

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

ZELLULÄRE SENESZENZ VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN UNTER
EINFLUSS VON 17 β -ÖSTRADIOL UND TAMOXIFEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Sprinzing

2012

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

ZELLULÄRE SENESZENZ VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN UNTER
EINFLUSS VON 17 β -ÖSTRADIOL UND TAMOXIFEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Sprinzing

2012

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Angele

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung:

16.10.2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knorpeldefekte: Möglichkeiten der Reparatur	2
1.2	Tissue Engineering: die Lösung des Knorpelreparatur-problems?	3
1.3	Telomere: mehr als TTAGGG	4
1.4	Telomer-Hypothese und replikative Seneszenz: die innere Uhr	6
1.5	Östrogen: kleines Molekül mit großer Wirkung	10
1.5.1	Östrogen und Knorpel	12
1.5.2	Östrogen und Telomerase	13
1.6	Tamoxifen: der erste SERM	14
1.7	Mesenchymale Stammzellen	15
2	Fragestellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Geräte und Hilfsmittel	19
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	21
3.1.3	Medien, Puffer und Lösungen	23
3.2	Biologisches Untersuchungsmaterial	27
3.3	Methoden	27
3.3.1	Zellbiologische Methoden	27
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	30
3.3.3	Statistik	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Etablierung und Optimierung der benötigten Methodik	46
4.1.1	X-Gal Färbung	46
4.1.2	Bestimmung der Telomerlänge	46
4.1.3	Bestimmung der Genexpression	48
4.2	Analyse der Zellproliferation	49
4.2.1	Analyse der Zellproliferation mesenchymaler Progenitorzellen	49
4.2.2	Zellproliferation von mit Hormonen kultivierten mesenchymalen Progenitorzellen	50

4.3	Analyse der Morphologie und der β -Gal- Expression.....	53
4.3.1	Morphologie und β -Gal-Expression junger Zellen.....	53
4.3.2	Morphologie und β -Gal-Expression seneszenter Zellen	53
4.4	Analyse der Telomerlänge	55
4.4.1	Telomerlängenverkürzung zunehmend seneszenter mesen-chymaler Progenitorzellen	55
4.4.2	Telomerlängenverkürzung unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol	56
4.4.3	Telomerlängenverkürzung unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol/ Tamoxifen und Tamoxifen	58
4.5	Analyse der Genexpression	61
4.5.1	Expression von TRF 1 und TRF 2.....	61
4.5.2	Expression von p21	63
4.5.3	Expression von XRCC	63
4.5.4	Expression von SIRT 1	64
5	Diskussion	66
5.1	Analyse der Zellproliferation.....	66
5.2	Analyse der Zellmorphologie.....	68
5.3	Analyse der β -Galaktosidase-Expression.....	69
5.4	Analyse der Telomerlänge	71
5.5	Analyse der Genexpression	75
5.6	Perspektiven.....	78
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literatur.....	83
8	Anhang.....	95
8.1	Abkürzungsverzeichnis	95
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	98
8.3	Tabellenverzeichnis.....	100
8.4	Danksagung	101
8.5	Veröffentlichung	102
8.6	Erklärung zur Dissertation	103

1 Einleitung

Gelenkerkrankungen gehören in den Industrienationen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. In den USA sind 22% aller Erwachsenen betroffen, wobei 9% dadurch erhebliche Einschränkungen im täglichen Leben in Kauf nehmen müssen¹. Die weltweit häufigste Gelenkerkrankung ist die Osteoarthritis². Die aus dieser Erkrankung resultierende volkswirtschaftliche Belastung ebenso wie die individuelle Beeinträchtigung ist enorm. Die Kosten, die direkt durch diese Krankheit 2002 verursacht wurden, beliefen sich in Deutschland auf über 7 Milliarden Euro³ und erreichen damit Rang 2 der diagnosebezogenen Krankheitskosten direkt nach der Hypertonie. Des Weiteren entstehen durch die mittelbar mit einer Arthritis in Zusammenhang stehenden Ressourcenverluste, vor allem durch Arbeitsunfähigkeit und Invalidität, zusätzliche sozioökonomische Belastungen von geschätzt weiteren 7 Milliarden Euro allein in Deutschland⁴. Da die Arthritis eine im Alter stark zunehmende Erkrankung ist wird sich die Prävalenz dieser Erkrankungen im Hinblick auf den demographischen Wandel in den nächsten Jahren drastisch erhöhen⁵. Dadurch wird die Wichtigkeit einer effektiven Behandlung solcher Erkrankungen deutlich.

Man nimmt unter anderem an, dass zunehmendes Alter das Risiko für degenerative Gelenkerkrankungen erhöht, da die Gelenkknorpelzellen ihre Fähigkeiten, das Knorpelgewebe aufrechtzuerhalten bzw. zu erneuern mit der Zeit einbüßen⁶. Das Problem, das Hunter vor mehr als 250 Jahren beschrieb und das trotz intensiver Forschung auch heute noch Gültigkeit besitzt, macht die Behandlung nicht einfacher: „Ulcerated cartilage is a troublesome thing ... once destroyed it is not repaired.“⁷ Auf Grund der limitierten Kapazität zur Selbstreparatur des Gelenkknorpels haben die Chirurgen eine Reihe von Techniken mit dem Bestreben etabliert, Schmerzen zu lindern, die Gelenkfunktion wiederherzustellen und das weitere Fortschreiten der Krankheit zu verhindern. Die passende Behandlungsmethode zu finden, hängt zunächst vor allem von der Größe, Tiefe und Ursache des Knorpeldefekts ab. So ist bei sehr großen Defekten oder fortgeschrittener Arthritis der Einsatz von künstlichen Gelenken indiziert, wohingegen kleinere Schäden durch weniger invasive arthroskopische Methoden behandelt werden können.

1.1 Knorpeldefekte: Möglichkeiten der Reparatur

Zu Beginn zielten diese Methoden auf die Stimulation des natürlichen Heilungsprozesses ab. So versucht man durch Abrasionarthroplastik⁸, durch die Pridie-Bohrung⁹ oder die Technik der Mikrofrakturierung¹⁰ mit Hilfe von artifiziell gesetzten Defekten im subchondralen Knochengewebe die pluripotenten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks dazu anzuregen, aus dem Fibringerinnsel neues Knorpelgewebe bzw. Knorpelersatzgewebe zu bilden. Allerdings wurde im Verlauf dieser Behandlungen minderwertiger, da weniger belastbarer Faserknorpel an Stelle des hyalinen Gelenkknorpels generiert. Dies hat zur Folge, dass ein Fortschreiten der degenerativen Prozesse des betroffenen Gelenks auf lange Sicht nicht aufgehalten werden konnte^{9,11-12}. Andere Methoden wie der „Osteochondral Autograft Transfer“ wurden entwickelt, um Gelenkknorpeldefekte mit osteochondralen autologen Transplantaten zu ersetzen. Bei dieser Technik werden entweder ein großes Transplantat oder bei der Mosaikplastik nach Hangody viele kleine Zylinder in einen Defekt eingebracht, die vorher an minderbelasteten Stellen des distalen Femur entnommen wurden¹³⁻¹⁴. Das klinische Outcome dieser Methode war zwar in über 90% der Patienten mit Defekten zwischen 1 und 4 cm² gut bis exzellent¹⁵, wobei im operierten Defekt hyalinartiger Knorpel und an der Entnahmestelle Faserknorpel nachgewiesen wurde¹⁶. Allerdings ist diese Methode stark durch die Größe des Defekts sowie die eingeschränkten Entnahmemöglichkeiten limitiert. Des Weiteren ist unklar, inwieweit sich in der Folge Morbiditäten an den Entnahmestellen ausbilden¹⁷. Man bediente sich auch an autologen Periostlappen¹⁸ oder am Perichondrium der Rippen¹⁹ mit ihren stammzellreichen Kambiumschichten als Reparaturmaterial, die klinische Datenlage diesbetrefflich ist jedoch sehr dünn und weist eine große Streubreite auf²⁰⁻²³.

Obwohl zur Behandlung symptomatischer Knorpeldefekte mehrere interventionelle Techniken etabliert wurden, konnte bisher noch kein überlegenes operatives Vorgehen identifiziert werden²⁴.

Einen Hoffnungsschimmer bieten neue, innovative Ansätze der regenerativen Medizin sowie des Tissue Engineerings.

1.2 Tissue Engineering: die Lösung des Knorpelreparatur-problems?

1988 fand die erste Konferenz zum Tissue Engineering in Lake Tahoe, Kalifornien, statt, die folgende Definition prägte:

„Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“²⁵. Bereits ein Jahr zuvor führten Peterson und Kollegen in Göteborg die erste autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) durch. Der Anfang des Tissue Engineerings in der orthopädischen Chirurgie war damit geschafft²⁶. Bei diesem Verfahren werden dem Patienten in einem ersten Eingriff Chondrozyten entnommen, die dann in vitro expandiert und nach zwei bis drei Wochen in den Defekt unter einen von der medialen Tibiaseite entnommenen Periostlappen, der an den Defekträndern eingenäht wird, implantiert. Der Defekt muss zudem mit Fibrinkleber versiegelt werden, um ein Austreten der injizierten Chondrozyten zu verhindern. 74-90% der Patienten, die sich einer solchen Transplantation unterzogen, zeigten in einer Studie mit 2-10 Jahre follow-up gute bis exzellente Ergebnisse²⁷.

Lediglich auf experimenteller Ebene werden momentan an Stelle der Chondrozyten Zellen mit chondrogenem Differenzierungspotential für die Belange der regenerativen Medizin eingesetzt. Eine Hoffnung ruht dabei auf den aus dem Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Progenitorzellen (MSCs), die unter bestimmten Kulturbedingungen und Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 zu funktionellen Knorpelzellen differenzieren²⁸.

Die ungelösten Probleme der autologen Chondrozyten-Transplantation sollten jedoch nicht außer Acht gelassen werden: Verletzungen der Entnahmestelle, limitierte Defektheilung bei großen Schäden oder Fibrosierungen an der Implantationsstelle²⁹. Diese Schwierigkeiten haben zu Weiterentwicklungen des Tissue-Engineerings bei Knorpeldefekten geführt. So werden Schwerpunkte auf den zusätzlichen Einsatz verschiedener Trägermatrizes, sogenannter Scaffolds³⁰ oder von Wachstumsfaktoren gelegt. Die Matrizes unterstützen die Implantate vor allem mechanisch und bieten

den Zellen die notwendige Struktur, um sich anzuheften und zu proliferieren. Die Wachstumsfaktoren können ebenfalls durch die Matrices in den Knorpel eingebracht werden. Damit sind die drei wichtigsten Komponenten des Tissue Engineerings genannt: Zellen, Scaffolds und Wachstumsfaktoren.

Jedoch weisen die meisten eukaryontischen Zellen lediglich eine beschränkte Teilungsfähigkeit auf. Da aber für das Tissue Engineering zahlreiche Zellvermehrungen *in vitro*^{6,31} nötig sind, um neues Gewebe zu produzieren, steht man hier erneut vor einem Problem, dem Problem der replikativen Seneszenz.

1.3 Telomere: mehr als TTAGGG

An allen Enden von linearen eukaryotischen Chromosomen finden sich spezielle Basensequenzen, die Telomere genannt werden. Dieser Begriff entstammt dem Griechischen und setzt sich zusammen aus telos, das Ende, und meros, der Teil. Geprägt wurde die Bezeichnung bereits 1938 von Muller. Allerdings gelang es erst Elizabeth H. Blackburn 1978 den DNA-Aufbau der sogenannten Telomere beim Wimperntierchen zu entschlüsseln³². Wie sich herausstellte, handelt es sich um kurze, repetitive Basensequenzen. Mit der Begründung, dass „die Entdeckung dieses Mechanismus, die Fantasie der Forschung beflügelt [hat, und] immer wieder mit der Idee von der ewigen Jugend und einem Leben in Unsterblichkeit in Zusammenhang gebracht [wird]“³³, wurde Elizabeth H. Blackburn im Jahre 2009 zusammen mit ihrer ehemaligen Doktorandin Carol Greider und Jack W. Szostak der Nobelpreis verliehen. Die Telomere bestehen überwiegend aus Thymin und Guanin und weisen bei zahlreichen Lebewesen kaum artspezifische Änderungen auf. Bei den menschlichen Telomeren findet sich die sich wiederholende Basenabfolge TTAGGG an den Enden eines jeden Chromosoms³⁴. Die Längen der Telomere bei den Chromosomen junger, normaler somatischer Zellen belaufen sich auf über 9 Kilobasenpaare (kbp)³⁵⁻³⁶. Diese DNA-Abschnitte kodieren nicht etwa für Gene, sondern haben andere, wesentliche Funktionen:

Zunächst schützen sie die Chromosomen vor Fusion, Degradation und Instabilität³⁷. Für diesen Schutz der Chromosomen wird jedoch noch ein wenig mehr benötigt, als die TTAGGG-Doppelstrang-Wiederholungen. Es ist leicht vorstellbar, dass die Enden der Chromosomen von der Zelle fälschlicherweise als Doppelstrangbrüche zu erkennen wären, weswegen einige zusätzliche Strukturen notwendig sind, um die

Telomere und somit die Chromosomen vor falschen Reparaturmechanismen oder End-zu-End-Fusion zu bewahren³⁸.

Bei Wirbeltieren endet der Guanin-reiche Strang in einem Einzelstrang-Überhang, dem „G-tail“. Außerhalb der Mitose lagert sich dieser G-tail mit mehreren telomerbindenden Proteinen zum Telomer-Nukleoproteinkomplex, auch Telosom genannt, zusammen. Es bilden sich zwei Schleifen, das doppelhelikale T-Loop und das tripelhelikale D-Loop³⁹(siehe Abb. 1.1)

Das Telosom wird durch sechs spezifische Proteine, den sogenannten Shelterin-Komplex, geformt. Diese sind an den Chromosomenenden reichlich vorhanden, akkumulieren sonst allerdings nirgends. Ihre bekannten Funktionen sind auf die Telomere beschränkt. Der Shelterin-Komplex (Abb. 1.1) setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen, die die TTAGGG- Wiederholungen direkt erkennen können: TRF1 und 2 (telomeric repeat binding factor 1 und 2), sowie POT1 (protein protection of telomeres 1). POT1 kann direkt an Einzelstrang-DNA binden und scheint für die Bildung des D-Loop von Bedeutung zu sein. Diese drei Untereinheiten sind durch drei zusätzliche Shelterin-Proteine miteinander vernetzt: TIN2 (TRF1-interacting nuclear factor 2), TPP1 (tripeptidyl peptidase 1) und Rap1 (repressor activator protein 1)³⁸. Gemeinsam vereinigen sie sich zu einem Komplex, der es den Zellen ermöglicht, Telomere von realen DNA-Schäden zu unterscheiden.

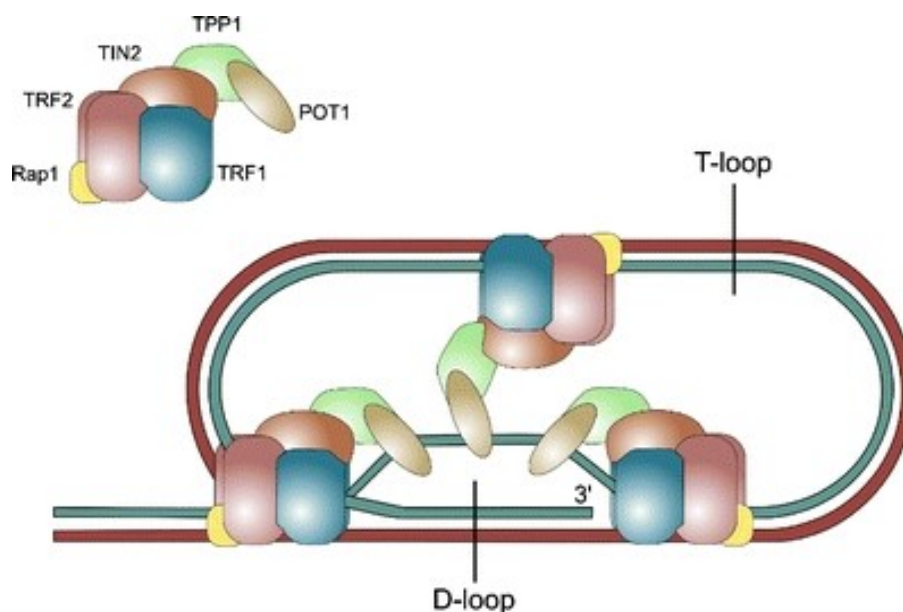


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Shelterin-Komplex, des T-Loop und des D-Loop⁴⁰

1.4 Telomer-Hypothese und replikative Seneszenz: die innere Uhr

Eine weitere wichtige Funktion nehmen die Telomere bei der DNA-Replikation ein. 1961 revolutionierte Leonard Hayflick die bis dahin geltenden Ansichten, humane diploide Fibroblasten seien unsterblich, mit dem Beweis, dass sie lediglich zu einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen fähig sind. Dieses Phänomen wird als „Hayflick-Limit“⁴¹ bezeichnet, es beträgt bei humanen Fibroblasten etwa 60 Zellpopulationsverdoppelungen (cpd)⁴², bei humanen Chondrozyten etwa 35 Verdoppelungen⁴³. Hayflick zeigte, dass humane diploide Fibroblasten in vitro nach circa 50 Zellverdopplungen (cpd) in ein Stadium übergehen, in dem sie zwar metabolisch noch aktiv sind, sich allerdings nicht mehr teilen und Veränderungen in Morphologie sowie in ihrer biochemischen Aktivität aufweisen. Sie sind dabei unter Umständen noch über Jahre lebensfähig⁴⁴. Die augenscheinlich veränderten Zellen erhielten die Bezeichnung „seneszent“.

Diese grundlegenden Erkenntnisse setzen die Existenz eines Mechanismus im Inneren einer jeden Zelle voraus, der die Zellteilungen zählt und sie nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen in den Zellzyklusarrest bringt. Ein Mechanismus, der als eine Art innere Uhr fungiert.

Unabhängig voneinander brachten Olovnikov 1971⁴⁵ und Watson 1972⁴⁶ dieses Phänomen in Verbindung mit den DNA-Sequenzen am Ende der Chromosomen und beschrieben das „End-Replikations-Problem“. Dieses Problem ergibt sich aus dem Mechanismus der DNA-Replikation. Da die DNA-Polymerase δ nur in 5'→3'-Lese-richtung arbeitet, kann eine kontinuierliche Replikation mit Ursprung an einem RNA-Primer nur an einem DNA-Strang, dem Führungsstrang erfolgen. Der zweite DNA-Strang muss diskontinuierlich repliziert werden, er wird deshalb auch als Verzögerungsstrang bezeichnet. Nachdem die DNA-Doppelhelix durch das Enzym Helikase aufgewunden wurde, binden am Verzögerungsstrang mehrere kurze RNA-Stücke als Primer. An deren freien 3'OH-Enden synthetisiert die DNA-Polymerase α komplementäre DNA-Stränge, die sogenannten Okazaki-Fragmente. In der Folge werden die RNA-Primer enzymatisch entfernt und die entstehenden Lücken von der DNA-Polymerase δ mit Hilfe der DNA-Ligase geschlossen. Allerdings kann die Lücke am 5'-Ende, also an den Telomeren des neu synthetisierten Stranges nicht aufgefüllt

werden, da hier keine dafür nötige 3'OH-Bindungsstelle zur Verfügung steht. So kommt es bei jeder Zellteilung zum Verlust von Basenpaaren (bp). Der Beweis des Zusammenhangs von Telomerlängenabnahme und der ansteigenden Anzahl durchgemachter Mitosen gelang allerdings erst Harley 1990 bei humanen Fibroblasten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*⁴⁷. Er wies einen Basenpaarverlust von 50bp pro Verdoppelung *in vitro* und 15bp pro Jahr *in vivo* bei den Fibroblasten nach und schlug damit eine Brücke zwischen Seneszenz und Telomeren. Dieser Zusammenhang konnte in der Folge auch für andere Zellarten nachgewiesen werden: So verlieren beispielsweise humane Chondrozyten *in vivo* circa 22bp pro Jahr⁴⁸ und hämatopoetische Stammzellen 9bp pro Jahr⁴⁹. Darüber hinaus konnte bei verschiedenen Gewebearten das Alter des Donors direkt mit der Telomerlänge korreliert werden⁵⁰⁻⁵¹. Das „End-Replikations-Problem“ verdeutlicht die Funktion der Telomere, durch ihre repetitiven, nicht kodierenden Einheiten den Verlust von essentieller genetischer Information zu verhindern, sowie möglicherweise als „innere Uhr“ zu fungieren. Die Telomere verkürzen sich bei jeder Zellteilung um 100-200 Basenpaare³⁶. Im Gegensatz dazu existieren auch Zellen, so zum Beispiel Keimbahn- oder Tumorzellen, bei denen die Telomerlänge trotz zahlreicher Teilungen konstant gehalten wird. Dies wurde zunächst 1985 plausibel durch die Entdeckung eines weiteren wichtigen Bestandteils der Telomere von Carol Greider: die reverse Transkriptase Telomerase, ein Enzym, das fähig ist, Telomere am 3'-Ende zu verlängern⁵². Es besteht aus drei Hauptkomponenten: dem RNA-Anteil hTR (human template RNA), der als Matrize fungiert, dem Telomerase-assoziierten Protein und der katalytischen Untereinheit hTERT (human telomerase reverse transcriptase subunit)⁵³⁻⁵⁵. Es ist darüber hinaus bekannt, dass die hTERT mRNA-Expression sehr stark mit der Telomeraseaktivität korreliert⁵⁶⁻⁵⁸.

Telomerase ist zum Beispiel in Keimbahnzellen oder Tumorzellen aktiviert und stabilisiert die Länge der Telomere, was folglich zur Immortalisierung dieser Zellen führt. In normalen somatischen Zellen ist das Enzym allerdings oft unterdrückt, weswegen diese einem ständigen „Alterungsprozess“ unterzogen sind.

Die Telomere verkürzen sich kontinuierlich mit jeder Zellteilung, unterschreiten schließlich die kritische Länge von 5-7,6 kbp⁵⁹, woraufhin die Zelle ihre Proliferation letztendlich durch einen p53- und Rb-abhängigen Zellzyklusarrest einstellt. Dies wird als Mortalitätsstadium M1 bzw. Seneszenz bezeichnet (siehe Abb. 1.2)

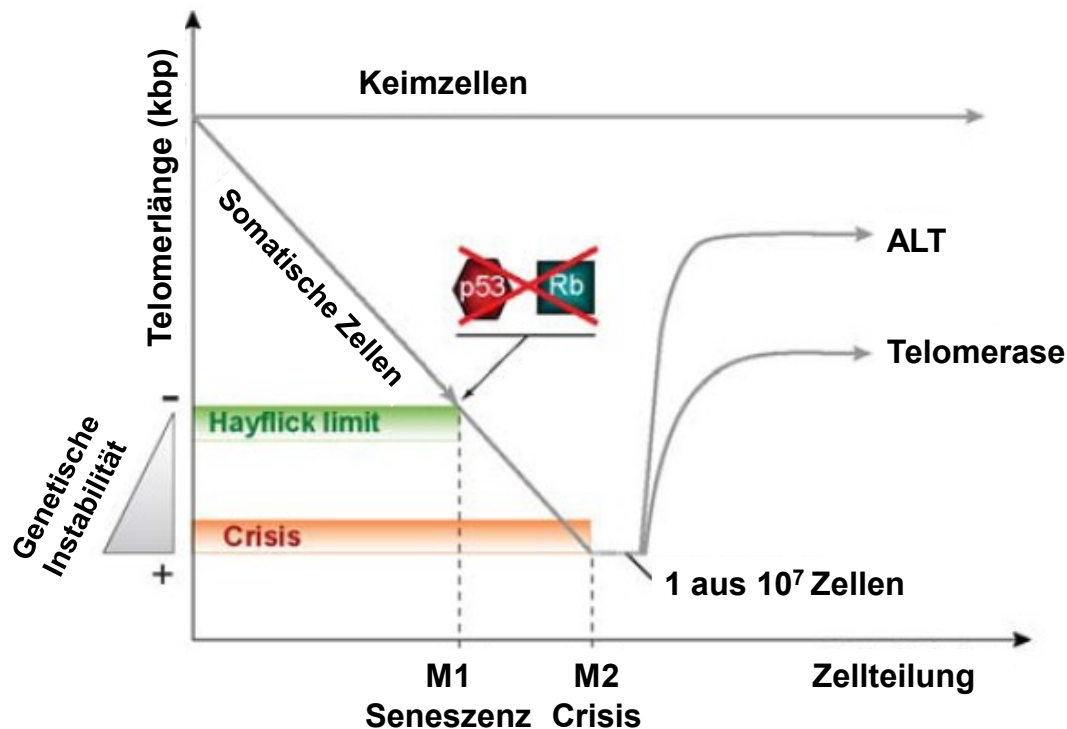


Abb. 1.2: Telomerhypothese der Zellalterung und Immortalisierung modifiziert nach⁴⁴

Es gilt zwar als bewiesen, dass die kontinuierliche Verkürzung der Telomere der zählende Mechanismus der Zelle ist, jedoch gibt es nur Theorien darüber, wie die kürzeren Telomere letztendlich als Trigger der replikativen Seneszenz fungieren. Man nimmt an, dass zu kurze Telomere keine suffiziente Interaktion mit den spezifischen telomerbindenden Proteinen wie TRF2 mehr zulassen und sich der Shelterin-Komplex nicht mehr ausbilden kann⁶⁰. Des Weiteren wird vermutet, dass die Telomerverkürzung proliferationsinhibierende Gene (Tumorsuppressorgene) aktiviert, die beim Erreichen des Hayflick-Limits eine Zellzyklusblockade auslösen. Die somit demaskierten Chromosomenenden werden nun als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt und induzieren dieselben Mechanismen wie andere Schäden dieser Art⁶¹. So wird der multifunktionale Transkriptionsfaktor p53 exprimiert, der die Transkription zellzyklusregulierender Gene stimuliert⁶². Aktiviert triggert p53 den Zellzyklusarrest über p21, was wiederum das Retinoblastom-Protein Rb aktiviert. Letzteres hemmt den Transkriptionsfaktor E2F und führt schließlich zur Seneszenz.

