-Expressionslevel nach subletaler Stresseinwirkung bei Fibroblasten<sup>74</sup> und Chondrozyten<sup>155</sup> über einen längeren Zeitraum erhöht blieben, kehrten diese bei MSCs innerhalb kurzer Zeit auf das Ausgangsniveau zurück<sup>154</sup>, was womöglich auf eine geringere Ansammlung von DNA-Schäden zurückzuführen ist. Anders als Fibroblasten<sup>74</sup> und Chondrozyten<sup>155</sup>, die postexpositionell das Wachstum komplett einstellten, proliferierten junge und präsenescente MSCs nach akuter Stresseinwirkung mit verminderten Raten weiter<sup>154</sup>. Zusammen betrachtet deuten alle Fakten auf eine erhöhte Widerstandsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen gegenüber oxidativer Schädigung im Vergleich zu somatischen Zellen hin<sup>154</sup>.

## 5.6. Perspektiven

Die komplexen Mechanismen der zellulären Seneszenz bedürfen weiterhin intensiver Forschung. Allein das Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge ermöglicht eine gezielte Beeinflussung der Zellalterung in vitro. Durch Verbesserung der Isolierungsmethoden könnten möglicherweise selektiv primitivere Stammzellspezies gewonnen werden. Deren Einsatz in der Therapie von Knorpelschäden und degenerativen Gelenkerkrankungen erscheint vielversprechend. Die Kontrolle der malignen Entartung vorausgesetzt, könnten sie mit unbegrenztem Teilungspotential und multiplen Differenzierungsmöglichkeiten das Tissue Engineering revolutionieren.

## 6. Zusammenfassung

Die Behandlungsmöglichkeiten bei Knorpelschäden und degenerativen Gelenkerkrankungen sind bis dato begrenzt und liefern teils unbefriedigende Ergebnisse. Einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bietet das Tissue Engineering, welches die Entnahme autologer Chondrozyten, deren Expansion *in vitro* und die Reimplantation mit Hilfe einer geeigneten Matrix beinhaltet. Mesenchymale Stammzellen stellen dank der vergleichsweise einfachen Gewinnung und ihrer vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten eine attraktive Zellquelle dar. Entgegen ihres Stammzellcharakters gehen MSCs nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in das Stadium der Seneszenz über. Alternde Zellen zeigen eine abnehmende Proliferationsgeschwindigkeit, entwickeln typische morphologische Zeichen und weisen einen stetigen Telomerverlust auf. Telomere, nicht kodierende Nukleoproteinstrukturen an den Chromosomenenden, stellen das molekularbiologische Substrat der zellulären Seneszenz dar. Bei jeder Zellteilung verlieren sie einen Teil ihrer repetitiven Basensequenzen. Verkürzte Telomere korrelieren mit abnehmender Proliferationskapazität und werden mit einem Funktionsverlust der Zellen in Verbindung gebracht. Neuere Erkenntnisse weisen auf eine multifaktorielle Genese der Seneszenz hin. Oxidativer Stress scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen. In Folge einer Imbalance zwischen oxidativen Einflüssen und antioxidativen Abwehrmechanismen kann es zu einer unkontrollierten Schädigung zellulärer Strukturen durch reaktive Sauerstoffspezies kommen, was je nach Ausmaß den Übergang der Zelle in das Stadium der Seneszenz zur Folge hat. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und begrenzter Reparaturkapazität können Telomere als eine Art Zähler kumulativer DNA-Schädigung angesehen werden. Bei kritischen DNA-Schäden sorgen sie für eine Unterbrechung der Zellproliferation.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte zur Simulation oxidativer Schädigung *in vitro* das in der Literatur gängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Modell etabliert, und anschließend die Einflüsse von akutem und chronischem oxidativem Stress auf mesenchymale Stammzellen bezüglich Proliferationsverhalten, Morphologie,  $\beta$ -Galactosidase-expression, Telomerlänge und Expression telomerassoziierter Gene, Regulatoren des Zellzyklus und DNA-Reparaturgene untersucht werden.