Nebenbei existiert auch noch ein p53-unabhängiger Signalweg, bei dem Rb direkt über p16 aktiviert werden kann⁶³.

Die Regulation von p53 erfolgt mittels Dephosphorylierung und Deacetylierung. Das NAD-abhängige SIRT1 zum Beispiel ist ein negativer p53-Regulator. Es deacetyliert p53 inaktiviert das Protein dadurch⁶⁴. So kann SIRT1 zelluläre Seneszenz verhindern..

Spezielle Transformationsereignisse - wie Inaktivierung des p53- und des Rb-Signalwegs - können somatischen Zellen aber unter Umständen ermöglichen, die Seneszenz zu umgehen und sich weiter zu teilen ohne dabei die Telomerase zu aktivieren. In diesen Zellen werden die Telomere weiterhin verbraucht und zunehmende Fehlfunktionen der Telomere in Kauf genommen. Schließlich werden die Telomere so kurz, dass sie die Chromosomen nicht mehr schützen können. Wenn dies passiert, erreichen die Zellen einen zweiten Proliferationsstopp, die sogenannte „crisis“. Sie ist gekennzeichnet durch ausgeprägte Telomerverkürzung, chromosomale Instabilität und Zelltod⁶⁵⁻⁶⁶.

An diesem Punkt gelingt es einigen wenigen Zellen (circa einer von 10^7 Zellen) Fähigkeiten zu erwerben, die es ihnen ermöglichen, die crisis zu überleben^{44,67}. Sie halten ihre Telomerlänge trotz weiterer DNA-Replikationen konstant⁶⁵. Dies geschieht im Großteil der Fälle durch Aktivierung der Telomerase. Andere Mechanismen, wie „alternative lengthening of telomeres“ (ALT), sind bis jetzt kaum verstanden⁴⁴ (siehe Abb. 1.2). Es wird vermutet, dass solche Zellklone an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind.

Letztendlich sind die Telomere vermutlich ein wichtiger, wenn auch nicht der einzige, Regulator bzw. Zählmechanismus der Zellteilungen. So haben etwa Hinweise auf eine Telomer-unabhängige Regulation von p16 Spekulationen über die Existenz multipler „innerer Uhren“ hervorgerufen⁶⁸.

Ein weiterer Diskussionspunkt betrifft den Begriff und das Stadium der Seneszenz. Denn es gibt Beweise dafür, dass nicht allein die Telomerverkürzung als Ursache für Seneszenz in Frage kommt. Zuerst wird die Funktion der Telomere wie oben beschrieben nicht nur durch die Länge bestimmt, sondern vor allem durch ihre molekulare Struktur, sowie ihre Strukturproteine.

Dazu kommt, dass ein seneszenten Phänotyp auch durch extrinsische Faktoren herbeigeführt werden kann. So kann bei Zellen, die zum Beispiel mit

Wasserstoffperoxid oder Gamma-Strahlung behandelt wurden, Seneszenz herbeigeführt werden, die nicht zwangsläufig mit verkürzten Telomeren einhergeht⁶⁹⁻⁷⁰, sich phänotypisch aber nicht von der replikativen Seneszenz unterscheidet. Begrifflich unterscheidet man deshalb die sogenannte „stress-induced premature senescence“, kurz SIPS⁷¹ von der replikativen Seneszenz. Dabei wird SIPS für alle Arten des seneszenten Phänotyps gebraucht, welche nicht durch verkürzte Telomere zustande gekommen sind.

Auf die Frage, inwieweit sich die replikative Seneszenz von SIPS auf molekularer Ebene unterscheidet, kann die Forschung zum jetzigen Zeitpunkt keine befriedigende Antwort geben. Wie sich die Rolle der Seneszenz entwickelt, bleibt spannend.

1.5 Östrogen: kleines Molekül mit großer Wirkung

Östrogene zählen zu den Steroidhormonen und werden über mehrere Vorstufen aus Cholesterol gebildet (siehe Abb. 1.3). Sie sind die wichtigsten weiblichen Geschlechtshormone und werden zum Großteil im Ovar und der Plazenta produziert. Aber auch in männlichen Individuen kann mit Hilfe des Enzyms Aromatase durch die Umwandlung von Testosteron Östrogen entstehen. Die aktive Form im menschlichen Körper ist hauptsächlich das 17- β -Östradiol, welches auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften leicht Zellmembranen passieren kann.

Die Östrogene entfalten ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren, die Östrogenrezeptoren α und β (ER α/β). Sie zählen zu der Superfamilie der Kernrezeptoren⁷². Östradiol diffundiert durch die Zellmembran, bindet an den spezifischen Steroidrezeptor. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex kann dann weiter in den Zellkern wandern, um dort mit spezifischen Bindungsstellen der DNA, den EREs (estrogen receptor responsive elements), in den Promotorregionen sensibler Gene zu interagieren und die Transkription direkt oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren zu regulieren⁷³⁻⁷⁴.

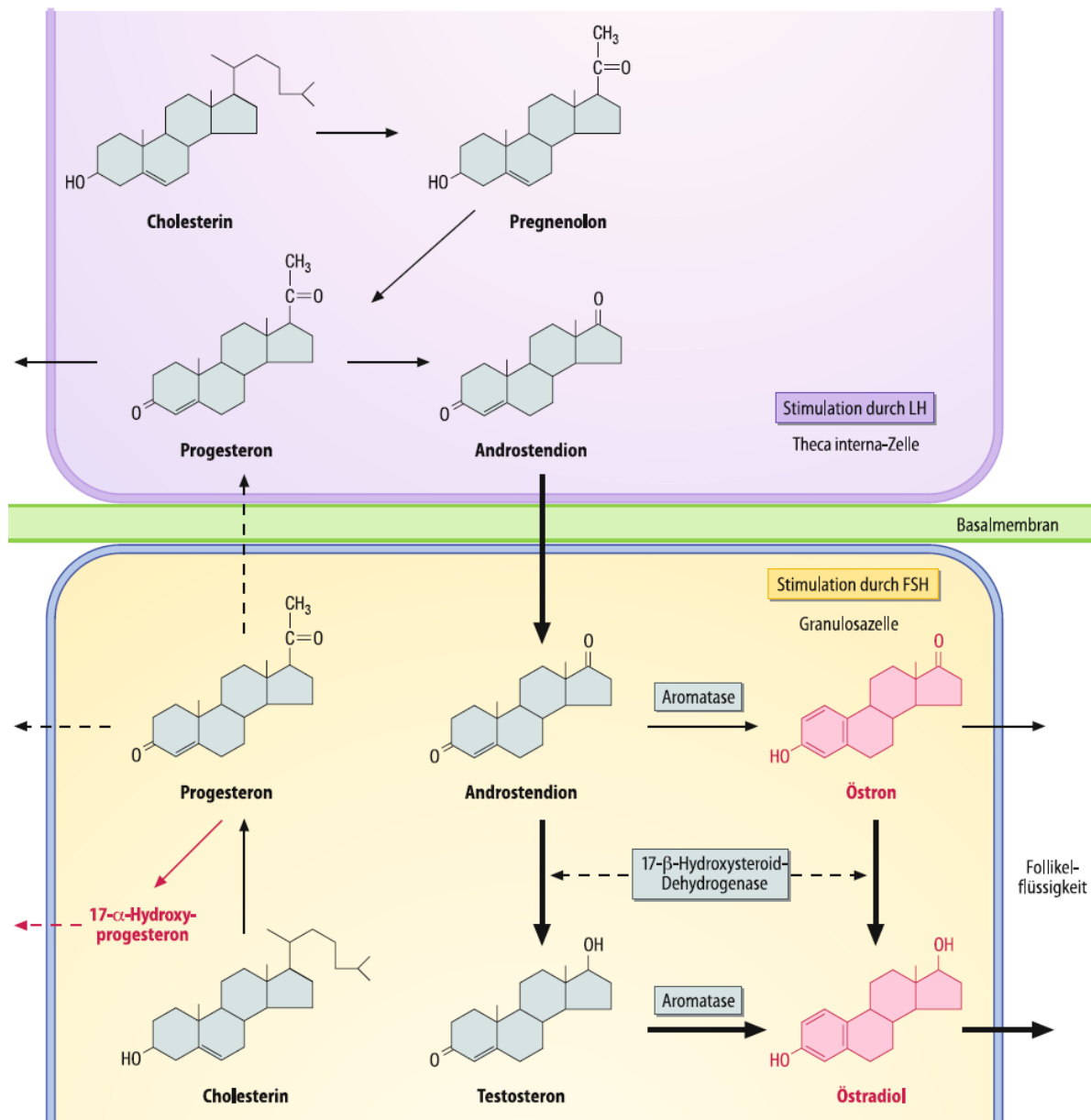


Abb. 1.3: Biosynthese des Östrogens⁷⁵

Allerdings sind dadurch nicht die unmittelbaren Effekte der Steroidhormone zu erklären. So existieren neben diesen klassischen noch weitere membranassoziierte Rezeptoren mit nachgeschalteter Aktivierung von sekundären Botenstoffen (second messengers). Carmeci identifizierte 1997 GPR30, einen membrangebundenen Östradiolrezeptor, der zu der Familie der G-Proteine gehört⁷⁶. Über die zusätzlichen nicht-klassischen Rezeptoren vermag Östradiol einerseits schnelle nichtgenomische Wirkungen, sowie alternative genomische Wirkungen andererseits zu entfalten (siehe Abb. 1.4).

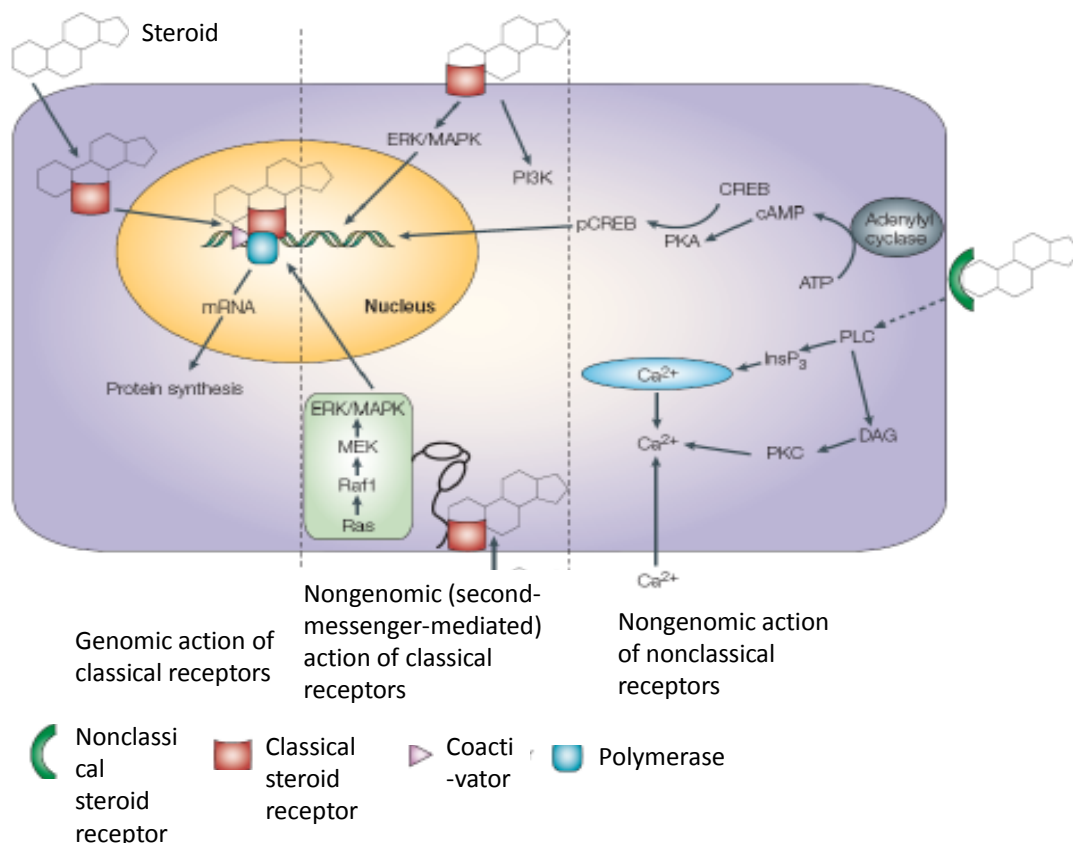


Abb. 1.4: Schema der unterschiedlichen Signalwege von Steroidhormonen⁷⁷

1.5.1 Östrogen und Knorpel

Östrogen entfaltet seine Wirkung an verschiedensten Geweben im gesamten menschlichen Körper, so auch am Knorpelgewebe. Die klassischen Östrogenrezeptoren ER α und β konnten unabhängig von Alter und Geschlecht in allen Zonen des Gelenkknorpels nachgewiesen werden⁷⁸⁻⁷⁹. Ebenso gelang es, den membrangebundenen Rezeptor GPR30 in der menschlichen Wachstumsfuge nachzuweisen, wobei dieser während der Pubertät herunterreguliert wird⁸⁰.

Östrogen spielt eine wichtige Rolle im physiologischen Wachstum, da es an der Initiation des pubertären Wachstumsschubes und am Schließen der Wachstumsfuge maßgeblich beteiligt ist⁷⁸.

Aber auch im Erwachsenenalter nimmt Östrogen noch eine bedeutende Stellung im Bezug auf das Knorpelgewebe ein. So findet sich bei Frauen eine von Knochenlänge und body mass index (BMI) unabhängige, signifikant dünnere Knorpelschicht mit

niedrigerem Knorpelvolumen im Vergleich zu Männern, wobei sich die Unterschiede ab einem Alter von 50 Jahren noch stärker manifestieren⁸¹.

Außerdem scheinen Östrogene eine wichtige Rolle bei degenerativen Erkrankungen wie der Osteoarthritis zu spielen. Die Erkrankung tritt bei prämenopausalen Frauen im Vergleich zu gleichaltrigen Männern weniger oft auf⁸². Im Gegensatz dazu ist bei postmenopausalen Frauen sowohl eine signifikant höhere Prävalenz als auch klinische Manifestation dieser Erkrankung zu beobachten, wenn man sie mit Männern des gleichen Alters vergleicht⁸³⁻⁸⁴. Dies legt die Vermutung nahe, dass die postmenopausal sinkenden Östrogenspiegel zu dem rapiden Anstieg des Auftretens der Osteoarthritis beitragen⁸². Die Ergebnisse der Studien zu diesem Thema sind allerdings kontrovers. Ebenso fraglich ist die Beeinflussung der Knorpeldicke durch eine langfristige Hormonersatztherapie, da auch diesbetrefflich unterschiedliche Studienergebnisse vorliegen⁸⁵⁻⁸⁶. Inwieweit Östrogen zur Entstehung und zum Progress der Osteoarthritis beiträgt und welche anderen Faktoren hinzukommen, bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.5.2 Östrogen und Telomerase

Des Weiteren ist Östrogen an der Entstehung einer Reihe von Krebserkrankungen beteiligt, wobei es als positiver Regulator der Zellproliferation auftritt. Hier seien vor allem Brustkrebs⁸⁷ und das Endometriumkarzinom⁸⁸ genannt. Auf der anderen Seite ist ein Sinken des Östrogenspiegels während der Menopause mit dem Verlust der reproduktiven Funktion oder einer Abnahme der Knochendichte assoziiert⁸⁹. Analog dazu induziert eine Inhibition von Östrogen über eine negative Mutante des ER α die replikative Seneszenz und hebt das tumorigene Potential auf⁹⁰.

Östrogen spielt also auch eine beachtliche Rolle bezüglich Zellproliferation, Zellalterung und Immortalisierung von Zellen.

Unter physiologischen Bedingungen konnte ein starker Zusammenhang zwischen zyklusabhängigem Östrogenspiegel und Telomeraseaktivität im Endometrium bewiesen werden⁹¹⁻⁹². Während der sogenannten proliferativen Phase des weiblichen Zyklus erreicht sowohl Telomeraseaktivität als auch der Östrogenspiegel den Höhepunkt⁹³⁻⁹⁴.

Ebenso konnten in vitro Studien zeigen, dass Östrogen die hTERT Genexpression und damit die Telomeraseaktivität in einigen ER α -positiven Zelllinien hochreguliert⁹⁵.

Wie bereits erwähnt, greift Östrogen in die Genexpression über Interaktionen zwischen aktiviertem ER und ERE ein. Es gibt darüber hinaus Hinweise dafür, dass das imperfekte ERE (GGTCAGGCTGATC) an der Stelle -2677 des hTERT-Promotors (Abb. 1.5) mit dem aktivierten ER α interagiert, und so die hTERT-Promotor-Aktivität reguliert wird. Analog dazu senkt eine Deletion dieses ERE die Östrogen-induzierte Telomeraseaktivität drastisch⁹⁵⁻⁹⁶.

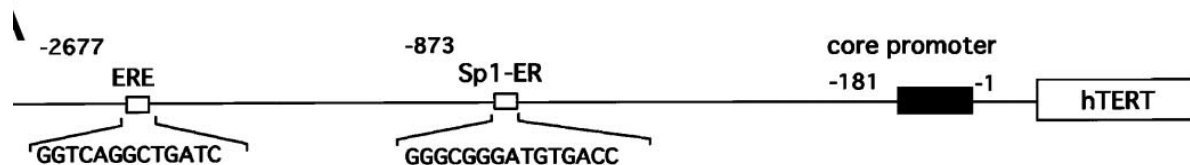


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des ERE im hTERT-Promotor⁹⁵

Sich dieser Erkenntnisse zu bedienen, um daraus eventuell neue Ansätze für die Generierung von Zellen zum Zwecke des Tissue Engineerings zu entwickeln, war unter anderem Teil dieser Arbeit.

1.6 Tamoxifen: der erste SERM

Tamoxifen ist ein nicht steroidaler Östrogen Agonist-Antagonist, der die Brustkrebstherapie revolutionierte⁹⁷ und heutzutage dafür weit verbreitet zum Einsatz kommt⁹⁸⁻⁹⁹. Tamoxifen und seine Metaboliten konkurrieren mit Östrogen um die Bindung an die zytoplasmatischen Östrogenrezeptoren. Außerdem wird vermutet, dass die Substanz anti-östrogene Effekte über Inhibition von Proteinkinase-abhängigen Signalwegen auf der Zellmembran ausübt¹⁰⁰. Aber Tamoxifen wirkt nicht allein anti-östrogen, sondern besitzt auch stimulatorische Aktivität an den Östrogenrezeptoren anderer Gewebe⁹⁷. Um diesen Eigenschaften Tribut zu zollen, wurde ein neuer Terminus geschaffen: SERM (Selective Oestrogen Receptor Modulator). Damit soll zum Ausdruck gebracht werden, dass eine einzige Substanz in der Lage ist, sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte abhängig vom Zielzelltyp auszuüben⁹⁷. Zusätzlich dazu wurde über weitere biologische und pharmakologische Einflüsse von Tamoxifen berichtet¹⁰¹⁻¹⁰³.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Tamoxifen in der Lage ist, den Anstieg der Telomeraseaktivität, der durch Östrogen induziert wurde, aufzuheben. Wohingegen

die alleinige Zugabe von Tamoxifen die Telomerasefunktion nicht zu beeinträchtigen scheint¹⁰⁴.

So bietet sich diese vielfach eingesetzte Substanz als Östrogen-Gegenspieler für diese Arbeit an.

1.7 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurden erstmals von Fridenstein entdeckt, der zeigte, dass sich Kolonien von abhängenden fibroblasten-ähnlichen Zellen entwickeln, die sich zu Knochenzellen und Adipozyten differenzieren, wenn man das Knochenmark in einem Medium mit fetalem Kälberserum (FCS) ausbringt¹⁰⁵. Allerdings benannte er diese Zellen noch anders, nämlich „colony-forming unit fibroblasts“ (CFU-Fs). Erst 1994 prägte Caplan den Begriff „mesenchymal stem cells“ (MSCs)¹⁰⁶. Seitdem haben sich zahlreiche Forschergruppen mit diesen Zellen beschäftigt und herausgefunden, dass die MSCs eine multipotente adulte Stammzellpopulation mit einem Differenzierungspotential zu verschiedenen Zelllinien (Abb. 1.6) wie Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten unter entsprechenden Kultivierungsbedingungen repräsentieren¹⁰⁷. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass sie sich ebenfalls zu Myozyten und sogar zu Zellen nichtmesodermaler Herkunft wie Hepatozyten und Neurozyten differenzieren können. Dies wird allerdings kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Forschungsarbeit¹⁰⁷⁻¹¹².

Da die MSCs ähnliche Eigenschaften aufweisen wie die embryonalen Stammzellen, jedoch keine ethischen Konflikte auslösen, werden auf diese Zellen große Hoffnungen bezüglich verschiedenster therapeutischer Optionen gesetzt, und ihr Nutzen wird in zahlreichen klinischen Untersuchungen getestet¹¹³. Die anfängliche Erwartung, die MSCs könnten die Lösung des Endreplikationsproblems darstellen und würden dank ihrer Stammzeleigenschaften unbegrenztes Proliferations- und Differenzierungspotential aufweisen, erwies sich leider als falsch. Man fand heraus, dass auch MSCs in vitro in Abhängigkeit vom Donoralter nach 24 bis 41 cpd die Seneszenz erreichen¹¹⁴ und außerdem im Gegensatz zu anderen adulten humanen Stammzellen keine oder zumindest mittels TRAP-Assay (Telomere Repeat Amplification Protocol-Assay) nicht detektierbare Telomeraseaktivität besitzen¹¹⁵⁻¹¹⁶.

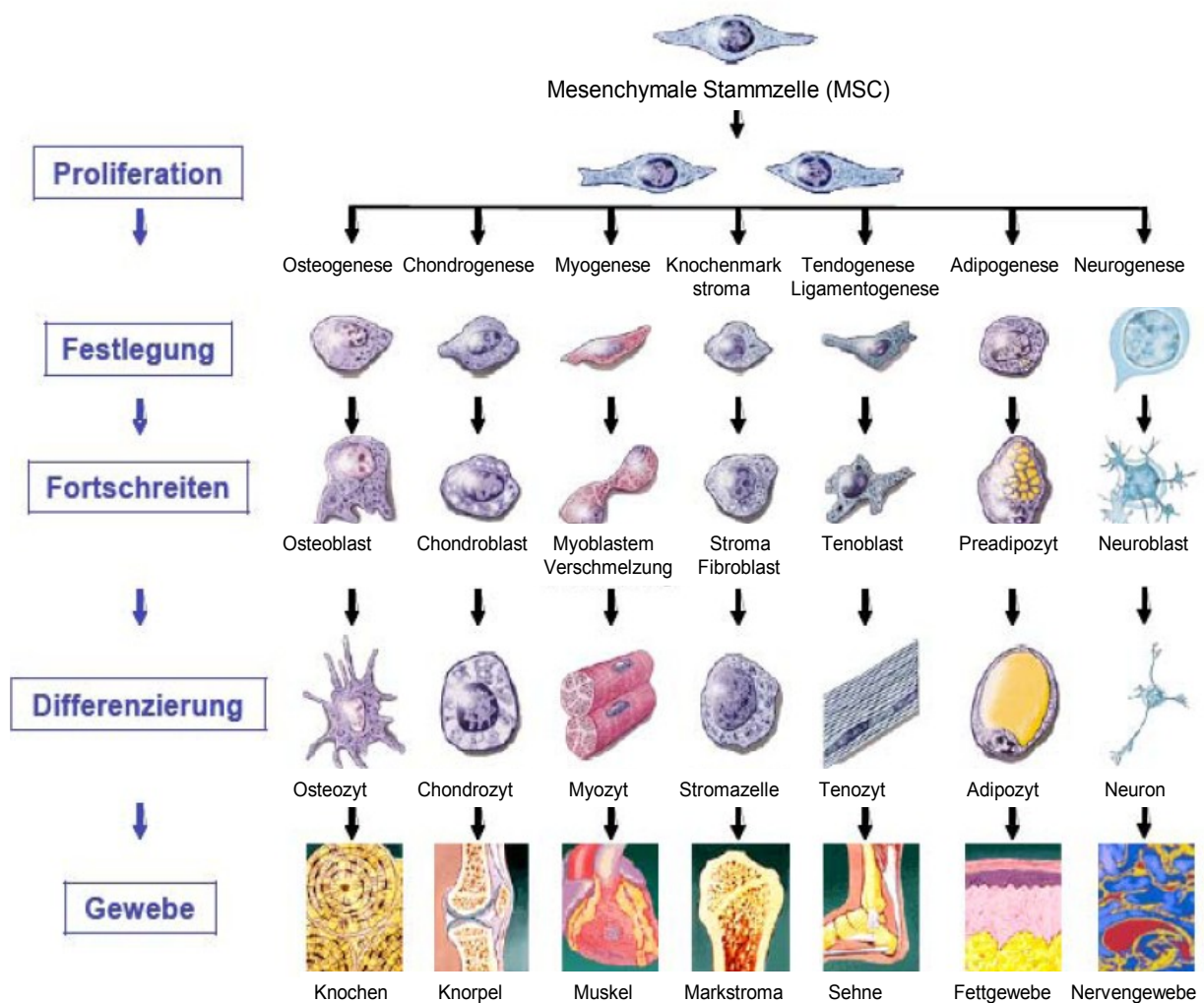


Abb. 1.6: Differenzierungspotential einer mesenchymalen Stammzelle¹¹⁷

Vor circa 10 Jahren wurde eine weitere Zellpopulation entdeckt: die primitivere multipotente adulte Progenitorzellpopulation (MAPCs)¹¹⁸. Diese Zellen sind nicht nur in der Lage zu mesenchymalen Stammzellen zu differenzieren, sondern auch zu Zellen meso-, neuroekto- und entodermaler Herkunft. Ein weiteres Merkmal, das diese Zellen von den MSCs unterscheidet, ist das enorme Proliferationspotential bei gleichbleibender Telomerlänge¹¹⁸⁻¹¹⁹. Gegebenenfalls existiert demnach eine telomerasepositive Subpopulation der MSCs, die die Lösung des Endreplikationsproblems darstellen könnte, die allerdings mit einer Häufigkeit von 1 MAPC zu 10^8 isolierten MSCs sehr selten ist¹¹⁰.

Nun sind Zelltherapien für die regenerative Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen auf dem Vormarsch. Vielversprechende Ergebnisse wurden in Studien

mit MSCs erzielt. In vitro Studien belegen, dass MSCs eine ganze Reihe von anti-inflammatorischen, angiogenetischen, neurotrophischen, immunmodulatorischen und antifibrotischen Faktoren sezernieren¹²⁰. So wird zunehmend die Meinung akzeptiert, dass MSCs die Regeneration und Heilung mit der Sekretion von zahlreichen pro-regenerativen Faktoren stimulieren.

Aktuelle Studien zur Wirksamkeit der MSCs bei fortgeschrittener Leberzirrhose¹²¹, diabetischem Fußsyndrom¹²², kutanen Wunden¹²³, komplexen neurologischen Erkrankungen wie Multisystematrophie¹²⁴, Knochenmarkstransplantationen¹²⁵, aber auch bei KHK und Myokardinfarkt¹²⁶⁻¹²⁷ zeigen das enorme Potential für den breiten therapeutischen Einsatz dieser Zellen. MSCs wirken immunsuppressiv¹²⁰, was zu ihrem Einsatz in der Therapie der akuten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) führte. Auf Grund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften ist neben einer lokalen auch eine systemische Applikation, auch HLA-unabhängig, möglich^{107,128}. Die Ergebnisse hierzu sind sehr vielversprechend¹²⁹⁻¹³⁰.

Neben den zahlreichen Ansätzen, MSCs für die Zelltherapie zu nutzen, bieten sie auch neue Möglichkeiten im Bereich des Tissue Engineerings. Die Vorteile der Nutzung der MSCs liegen dabei klar auf der Hand: mit Hilfe von speziellen Scaffolds könnten große Mengen an Gewebe hergestellt werden. Speziell bei Knorpelzelltransplantationen muss im Gegensatz zur Verwendung von Chondrozyten bei der Gewinnung von MSCs kein gesundes Knorpelgewebe verletzt werden. Schließlich weisen auch die sogenannten Minderbelastungszonen durchaus hohe Kontaktdrücke auf¹⁷. Des Weiteren ist eine Knochenmarkpunktion zum Beispiel des Beckens vergleichsweise leicht und ambulant durchführbar und es bedarf keiner zweizeitigen Operation (vgl.1.2).

Obwohl die Nutzung von MSCs für den therapeutischen Bereich bis jetzt nur auf experimenteller Ebene möglich ist, wecken sie doch große Hoffnungen. Die zahllosen Publikationen und Arbeitsgruppen, die sich mit diesem Thema beschäftigen, legen Zeugnis über das nach wie vor ungebrochene enorme Interesse an diesen Zellen ab.

2 Fragestellung

Mesenchymale Stammzellen sind durch ihre vergleichsweise einfache Gewinnung und Kultivierung sowie deren enormes Differenzierungspotential zu einer interessanten Quelle für den Bereich des Tissue Engineerings geworden. Vor allem im Bereich der Knorpelersatztherapie wird ihr Einsatz erprobt. Allerdings ist für die autologe Knorpelzelltransplantation eine ex vivo Expansion mesenchymalen Stammzellen in Zellkulturen notwendig. Es ist bekannt, dass diese Zellen nur über ein beschränktes Teilungspotential verfügen und nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen das Stadium der replikativen Seneszenz erreichen. Die Wirkung von Östrogen auf die Zellalterung ist weitgehend ungeklärt. Die enge Beziehung zum Promotor des hTERT-Gens lässt allerdings vermuten, dass dieses Hormon einen starken Einfluss auf die Seneszenz haben könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Östrogen und dessen Antagonisten Tamoxifen auf die Zellbiologie der mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck sollten folgende Aspekte während und nach Exposition mit Östrogen und/oder Tamoxifen genauer unter die Lupe genommen werden:

- Einfluss auf das Proliferationsverhalten
- Zellmorphologische Veränderungen
- Veränderungen typischer Seneszenzmarker (SA- β -Galaktosidase-Expression)
- Einfluss auf die Telomerlänge
- Expression telomerassoziierter Gene (TRF1, TRF2)
- Expression von DNA-Reparaturgenen (XRCC5)
- Expression bestimmter Regulatoren des Zellzyklus (p21, SIRT1)

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
Mikroskop	Dialux 20 EB	Leitz, Weimar
Mikroskopkamera	DMC 2	Polaroid, Offenbach
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
Zentrifugen:	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 ²	Sarstedt, Newton, NC
	Falcon 15 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	Falcon 50 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	6-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 ₂	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 (ohne Phenolrot)	PAN, Aidenbach
	FCS (nicht hitzeinaktiviert)	PAN, Aidenbach
	Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
	Hepes-Puffer	Gibco, Karlsruhe
Passage:	DPBS (pH 7,4)	Cambrex, Verviers, Belgien
	0,05% Trypsin/	Gibco, Karlsruhe
	0,02% EDTA	Gibco, Karlsruhe
Hormone:	17-β-Estradiol	Sigma, Taufkirchen
	Tamoxifen	Sigma, Taufkirchen

β-Galaktosidase-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 ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Merck, Darmstadt
	K ₄ [Fe(CN) ₆]	Merck, Darmstadt

Telomernanalytik (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
	λ-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) ₇ , 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 ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
PCR:	LightCycler FastStart DNA Master SYBR-Green I	Roche, Mannheim
	Primer für LightCycler-PCR: TRF1, TRF2, p21, SIRT1, XRCC, GAPDH	TIB MOLBIOL, Berlin

3.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Zellbiologische Arbeiten

MSC-Medium	DMEM (ohne Phenolrot)	PAN, Aidenbach
	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-2-Hydrat	0,3 M
	DEPC-Wasser	
2x SSC (pH 7,0):	20x SSC	10%
	DEPC-Wasser	
SDS 10% (pH 7,2):	SDS	10%
	DEPC-Wasser	
Maleinsäurepuffer (pH 7,5):	Maleinsäure	100 mM
	NaCl	150 mM
	DEPC-Wasser	

β-Galaktosidase Nachweis

Fixationslösung:	Formaldehyd 37%	10%
	DPBS (pH 7,4)	
X-Gal-Lösung:	X-Gal	200mg/ml
	DMF	
Zitronensäurelösung:	Zitronensäure	100mM
	Aqua bidest.	
Natriumphosphatlösung:	Dinatriumhydrogen-phosphat	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 ₃ [Fe(CN) ₆]	5mM
	K ₄ [Fe(CN) ₆]	5mM
	NaCl	150mM
	MgCl ₂	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 ₂	50 mM
	DEPC-Wasser	
Puffer 5:	Blocking Powder	10%
	Maleinsäurepuffer	

3.2 Biologisches Untersuchungsmaterial

Die Gewinnung der mesenchymalen Progenitorzellen erfolgte durch Aspiration von ca. 40 ml Knochenmark aus dem Os ilium im Rahmen autologer Knochen-
transplantationen.

Für die experimentelle Verwendung der Knochenmarksentnahmen lagen Einverständniserklärungen sowohl von den Patienten, als auch die Genehmigung von einer Ethikkommission für dieses Projekt vor.

Für diese Arbeit wurden MSCs von drei männlichen Patienten im Alter zwischen 26 und 70 Jahren (MW \pm SD: 45,7 \pm 18,3 Jahre) verwendet. Zum Zwecke der Anonymisierung sowie der leichteren Zuordnung wurden die Patienten nach laborinternem Standard mit Labornummern (LN) versehen.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellbiologische Methoden

3.3.1.1 Gewinnung und Kultivierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen

Die humanen mesenchymalen Progenitorzellen wurden aus dem Knochenmark des Beckenkamms gemäß Ficoll-Methode gewonnen (2 x 20 ml).

Je 20 ml Knochenmark wurden mit MSC-Medium (vgl. 3.1.3) auf 45 ml aufgefüllt, gemischt und bei 2000g 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 5 ml aufgenommen, auf einen Ficollgradienten aufgetragen und erneut 15 Minuten zentrifugiert (2000g, 25°C). Circa 16 ml der grautrüben „Interphase“ (1,073g/ml) wurden in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt, erneut mit MSC-Medium auf 45 ml aufgefüllt und 5 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das zurückgebliebene Pellet mit circa 5 ml Medium resuspendiert und mit der anderen Hälfte gepoolt. Darauf folgte eine Zellzählung (vgl. 3.3.1.3) sowie die Aussaat von je 10^6 Zellen pro Flasche.

Die MSCs wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml MSC-Medium bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das MSC-Medium wurde

initial frühestens nach 4 Tagen, ansonsten alle 3-4 Tage gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen erstmals passagiert.

Dafür wurden die Zellkulturflaschen zweimal mit PBS (phosphate buffered saline) gespült, um Serumreste vollständig zu entfernen. Darauf folgte die Inkubation mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA (3 min, Raumtemperatur). Die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald sich die Zellen vollständig abgelöst hatten, erfolgte der Reaktionsstopp durch Zugabe von 5 ml Medium, die Überführung in 50 ml Falcons und die Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000g und 25°C. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in Medium resuspendiert und ausgezählt (vgl.3.3.1.3). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte aus organisatorischen Gründen zunächst die Kryokonservierung.

3.3.1.2 Aufteilung auf die Untersuchungsbedingungen

Bei erneutem Erreichen einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen auf die 8 Untersuchungsbedingungen aufgeteilt. Hierfür wurden zunächst jeweils 10^{-3} M Östrogen- sowie Tamoxifen-Stammlösungen in Ethanol 100% hergestellt. Die acht unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen konnten so vor jeder weiteren Passage und jedem Medienwechsel über eine Verdünnungsreihe frisch angesetzt werden. Es wurden folgende Modifikationen untersucht: MSC-Medium ohne Zusatz von Hormonen als Kontrollgruppe, Medium mit den Östrogenkonzentrationen 10^{-7} M, 10^{-9} M und 10^{-11} M, Medium mit dem Zusatz von Tamoxifen mit Östrogen in gleichmolaren Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-9} M und 10^{-11} M, sowie Medium mit der Zugabe von 10^{-7} M Tamoxifen als zweite Kontrollgruppe.

Pro Flasche wurden nach jeder Passage 200 000 Zellen in frischem Hormonmedium bzw. Kontrollmedium ausgesät.

3.3.1.3 Bestimmung von Zellzahl, Trypanblaufärbung und Bestimmung der Zellproliferation

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen eines Aliquots in Medium suspendierter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl Aliquot mit 10 µl Methylenblau gemischt, in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die vier Zählquadrate ausgezählt. Das Methylenblau wurde zum Zwecke der Unterscheidung zwischen toten und lebendigen Zellen hinzugefügt.

Hierbei ergab der Mittelwert (Z) aller vier Quadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (X), dem Volumen (10^4) und der zur Resuspension verwendeten Mediummenge (V) in ml die Gesamtzellzahl: $N = Z \cdot X \cdot 10^4 \cdot V$.

Als Parameter für die Zellproliferation wurden die Zellpopulationsverdoppelungen (cpd) herangezogen, die sich aus folgender Formel berechneten:

$\text{cpd} = \log_{10}(N/N_0) \cdot 3,33$. Dabei bezeichnete N die Anzahl der Zellen am Ende des Experiments bzw. vor der nächsten Passage und N_0 ihre Anzahl zu Beginn.

3.3.1.4 Morphologie

Die Morphologie wurde mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops und Fotoapparates erfasst. Jeweils zu Beginn und am Ende des Versuchs erfolgten Dokumentation und Evaluation.

3.3.1.5 X-Gal Färbung

Diese Methode beruht auf dem Nachweis einer erhöhten Aktivität der Seneszenz-spezifischen-beta-Galaktosidase (SA- β -Gal) in seneszenten Zellen. Dieses Enzym ist verwandt mit der lysosomalen Galaktosidase, zeigt allerdings auch Aktivität bei pH 6 und nicht nur bei pH 4,5 wie das lysosomale Enzym. Für die Färbung wurden jeweils 2×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät, um dem Verhältnissen in den Zellkulturflaschen möglichst nahe zu kommen. Die Zellen wurden nach 24 bis 48 Stunden gefärbt.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Wells zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit je 2 ml einer frisch hergestellten 3,7-prozentigen Formaldehyd-lösung (37% Formaldehyd in PBS) 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Dann folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS, bevor 1,5 ml der x-gal-staining solution hinzugefügt wurde. Diese Lösung enthielt das Substrat Bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid (syn. BCIG bzw. X-Gal), das durch die SA- β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Die Wells wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen, 12-16 Stunden im Ofen bei 37°C inkubiert und danach fotografiert und evaluiert.

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

3.3.2.1 Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Assay)

3.3.2.1.1 DNA-Isolierung

Da die etablierte Methode zur DNA-Isolierung aus den in Monolayern kultivierten MSCs, die Phenol-Chloroform-Methode, einige Nachteile wie großen Zellmaterialbedarf bot, wurden nach einer geeigneteren Methode gesucht. Hierzu wurden zwei Verfahren, die DNA STAT-60TM-Methode (Fa. Tel-Test, Inc.) und das High Pure PCR Template Preparation Kit[®] (Fa. Roche), getestet. Letzteres erwies sich sowohl betrefflich Ausbeute als auch Reinheit als geeignete Extraktionsmethode.

Hierfür wurden die Zellen abtrypsinisiert, jeweils 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in ein Eppendorf Cup überführt, und 10 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert.

Anschließend wurden die Zellpellets in 200 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Binding Buffer sowie 40 µl Proteinase K wurden die Zellsuspensionen 10 Minuten bei 70°C im Wärmeblock inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu verdauen und die Nukleinsäuren freizusetzen.

Zur Extraktion wurden die Proben mit jeweils 100 µl Isopropanol 100% gemischt und auf das Säulchen überführt. Es folgte die Zentrifugation (1 min bei 8000g), um die DNA im Filter vom Rest der Flüssigkeit zu trennen. Daraufhin wurden 500 µl Inhibitor Removal Buffer auf das Säulchen pipettiert und die Proben erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer und Zentrifugationen erfolgte die Eluierung der DNA. Dazu wurden die Säulchen in sterile 1,5 ml Eppendorf Cups überführt. Dann wurde DNase freies Wasser, dessen pH zuvor mit Natriumhydroxid auf 8,0 angehoben worden war, auf 70°C erhitzt und jeweils 200 µl auf jedes Säulchen aufgebracht. Durch anschließende Zentrifugation von 1 Minute bei 8000g wurde die DNA vom Säulchen eluiert und in dem sterilen Eppendorf Cup aufgefangen.

3.3.2.1.2 Einengung des DNA-Probenvolumens und Bestimmung der DNA-Konzentration

Zunächst wurde das Probenvolumen von 200 µl auf circa 30-50 µl eingengt, um eine für den Hinf-Verdau geeignete DNA-Konzentration zu erhalten. Dies geschah mit Hilfe einer Vakuumzentrifugation von circa 2,5 Stunden.

Danach erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration. Da die Absorptionsspektrometrie lediglich im Bereich zwischen 0,1 und 1 OD (optische Dichte) zuverlässige Werte liefert, wurden die Proben mit TE-Puffer 1:36 verdünnt. Somit wurde die gewünschte Nukleinsäurekonzentration von 5-50 µg pro ml erreicht. Die Absorption wurde in einer Einmalküvette bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}) gemessen. Aus dem Mittelwert der durchgeführten Doppelbestimmung wurde die DNA-Konzentration der Probe berechnet.

Zur groben Einschätzung der Reinheit der DNA diente die Ratio, der Quotient aus A_{260} und A_{280} . Der Wert des Quotienten sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte unter 1,6 deuten auf Phenol- oder verbliebene Proteinreste hin, deren Absorptionsmaximum bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ liegt. Werte über 2,1 liegen unter anderem in einer Verunreinigung mit RNA oder durch Denaturierung der DNA begründet.

3.3.2.1.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde einerseits zur Überprüfung der Integrität der isolierten DNA im Anschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung verwendet, andererseits diente sie als Kontrolle der Vollständigkeit des Restriktionsverdaus. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente für den Southern Blot erfolgte ebenfalls mittels Gelelektrophorese.

Für alle Anwendungen wurden Gele mit 0,8% Agarose in 1x TBE-Puffer verwendet. Zuerst wurde die Agarose in 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle so oft aufgeköcht, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren, jedoch mindestens dreimal. Nach Abkühlen auf circa 50°C wurden 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Agarosegel hinzugefügt und in die vorbereitete horizontale Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Das Erstarren des Gels erfolgte bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Vernetzung und Abkühlung.

Die Proben wurden mit DEPC-H₂O bzw. 1xNEB-Puffer zum benötigten Gesamtvolumen ergänzt und nach Zugabe von 20 Volumenprozent Ladungspuffer in die Probentaschen pipettiert.

Als Längenstandard wurden 1 µl der 1 kb DNA-Ladder mit 7 µl DEPC- H₂O und 2 µl Ladungspuffer aufgetragen, als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet.

Die Elektrophoresebedingungen waren

- 100 V (6,67V/cm) für 1,5-2h für analytische Gele (Überprüfung der DNA-Integrität und des Restriktionsverdaus)
- 60 V (4V/cm) für 12-13h für Transfergele (Auftrennung der Restriktionsfragmente für den Southern Blot)

Mit Hilfe von UV-Licht konnte die DNA nach der Gelelektrophorese detektiert werden. Dies ist möglich, da der Farbstoff Ethidiumbromid als Interkalator, bevorzugt neben CG-Basenpaaren, fungiert und durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) zur Emission von Licht ($\lambda = 500\text{-}590 \text{ nm}$) angeregt wird. Dies wurde zur Dokumentation fotografiert (Abb. 3.1)

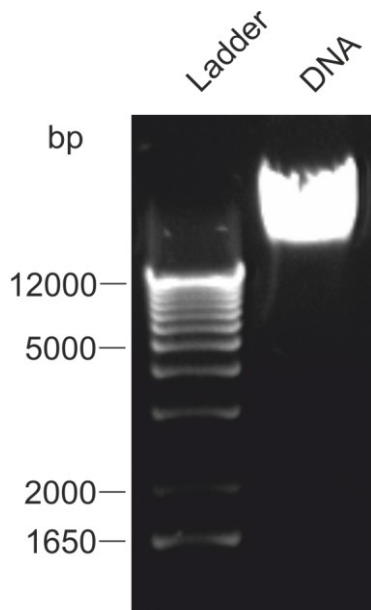


Abb. 3.1: Gelelektrophorese zur Überprüfung der Integrität der DNA. Zur Größenorientierung wurde zusätzlich der DNA-Ladder aufgetragen.

3.3.2.1.4 Restriktion der DNA

Nach Überprüfen der DNA im Agarosegel erfolgte die Restriktion der hoch-molekularen genomischen DNA mit Hinf I.

Das Restriktionsenzym Hinf I ist eine Endonuklease aus *Haemophilus influenzae* Rf. Auf Grund seiner Erkennungssequenz 5'...G/ANTC...3' existieren innerhalb des DNA-Doppelstrangs zahlreiche Schnittstellen. Allerdings weisen die Telomerregionen diese Schnittstellen nicht auf. So liefert der Verdau mit Hinf I einerseits viele kurze DNA-Fragmente und andererseits die ungeschnittenen Telomerenden, die 4-15 kbp groß sind. Durch Gelelektrophorese lassen sich die Telomere dann vom Rest der DNA trennen.

Der Restriktionsansatz enthielt 10 µg DNA und 10 Volumenprozent 10xNEBuffer 2. Die Proben wurden mit DEPC-H₂O auf das gewünschte Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Da pro 1 µg DNA 2 Units Hinf I (2U = 1 µl) benötigt werden, folgte zuletzt die Zugabe von 2 µl Hinf I. Hierbei musste beachtet werden, dass die Enzymkonzentration 5% des Endvolumens nicht überschreiten sollte.

Um eine ausreichende Enzymaktivität zu überprüfen und zu gewährleisten, wurde ein Kontrollansatz benötigt, in dem eine definierte Menge λ-DNA von dem im Restriktionsansatz vorhandenen Hinf I verdaut werden sollte. Dafür wurde dem betreffenden Restriktionsansatz ein Aliquot entnommen, das 500 ng DNA enthielt. Nach Zugabe von jeweils 2 µl λ-DNA wurde dieser Ansatz mit 1xNEBuffer 2 zu einem Endvolumen von 17 µl ergänzt. Der Leerwert setzte sich aus 15 µl 1xNEBuffer 2 und 2 µl λ-DNA zusammen.

Sowohl Leerwert als auch Restriktions- und Kontrollansätze wurden bei 37°C über Nacht, jedoch mindestens 5 Stunden im Wasserbad inkubiert.

Darauf folgte die gelelektrophoretische Kontrolle: Hierzu wurden den Restriktionsansätzen erneut Aliquots entnommen, die einer Menge von je 500 ng DNA entsprachen, und mit DEPC-H₂O zu einem Gesamtvolumen von 12 µl ergänzt. Anschließend wurde zu diesen Proben, zu den Kontrollansätzen und zum Leerwert je 1,5 µl 10xLadungspuffer hinzugefügt und als letztes zusammen mit einem Molekulargewichtsmarkeransatz, bestehend aus 1 µl der 1 kb DNA-Ladder, 12,5 µl DEPC-H₂O sowie 1,5 µl 10xLadungspuffer, auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen.