Nach einer bestimmten Anzahl von Zellverdopplungen stellten MSCs ihr Wachstum ein, zeigten Seneszenz-typische morphologische Veränderungen und wurden  $\beta$ -Galactosidase positiv. Chronischer Stresseinfluss hatte in der geringen applizierten Dosis keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten. Nach akutem subletalem Stresseinfluss zeigte sich ein signifikanter Abfall der Zellproliferation. Während chronischer Stresseinfluss in der applizierten Dosis keinen Einfluss auf Morphologie und  $\beta$ -Galactoseexpression hatte, entwickelten junge MSCs nach subletaler Stresseinwirkung ausgeprägte morphologische Seneszenzzeichen und zeigten eine gesteigerte  $\beta$ -Galactosidasexpression.

Unter chronischem Stresseinfluss zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Telomerverkürzung. Einmalig applizierte subletale Stressdosen hatten akut keinen Telomerverlust zur Folge. Nach weiterer Kultivierung zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch ebenfalls ein signifikant erhöhter Telomerverlust. Durch direkte DNA-Schäden, wie Basenoxidation, Strangbrüche oder Deletionen, aktiviert oxidativer Stress die zellulären Reparaturmechanismen, die je nach Schadensausmaß eine Restitutio ad integrum oder p53-vermittelt Seneszenz und Apoptose herbei führen. Offensichtlich ist zelluläre Seneszenz also eher ein Ergebnis der Interaktion zwischen oxidativem Schaden und antioxidativer Abwehr als eine reine Funktion der Telomerlänge.

Die telomerassoziierten Proteine TRF1 und TRF2 sind für die Bildung der telomerprotektiven t-loop verantwortlich und fungieren als negative Regulatoren der Telomerlänge. Akuter Stresseinfluss verursachte einen Rückgang der TRF1-Expression und eine verstärkte Expression von TRF2. Obwohl eine Überexpression von TRF2 protektive Effekte bezüglich stressinduzierter Apoptose haben soll, wurde gezeigt, dass MSCs trotz ausreichender TRF Expression in ein seneszenten Stadium übergehen. Oxidativer Stress aktiviert Signalwege die zu dem Tumorsuppressorprotein p53 führen. P53 vermittelt seine zytostatischen Effekte über p21. Nach subletaler Stressexposition stieg die p21-Expression zwar zunächst signifikant an, fiel jedoch im Anschluss auf das Ausgangsniveau zurück. Bei somatischen Zellen dagegen bleibt die p21 Expression nach subletalem Stressinsult über einen längeren Zeitraum hinweg signifikant erhöht. SIRT1 kann p53 deaktivieren und so das Überleben nach akuter Stressexposition begünstigen. Nach oxidativer Stresseinwirkung war die SIRT1-Expression signifikant erhöht. Bei

somatischen Zellen fällt der Expressionsanstieg tendentiell geringer aus. Als Apoptoseinhibitor und begünstigender Faktor der Zellproliferation könnte eine gesteigerte SIRT1-Aktivität, insbesondere für ältere MSCs ein wirkungsvoller Mechanismus sein, Seneszenz und Apoptose zu verhindern. Proliferierende Zellen zeigen für gewöhnlich eine hohe XRCC5 Expression, um die notwendige DNA-Reparatur in Folge der Replikation zu ermöglichen. Eine abnehmende Expression von XRCC5 weist dagegen auf einen ausgeprägten DNA Schaden hin und kündigt die bevorstehende Apoptose an. Nach akuter Stressexposition zeigte sich eine Expressionssteigerung von XRCC5. Der Expressionsanstieg der Gene SIRT1 und XRCC5 fiel bei präseneszenten MSCs tendentiell höher aus als bei jungen MSCs. Dies könnte auf eine verbesserte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativer Stresseinwirkung und eine gesteigerte DNA-Reparaturkapazität adulter mesenchymaler Stammzellen hinweisen. Dagegen zeigen somatische Zellen mit zunehmender Seneszenz eine rückläufige Expression der DNA-Reparaturgene.