Nach etwa 1,5 h bei 100V wurde das Ergebnis unter UV-Licht fotografiert und dokumentiert, wobei die Kontrollansätze das λ-DNA-spezifische Schnittmuster, der Leerwert dagegen die ungeschnittene hochmolekulare λ-DNA aufweisen sollten. Bei den Proben der Restriktionsansätze zeigte sich der erwartete typische Schmier im Größenbereich < 4kbp (siehe Abb. 3.2).

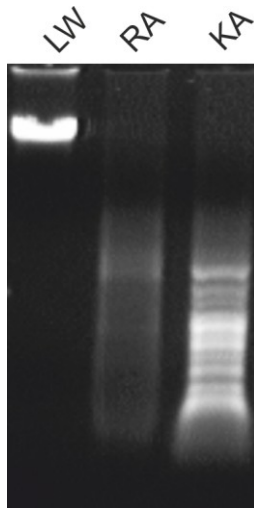


Abb. 3.2: Kontrollgel der DNA-Restriktion. Der Leerwert (LW) repräsentiert die ungeschnittene λ -DNA. Der Restriktionsansatz (RA) zeichnet sich durch den typischen Schmier im niedermolekularen Bereich aus, wohingegen der Kontrollansatz (KA) das charakteristische Schnittmuster von mit Hinf I verdauter λ -DNA zeigt.

3.3.2.1.5 Southern Blot

Der Southern Blot ist ein gängiges Verfahren zur molekularbiologischen Untersuchung von DNA. Benannt ist es nach Edwin Southern, der es 1975 entwickelte. Im Prinzip werden dabei DNA-Fragmente, die durch den Verdau mit speziellen Restriktionsenzymen gewonnen wurden, gelelektrophoretisch aufgetrennt und – nach Aufschmelzung des Doppelstrangs – auf flexible Membranen übertragen und dort fixiert. In diesem Experiment wurden von den Proben nach der gelungenen Restriktion mit Hinf I je 4 μg DNA entsprechend 20 μl Probenvolumen benötigt. Nach Zugabe von 5 μl 10xLadungspuffer erfolgte der Auftrag auf ein 0,8% Agarosegel inklusive zweier Markeransätze. Diese setzten sich aus zwei Längenstandards zusammen, wobei der erste aus 1 μl kb DNA-Ladder, 6,5 μl DEPC- H_2O und 2,5 μl 10x Ladungspuffer bestand und der andere 5 μl des DIG Molecular Weight Marker II, sowie 2,5 μl DEPC- H_2O und 2,5 μl 10x Ladungspuffer enthielt. Es schloss sich die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben bei 60V für 11-13 h an. Anschließend wurden die Banden im UV-Licht detektiert und fotografiert (siehe Abb. 3.3a).

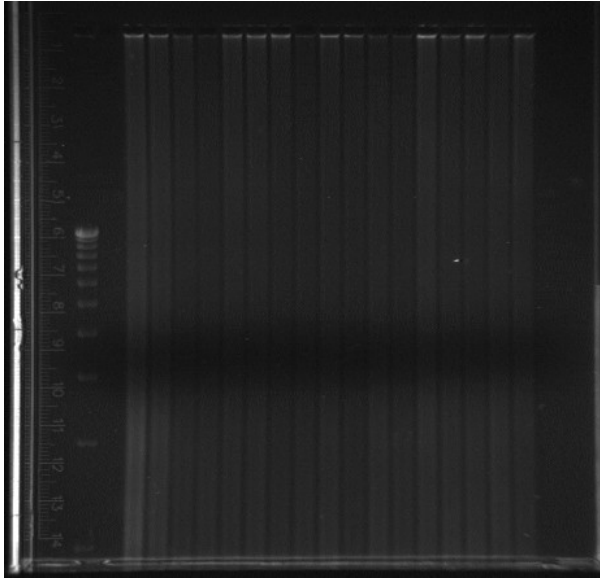


Abb. 3.3a: Blotgel (LN 604), die beiden Längenstandards sind auf den ersten beiden Banden aufgetragen, die Übrigen zeigen die kurzen DNA-Fragmente, die als „Schmier“ sichtbar werden.

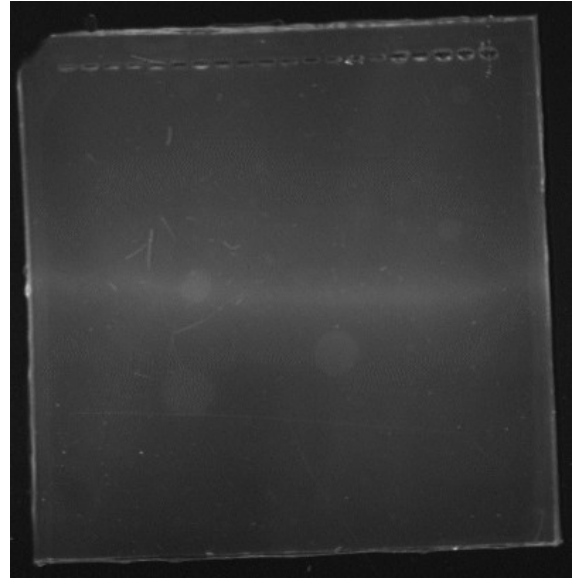


Abb. 3.3b: Die Signale sind nach vollständigem Southern Blot nicht mehr detektierbar.

Um die Transfereffizienz langer DNA-Fragmente >5 kbp zu verbessern, wurde die DNA in frisch hergestellter 250 mM HCl - Lösung 10 min depurinisiert. Danach wurde das Gel in destilliertem Wasser kurz gespült. Um die Doppelstränge aufzuschmelzen und so die für den Transfer benötigten Einzelstränge zu erhalten, wurde das Gel 30 Minuten mit der Denaturierungslösung auf dem Taumler inkubiert, kurz in destilliertem Wasser gespült und 30 Minuten mit der Neutralisierungslösung neutralisiert. Als letztes folgte die Äquilibration des Gels für 10 Minuten in 20xSSC.

Der DNA-Transfer auf die Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot. Hierfür wurde aus drei mit 20x SSC angefeuchteten Whatman 3MM paper eine „Brücke“ über eine Platte gelegt, die auf Gummifüßen in einer Wanne mit 20x SSC stand. Darauf wurde das Gel upside down platziert. Eine auf die Größe des Gels zugeschnittene Nylonmembran musste ebenso wie drei weitere Whatman 3MM paper luftblasenfrei aufgelegt und mit 20x SSC befeuchtet werden. Daraufhin wurden der Towel Stock aus Zellstoff sowie eine Glasplatte daraufgesetzt und mit circa 500g beschwert (siehe Abb. 3.4).

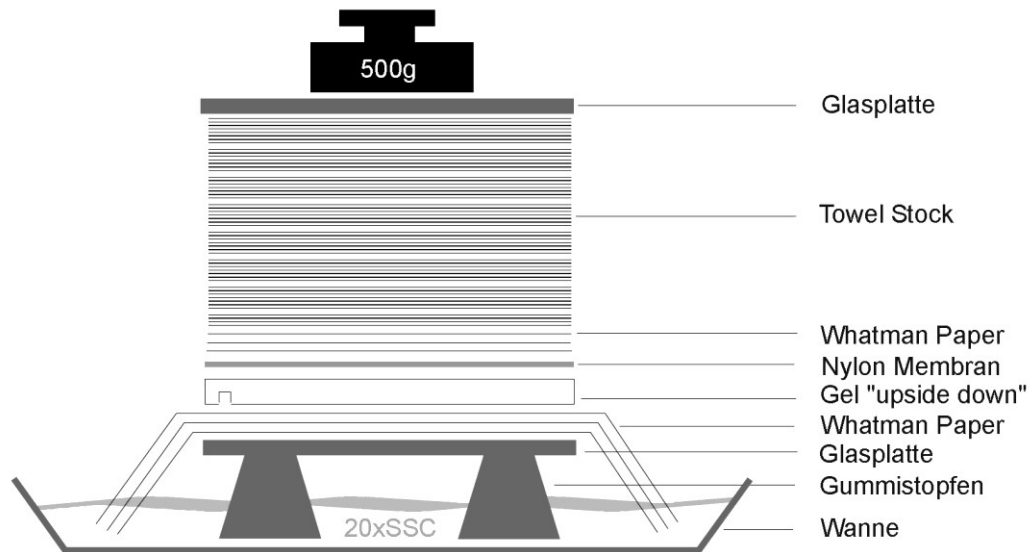


Abb. 3.4: Aufbau des Southern Blots¹³¹

Nach 12 bis 16 Stunden wurde das Blotten beendet. Zur Kontrolle der Bloteffizienz wurde das Gel unter UV-Licht auf eventuell verbliebene DNA-Fragmente hin überprüft (Abb. 3.3b).

Die Membran wurde 10 min in 2xSSC gewaschen, in feuchtem Zustand zwischen zwei trockene Whatman 3MM paper gelegt und sofort 30 Minuten bei 120°C gebacken, um eine Fixierung der DNA auf der Membran zu erreichen.

3.3.2.1.6 Hybridisierung

Zunächst wurde die Membran eingeschweißt und mit der vorgewärmten Prähybridisierungslösung bei 42 °C für mindestens 30 Minuten auf einer Eigenkonstruktion aus Taumler, Heizplatte und Isolierung aus Styropor und Pappe äquilibriert. Diese Konstruktion wurde auch für die folgenden Hybridisierungs- und Waschschrte verwendet (Abb. 3.5.). Während der Prähybridisierung erfolgte die Vorbereitung der Hybridisierungslösung. Hierfür wurden 2,4 pmol/ml (31,8 ng/ml) frisch denaturierte Telomer-Sonde und Prähybridisierungslösung benötigt. Für die Denaturierung wurde ein Aliquot, das eine entsprechende Menge Telomer-Sonde enthielt, mit DEPC-H₂O zu 50 µl ergänzt, 5 Minuten bei 55°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt.

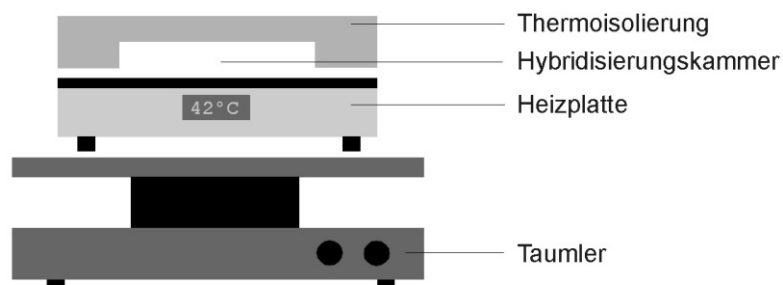


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Hybridisierungsvorrichtung¹³¹

Diese denaturierte Sonde wurde nun zu einer entsprechenden Menge vorgewärmter Prähybridisierungslösung gefügt. Im nächsten Schritt wurde die eingeschweißte Membran mit der so erhaltenen Hybridisierungslösung für mindestens 15 bis 16 Stunden bei 42°C inkubiert.

Um eventuelle Fehlpaarungen der Sonde zu lösen, folgten im Anschluss zwei 15-minütige Waschschrirte bei 42°C mit 2xSSC/0,1% SDS. Anschließend wurde die Membran noch zweimal jeweils 5 Minuten in 2xSSC und Maleinsäurepuffer/0,1% Tween bei Raumtemperatur gewaschen.

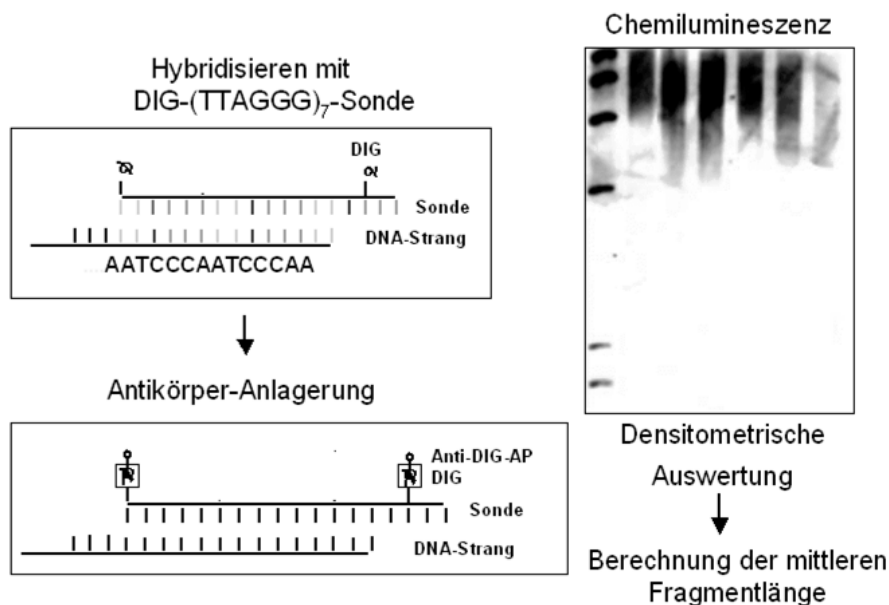


Abb. 3.6: Schematische Darstellung von Hybridisierung und Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente¹³²

3.3.2.1.7 Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente

Um eine Maskierung aller unbesetzten Bindungsstellen für den Antikörper herbeizuführen und somit ein günstiges Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund zu erreichen, wurden die Membranen mindestens 30 Minuten einer Blockierungslösung 1% auf dem Taumler ausgesetzt. Aus dem gleichen Grund wurde auch der Antikörper 1:10000 in 1 % Blockierungslösung verdünnt. Die Membranen wurden mit 10ml der Antikörper-Lösung in eine Folie eingeschweißt und mindestens 30min unter ständiger Bewegung inkubiert. Danach wurde überschüssiges Antikörperkonjugat durch zwei 15-minütige Waschschrte in Maleinsäurepuffer/0,1% Tween bei Raumtemperatur entfernt.

Da für die Umsetzung des Chemilumineszenzsubstrates ein alkalischer pH-Wert Voraussetzung ist, erfolgte die Äquilibration der Membran in dem alkalischen Reaktionspuffer 4 mit dem pH 9,5 für 2 Minuten. Daraufhin wurde circa 1ml CDP-Star-Lösung mit Hilfe eines handelsüblichen Sprühkopfes gleichmäßig auf der Membran gleichmäßig, die Membranen einzeln in Folien eingeschweißt und 5 Minuten im Dunkeln mit dem Chemilumineszenzsubstrat inkubiert. Nach der Entfernung des überschüssigen Substrats durch Einschweißen der Membranen in neue Folien, fand die Filmexposition in Filmkassetten bei Raumtemperatur statt. Die Expositionszeiten lagen zwischen 15 Sekunden und 5 Minuten.

3.3.2.1.8 Strippen der Membranen

Die Membranen konnten, wenn nötig, gestrippt und erneut hybridisiert werden. Dazu wurden die Membranen circa eine Minute bei Raumtemperatur in destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie 20 Minuten auf einem Rüttler bei 45°C im Ofen mit 2xSSC inkubiert wurden. Es folgten zwei weitere 5-minütige Waschschrte in 0,2 M NaOH/0,1% SDS bei Raumtemperatur. Anschließend konnten die Membranen entweder erneut hybridisiert oder nach Einschweißen in Folie und Zugabe von einigen Millilitern 2xSSC im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.3.2.1.9 Auswertung und Berechnung der mittleren Restriktionsfragmentlängen

Für die Auswertung der Blots werden in der Literatur grundsätzlich zwei Verfahren beschrieben¹³³. In dieser Arbeit wurde die zu besser reproduzierbaren Ergebnissen führende zweite Auswertemethode, die auf der Integration der Fläche unter der

Kurve beruht, verwendet. Zusätzlich wurde eine Wichtung der Messwerte durchgeführt, um die quantitative Überbewertung langer Restriktionsfragmente infolge einer Bindung mehrerer Sondenmoleküle, die zu einer Verstärkung des Signals führte, auszugleichen.

Die Auswertung der eingescannten Filme erfolgte densitometrisch. Mit Hilfe des Programmes Telometric 1.2 (Fox Chace Cancer Center) wurde die mittlere Telomerlänge mindestens in einer Doppelbestimmung auf verschiedenen Blots ermittelt (Abb. 3.7).

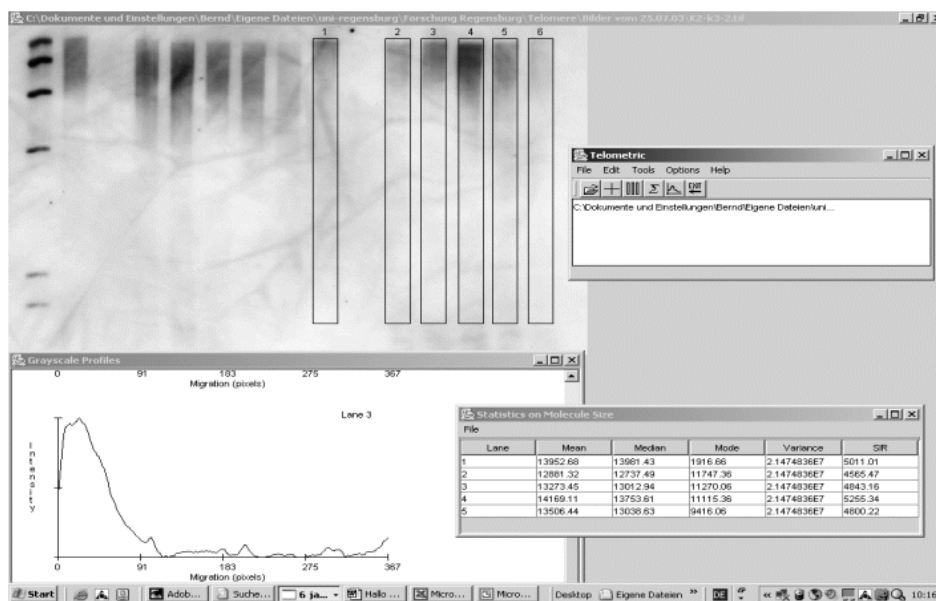


Abb. 3.7: Beispiel der Auswertung eines Southern Blots mit Hilfe des Programms Telometric 1.2 (Fox Chace Cancer Center)¹³²:

- links oben:** Blot mit Marker und den die in die Auswertung eingehenden Flächen markierenden Säulen in der rechten Bildhälfte
- links unten:** Gegen die Laufstrecke aufgetragene optische Dichte des Signals der Lane 3. Das gewichtete Integral dieser Funktion über der gesamten Laufstrecke ergibt die mittlere Telomerlänge der Probe
- rechts unten:** Berechnete Mittelwerte, Mediane, Varianz und Standardabweichung der TRF-Längen in den markierten Lanes

Des Weiteren wurden einige Maßnahmen ergriffen, um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, die im Folgenden beschrieben werden:

Auf jedem Gel wurde ein mit Digoxigenin gelabelter Längenstandard (DIG-Molecular Weight Marker II) mitgeführt, um eine eventuelle Inhomogenität der Gele untereinander sowie des Gellaufs auszugleichen. Zweitens wurde für jeden Blot ein spezifisches Hintergrundsignal bestimmt, das gleichmäßig über die ganze Spur der Probe abgezogen wurde. Ferner wurden die Proben über die gesamte Länge und die ganze Spurbreite der Signale ausgewertet. Zur Standardisierung des Verfahrens trug zusätzlich die Maßnahme bei, dass die Auswertung aller Blots auf einmal und von derselben Person durchgeführt wurde¹³².

3.3.2.2 Analyse der Genexpression

3.3.2.2.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus den in Monolayern kultivierten MSCs existierte die RNAzol-Methode als die etablierte Extraktionsmethode für die RNA-Isolierung aus Aggregaten oder Zellpellets. In dieser Arbeit wurde diese Methode für die RNA-Isolierung direkt aus den Monolayer-Kulturflaschen erweitert.

Hierfür wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt, die Flasche zweimal mit je 5 ml PBS gespült und anschließend sorgfältig abgesaugt. Dabei war wichtig, den Zellrasen so weit möglich von den Lösungen zu befreien. Anschließend wurde 2 ml RNAzol direkt in die Flasche pipettiert. Mit Hilfe eines cell scrapers wurde das RNAzol gleichmäßig über die gesamte Flasche verteilt und gleichzeitig die Zellen vom Boden gelöst. Durch Auf- und Abpipettieren des Zell-RNAzol-Gemisches wurde eine Lyse der Zellen erreicht. Dann wurde das Gemisch in zwei frische RNase freie Eppendorf Cups überführt, je 100 µl, entsprechend 1/10 des Volumens, Chloroform pro Cup hinzugefügt und 15 Sekunden per Hand stark geschüttelt. Nach 5-minütiger Inkubation der Proben bei 4°C folgte eine Zentrifugation bei 12000g und 4°C für 15 Minuten. Dadurch bildeten sich zwei Phasen, wobei die untere, blaue, organische Phenol-Chloroform-Phase Proteine und DNA enthielt, während die RNA in der oberen, farblosen, wässrigen Phase zu finden war. Diese RNA-haltige Phase wurde abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit dem gleichen Volumenanteil (1VT) Isopropanol gemischt. Darauf folgte eine 45-minütige Inkubation auf Eis bevor die Proben 15 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert und die Überstände entfernt wurden. Zur Reinigung der RNA wurde je 1ml 75%iges Ethanol zu den Pellets gegeben, durch Vortexen eine Mischung erzielt und eine erneute

Zentrifugation, allerdings bei 7500g und 4°C für 8 Minuten gestartet. Nach Entfernung der Überstände wurde die RNA für mindestens 90 Minuten zum Trocknen aufgestellt und zuletzt in DEPC-Wasser gelöst.

3.3.2.2.2 DNase Verdau und Bestimmung der RNA-Konzentration

DNase Verdau

Um eine Verunreinigung der RNA mit DNA gänzlich zu vermeiden, wurden alle RNA-Proben einem DNase Verdau unterzogen. Zu diesem Zweck wurde zu den 20 µl RNA-Probe noch 3µl 10xPuffer und 3µl DNase gefügt. Anschließend wurden die Proben mit DEPC-Wasser zu einem Endvolumen von 30µl ergänzt und 30 Minuten bei 37°C im Heizblock verdaut. Es folgte die Zugabe von 6 µl, entsprechend 0,2 Volumenanteile, Inactivation Reagent und eine 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach maximaler Zentrifugation für 1,5 Minuten konnte der Überstand in ein neues Eppendorf Cup überführt werden.

Messen der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

Die Absorptionsspektrometrie liefert nur im Bereich zwischen 0,1 und 1 OD (optische Dichte) zuverlässige Ergebnisse, was einer Nukleinsäurekonzentration von 5-50µg/ml entspricht. Deshalb wurden die Proben mit TE-Puffer 1:36 verdünnt und die Absorption in einer Einmalküvette bei $\lambda = 260\text{nm}$ (A_{260}) gemessen. Aus dem Mittelwert der durchgeführten Doppelbestimmung wurde die RNA-Konzentration der Probe berechnet.

Zur Überprüfung der Reinheit der RNA wurde als Orientierungswert die Ratio, der Quotient aus A_{260} und A_{280} herangezogen. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte kleiner als 1,6 deuten dabei auf das Vorhandensein von Phenolresten oder verbliebenen Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei $\lambda = 280\text{nm}$ liegt, hin. Werte größer als 2,1 können durch eine Denaturierung der RNA verursacht werden.

3.3.2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Integrität der isolierten RNA wurde im Anschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung und den DNase Verdau die Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurde ein 0,8% Agarosegel in 1xTBE-Puffer hergestellt (vgl.3.3.2.1.3).

Die erforderlichen 2 µl Probenmengen wurden mit DEPC-Wasser zum benötigten Gesamtvolumen ergänzt, 10 min bei 65°C erhitzt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden, und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1,5 µl RNA-Sample-Loading-Buffer wurden die Proben in die Taschen aufgetragen. Dieser spezielle RNA-Ladungspuffer enthält Formalin zur Inaktivierung von RNasen sowie Formamid zur Stabilisierung der RNA-Einzelstränge. Im Anschluss an die 1,5 bis 2-stündige Elektrophorese bei 100V (6,67 V/cm) konnte die RNA im UV-Licht detektiert werden, da der Farbstoff Ethidiumbromid bevorzugt neben CG-Basepaaren interkaliert und durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 302\text{nm}$) zur Emission von Licht ($\lambda = 500\text{-}590\text{nm}$) angeregt wird. Dies wurde zu Dokumentationszwecken fotografiert. Die intakte, nicht degradierte RNA zeigt nach gelelektrophoretischer Auftrennung typischerweise die 18s- und die 28s- Bande (siehe Abb. 3.8).

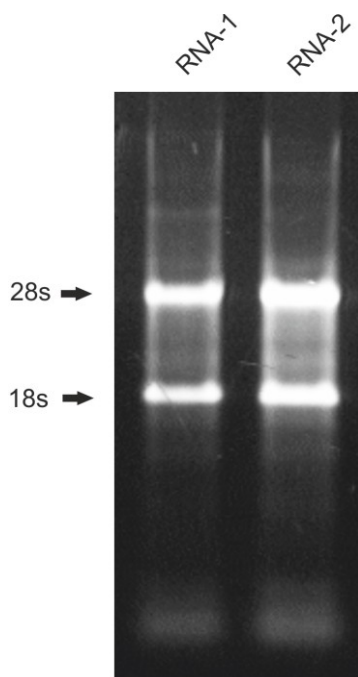


Abb. 3.8: RNA-Kontrollgel nach DNase Verdau mit den typischen 18s- und 28s-Banden

3.3.2.2.4 Analyse telomerregulierender Genexpression der jungen und seneszenten Zellen

Um herauszufinden, ob sich die Transkription telomerregulierender Gene bei jungen und seneszenten Zellen unterscheidet, wurden die mRNA-Expressionen von p21, TRF1 und TRF2, XRCC5 und SIRT1, sowie des unregulierten Housekeeping-Genes

GAPDH mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. Die Expression der GAPDH stellte dabei eine Kontrolle des rt-PCR-Laufes dar und wurde als Referenzwert für die relative Quantifikation verwendet.

Dazu mussten die RNA-Proben in cDNA transkribiert werden, um ein stabileres Produkt zu erhalten. Diese cDNA-Proben wurden dann zur Light-Cycler Analyse eingesetzt.

cDNA – Synthese

Es erfolgte für jede Probe eine Doppelbestimmung, wofür pro Ansatz 2 µg RNA eingesetzt wurde.

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurde das Enzym SuperScript™ II RNase H⁻ verwendet, eine aus E.coli isolierte reverse Transkriptase, die das *pol* Gen des Moloney Murine Leukemia Virus enthält¹³⁴⁻¹³⁵. Dieses Enzym ist in der Lage cDNA-Einzelstränge mit einer Länge von bis zu 12,3 kbp zu synthetisieren.

Zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen wurden das Wasser, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindende Primer Oligo(dT), sowie die Nukleotide ATP, TTP, GTP und CTP (dNTPs) stets aliquotiert.

1 µl Oligo(dT), 1 µl dNTPs, sowie ein 2 µg RNA enthaltenden Aliquot wurden mit DEPC-Wasser auf 12 µl ergänzt und 5 min bei 65°C zum Annealing inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und kurz anzentrifugiert. Nach Hinzufügen von 4 µl 5xFirst-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) und 2 µl 0,1 M DTT auf Eis, folgte die Erhitzung für 2 min bei 42°C. Nun wurde 1 µl reverse Transkriptase (SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase) hinzupipettiert und die Proben 50-60 min bei 42°C inkubiert, bevor durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C der Reaktionsstopp herbeigeführt wurde.

Die beiden Reaktionsansätze wurden gepoolt.

Polymerase Chain Reaction (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, entsprechend 0,5 µg cDNA, und 18 µl Master-Mix. Die Zusammensetzung des Master-Mixes fiel je nach Primer unterschiedlich aus, da sie von der für den einzelnen Primer optimalen MgCl₂-Konzentration in der Probe abhängig war. Sie ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

	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 ₂	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 ₂ O	13,2 µl	14 µl	14 µl	14 µl	14,8 µl	14 µl

Tab. 3.1: Zusammensetzung des Master-Mix

Der Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA-Probe 2 µl Wasser zugegeben. Nach Zugabe des Fast Starts wurden die Ansätze in einer Dunkelbox weiterbearbeitet. Die Analyse der Ansätze erfolgte letztlich in einer Dreifachbestimmung im Light-Cycler zusammen mit Standardansätzen. Die Auswertung erfolgte mit der Pfaffl-Methode¹³⁶.

3.3.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS® 17,0 for Windows verwendet.

Zusammenhänge zwischen zwei Messgrößen wurden unter Verwendung der Methoden der linearen Regression und der Korrelationsanalyse nach Pearson analysiert. Mit Hilfe des T-Test sollten eventuelle statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen gezeigt werden. Die Kontrolle der Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit einem Signifikanzniveau nach Liliefors 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 Etablierung und Optimierung der benötigten Methodik

Ein erster Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung und Optimierung der im Regensburger Tissue Engineering Labor teilweise bereits eingeführten Methoden¹³². Die Methoden für die Bestimmung der Telomerlängen und der Gen-expression, sowie für den Nachweis von Seneszenz wurden überdacht und zugunsten der Benutzerfreundlichkeit optimiert.

4.1.1 X-Gal Färbung

Zunächst wurde ein einfach durchführbarer und gängiger Seneszenz-Nachweis benötigt. Hierfür bot sich die Etablierung der Färbung mit Bromo-chloro-indol-Galaktopyranosid (X-Gal) an, einem Substrat der seneszenzspezifischen β -Galaktosidase. Dieses Enzym ist ein Biomarker, der sich spezifisch im Zytosol seneszenten, nicht aber präseneszenten Zellen nachweisen lässt¹³⁷. Für die Färbung wurde ein in der Literatur beschriebenes Protokoll im Vorfeld mehrfach durchgeführt. Der in 3.3.1.5 beschriebene Versuchsablauf lieferte dabei stets reproduzierbare Ergebnisse. Um den Kulturbedingungen in den 75 cm² Monolayern möglichst nahe zu kommen, wurden zu Beginn und am Ende jeden Versuchs Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Es stellte sich heraus, dass es am günstigsten war, jeweils circa 20 000 Zellen pro Well auszusähen, da dies in etwa der Zelldichte in den Kulturflaschen entsprach. Die MSCs wurden nach 24 bis 48 Stunden zeitnah gefärbt.

4.1.2 Bestimmung der Telomerlänge

4.1.2.1 DNA-Isolierung

Die bisher etablierte Methode zur Isolierung von DNA aus MSCs war die Phenol-Chloroform-Methode. Da diese aber einen enormen Zeitaufwand und vor allem Zellmaterialbedarf bedeutete, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer geeigneteren Methode gesucht. Zunächst erschien das beste Verfahren die Isolierung mittels DNA-STAT 60TM-Methode der Firma Tel-test Inc. zu sein. Diese Methode basiert auf einem monophasischen Reagenz, das aus einer chaotropischen Komponente zur

Zelllyse und einer phenolfreien Extraktionskomponente besteht, vergleichbar mit dem RNazol zur RNA-Extraktion. DNA-STAT 60TM versprach erstens einen geringeren Bedarf an Zellmaterial, da laut Hersteller die reverse Isolation möglich sein sollte und zwar aus dem RNazol-Ansatz, der zur RNA-Isolation benötigt und dessen Überstand inklusive DNA normalerweise verworfen wird. Zweitens erhoffte man sich dadurch eine Verringerung des Zeitaufwandes, da RNA und DNA aus einer einzigen Probe isoliert werden sollten. Allerdings wurde diese Methode nach verschiedenen Modifikationsversuchen sowohl auf Grund mangelnder Reinheit der DNA als auch zu geringer Ausbeute verworfen.

Es folgte die Prüfung, ob das Pure PCR Template Preparation Kit[®] von Roche[®] den Anforderungen des TRF-Assays gerecht wurde. Tests mit unterschiedlichen Zellanzahlen ergaben, dass die Ausbeute bei 0,5 bis 1×10^6 Zellen pro Säulchen am Größten war. Deshalb wurde diese Menge für alle weiteren Versuche verwendet. Des Weiteren wurde der Eluierungs-Puffer durch Wasser ersetzt, dessen pH-Wert zuvor auf 8,0 angehoben wurde.

Die Integrität der DNA wurde gelelektrophoretisch kontrolliert (vgl. 3.3.2.1.3) und die Ausbeute photometrisch bestimmt (vgl. 3.3.2.1.2). Die Säulchen-Methode zeigte bezüglich Qualität und Quantität hervorragende Ergebnisse, so dass sie sich für dieses Experiment als geeignet erwies.

4.1.2.2 Hybridisierung

Für die Hybridisierung der Membranen war normalerweise die Zuhilfenahme eines Hybridisierungssofens gebräuchlich und nötig. Um diesen wichtigen Arbeitsschritt von diesem Gerät unabhängig zu machen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Alternative gesucht. Da die geforderten 42°C auch von einer Heizplatte erreicht werden, wurde untersucht, ob das Einschweißen der Membranen und Inkubieren auf der Heizplatte mit einem aus Styropor konstruierten „Deckel“ ebenso effektiv war. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen auf die Membranen zu erzielen, wurde die modifizierte Heizplatte zusätzlich auf einen Taumler gestellt (siehe Abb. 3.5). Ein weiterer Vorteil neben der logistischen Erleichterung dieses Vorgehens war zusätzlich das Einsparen von Material respektive Puffer- und Hybridisierungslösung, da

durch Einschweißen der Membranen in Folie eine erhebliche Reduktion der Puffer- und Hybridisierungslösung möglich war.

Es zeigte sich, dass die Hybridisierung auf diese Art und Weise ebenso effektiv war wie zuvor im Hybridisierungssofen. Ein weiterer Vorteil dieses Vorgehens war, dass es die Möglichkeit bot, mehrere Membranen übereinander zu platzieren und somit zeitgleich zu hybridisieren.

4.1.3 Bestimmung der Genexpression

4.1.3.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung existierte bereits die etablierte RNazol-Methode, die allerdings für die Belange dieser Arbeit modifiziert und optimiert werden musste, da sie zunächst lediglich für die Isolierung aus Aggregaten und Zellpellets etabliert war. Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Zellen ohne Abtrypsinieren und somit ohne potentielle Veränderung der Transkription direkt aus den 75 cm² Monolayern zu isolieren. Es ergab sich, dass die in 3.3.2.2.1 beschriebene Vorgehensweise sowohl betrefflich Ausbeute als auch Integrität der RNA gut geeignet war. Kontrolliert wurde die Integrität der RNA dabei durch gelelektrophoretische Auftrennung (vgl. 3.3.2.2.3). Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch bestimmt (vgl. 3.3.2.2.2).

4.1.3.2 PCR

Zur Überprüfung der Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Genexpression wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Verwendung nicht degradierter RNA
- Verwendung mit DNase behandelter RNA-Proben
- Quantifizierung von Negativkontrollen in den PCR-Läufen
- Verwendung interner Standards in den PCR-Läufen

Die Kontrolle der RNA-Proben nach dem DNase Verdau im Agarosegel, wo sich die für die intakte RNA typischen 18s- und 28s-Banden zeigten (Abb. 3.8.), sollte die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erhöhen.

4.2 Analyse der Zellproliferation

4.2.1 Analyse der Zellproliferation mesenchymaler Progenitorzellen

Für diesen Versuchsteil wurden MSC-Kulturen aus drei männlichen Donoren über 5 bis 9 Passagen gezüchtet bis zur Seneszenz (vgl. 3.3.1.1). Zu jedem Passagezeitpunkt wurde die Populationsverdoppelung nach der in 3.3.1.3 beschriebenen Methode bestimmt und gegen die Kultivierungszeit in Tagen aufgetragen. Nach 5 bis 9 Passagen erreichten die MSCs kumulative Populationsverdoppelungen (cpd) von 10,6 bis 23,2.

Die kumulativen Populationsverdoppelungen wurden gegen die Kultivierungsdauer in Tagen aufgetragen.

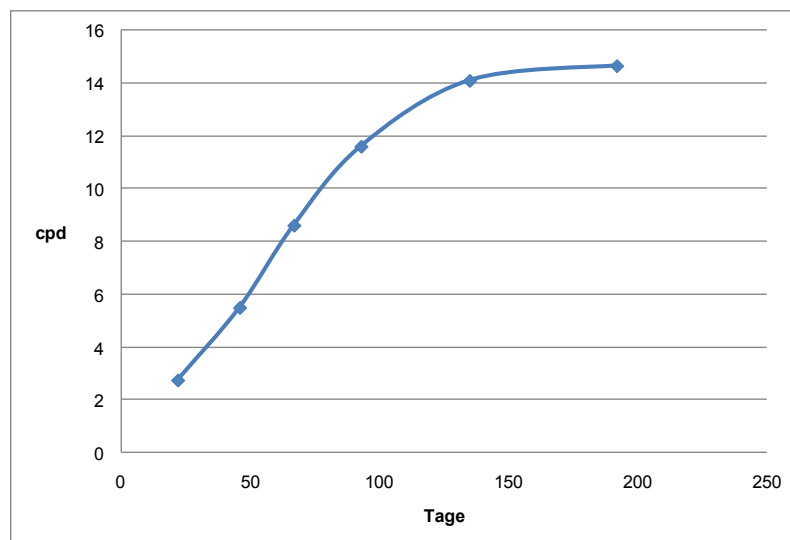


Abb. 4.1: Typischer Verlauf der Proliferationsgeschwindigkeit am Beispiel LN619

Wie aus Abb. 4.1 ersichtlich, erreichte die Proliferationsgeschwindigkeit gegen Ende des Versuchs nahezu ein Plateau. Folglich war die Proliferationsaktivität nur noch in geringem Maße ($\text{cpd}/4 \text{ Wochen} < 1$) vorhanden, was Kennzeichen der replikativen Seneszenz ist.

Im Durchschnitt betrug die Proliferationsgeschwindigkeit der MSCs 15,2 cpd pro 100 Tage, wobei hier nur die Werte der jungen MSCs der Kontrollgruppen einbezogen wurden. Das mittels Regressionsanalyse ermittelte Bestimmtheitsmaß R^2 betrug 0,96 (vgl. Abb. 4.2)

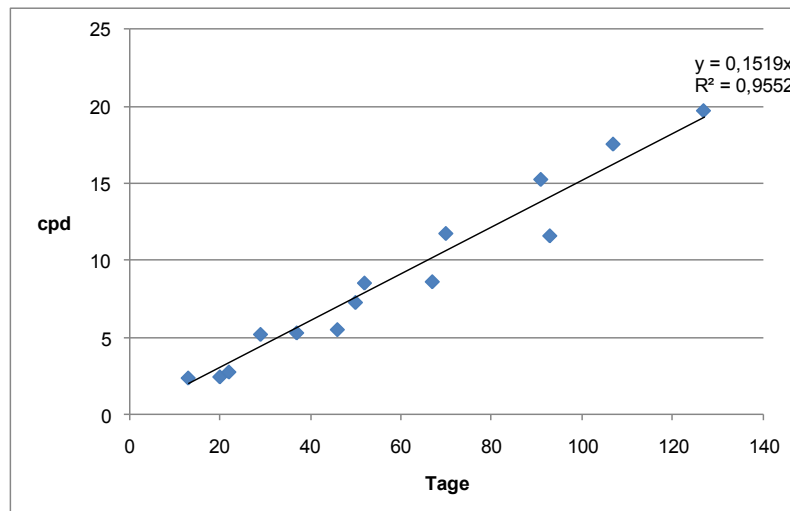


Abb. 4.2: Proliferationsgeschwindigkeit aller jungen Kontrollgruppen

Die Korrelationsanalyse nach Pearson lieferte einen Korrelationskoeffizienten von 0,899. Das heißt, es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen kumulativen Populationsverdoppelungen und Kultivierungsdauer ($p < 0,0001$).

4.2.2 Zellproliferation von mit Hormonen kultivierten mesenchymalen Progenitorzellen

Um die Wirkung von Östrogen und Tamoxifen auf die Zellproliferation zu erfassen, wurden parallel zur Kontrollgruppe, Zellen unter den 7 weiteren Untersuchungsbedingungen kultiviert, bei jeder Passage die Zellzahl bestimmt und daraus die cpd errechnet (vgl. 3.3.1.2 und 3.3.1.3).

Die errechneten kumulativen Populationsverdoppelungen wurden auch hier gegen die Dauer der Kultivierung aufgetragen. Im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich hieraus keine Unterschiede (siehe Abb. 4.3). Auch statistisch analysiert konnten sich keine relevanten Unterschiede bezüglich Proliferationsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen herauskristallisieren.

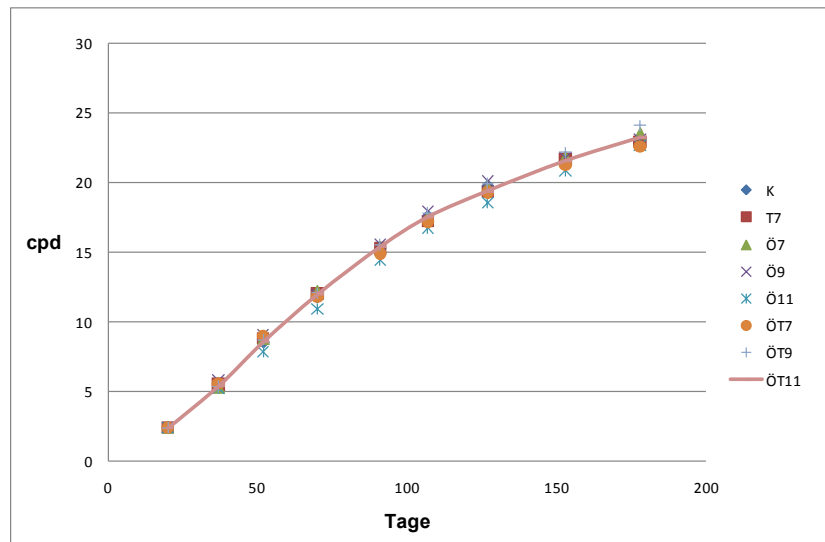


Abb. 4.3: Proliferationsgeschwindigkeiten unter Hormoneinfluss (LN 604): keine Unterschiede. Kontrollgruppe (K), Tamoxifen 10^{-7} M (T7), Östrogen 10^{-7} M (Ö7), Östrogen 10^{-9} M (Ö9), Östrogen 10^{-11} M (Ö11), Östrogen/Tamoxifen 10^{-7} M (ÖT7), Östrogen/Tamoxifen 10^{-9} M (ÖT9), Östrogen/Tamoxifen 10^{-11} M (ÖT11)

Die Korrelationsanalyse nach Pearson lieferte folgende Korrelationskoeffizienten (siehe Tab. 4.1) und zeigte somit eine signifikante Korrelation der kumulativen Populationsverdoppelungen und der Kultivierungsdauer in allen Gruppen ($p < 0,0001$).

	K	T7	Ö7	Ö9	Ö11	ÖT7	ÖT9	ÖT11
Korrelationskoeffizient	0,899	0,889	0,897	0,891	0,897	0,892	0,896	0,893

Tab. 4.1: Werte der Korrelationskoeffizienten der Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen cpd und Kultivierungsdauer

Es zeigten sich signifikante bis hochsignifikante Unterschiede (siehe Tab. 4.2) hinsichtlich Proliferation zwischen jungen und seneszenten Zellen im T-Test zur Analyse zweier gepaarter Stichproben und zwar unter allen Untersuchungsbedingungen.

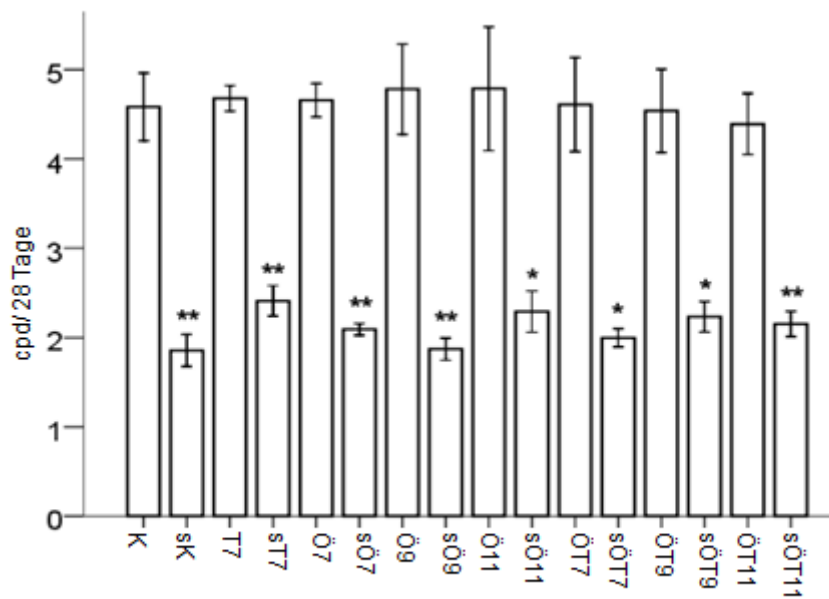


Abb. 4.4: Reduktion des Zellwachstums von seneszenten im Vergleich zu jungen Zellen (s= seneszent)

Untersuchungs- bedingung	Mittelwert [cpd/28 Tage]	Standard- abweichung	Signifikanz (T-Test jung versus seneszent)
K	4,6	0,31	0,002
K seneszent	1,9	0,15	
T7	4,7	0,12	0,002
T7 seneszent	2,4	0,14	
Ö7	4,7	0,15	0,003
Ö7 seneszent	2,1	0,05	
Ö9	4,8	0,41	0,01
Ö9 seneszent	1,9	0,10	
Ö11	4,8	0,57	0,043
Ö11 seneszent	2,3	0,19	
ÖT7	4,6	0,43	0,016
ÖT7 seneszent	2,0	0,08	
ÖT9	4,5	0,38	0,023
ÖT9 seneszent	2,2	0,14	
ÖT11	4,4	0,28	0,009
ÖT11 seneszent	2,1	0,12	

Tab. 4.2: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferation über 28 Tage. Die Signifikanzen des T-Test zur Analyse der Unterschiede hinsichtlich Proliferation zwischen jungen und seneszenten Zellen können der letzten Spalte entnommen werden.

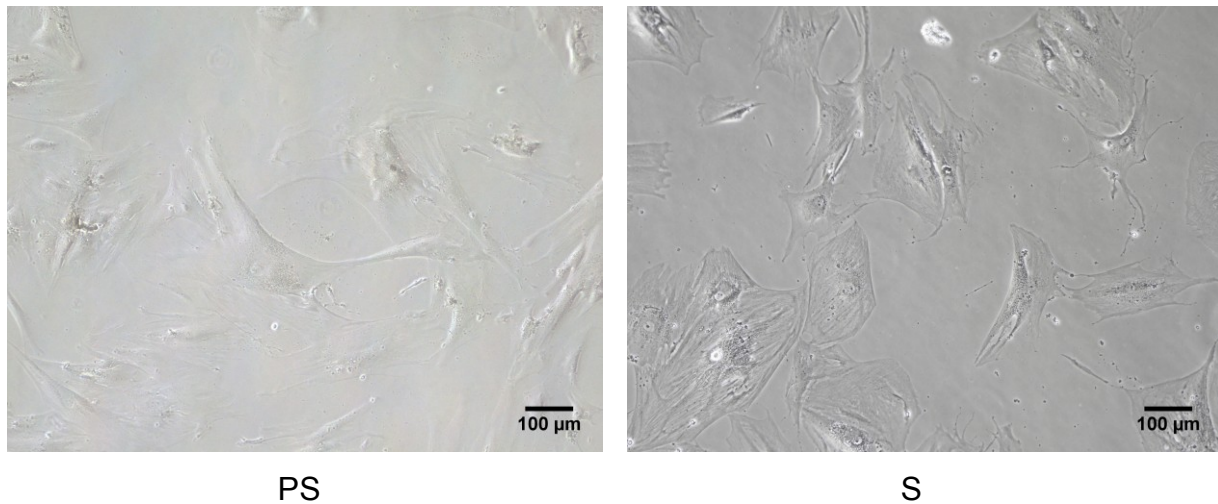


Abb. 4.6: Veränderungen der Morphologie präseneszenten Zellen (PS) und seneszenten Zellen (S) (LN 604)

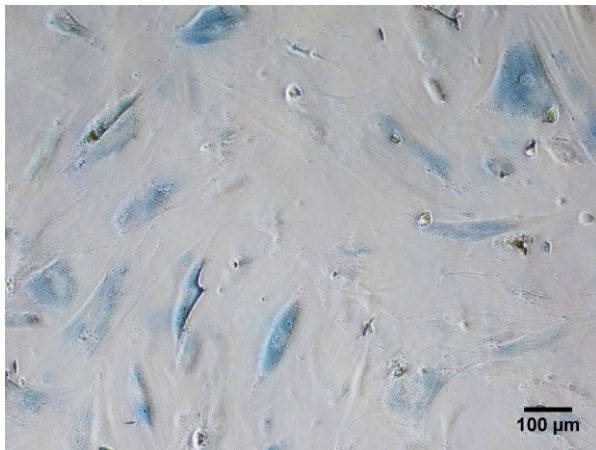


Abb. 4.7: SA-β-Galaktosidase-Expression (blau) seneszenten Zellen (LN 604)

Die SA-β-Galaktosidase-Expression nahm während der Kultivierung stark zu, so dass am Ende über 80% der Zellen eine Blaufärbung zeigten (Abb. 4.7)

Es konnten allerdings keine relevanten Unterschiede bezüglich Morphologie und SA-β-Galaktosidase-Expression zwischen den einzelnen Versuchsgruppen identifiziert werden. Die Anzeichen einer replikativen Seneszenz zeigten sich also in allen Versuchsgruppen gleichermaßen.