Mesenchymale Stammzellen tragen zur Gewebereparatur in vivo bei und stellen eine Zellquelle der regenerativen Medizin dar. Entgegen ihres Stammzellcharakters zeigen MSCs mit steigender Kulturdauer einen zunehmenden Telomerverlust, stellen die Proliferation ein und entwickeln morphologische Zeichen der Seneszenz. Oxidativer Stress beschleunigt den Telomerverlust erheblich. Das Proliferationsverhalten scheint im Vergleich zu somatischen Zellen weniger stark beeinflusst zu werden, was auf eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress hindeutet. Auch die Expressionsveränderungen der Zellzyklusregulatoren p21 und SIRT1, sowie des DNA-Reparaturgens XRCC5 sprechen für eine erhöhte Stresstoleranz mesenchymaler Stammzellen gegenüber somatischen Zellen. Die Tatsache, dass auch mesenchymale Stammzellen der Seneszenz unterliegen, erklärt die limitierten Möglichkeiten des Tissue Engineering bei älteren Patienten. Durch weitere Erforschung der zugrunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen könnte in Zukunft eine gezielte Beeinflussung der Seneszenz in vitro gelingen.

## 7. Literatur

1. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res* 1995;3-6.
2. Fautrel B, Hilliquin P, Rozenberg S, et al. Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA. *Joint Bone Spine* 2005;72:235-40.
3. Gupta S, Hawker GA, Laporte A, Croxford R, Coyte PC. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1531-7.
4. Sudo A, Miyamoto N, Horikawa K, et al. Prevalence and risk factors for knee osteoarthritis in elderly Japanese men and women. *J Orthop Sci* 2008;13:413-8.
5. Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl* 2000;60:6-8.
6. Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, Underwood C, Butler PE, Cowen T. Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:614-22.
7. Newman AP. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* 1998;26:309-24.
8. Chang RW, Falconer J, Stulberg SD, Arnold WJ, Manheim LM, Dyer AR. A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1993;36:289-96.
9. Jackson RW, Dieterichs C. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:13-20.
10. Shannon FJ, Devitt AT, Poynton AR, Fitzpatrick P, Walsh MG. Short-term benefit of arthroscopic washout in degenerative arthritis of the knee. *Int Orthop* 2001;25:242-5.
11. Wray NP, Moseley JB, O'Malley K. Arthroscopic treatment of osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:381.
12. Pridie K. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Endosc* 1989;1B:618-9.
13. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2001:S306-17.

14. Rodrigo JJ SJ, Silliman JF. Improvement of fullthickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg* 1994;7:109-16.
15. Hunt SA, Jazrawi LM, Sherman OH. Arthroscopic management of osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 2002;10:356-63.
16. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:477-84.
17. Alfredson H, Lorentzon R. Superior results with continuous passive motion compared to active motion after periosteal transplantation. A retrospective study of human patella cartilage defect treatment. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1999;7:232-8.
18. Korkala OL, Kuokkanen HO. Autoarthroplasty of knee cartilage defects by osteoperiosteal grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995;114:253-6.
19. Lorentzon R, Alfredson H, Hildingsson C. Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1998;6:202-8.
20. Hangody L, Karpati Z. [New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee]. *Magy Traumatol Ortop Kezseb Plasztikai Seb* 1994;37:237-43.
21. Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A Suppl 1:65-72.
22. Jakob RP, Franz T, Gautier E, Mainil-Varlet P. Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections. *Clin Orthop Relat Res* 2002:170-84.
23. Simonian PT, Sussmann PS, Wickiewicz TL, Paletta GA, Warren RF. Contact pressures at osteochondral donor sites in the knee. *Am J Sports Med* 1998;26:491-4.
24. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S147-55.
25. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000:212-34.

26. Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, et al. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin J Sport Med* 2001;11:223-8.
27. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-72.
28. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95.
29. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 1998;41:1331-42.
30. Hayflick L. The cell biology of human aging. *N Engl J Med* 1976;295:1302-8.
31. von Zglinicki T, Nilsson E, Docke WD, Brunk UT. Lipofuscin accumulation and ageing of fibroblasts. *Gerontology* 1995;41 Suppl 2:95-108.
32. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-52.
33. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991;256:271-82.
34. Houben A, Raes M, Houbion A, Remacle J. Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture. I. Conditions for the appearance of an alteration in glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Mech Ageing Dev* 1984;25:23-34.
35. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-7.
36. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 1999;9:939-45.
37. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997;33:703-9.
38. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 1978;120:33-53.

39. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6622-6.
40. Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 1997;33:735-49.
41. Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* 1997;16:1785-94.
42. Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J* 2001;20:5532-40.
43. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999;97:503-14.
44. Hsu HL, Gilley D, Galande SA, et al. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* 2000;14:2807-12.
45. Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer - look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2002;2:879-84.
46. Harvey Lodish AB, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. *Molecular Cell Biology*. 6th ed: Palgrave Macmillan; 2007.
47. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, et al. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 1995;220:194-200.
48. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992;225:951-60.
49. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10114-8.
50. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
51. Blackburn D. Structure and function of telomeres. *Nature* 1995;350:569-72.
52. Rohde V, Sommerfeld HJ, Sattler HP, Wullich B. Telomerase in tumors: facts and perspectives. *Urologe A* 1998;37:386-94.
53. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-60.
54. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:99-106.

55. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998;92:401-13.
56. von Zglinicki T SG. Die Mechanismen der Seneszenz in Zellkultur. *Gerontol Geriatr Educ* 1997;30:24-8.
57. Langley E, Pearson M, Faretta M, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 2002;21:2383-96.
58. Ben-Porath I. The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005;37:961-76.
59. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992;27:375-82.
60. Martin JA, Buckwalter JA. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:B172-9.
61. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9857-60.
62. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994;55:876-82.
63. Engelhardt M, Martens UM. The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality (Review). *Oncol Rep* 1998;5:1043-52.
64. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
65. Martensson J, Steinherz R, Jain A, Meister A. Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8727-31.
66. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 1993;364:535-7.
67. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
68. Parker WD, Jr., Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989;26:719-23.

69. Abe JB, B. C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc* 1998;8:59-64.
70. Joosten SA, van Ham V, Nolan CE, et al. Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. *Am J Pathol* 2003;162:1305-12.
71. Packer L, Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 1977;267:423-5.
72. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995;220:186-93.
73. Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4130-4.
74. Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001;265:294-303.
75. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
76. Kirkwood TB, Kowald A. Network theory of aging. *Exp Gerontol* 1997;32:395-9.
77. Rodemann HP, Bayreuther K, Francz PI, Dittmann K, Albiez M. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res* 1989;180:84-93.
78. Honda S, Matsuo M. Shortening of the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts exposed to hyperbaric oxygen. *Exp Gerontol* 1983;18:339-45.
79. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4337-41.
80. Balin AK, Fisher AJ, Carter DM. Oxygen modulates growth of human cells at physiologic partial pressures. *J Exp Med* 1984;160:152-66.
81. Corpas E, Harman SM, Blackman MR. Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 1993;14:20-39.
82. Monnier VM. Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog Clin Biol Res* 1989;304:1-22.



83. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992;256:628-32.
84. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-72.
85. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;153:1133-40.
86. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
87. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189:54-63.
88. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;88:845-52.
89. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-402.
90. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int* 2007;31:1191-7.
91. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33:1402-16.
92. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1993;52:222-6.
93. Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 2002;71:36-44.

94. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406-13.
95. Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005;68:1940-3.
96. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004;113:1701-10.
97. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40:1275-84.
98. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33:919-26.
99. Rattan S. *Aging outside the body: usefulness of the Hayflick system*. London: Kuwer Academic; 2003.
100. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:592-6.
101. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003;17:1146-9.
102. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.
103. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:231-3; discussion 3-5.
104. Abdallah BM, Haack-Sorensen M, Burns JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:527-38.
105. Serakinci N, Guldborg P, Burns JS, et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004;23:5095-8.

106. Serakinci N, Hoare SF, Kassem M, Atkinson SP, Keith WN. Telomerase promoter reprogramming and interaction with general transcription factors in the human mesenchymal stem cell. *Regen Med* 2006;1:125-31.
107. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60:334-9.
108. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994;56:283-94.
109. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-6.
110. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:427-35.
111. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
112. Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med* 2004;5:82-98.
113. Leone AM, Crea F. Stem cells in acute myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly. *Eur Heart J* 2006;27:2911-3.
114. Tse HF, Yiu KH, Lau CP. Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5:103-12.
115. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 2003;139:510-6.
116. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
117. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890-6.
118. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with

osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8932-7.

119. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, et al. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 2003;17:474-6.

120. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-43.

121. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722-9.

122. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-8.

123. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41.

124. Inoue S, Popp FC, Koehl GE, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006;81:1589-95.

125. Lee ST, Jang JH, Cheong JW, et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002;118:1128-31.

126. Maitra B, Szekely E, Gjini K, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:597-604.

127. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81:1390-7.