4.4 Analyse der Telomerlänge

4.4.1 Telomerlängenverkürzung zunehmend seneszenten mesenchymaler Progenitorzellen

Die MSCs von drei Spendern wurden zunächst kultiviert und 5- bis 9-mal passagiert. Für das Verhalten der Telomerlänge der Kontrollgruppe wurden 20 DNA-Proben, die jeweils zum Zeitpunkt einer jeden Passage gewonnen wurden, mittels TRF-Assay analysiert (vgl. 3.3.2.1). Jede Probe wurde densitometrisch ausgewertet, die Telomerlängen berechnet (vgl. 3.3.2.1.9) und gegen die Anzahl der Zellpopulationsverdoppelungen aufgetragen (siehe Abb. 4.8).

Die mittleren Telomerlängen lagen zu Beginn zwischen 9,4 kbp und 10,9 kbp (MW \pm SD: 10370 bp \pm 674 bp). Über die gesamte Versuchszeit nahmen die Telomere im Mittel um 102 bp (MW \pm SD: 102 bp \pm 6,8 bp) pro Zellpopulationsverdoppelung auf Werte zwischen 8,2 kbp und 9,5 kbp (MW \pm SD: 8727 bp \pm 556 bp) ab.

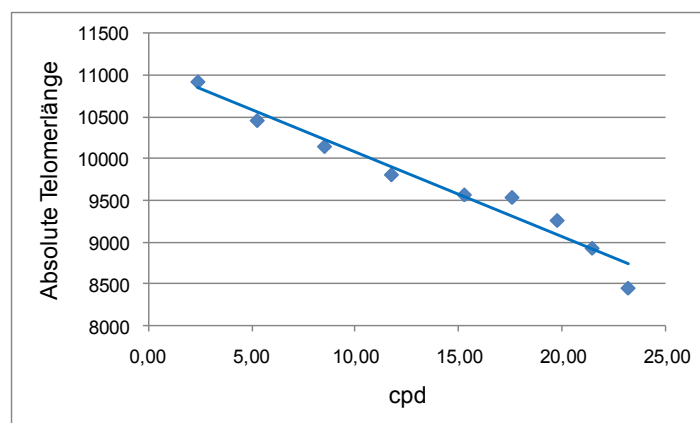


Abb. 4.8: Absolute Telomerlängen im Verlauf des Versuchs (LN 604)

Da das Problem der Heterogenität der Ausgangstelomerlängen die Auswertung und Beurteilung der Telomerabnahme erschwerte, wurden die absolut gemessenen Werte auf die zugehörigen Ausgangswerte bezogen. Die dadurch erhaltenen relativen Telomerlängen wurden als Funktion der Zellpopulationsverdoppelungen aufgetragen (siehe Abb. 4.9).

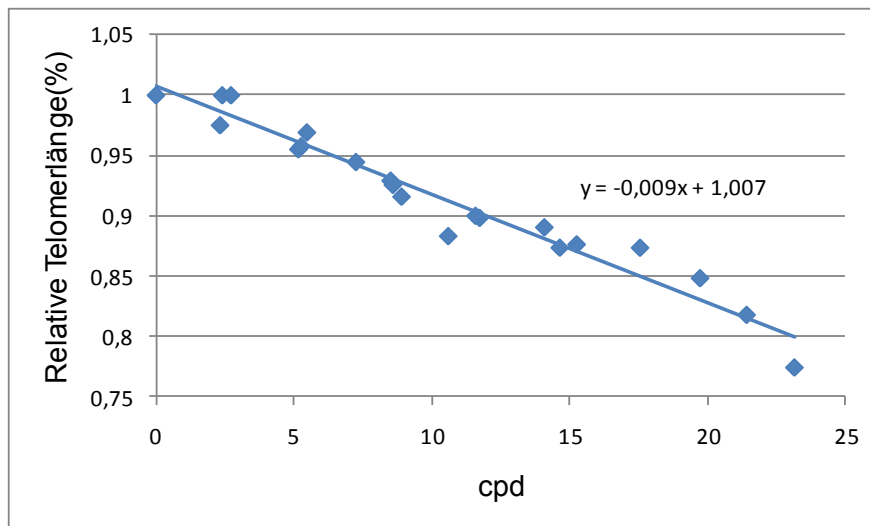


Abb. 4.9: Relative Telomerlängen der zunehmend seneszenten MSCs

Mittels linearer Regressionsanalyse ergab sich eine mittlere relative Telomerverkürzung von 0,98% der Ausgangslänge pro Zellpopulationsverdoppelung (MW \pm SD: 0,0098 \pm 0,0004619). Bei einem Koeffizienten von 0,976 war die Korrelation nach Pearson der Telomerlänge und der cpd signifikant bei ($p < 0,0001$).

4.4.2 Telomerlängenverkürzung unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol

Um die Auswirkung von 17- β -Östradiol auf die Telomerlänge von mesenchymalen Progenitorzellen zu erfassen, wurden drei Versuchsgruppen gebildet. Für die erste wurden die MSCs in Medium gezüchtet, welches 10^{-7} M 17- β -Östradiol enthielt. Der zweiten Gruppe wurde das Hormon in einer 10^{-9} -molaren Konzentration beigelegt. Der dritten Gruppe wurde 10^{-11} M Östradiol zugesetzt.

Um die Telomerlängenveränderung unter diesen Bedingungen zu messen, wurden 18 DNA-Proben pro Gruppe, insgesamt 54, mittels TRF-Assay analysiert (vgl. 3.3.2.1). Zu Beginn der Kultivierung lagen die Längen der Restriktionsfragmente zwischen 8,9 kbp und 10,9 kbp (MW \pm SD: 10051 bp \pm 877 bp) für Östrogen 10^{-7} M, zwischen 8,5 kbp und 10,9 kbp (MW \pm SD: 9921 bp \pm 1020 bp) für Östrogen 10^{-9} M, und für die dritte Bedingung Östrogen 10^{-11} M zwischen 8,7 kbp und 10,9 kbp (MW \pm SD: 10007 bp \pm 937 bp). Die Telomere nahmen im Laufe des Versuchs in den drei

Gruppen unterschiedlich stark ab: In der ersten (Ö7) Gruppe verkürzten sich die Chromosomenenden lediglich um 64,6 bp pro cpd (MW \pm SD: 64,6 bp/cpd \pm 2,2 bp/cpd) auf Werte zwischen 8,0 kbp und 9,6 kbp (MW \pm SD: 8917 bp \pm 694 bp). Die zweite Gruppe (Ö9) verlor im Mittel 72,5 bp pro Zellpopulationsverdoppelung (MW \pm SD: 72,5 bp/cpd \pm 14,3 bp/cpd), besaß also am Ende noch zwischen 7,7 kbp und 9,5 kbp (MW \pm SD: 8796 bp \pm 783 bp) lange Telomere. Unter der dritten Versuchsbedingung, Ö11, zeigte sich ein Verlust von 85,3 bp pro cpd (MW \pm SD: 85,3 bp/cpd \pm 20,7 bp/cpd), das bedeutete eine Abnahme der Telomerlänge auf Werte zwischen 7,8 kbp und 9,2 kbp (MW \pm SD: 8650 bp \pm 574 bp).

Auch hier wurden zur besseren Veranschaulichung die relativen Restriktionsfragmentlängen bestimmt und als Funktion der Anzahl der Zellverdoppelungen aufgetragen (siehe Abb. 4.10).

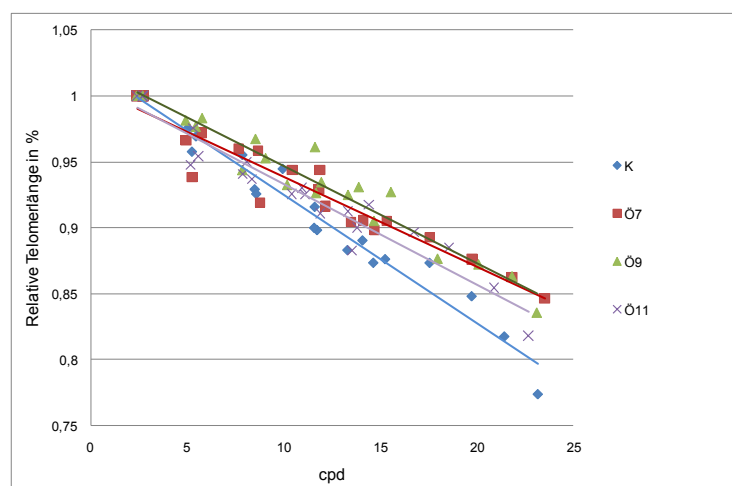


Abb. 4.10: Relative Telomerverkürzung mesenchymaler Stammzellen unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol in 10^{-7} (Ö7), 10^{-9} (Ö9) und 10^{-11} (Ö11) M, sowie der Kontrollgruppe (K)

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. 4.4.1) war die relative Telomerverkürzung pro Zellpopulationsverdoppelung der dritten Gruppe (Ö11) mit 0,91%/cpd (MW \pm SD: 0,00907/cpd \pm 0,00130/cpd) geringer als die der Kontrollgruppe, allerdings noch höher als die zweite Gruppe (Ö9) mit 0,73% Verlust pro cpd (MW \pm SD: 0,00727/cpd \pm 0,00059/cpd). Am geringsten fiel der Basenpaarverlust in der Ö7-Gruppe mit 0,72% des Ausgangswertes pro cpd aus (MW \pm SD: 0,00717/cpd \pm 0,00110/cpd). Das

Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgeraden betrug 0,899 für Östrogen 10^{-7} M, 0,881 für Östrogen 10^{-9} M und 0,883 für Östrogen 10^{-11} M.

Die Korrelationsanalyse nach Pearson ergab eine statistisch signifikante Korrelation zwischen kumulativer Populationsverdoppelung und Telomerverkürzung mit Korrelationskoeffizienten von 0,948 (Ö7), 0,939 (Ö9) und 0,949 (Ö11) ($p < 0,0001$).

Mit Hilfe des T-Tests zur Untersuchung gepaarter Stichproben konnte im Bezug auf die Kontrollgruppe ein signifikant geringerer Telomerverlust in zwei der drei Untersuchungsbedingungen verifiziert werden. Sowohl die Zellen, die mit einer 10^{-7} - molaren 17- β -Östradiol-Konzentration ($p=0,019$) angezüchtet wurden, als auch die MSCs, die der 10^{-9} molaren Östrogenlösung ($p=0,043$) ausgesetzt waren, büßten signifikant weniger an Telomerlänge ein (siehe Abb. 4.11). Bei der letzten Östrogen- gruppe (Ö11) war der Telomerverlust nicht signifikant verändert ($p=0,30$).

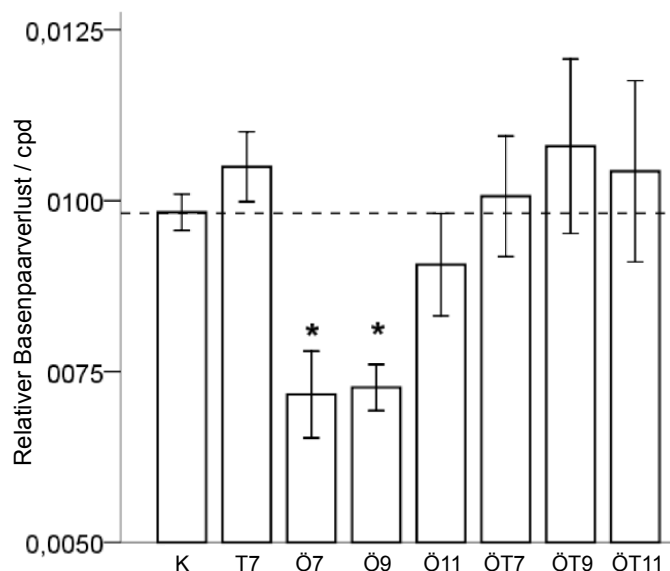


Abb. 4.11 Relativer Telomerverlust (bp/cpd)

4.4.3 Telomerlängenverkürzung unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol/ Tamoxifen und Tamoxifen

Da Tamoxifen der weitverbreitete und vor allem auch klinisch eingesetzte Antagonist des Östrogens ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob die

durch Östrogen induzierten Änderungen bezüglich Telomerlänge durch den Zusatz von Tamoxifen in äquimolaren Mengen hemmbar sind.

Für diesen Teil des Versuchs wurden nun drei weitere Untersuchungsbedingungen analysiert: Den Nährmedien mit den Östrogen-Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-9} M und 10^{-11} M wurden äquimolare Mengen Tamoxifen beigefügt.

Da die alleinige Wirkung von Tamoxifen bezüglich Restriktionsfragmentelänge unklar war, und um daraus entstehende Fehlinterpretationen zu verhindern, wurde zusätzlich eine Tamoxifen-Kontrollgruppe untersucht. Für diese Gruppe wurden die Zellen in Medium mit einer 10^{-7} -molaren Tamoxifen-Konzentration kultiviert.

Für die Ermittlung der Telomerentwicklung unter diesen vier Untersuchungsbedingungen wurden die Zellen derselben Spender verwendet, wie für die Östrogengruppen. Die Zellen wurden dabei ebenfalls über einen Zeitraum zwischen 94 und 192 Tagen gezüchtet und dabei 5- bis 9-mal passagiert. Die bei jedem Passagezeitpunkt entnommenen DNA-Proben, insgesamt 72, wurden mittels TRF-Assay analysiert (vgl.3.3.2.1) und ausgewertet.

Tab. 4.3 zeigt eine Übersicht der Mittelwerte der Telomerlängen zu Beginn und am Ende der Kultivierung, sowie den absoluten Basenpaarverlust pro Zellpopulationsverdoppelung.

Untersuchungs- bedingung	n	Telomerlänge Kultivierungsbeginn [bp]		Telomerlänge Kultivierungsende [bp]		Mittlere Telomerverkürzung [bp/cpd]	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
T	3	10185	772	8302	541	106	4,7
ÖT7	3	10013	1012	8603	1093	100	9,2
ÖT9	3	10345	947	8881	948	110	14
ÖT11	3	9964	1253	8269	1312	102	10

Tab. 4.3: Telomerlängen zu Beginn und am Ende der Kultivierung und mittlere Telomerverkürzung (bp/cpd) der Tamoxifen-Kontrollgruppe und der drei Östrogen/Tamoxifen-Gruppen.

Die relative Telomerverkürzungen können Tab. 4.4 entnommen werden.

Unter- suchungs- bedingung	n	Mittlere relative Telomerverkürzung [%]		Korrelation relative Telomerverkürzung - cpd ($p < 0,0001$)
		MW	SD	Korrelationskoeffizient
T	3	1,05	0,09	0,973
ÖT7	3	1,01	0,15	0,805
ÖT9	3	1,08	0,22	0,850
ÖT11	3	1,04	0,23	0,789

Tab. 4.4: Relative Telomerlängenverkürzung (%) der Tamoxifen-Kontrollgruppe und der drei Östrogen/Tamoxifen-Gruppen, sowie Korrelation zwischen relativer Telomerverkürzung und kumulativer Zellpopulationsverdoppelung.

Unter Verwendung der Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte sich in allen Gruppen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen relativer Telomerverkürzung und kumulativer Zellpopulationsverdoppelung.

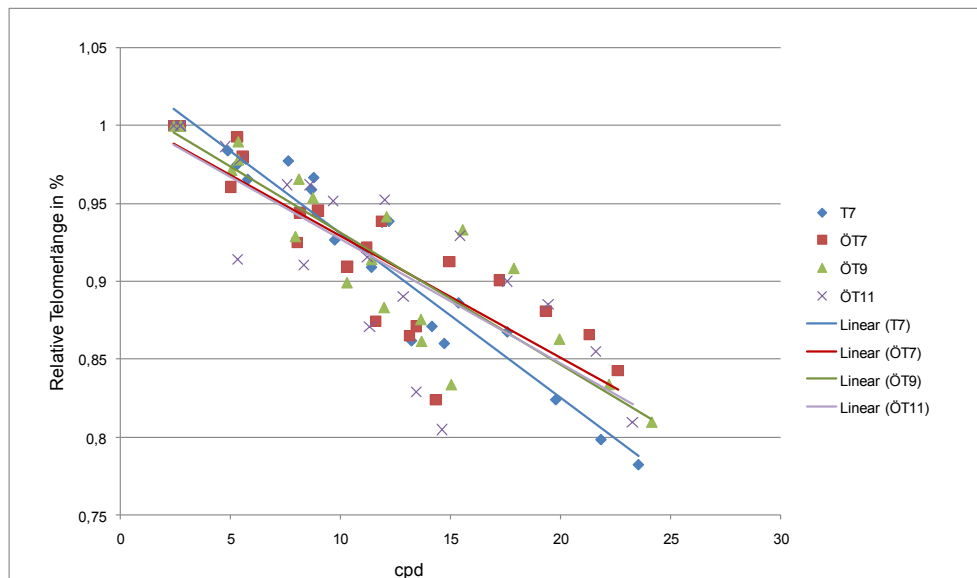


Abb. 4.12: Relativer Telomerverlust der MSCs, die mit Tamoxifen 10^{-7} (T), Östrogen/Tamoxifen 10^{-7} (ÖT7), 10^{-9} (ÖT9) und 10^{-11} (ÖT11) M kultiviert wurden. Für jede Gruppe ist die Regressionsgerade dargestellt.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgeraden betrug 0,887 für die T7-Kontrollgruppe, 0,648 für die ÖT7-Gruppe. Die lineare Regressionsanalyse der ÖT9-Gruppe lieferte ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,723 und die der ÖT11-Gruppe einen Wert von 0,651 (siehe Abb. 4.12).

Der T-Test zur Untersuchung gepaarter Stichproben ergab für diese Untersuchungsbedingungen keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 4.11).

4.5 Analyse der Genexpression

Zur Analyse der Genexpression unter Kontrollbedingungen bzw. unter Kultivierung mit den verschiedenen Hormonkonzentrationen erfolgten Probenentnahmen zu Beginn des Versuchs, zum Zeitpunkt der ersten Passage unter Hormoneinfluss und am Ende des Versuchs. Hierzu wurden den 8 Untersuchungsbedingungen Zellen im konfluenten Zustand entnommen, die RNA daraus isoliert (vgl. 3.3.2.2.1) und mit Hilfe der PCR die Expression der Gene TRF1, TRF2, p21, XRCC und SIRT1 bestimmt. Die zusätzliche Bestimmung der Expression des Housekeeping-Genes GAPDH diente als Normierung.

Im Folgenden ist die relative Genexpression bezogen auf die Kontrollgruppe dargestellt.

4.5.1 Expression von TRF 1 und TRF 2

Weder TRF1 noch TRF2 wurden durch die Zugabe von Östrogen bzw. Tamoxifen verändert exprimiert. Es zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression der beiden Gene zwischen jungen und seneszenten Zellen (siehe Abb. 4.13 und Abb. 4.14)

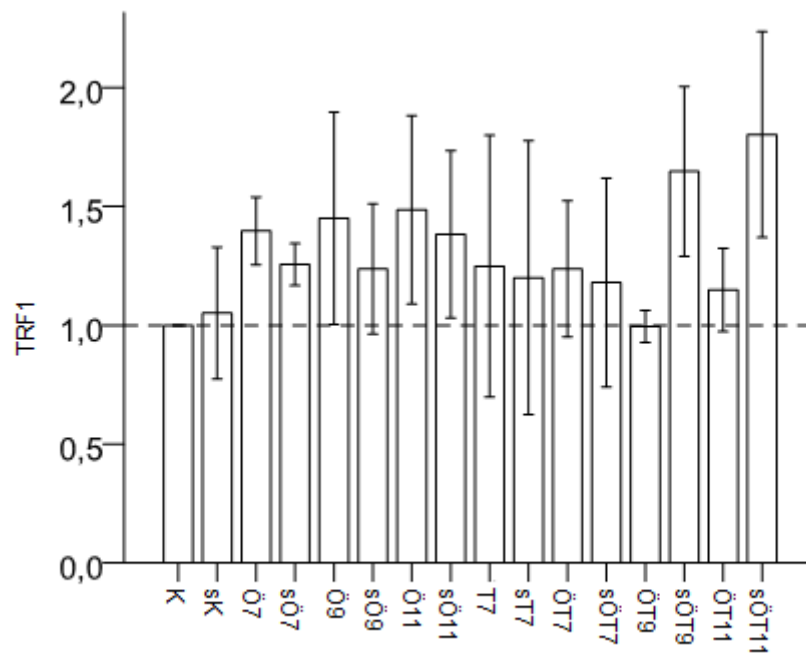


Abb. 4.13: Expression von TRF1 in jungen und seneszenten (s) MSCs mit und ohne Hormonsubstitution

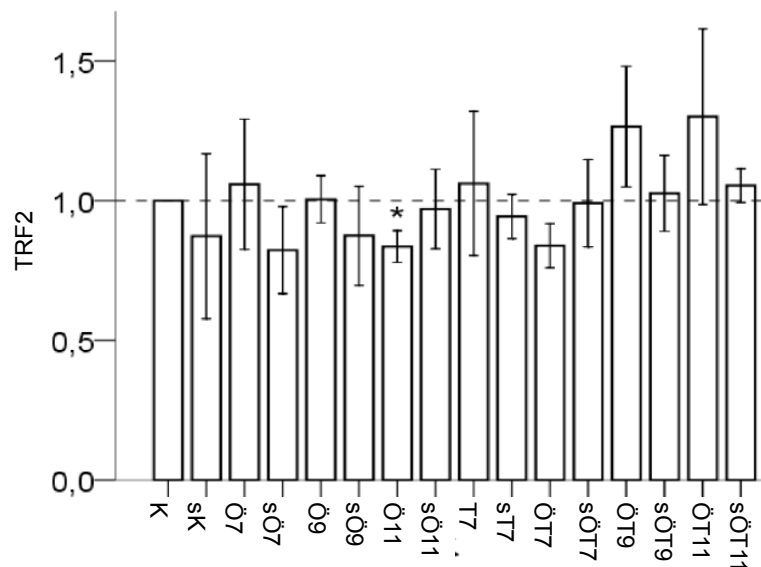


Abb. 4.14: Expression von TRF2 in jungen und seneszenten (s) MSCs mit und ohne Hormonsubstitution

4.5.2 Expression von p21

Die Analyse der Expression von p21 ergab eine signifikante Erhöhung auf etwa das Dreifache in den seneszenten Zellen im Vergleich zu den jungen MSCs. Dies konnte in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Allerdings scheint die Hormonsubstitution in keinem Fall eine Veränderung der Genexpression hervorzurufen (siehe Abb. 4.15). Mittels T-Test zur Analyse gepaarter Stichproben ließen sich die folgenden Signifikanzen ermitteln: Kontrollgruppe ($p = 0,047$), Ö7 ($p = 0,045$), Ö9 ($p = 0,014$), Ö11 ($p = 0,05$), T7 ($p = 0,049$), ÖT7 ($p = 0,036$), ÖT9 ($p = 0,049$) und ÖT11 ($p = 0,047$).

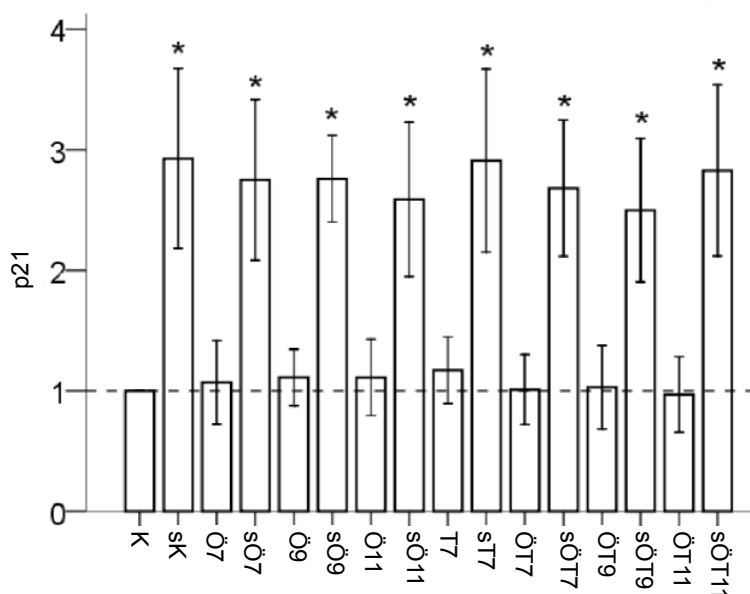


Abb. 4.15: Expression von p21 in jungen und seneszenten (s) MSCs mit und ohne Hormonsubstitution

4.5.3 Expression von XRCC

Eine signifikante Downregulation der XRCC-Expression auf das 0,6-fache zeigte sich in den Östrogengruppen und der Kontrolle (siehe Abb. 4.16). In den gemischt Tamoxifen/Östrogen-Gruppen, sowie der Tamoxifengruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung.