128. Dean RM, Bishop MR. Graft-versus-host disease: emerging concepts in prevention and therapy. *Curr Hematol Rep* 2003;2:287-94.

129. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, et al. LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 1997;8:1417-27.
130. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001;414:118-21.
131. Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000;49:328-37.
132. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-70.
133. Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S156-62.
134. Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S73-81.
135. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, Spector M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J Orthop Res* 2000;18:790-9.
136. Kassem M, Abdallah BM. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res* 2008;331:157-63.
137. Southern E. Southern blotting. *Nat Protoc* 2006;1:518-25.
138. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1931-41.
139. Brandl A. Replikative Seneszenz humaner Chondrozyten und mesenchymaler Progenitorzellen während der in vitro Expansion [Dissertation]: Universität Regensburg, Medizinische Fakultät; 2005.
140. Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC. Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 1986;5:271-9.
141. Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 1985;35:249-58.

142. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
143. Rosenberger RF. The initiation of senescence and its relationship to embryonic cell differentiation. *Bioessays* 1995;17:257-60.
144. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000;28:707-15.
145. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 2004;22:675-82.
146. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64:278-94.
147. Reddel RR. Genes involved in the control of cellular proliferative potential. *Ann N Y Acad Sci* 1998;854:8-19.
148. Kassem M, Ankersen L, Eriksen EF, Clark BF, Rattan SI. Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporos Int* 1997;7:514-24.
149. Khatib AM, Siegfried G, Messai H, Quintero M, Barbara A, Mitrovic RD. Basal and induced nitric oxide and cGMP productions are decreased in senescent cultured rat articular chondrocytes. *Mech Ageing Dev* 1998;101:21-32.
150. Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol* 2001;36:1619-37.
151. Balin AK, Goodman BP, Rasmussen H, Cristofalo VJ. The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of WI-38 cells. *J Cell Physiol* 1976;89:235-49.
152. Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Buckwalter JA. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop J* 2004;24:15-20.
153. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development

of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R380-91.

154. Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Angele P. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2011.

155. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res* 2011.

156. Rodemann HP. Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation* 1989;42:37-43.

157. Dumont P, Burton M, Chen QM, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 2000;28:361-73.

158. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 2007;371:21-31.

159. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 2000;257:162-71.

160. de Magalhaes JP, Migeot V, Mainfroid V, de Longueville F, Remacle J, Toussaint O. No increase in senescence-associated beta-galactosidase activity in Werner syndrome fibroblasts after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1019:375-8.

161. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 20):3613-22.

162. Minamino T, Yoshida T, Tateno K, et al. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation* 2003;108:2264-9.

163. Park JS, Kim HY, Kim HW, et al. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech Ageing Dev* 2005;126:551-9.

164. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 2000;35:927-45.

165. Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1407-20.
166. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, et al. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 2001;15:398-403.
167. von Zglinicki T. Telomeres and replicative senescence: Is it only length that counts? *Cancer Lett* 2001;168:111-6.
168. Ohtani N, Mann DJ, Hara E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci* 2009;100:792-7.
169. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661-73.
170. Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 2003;33:492-6.
171. Saretzki G, Von Zglinicki T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:24-9.
172. Von Zglinicki T. Replicative senescence and the art of counting. *Exp Gerontol* 2003;38:1259-64.
173. Carman TA, Afshari CA, Barrett JC. Cellular senescence in telomerase-expressing Syrian hamster embryo cells. *Exp Cell Res* 1998;244:33-42.
174. Rubio MA, Davalos AR, Campisi J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. *Exp Cell Res* 2004;298:17-27.
175. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27:339-44.
176. Opresko PL, Fan J, Danzy S, Wilson DM, 3rd, Bohr VA. Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1230-9.
177. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426:194-8.
178. Saretzki G, von Zglinicki T. [Replicative senescence as a model of aging: the role of oxidative stress and telomere shortening--an overview]. *Z Gerontol Geriatr* 1999;32:69-75.



179. Brandl A, Angele P, Roll C, Prantl L, Kujat R, Kinner B. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J Orthop Res* 2010;28:354-60.
180. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000;20:1659-68.
181. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997;385:740-3.
182. Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve-Grez H, Jauch A, de Lange T. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol* 2002;12:1635-44.
183. Oh H, Wang SC, Prahash A, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5378-83.
184. Zhang Y, Cao EH, Qin JF. Up-regulation of telomere-binding TRF1, TRF2 related to reactive oxygen species induced by As(2)O(3) in MGC-803 cells. *Eur J Pharmacol* 2005;516:1-9.
185. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999;283:1321-5.
186. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003;13:1549-56.
187. Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Davies KJ, Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *FASEB J* 2000;14:2503-10.
188. Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 1998;332 ( Pt 1):43-50.
189. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596-606.
190. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 2004;73:417-35.
191. North BJ, Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol* 2004;5:224.

192. Imai S, Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Park PU, Guarente L. Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000;65:297-302.
193. Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2001;410:227-30.
194. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:793-8.
195. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001;107:137-48.
196. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001;107:149-59.
197. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 2005;16:4623-35.
198. Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:164-71.
199. Critchlow SE, Jackson SP. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 1998;23:394-8.
200. Smith GC, Divecha N, Lakin ND, Jackson SP. DNA-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem Soc Symp* 1999;64:91-104.
201. Featherstone C, Jackson SP. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 1999;434:3-15.
202. Dynan WS, Yoo S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1551-9.
203. Doherty AJ, Jackson SP. DNA repair: how Ku makes ends meet. *Curr Biol* 2001;11:R920-4.
204. Polotnianka RM, Li J, Lustig AJ. The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* 1998;8:831-4.
205. Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:655-72.
206. Shackelford DA, Tobaru T, Zhang S, Zivin JA. Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 1999;19:4727-38.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A/C/G/T/N	Adenosin/ Cytosin/ Guanin/ Thymin/ Nukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
Calcein-AM	Calceinacetoxymethylester
cpd	Populationsverdoppelung (cell population doubling)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA abhängige Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Dinukleotidphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EthD1	Ethidiumhomodimer 1
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kalbsserum (fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDF	Humane diploide Fibroblasten
Hepes	N-2-Hydroxyethyl Piperazine-N'-2-Ethan Sulfonic acid
hTERT	human telomere reverse transcriptase (katalytische Untereinheit der Telomerase)
kpb	Kilo-Basenpaar
kD	Kilodalton
KI	95% 95%-iges Konfidenzintervall
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
M1, M2	Mortalitätsstadium 1, Mortalitätsstadium 2
MAPC	multipotente adulte Progenitorzellpopulation

min	Minute
MW	Mittelwert
mRNA	messenger-RNA
MSCs	mesenchymale Progenitorzellen
n	Anzahl
NHEJ	non-homologous end joining
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
p16, p21, p53	Protein 16, Protein 21, Protein 53
r	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rt-PCR	real time Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SIPS	stress induced premature senescence
sir2	silent information regulator 2
SIRT1	Sirtuin 1
SSC	Natriumhydroxid-Citrat-Lösung
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris/EDTA
TGFβ1	transforming growth factor β 1 (Wachstumsfaktor)
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF1/2	telomeric-repeat binding factor 1/2 (telomerassoziierte Proteine)
TRF	Telomer-Restriktionsfragmente
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

---

U	unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VK	Variationskoeffizient
VT	Volumenteil
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (80 kDa Untereinheit von Ku)
$\lambda$	Wellenlänge

## **8.2. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. M. Nerlich danke ich für die Überlassung dieses überaus interessanten und aktuellen Themas. Über sein stetig gezeigtes Interesse habe ich mich sehr gefreut.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. P. Angele für die freundliche Diskussionsbereitschaft bei sämtlichen inhaltlichen Fragestellungen.

Frau Daniela Drenkard und Herrn Dr. R. Kujat danke ich als zuverlässige Ansprechpartner bei Problemen jeglicher Natur.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Anita Breu, die diese Doktorarbeit betreut hat. Weit über die Durchführung der PCR hinaus hat ihr Engagement und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft diese Arbeit erst möglich gemacht.

Zuletzt darf ich mich vielmals bei meinen Mitstreitern in der Forschungsgruppe Seneszenz, Frau Katharina Merkl, Herrn Benedikt Sprinzing und Herrn Andreas Hartmann bedanken. Mit Rat und Tat standen sie mir treu zur Seite und sorgten stets für ein freundschaftliches Arbeitsklima.

### **8.3. Erklärung zur Dissertation**

Herr Prof. Dr. med. Peter Angele und Frau Dr. med. Anita Breu haben die Dissertation angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.