Die mittels T-Test berechneten Signifikanzen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

	sK	sÖ7	sÖ9	sÖ11	sT7	sÖT7	sÖT9	sÖT11
P	0,007	0,022	0,038	0,036	0,108	0,637	0,070	0,680

Tab. 4.5: Signifikanzen der seneszenten (s) Gruppen.

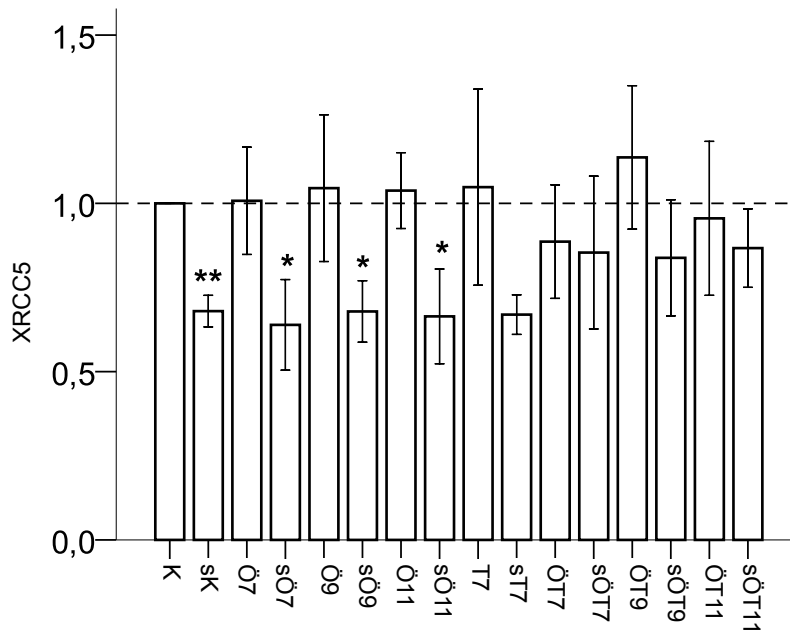


Abb. 4.16: XRCC5-Expression in jungen und seneszenten (s) MSCs. Darstellung aller Versuchsgruppen

4.5.4 Expression von SIRT 1

Auch die SIRT1-Expression veränderte sich signifikant zwischen den jungen und den seneszenten MSCs. In den seneszenten Zellen konnte eine Hochregulation bis auf das 1,8-fache im Vergleich zu den jungen Zellen detektiert werden. Dies galt für alle Untersuchungsbedingungen (siehe Abb. 4.17). Die Behandlung mit verschiedenen Hormonkonzentrationen hatte keinen Effekt auf die Expression von SIRT1 (siehe Abb. 4.17). Für die seneszenten Gruppen galt: Kontrollgruppe ($p=0,019$), Ö7 ($p=0,021$), Ö9 ($p=0,043$), Ö11 ($p=0,049$), T7 ($p=0,042$), ÖT7 ($p=0,02$), ÖT9 ($p=0,02$), ÖT11 ($p=0,014$).

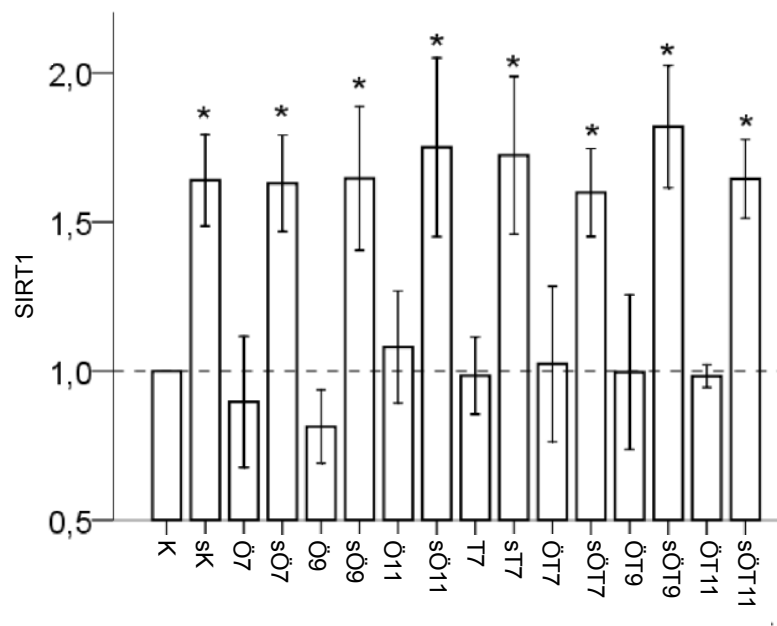


Abb. 4.17: SIRT1-Expression junger und seneszenten (s) MSCs unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen

5 Diskussion

Der Gelenkknorpel ist ein Östrogen-sensibles Gewebe. Östrogen beeinflusst sowohl das physiologische Wachstum⁷⁸, als auch degenerative Prozesse am Knorpel¹³⁸. Das heißt, Östrogen steht in gewisser Weise in Zusammenhang mit dem Alterungsprozess des Knorpels. Auf molekularer Ebene bestimmen unter anderem Telomerlänge und Telomeraseaktivität den Alterungsprozess^{47,56}. Dies ist insofern interessant, als dass bekannt ist, dass eine imperfekte Bindungsstelle für Östrogen im Bereich des hTERT-Promotors existiert, und dadurch die Telomeraseexpression reguliert wird⁹⁵. Es kann also durchaus ein Zusammenhang zwischen Östrogenexposition, Zellproliferation und Zellalterung des Knorpels vermutet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Östrogen die Zellproliferation und die Zellalterung von humanen MSCs beeinflusst.

5.1 Analyse der Zellproliferation

Mesenchymale Stammzellen stellen eine multipotente Stammzellpopulation mit vielfältigem Differenzierungspotential dar. Sie können nicht nur zu Chondrozyten, sondern auch zu Adipozyten, Osteoblasten, glatten Muskelzellen u.a. differenzieren¹³⁹⁻¹⁴¹.

In vitro weisen die MSCs zwar eine hohes Maß an Proliferationsfähigkeit auf, allerdings sind sie nicht fähig, sich unendlich oft zu teilen, sondern treten nach ungefähr 24-41 cpds in Abhängigkeit des Donoralters in das Stadium der Seneszenz ein¹¹⁴. Dies spielt insbesondere beim Tissue Engineering eine große Rolle, da die Zellen hierfür in vitro massiv expandiert werden müssen^{6,31}, bevor sie dem Patienten erneut eingesetzt werden können.

In dieser Arbeit proliferierten die MSCs der drei Spender die ersten 50 bis 127 Tage relativ schnell. Danach verlangsamte sich ihre Proliferation, bis sie schließlich seneszent wurden. Dies geschah nach durchschnittlich 16,1 kumulativen Populationsverdoppelungen (cpd). Dabei konnten große Schwankungen zwischen den Spendern beobachtet werden. Die in der Literatur beschriebenen 24-41 cpd^{114,142} konnten nur in einer Kultur mit 23,16 cpd annähernd erreicht werden. Dies kann eventuell dadurch erklärt werden, dass in dieser Arbeit eine Erfassung und

Berücksichtigung der ersten Proliferationsphase zwischen Knochenmarksentnahme und Kryokonservierung nicht möglich war. Deshalb konnten die Populationsverdoppelungen, die in dieser ersten Phase stattgefunden hatten, in den Berechnungen nicht berücksichtigt werden. Andere Forschergruppen erreichten unter ähnlichen Kulturbedingungen wie in dieser Arbeit vergleichbare Werte für cpd und Proliferationsgeschwindigkeit¹⁴³. Colter et al. berichteten über einzelne MSC, die sogar bis zu 50 cpd in nur 10 Wochen expandiert werden konnten, jedoch unter der Bedingung, dass sie durchgehend in niedriger Zelldichte kultiviert wurden¹⁴⁴. Auch Colter et al. konnten bei MSCs, die in höherer Zelldichte kultiviert wurden, diese hohen cpd nicht erreichen¹⁴⁴. In dieser Arbeit wurden immer 200000 MSCs in 75cm² Monolayern ausgesät und bei einer Konfluenz von circa 90% passagiert. Sie waren somit einer relativ hohen Zelldichte ausgesetzt. Des Weiteren sollte man stets im Hinterkopf bewahren, dass eine Analyse der kumulativen Populationsverdoppelungen stets Verluste wie etwa durch Apoptose oder sonstige Ereignisse unterschlägt¹⁴⁵. Dies ist ein ebenso bekanntes Problem wie die großen interindividuellen Schwankungen der Proliferationskapazität von MSCs¹⁴³.

Mit der Absicht, die Zellproliferation unter Einfluss von Östrogen und Tamoxifen zu untersuchen, wurden die Zellen der drei Spender nach der ersten Passage in unterschiedliche Untersuchungsgruppen aufgeteilt und ab diesem Zeitpunkt in Medium mit Hormon kultiviert. Die Entscheidung fiel auf drei Östrogengruppen mit den Konzentrationen von 10⁻⁷M, 10⁻⁹M und 10⁻¹¹M. Dies entspricht physiologischen Serumleveln und zwar denen in der Schwangerschaft (10⁻⁷M), periovulatorisch (10⁻⁹M) bzw. den Serumspiegeln bei postmenopausalen Frauen (10⁻¹¹M)¹⁴⁶. Um konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden bewusst nur Zellen aus männlichen Spendern verwendet, da die Östrogenlevel bei Männern weitgehend konstant sind und nicht zyklus- und altersabhängigen starken Schwankungen ausgesetzt sind wie bei Frauen¹⁴⁷.

Die Auswirkungen von Östrogen auf die Zellproliferation von MSCs sind weitgehend unbekannt. Allerdings wurde zum Beispiel für EPCs (endothelial progenitor cells)¹⁴⁸, sowie für reife Endothelzellen¹⁴⁹ eine Steigerung der Proliferation durch 17-β-Östradiol nachgewiesen.

In dieser Arbeit erreichten die MSCs aus den drei Spendern unter Östrogeneinfluss durchschnittlich 16,1 cpd und proliferierten die ersten 50-127 Tage mit einer

Geschwindigkeit von 15,2 cpd pro 100 Tagen, bevor sie seneszent wurden. Sie unterschieden sich damit nicht von der Kontrollgruppe. Auch die drei Östrogengruppen unterschieden sich hinsichtlich cpd und Proliferationsgeschwindigkeit nicht untereinander. Ebenso ließen sich bei den Zellen, die mit Östrogen und bzw. oder Tamoxifen kultiviert wurden, keine Unterschiede feststellen, diese erreichten nahezu identische cpd sowie Proliferationsgeschwindigkeiten¹⁵⁰.

Da in dieser Arbeit die Stichprobenanzahl mit $n=3$ allerdings nicht groß war, könnte es durchaus sein, dass eventuelle Einflüsse auf die Proliferation von MSCs erst bei einer größeren Stichprobenanzahl deutlich würde. Auf der anderen Seite zeichneten sich nicht einmal annähernd Tendenzen von Unterschieden ab, was vielleicht eher ein Hinweis darauf ist, dass weder 17- β -Östradiol noch Tamoxifen das Proliferationsverhalten der MSCs beeinflussen.

5.2 Analyse der Zellmorphologie

Junge mesenchymale Stammzellen weisen eine fibroblasten-ähnliche Morphologie auf. Ihre Zelleiber sind schlank, spindelförmig und besitzen zahlreiche zytoplasmatische Zellausläufer, die sie zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten benötigen. Ein heller, ovaler Zellkern mit sichtbarem Nukleolus ist ebenso charakteristisch wie das gut ausgebildete endoplasmatische Retikulum. Diese Zellen proliferieren schnell und werden als Typ I MSCs bezeichnet¹⁵¹. Im Laufe der Kultivierung nimmt eine andere morphologische Erscheinungsform der MSCs Überhand: Die Zellen nehmen deutlich an Größe zu, ihre Zelleiber werden unregelmäßig, verplumpen und flachen ab. Das Zytoplasma zeigt eine zunehmende Granulierung mit multiplen Zeileinschlüssen. Es treten Ablagerungen in Form von Zell-Debris auf¹⁴²⁻¹⁴³. Die Proliferationsgeschwindigkeit sinkt drastisch¹⁴⁴. Diese Zellen werden als Typ II MSCs bezeichnet¹⁵¹.

Baxter et al. zeigten, dass diese Veränderungen nicht nur bei den ex vivo kultivierten MSCs auftreten, sondern auch mit dem Spenderalter zunehmen. Sie stellten fest, dass sich die Typ I MSCs mit steigendem Donoralter zu Gunsten der Typ II Zellen reduzieren¹⁵¹.

Diese Erkenntnisse legen eine Assoziation der morphologischen Veränderungen der MSCs mit zunehmendem Erreichen der replikativen Seneszenz nahe¹⁵¹⁻¹⁵² und ver-

deutlichen, dass sich der Alterungsprozess der MSCs bereits augenscheinlich in ihrer Morphologie niederschlägt.

Die in der Literatur beschriebenen Erscheinungen konnten in dieser Arbeit gut nachvollzogen werden. Die langsame Veränderung der Morphologie hin zu den Typ II Zellen war lichtmikroskopisch klar zu erkennen.

Da bereits bekannt ist, dass Östrogen in der Lage ist, die Telomeraseexpression in einigen Geweben wie zum Beispiel im Epithel des Ovars⁹⁶, im vaskulären Endothel¹⁵³ oder in EPCs¹⁵⁴ zu stimulieren⁹⁵ und die Seneszenz damit zumindest in vitro zu verzögern¹⁵⁴, untersuchten wir den Einfluss von 17- β - Östradiol auf die Morphologie der MSCs im Verlauf der Kultivierung. Darüber existierten bisher noch keine Daten.

Die Vermutung, Östrogen könne die morphologischen Veränderungen verzögern oder gar stoppen, konnte nicht bestätigt werden. Die MSCs, die unter Zugabe von Östrogen kultiviert wurden, zeigten die gleichen morphologischen Merkmale wie die der Kontrollgruppe. Lichtmikroskopisch ließen sich keine Unterschiede detektieren. In den Versuchsgruppen, die zusätzlich oder ausschließlich Tamoxifen als Zugabe zum Medium erhielten, waren ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich Morphologie feststellbar. Allerdings konnte in allen Gruppen ausnahmslos die Entwicklung von den jungen Typ-I-Zellen zu den gealterten Typ-II-Zellen sehr gut nachvollzogen werden.

5.3 Analyse der β -Galaktosidase-Expression

Ein relativ einfaches Verfahren zum Nachweis von Seneszenz wurde von Dimri et al. 1995 etabliert. Sie fanden heraus, dass verschiedene seneszente Zelltypen wie Fibroblasten und Keratinozyten bei pH 6 eine β -Galaktosidase exprimieren. Damit unterschieden sie sich von jungen und präseneszenten Zellen, die dieses Enzym nicht exprimierten¹³⁷. Dimri et al. zeigten dies nicht nur für die in vitro kultivierten Zellen, sondern stellten ebenfalls eine Zunahme der β -Galaktosidaseexpression bei Hautbiopsien in vivo in Abhängigkeit des Alters der Patienten fest¹³⁷. Das Enzym wurde daraufhin als seneszenzspezifische β -Galaktosidase (SA- β -Gal) bezeichnet. Seitdem ist der β -Galaktosidase-Nachweis, vor allem auf Grund seiner Einfachheit und Zuverlässigkeit, eines der weitverbreiteten Verfahren zum Nachweis seneszenten Zellen und dient als Biomarker alternder Zellen. Auch in seneszenten MSCs wurde dieses Enzym detektiert¹⁴³. Allerdings muss beachtet werden, dass eine erhöhte

Galaktosidaseaktivität bei pH 6 durchaus auch in verschiedenen nichtseneszenten Stadien beobachtet wurde, wie zum Beispiel in konfluenten Kulturen mit hoher Zelldichte¹⁵⁵⁻¹⁵⁶. Deshalb sollte der Assay stets bei präkonfluenten Zellen mit ähnlicher Dichte beurteilt werden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten¹⁵⁷. Außerdem sind die Berichte über die SA- β -Gal-Aktivität in gealtertem Gewebe vor allem in vivo in der Literatur widersprüchlich und sein Nutzen als allgemeiner Seneszenznachweis nicht unumstritten^{156,158-161}. Lange Zeit war unklar, inwiefern die Aktivität der SA- β -Galaktosidase mit der Entstehung von Seneszenz zusammenhängt bzw. warum dieses Enzym in seneszenten Zellen exprimiert wird. Mittlerweile wird konstatiert, dass es keinen kausalen Zusammenhang mit Seneszenz gibt, und eine hohe Aktivität des Enzyms nicht seneszenzspezifisch ist^{155,162}. Die genaue Bedeutung der hohen Enzymlevel in seneszenten Zellen ist immer noch nicht geklärt. Es scheint, als seien Veränderungen des lysosomalen Kompartments der Zelle hierfür verantwortlich¹⁶⁰. In den Lysosomen eukaryotischer Zellen existiert eine saure β -Galaktosidase¹⁶³. Das ist eine Hydrolase mit saurem pH-Optimum bei pH 4,5, welcher natürlicherweise annähernd im Lysosom vorliegt¹⁶⁰. Diese lysosomale Galaktosidase erreicht auf Grund einer starken Zunahme der Lysosomen während des Alterungsprozesses so hohe Konzentrationen, dass das Enzym auch bei einem suboptimalen pH von 6,0 nachgewiesen werden kann. Die sogenannte seneszenzspezifische β -Galaktosidase ist demnach in Wirklichkeit identisch mit dem lysosomalen Enzym und repräsentiert lediglich höhere Enzymspiegel^{155,160}. Trotz aller Kritik und ihrer Unspezifität ist die Methode nach wie vor eine der meist benutzten Seneszenzmarker.

In dieser Arbeit konnte eine Zunahme der SA- β -Galaktosidase-Expression beobachtet werden. War der X-Gal-Assay zu Beginn der Kultivierung der MSCs größtenteils negativ, zeigte sich im Verlauf eine deutliche Zunahme der positiven Zellen, bis im seneszenten Stadium über 80% der MSCs eine Expression des Enzyms zeigten. Die bisher in der Literatur beschriebenen Beobachtungen konnten, was die in vitro Alterung von MSCs betrifft, nachvollzogen und gestützt werden^{137,143}. Zu Beginn der Kultivierung wurden lediglich vereinzelt MSCs mit β -Galaktosidaseaktivität gefunden und es konnte keine Assoziation zum Spenderalter konstatiert werden, was die Eignung dieser Methode als Biomarker des Alterns in vivo zumindest für die MSCs in Frage stellt.

Über die Wirkung von Hormonen auf die β -Galaktosidaseaktivität existierten keine Daten zum Vergleich. Zunächst lag die Vermutung nahe, Östrogen könne auf Grund seiner Fähigkeit zur Telomeraseaktivierung⁹⁵ die Seneszenz und somit die Expression der β -Galaktosidase verringern. Dies konnte allerdings während der Kultivierung mit Östrogen weder in prä- noch postmenopausalen noch in graviden Konzentrationen bestätigt werden. Die MSCs zeigten unter diesen Bedingungen keine Unterschiede in Auftreten, Zunahme oder prozentualem Anteil der positiv detektierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Zugabe des SERMs Tamoxifen beeinflusste die β -Galaktosidaseaktivität nicht.

Die Beobachtungen können allerdings analog zur Analyse der Zellmorphologie und der Zellproliferation dieser Arbeit gesehen werden. Die verwendeten Hormone zeigen auf keine der drei Bereiche einen Einfluss. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Östrogen nicht in der Lage ist, MSCs vor dem Auftreten der replikativen Seneszenz zu bewahren.

5.4 Analyse der Telomerlänge

Die Telomere gelten als eine Art Zähluhr der Zellteilungen bzw. als sogenanntes „Replikometer“¹⁶⁴. Sie verkürzen sich in den meisten somatischen Zellen ohne Telomeraseaktivität kontinuierlich mit jeder Mitose. Dies erklärt auch, wie es möglich ist, dass Zellen, die nach einer beliebigen Anzahl von Mitosen eingefroren werden, nach dem Auftauen auch Jahre später genau bis zu ihrem Hayflick-Limit weiterproliferieren. Sie besitzen also eine Art Gedächtnis, das sie daran erinnert, wie viele Populationsverdoppelungen sie bereits hinter sich haben¹⁶⁴.

Erreichen die Telomere eine kritische Länge, so ist dies ein verlässlicher Indikator für das Auftreten von Zellzyklusarrest und Seneszenz^{42,165-166}. Dazu steht auch die Tatsache im Einklang, dass durch alleinige Transfektion der katalytischen Untereinheit hTERT in humane Fibroblasten erreicht werden kann, dass diese Zellen über ihr normales Hayflick Limit hinaus wachsen können und immortal werden^{56,167}. Analog dazu exprimieren die meisten immortalen Zellen, wie Keimbahnzellen oder Tumorzellen, aktiv Telomerase¹⁶⁸. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Enzyms in solchen Zellen zu progressiver Telomerverkürzung führte, aus der schließlich End-zu-End-Fusion und Zelltod resultierte¹⁶⁹⁻¹⁷⁰.

Die Telomerverkürzung spielt nicht nur als „Replikometer“ im Alterungsprozess von Zellen eine wichtige Rolle, sondern übernimmt zugleich die Funktion eines Tumorsuppressors. Dafür spricht die Tatsache, dass die meisten aller humanen Krebszellen ihre Telomerlänge mit Hilfe verschiedener Mechanismen konstant halten. Meist geschieht dies durch hohe Expressionslevel von Telomerase⁴⁴, oder seltener durch „alternative lengthening of telomeres“ (ALT), welches durch homologe Rekombination innerhalb der Telomere zustande kommt¹⁷¹.

Die Telomere scheinen sorgfältig kontrollierte Strukturen und wirksame Regulatoren der Zellbiologie zu sein¹⁷².

Das Phänomen der Seneszenz tritt jedoch nicht einzig und allein nach einer gewissen Anzahl von Zellverdoppelungen auf. Einige Einflüsse wie Bestrahlung¹⁷³, Behandlung mit Wasserstoffperoxid^{69,174}, erhöhter Sauerstoffpartialdruck¹⁷⁵ oder Transfektion einiger Onkogene¹⁷⁶ können einen vorzeitigen Seneszenz-ähnlichen Zellzyklusarrest hervorrufen.

Chens Versuche mit humanen Fibroblasten kamen zu dem Ergebnis, dass die Exposition mit subletalen Dosen von Wasserstoffperoxid zwar einen Zellzyklusarrest mit phänotypisch seneszenten Zellen zur Folge hatte, ein signifikanter Telomerverlust hingegen nicht beobachtet werden konnte⁶⁹.

Saretzki dagegen konnte zeigen, dass sich Stress auf das Ausmaß der Telomerverkürzung auswirkt. So verkürzten sich die Telomere der Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, vorzeitig, und die Lebensspanne verkürzte sich dementsprechend^{172,177-178}. Dies passt gut zu der Aussage, dass eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Telomerverkürzung und der antioxidativen Kapazität von Zellen besteht¹⁷².

Kiyono und Dickson konstatierten, dass die alleinige Transfektion von hTERT nicht in allen mortalen Zellen zur Immortalisierung führt, sondern dass in Epithelzellen und Keratinozyten eine zusätzliche Inaktivierung des p16^{INK4A} Tumorsuppressorgens nötig ist, um diese unsterblich zu machen¹⁷⁹⁻¹⁸⁰. Im Gegensatz dazu wird berichtet, dass sowohl Epithelzellen also auch Keratinozyten durchaus durch hTERT alleine immortalisiert werden können, vorausgesetzt man lässt sie in vitro unter adäquaten Kulturbedingungen proliferieren¹⁸¹.

Die Ergebnisse sind zum Teil kontrovers und die Forschermeinungen gehen stark auseinander. Bis heute ist nicht geklärt, ob nun allein die Telomere für den

replikativen Alterungsprozess verantwortlich sind, bzw. welche Rolle andere Mechanismen bei der Entstehung zellulärer Seneszenz spielen.

Trotz allen Unklarheiten könnte die Telomerlängenverkürzung eine Hilfe bei der Abschätzung zellulären Alterns darstellen. Die Analyse der Telomerlänge könnte über die mitotische Vergangenheit oder die zukünftige Lebensspanne einer Zelle Auskunft geben¹⁴⁵.

In dieser Arbeit ging es um die Frage, ob Östrogen das Auftreten von zellulärer Seneszenz bzw. von Telomerverkürzung beeinflusst und somit an Alterungsprozessen beteiligt ist.

Dies ist von Interesse, da starkes Absinken der Östrogenspiegel, wie es zum Beispiel bei Frauen in der Menopause der Fall ist, mit vielen physiologischen Veränderungen zusammenhängt. Dazu zählen Verlust der Fruchtbarkeit und der Knochendichte⁸⁹ oder die Erhöhung des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen¹⁸².

Passend dazu fand Kato heraus, dass durch Inhibition von Östrogen in Form einer negativen Mutante des ER α replikative Seneszenz induziert werden kann⁹⁰. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Östrogen zelluläre Seneszenz in humanen endothelialen Progenitorzellen dosisabhängig unterdrücken kann¹⁵⁴.

Die Wirkung von Östrogen auf die Telomerlänge von MSCs wurde unseres Wissens nach bis dato noch nicht untersucht und sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer beleuchtet werden. Bekannt war, dass MSCs normalerweise keine Telomeraseaktivität aufweisen und sich folglich ihre Telomere kontinuierlich um 50-200 Nukleotide pro Zellzyklus verkürzen¹⁸³. Durch ektopische Telomeraseexpression kann eine Immortalisierung von MSCs herbeigeführt werden, gleichzeitig behalten sie ihr Differenzierungspotential¹¹⁵.

In diesen Kontext passen die Ergebnisse unserer Arbeit sehr gut. Die Telomerverkürzung konnte durch Kultivierung mit Östrogen signifikant verringert werden. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit. Sowohl in der Versuchsgruppe, die mit einer Konzentration von 10^{-7} M 17- β -Östradiol kultiviert wurde, als auch in der Gruppe, die 10^{-9} M ausgesetzt war, konnte eine signifikante Verringerung des Telomerverlustes beobachtet werden. Bei der niedrigsten Dosis, 10^{-11} M, zeichnete sich allenfalls ein Trend ab, der allerdings ohne statistische Signifikanz blieb¹⁵⁰.

Die telomerschützenden Effekte von Östrogen sind sowohl für Frauen als auch für Männer durchaus relevant, da sich in beiden Geschlechtern vergleichbare Kon-

zentrationen des Hormons in Gelenken detektieren ließen¹⁸⁴. Des Weiteren wurden im Vergleich zum Serumlevel höhere lokale Östrogenkonzentrationen in Gelenken gefunden, weil extrazelluläre Matrix in der Lage ist, Östrogen zu „speichern“¹⁸⁴⁻¹⁸⁵.

Dass Östrogen in der Lage ist, die Telomerverkürzung einzudämmen, kann zum einen durch die Tatsache erklärt werden, dass es fähig ist, über Bindung des ER α an die Bindungsstelle im Bereich des hTERT Promotors die Telomeraseexpression zu erhöhen. Zum anderen kann Östrogen oxidative Schäden reduzieren¹⁸⁶ und somit einem verstärkten Verlust an Telomerlänge entgegenwirken.

Es lässt sich mutmaßen, dass der Wegfall des telomerschützenden Östrogeneffekts postmenopausal und der damit verbundene Anstieg der Telomerverkürzung eine zumindest teilweise Seneszenz-abhängige Ursache des Auftretens von Osteoarthritis bei Frauen nach der Menopause darstellen könnte.

Durch Zugabe des Östrogen-Agonist-Antagonisten Tamoxifen konnte die Östrogenwirkung auf die Telomere komplett aufgehoben werden. In keiner Dosierung konnte eine signifikante Veränderung der mittleren Telomerlänge im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden. Auch die Exposition mit Tamoxifen alleine beeinträchtigte die Telomerverkürzung nicht.

Dies stützt die Hypothese, dass Östrogen seine telomerschützende Wirkung über einen Anstieg der Telomeraseaktivität entfalten könnte. Es wurde diesbezüglich bereits gezeigt, dass Tamoxifen fähig ist, den Östrogen-induzierten Anstieg der Telomeraseaktivität aufzuheben. Andererseits scheint die Telomerase durch alleinige Exposition mit Tamoxifen nicht moduliert zu werden¹⁰⁴.

Dies steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Eine direkte Verknüpfung des signifikant geringeren Telomerverlustes unter Östrogenexposition und eines verspäteten oder gar ausbleibenden seneszenten Phänotyps konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Zellen unter Östrogenkultivierung zeigten wie oben beschrieben keinerlei Unterschiede hinsichtlich Morphologie, Zellproliferation oder SA- β -Galaktosidase-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Östrogen scheint zwar in der Lage zu sein, den Verlust an Telomerlänge zu verlangsamen, dies hat aber keinen erkennbaren Einfluss auf das Schicksal der Zelle, was das unausweichliche Zuschreiten auf die Seneszenz angeht.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass tatsächlich nicht die Länge der Telomere an sich entscheidend ist, dass die Merkmale der Seneszenz sichtbar ausgebildet werden.

Tatsächlich ist es nun so, dass eine Knorpelregeneration nach Chondrozyten- oder MSC-Transplantation bei jungen Frauen weniger vielversprechend ist als bei Männern gleichen Alters, wenn man Lebensqualität, Gesundheit und sportliche Aktivität betrachtet¹⁸⁷. Und das trotz der telomerschützenden Effekt der prämenopausalen Östrogendosen. So könnten unsere Daten darauf hinweisen, dass der unterschiedliche Erfolg zwischen Männern und Frauen nach autologer Knorpeltransplantation durch einen Seneszenz-unabhängigen Mechanismus zustande kommt. Das vermehrte Auftreten der Osteoarthritis bei postmenopausalen Frauen hingegen korreliert gut mit unseren Ergebnissen, da mit sinkendem Östrogenspiegel auch der telomerprotektive Effekt des Östrogens schwindet.

5.5 Analyse der Genexpression

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Bestimmung und Analyse der Expression verschiedener telomerassoziierter Gene sowie telomerunabhängiger Zellzyklusregulatoren. Es sollte untersucht werden, ob Östrogen die Expressionsrate dieser Gene beeinflusst, ob Östrogen die Telomerlänge über telomerase-unabhängige Signalwege modulieren kann, und ob sich Unterschiede zwischen jungen und seneszenten Zellen herausstellen lassen.

TRF1 und TRF2 zählen zu den telomerassozierten Proteinen des Shelterinkomplexes. Sie sind mitunter für die Bildung des t-loops von essentieller Bedeutung. Während TRF1 das Umschlagen um 120° und Paaren der telomerischen DNA induziert^{39,188}, vermittelt TRF2 in vitro die Invasion des 3'-Überhangs in den doppelsträngigen Anteil der Telomere³⁹. Beide Proteine werden als eine Art Gegenspieler der Telomerase angesehen und übernehmen die Funktion eines negativen Regulators der Telomerverlängerung¹⁸⁹⁻¹⁹². Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von TRF1 zu einer sukzessiven Abnahme der Telomerlänge führte. Umgekehrt resultierte aus der Expression eines dominant negativen Allels für TRF1 eine Telomerverlängerung¹⁹⁰.

Die Rolle von TRF2 ist nicht ganz so einfach zu verstehen. Es konnte beobachtet werden, dass in Zellen mit einem dominant negativen Allel für TRF2 eine rasche Initiierung von Apoptose stattfand, und Telomere, denen TRF2 fehlte, ihren 3'-Überhang verloren und End-zu-End-Fusion zum Opfer fielen^{60,190}.

In unseren Versuchen zeigten sich keine Unterschiede in physiologisch relevantem Ausmaß bei der Expression von TRF1 und TRF2 zwischen jungen und seneszenten Zellen. Darüber hinaus konnte kein relevanter Effekt von Östrogen auf die Expression der beiden Gene nachgewiesen werden.

Die Wirkung von Östrogen auf die Telomerlänge scheint folglich nicht über Beeinflussung der Genexpression von TRF1 oder TRF2 reguliert zu sein.

Ein wichtiger Regulator des Zellzyklus ist das p53. Das Aktivitätslevel dieses Proteins wird durch DNA-Schäden oder genomische Veränderungen, wie sie zum Beispiel durch oxidativen Stress oder ungeschützte Telomerenden in alternden Zellen entstehen, hochreguliert und p53 akkumuliert in der Zelle. Dadurch werden entweder ein Zellzyklusarrest oder Apoptose induziert¹⁹³. Auch am Eintritt in die zelluläre Seneszenz ist p53 maßgeblich beteiligt⁶³. Das aktivierte Protein erreicht zytostatische Effekte, indem es als Transkriptionsfaktor fungiert und die Expression des Cyklin-abhängigen-Kinase-Inhibitors p21 erhöht⁶³. Das Protein p21 ist ein Inhibitor der DNA-Synthese in seneszenten Zellen¹⁹⁴. Dementsprechend konnte durch die Entfernung von p21 aus humanen Fibroblasten ein zeitweises Entrinnen der Seneszenz erreicht werden¹⁹⁵.

In unseren Versuchen zeigte sich in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg der p21-Expression in seneszenten MSCs. Dies stimmt mit der Datenlage anderer somatischer Zellen überein¹⁹⁶. Allerdings ergab sich kein Hinweis darauf, dass Östrogen die Expression beeinflusst. Alle Versuchsgruppen zeigten die Veränderungen der Expression zwischen jungen und seneszenten Zellen gleichermaßen. Das legt die Vermutung nahe, dass Östrogen nicht in der Lage ist, über den p53 → p21 → Rb -Signalweg Seneszenz zu verhindern oder zu verlangsamen.

Sirtuine oder auch SIR Gene (silent information regulator genes) existieren in nahezu allen Spezies. Das erste dieser Gene wurde u.a. in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und das Protein silent mating type information regulation-2 (Sir2) genannt. Bei dem Enzym handelt es sich um eine NAD-abhängige Deacetylase¹⁹⁷, die in diesen Organismen an der Regulation verschiedener Signalwege beteiligt ist,

einschließlich derer, die Alterung und Lebenserwartung betreffen¹⁹⁸⁻¹⁹⁹. Bei Menschen bzw. Säugetieren wurden sieben Sirtuine, SIRT1 bis SIRT7, identifiziert. Es wird vermutet, dass Sirtuine bei der Antwort eines Organismus auf Stress oder Toxizität mitwirken. Ferner scheinen sie einen Einfluss auf Krankheiten des Alters bei Säugetieren zu haben¹⁹⁸.

SIRT1 ist Sir2 sequentiell am ähnlichsten²⁰⁰ und man weiß heute, dass unter anderem p53 als Substrat sowohl in vitro als auch in vivo von SIRT1 reguliert wird²⁰¹⁻²⁰². SIRT1 ist in der Lage, p53 zu deacetylieren und damit die Transkriptionsaktivität von p53 herunterzuregulieren²⁰². Dadurch begünstigt SIRT1 die Zellproliferation und verhindert Apoptose und Seneszenz⁶⁴.

In dieser Arbeit konnte eine ausgeprägte Erhöhung der SIRT1-Expression in seneszenten MSCs gezeigt werden¹⁵⁰. Man könnte vermuten, dass die MSCs mit zunehmendem Alter vermehrt SIRT1 exprimieren, um durch Unterdrückung des p53 → p21 → Rb – Signalwegs das Auftreten von Seneszenz und Apoptose möglichst lange hinauszuzögern. Augenscheinlich ist SIRT1 allerdings nicht dazu fähig, dies ganz aufzuhalten, da Seneszenz in allen Versuchsgruppen auftrat. Die SIRT1-Expression zeigte sich unabhängig von der Behandlung der Zellen mit Östrogen. Das Hormon scheint keinen Einfluss auf dieses Gen zu haben¹⁵⁰.

Eine wichtige Stellung im Zellzyklus nehmen DNA-Reparaturgene ein. Auf deren Funktionen ist eine proliferierende Zelle angewiesen, da ihr bei Akkumulation von DNA-Schäden Apoptose droht.

Doppelstrangbrüche gelten als schwerwiegende Form von DNA-Schäden. Sie können exogen zum Beispiel durch ionisierende Strahlung, aber auch durch normale biologische Prozesse wie somatischer Rekombination entstehen. Sie sind deshalb so zytotoxisch, da bereits ein einziger nicht reparierter Doppelstrangbruch ausreicht, den Zelltod zu induzieren. Bei fehlerhafter Reparatur können Doppelstrangbrüche chromosomale Translokationen oder genomische Instabilität zur Folge haben²⁰³. Auf Grund dessen sind die DNA-Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche von enormer Bedeutung. Den Zellen von Säugetieren stehen hauptsächlich zwei Reparaturwege zur Verfügung: Zum Einen „homology directed repair“ (HDR), zum Anderen „non-homologous end-joining“ (NHEJ)²⁰⁴. Im Gegensatz zu HDR funktioniert NHEJ während des gesamten Zellzyklus²⁰⁵. Im Grunde genommen werden bei NHEJ die DNA Enden einfach direkt miteinander verknüpft. Der erste Schritt dabei besteht zu-

nächst in der Erkennung des Doppelstrangbruchs. Hierfür wird die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) benötigt, die aus einer katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs) und einer Ku-Untereinheit besteht²⁰⁶. Die Ku-Untereinheit wiederum setzt sich zusammen aus dem Heterodimer Ku70/Ku80. In vitro bindet Ku mit hoher Affinität an die Enden doppelsträngiger DNA ohne eine augenscheinliche Sequenzspezifität²⁰⁷. Durch die Bindung von Ku werden die DNA-Enden für andere Proteine, wie die DNA-PKcs, zugänglich gemacht²⁰⁸, somit wird die Reparatur ermöglicht. Darüber hinaus schützt Ku die Chromosomenenden vor dem Abbau durch Exonukleasen und unterstützt die Positionierung der DNA-Enden bei der anstehenden Reparatur²⁰⁹⁻²¹⁰. Interessant ist, dass Ku scheinbar auch telomerprotektiv wirkt. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust von Ku zu erhöhtem Telomerverlust und zu vermehrter End-zu-End-Fusion von Chromosomen führt²¹¹.

Das in dieser Arbeit untersuchte XRCC5 Gen kodiert für Ku80, den einen Teil des Ku-Heterodimers²¹². Normalerweise weisen proliferierende Zellen eine erhöhte XRCC5 Expression auf, um die Reparatur von DNA-Schäden zu erleichtern. Eine sinkende Expression von XRCC5 ist bereits ein Zeichen für ausgedehnte DNA-Schäden und Apoptose²¹³. In unserer Analyse der XRCC5 Expression zeigte sich eine signifikant verringerte Expression in einigen seneszenten MSC-Gruppen¹⁵⁰. Dies steht im Einklang mit der oben erwähnten Tatsache, dass proliferierende Zellen, also die jungen MSCs, eine höhere XRCC5 Expression aufweisen als Zellen, die sich im Zellzyklusarrest befinden.

Eine Beeinflussung der XRCC5 Expression durch Östrogen oder Tamoxifen konnte nicht nachvollzogen werden.

5.6 Perspektiven

Da die Mechanismen, die zur Seneszenz führen, noch immer nur unvollständig geklärt sind, bedarf es weiterer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet. Erst durch weitere Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen könnte eine gezielte Beeinflussung der Seneszenz in vitro erreicht werden. Dabei darf allerdings potentielle Tumorentstehung und Entartung nicht außer Acht gelassen werden. Des Weiteren bestünde möglicherweise durch Optimierung der Isolierungsmethoden die Möglichkeit, primitivere Stammzellen mit größerem Proliferations- und Differenzierungs-

potential zu isolieren und vielversprechend im Bereich des Tissue Engineerings einzusetzen.

6 Zusammenfassung

Krankheiten des Knorpels stellen auf Grund ihrer Häufigkeit, der zunehmend alternenden Bevölkerung und dem Gedanken, bis ins hohe Alter aktiv und fit bleiben zu wollen, ein großes Behandlungsfeld dar. Allerdings sind die Behandlungsoptionen auch heutzutage noch begrenzt. Da Knorpel ein bradytrophes Gewebe ist, sind seine Regenerationsmöglichkeiten stark begrenzt und die Behandlungsmethoden bis heute nicht ausreichend.

Neue Maßstäbe in diesem Bereich setzt das Tissue Engineering, das letztendlich das Ziel vom neu gezüchteten, voll funktionsfähigen Knorpeltransplantat verfolgt. Um diesen zu verwirklichen, werden zunächst Zellen benötigt, die dem Patienten als leistungsfähige Knorpelzellen implantiert werden können bzw. Zellen, die in der Lage sind, sich nach Replantation in ein Gelenk zu richtigen Knorpelzellen zu differenzieren. Hier kommen die mesenchymalen Stammzellen ins Spiel. Sie sind zum Einen leicht zu gewinnen, zum Anderen weisen sie ein hohes Differenzierungspotential auf. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, nimmt die ethische und moralische Fragwürdigkeit keinen allzu großen Stellenwert ein. Allerdings gehen MSCs nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen in ein Stadium der Seneszenz über, in dem sie zwar metabolisch aktiv sind, aber ihre Teilungsfähigkeit weitestgehend eingebüßt haben. Mit zunehmendem Alter proliferieren die Zellen immer langsamer, bis sie schließlich ein Plateau erreichen. In diesem Stadium weisen sie typische morphologische Kennzeichen auf. Außerdem verkürzen sich ihre Telomere mit zunehmendem Alter stetig. Die Verkürzung der Telomere korreliert dabei mit der Abnahme der Proliferationsgeschwindigkeit. Lange Zeit wurden einzig und allein die Telomere als Ursache für das Altern gesehen. Mittlerweile geht man von einem komplexen Geschehen und multiplen Faktoren aus. Allerdings hat Seneszenz nicht nur den negativen Effekt des Alterns, sondern bietet zudem Schutz vor Entartung und Tumorentstehung.

Das Hormon Östrogen steht scheinbar mit dem Alterungsprozess des Knorpels in Verbindung. So ist eine Zunahme der Häufigkeit von Gelenkerkrankungen bei Frauen in der Menopause nach Abfall der Östrogenkonzentration zu beobachten.

In dieser Arbeit sollten ein Modell zur Untersuchung des Einflusses von Östrogen auf mesenchymale Stammzellen etabliert und die gängigen Methoden zur Bestimmung der Telomerlänge optimiert werden. Im Anschluss daran wurde der Einfluss von Östrogen sowie des Gegenspielers Tamoxifen auf mesenchymale Stammzellen hinsichtlich Proliferationsverhalten, Morphologie, β -Galaktosidase-Expression und Telomerlänge untersucht. Zudem erfolgte die Bestimmung und Analyse der Expression von telomerassoziierten Genen, von Regulatoren des Zellzyklus und von DNA-Reparaturgenen. Hierzu wurden MSCs von drei verschiedenen Spendern unter jeweils acht verschiedenen Bedingungen kultiviert. Als Kontrolle diente eine Gruppe, die in normalem MSC-Medium gezüchtet wurde. Um die Auswirkung von Östrogen zu untersuchen, wurden Zellen in Medium mit unterschiedlich hoher Östrogenkonzentration kultiviert: Östrogen 10^{-7} M, Östrogen 10^{-9} M, Östrogen 10^{-11} M. Eine weitere Untersuchungsbedingung, Tamoxifen 10^{-7} M, diente als zweite Kontrollgruppe. Außerdem wurden noch Zellen, zu deren Medium Östrogen und Tamoxifen in äquimolaren Konzentrationen von 10^{-7} M, 10^{-9} M und 10^{-11} M hinzugefügt wurde, hinsichtlich der oben genannten Kriterien untersucht. Die Kultivierung aller Gruppen erfolgte bis zur Seneszenz. Zu Beginn und am Ende, sowie zu den Passagezeitpunkten wurden Daten erhoben und zum Schluss analysiert.

Die MSCs stellten ihre Proliferation wie erwartet nach einer bestimmten Anzahl von Verdoppelungen ein, ihre Proliferation verlangsamte sich über den Zeitraum der Kultivierung zusehends. Die morphologischen Veränderungen nahmen im Verlauf zu und entwickelten sich hin zu den Seneszenz-typischen Merkmalen. Der β -Galaktosidase-Nachweis wurde gegen Ende der Kultivierung zunehmend positiv. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich Proliferation, Morphologie oder β -Galaktosidase-Expression zwischen den verschiedenen Untersuchungsbedingungen festgestellt werden.

Sowohl Östrogen in der 10^{-7} molaren, sowie Östrogen in der 10^{-9} molaren Konzentration konnte die Verkürzung der Telomerlänge verzögern. Die Zellen dieser beiden Versuchsgruppen verloren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger Basenpaare. Interessant ist, dass dieser Effekt durch Zugabe des Östrogen-Agonist-Antagonisten Tamoxifen komplett aufgehoben werden konnte, wohingegen Tamoxifen allein keinen Einfluss auf die Telomerlänge hatte.

Sowohl TRF1 als auch TRF2 sind Bestandteile des Shelterinkomplexes und werden als eine Art negative Regulatoren der Telomerverlängerung angesehen. Hinsichtlich ihrer Expression konnte für keines der beiden Gene ein Unterschied zwischen jungen und seneszenten Zellen gezeigt werden. Auch die Zugabe der Hormone beeinflusste die Expression von TRF1 oder TRF2 nicht.

p21 fungiert als Inhibitor der DNA-Synthese in seneszenten Zellen. Die p21-Expression stieg in den seneszenten MSCs signifikant an, allerdings war auch hier kein Unterschied zwischen den Untersuchungsbedingungen zu vermerken.

SIRT1 kann Apoptose und Seneszenz verzögern. Es konnte eine starke Erhöhung der SIRT1-Expression gezeigt werden, die allerdings nicht in der Lage war, das Auftreten der Seneszenz zu verhindern. Es zeigte sich keine Beeinflussung durch die Zugabe der Hormone Östrogen oder Tamoxifen.

Das XRCC5 Gen zählt zu den DNA-Reparaturgenen und wird in proliferierenden Zellen vermehrt exprimiert, wobei eine sinkende Expression bereits Hinweise auf relevante DNA-Schäden oder bevorstehende Apoptose liefert. In dieser Arbeit konnte eine signifikant verringerte XRCC5-Expression in den seneszenten Zellen der Kontrolle und aller Östrogengruppen nachgewiesen werden. Auch hier nahm die Behandlung mit Östrogen oder Tamoxifen keinen Einfluss auf die Genexpression.

Da auch die mesenchymalen Stammzellen der Seneszenz unterliegen, können sie das Problem der Knorpelregeneration momentan nicht vollständig lösen. Die Tatsache, dass Östrogen in bestimmten Dosen die Verkürzung der Telomere in vitro verlangsamen kann, steht im Einklang mit dem protektiven Effekt dieses Hormons auf den Knorpel in vivo. So könnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu führen, die Wirkung von Östrogen auf Knorpelgewebe weiter molekularbiologisch zu untersuchen und über eventuelle Therapiemöglichkeiten degenerativer Erkrankungen in vivo nachzudenken.

7 Literatur

1. Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation --- United States, 2007-2009. *MMWR* **59**, 1261–1265 (2010).
2. Felson, D.T. Osteoarthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America* **16**, 499–512 (1990).
3. Bundesamt, S. Gesundheit, Krankheitskosten 2002. (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2004).
4. Arbeitsmedizin, B.f.A.u. Volkswirtschaftliche Kosten durch Arbeitsunfähigkeit 2002.
5. Elders, M.J. The increasing impact of arthritis on public health. *The Journal of rheumatology* **60**, 6–8 (2000).
6. Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* **47**, 477–486 (1998).
7. Hunter, W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clinical orthopaedics and related research*, 3–6 (1995).
8. Johnson, L.L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official* **2**, 54–69 (1986).
9. Pridie, K.H. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *The Journal of bone and joint surgery*, 618±419 (1959).
10. Steadman, J.R., Rodkey, W.G., et al. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clinical orthopaedics and related research*, S362-369 (2001).
11. Insall, J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clinical orthopaedics and related research*, 61–67 (1974).
12. Campbell, C.J. The healing of cartilage defects. *Clinical orthopaedics and related research* **64**, 45–63 (1969).
13. Bobic, V. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the* **3**, 262–264 (1996).
14. Hangody, L., Kish, G., et al. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* **21**, 751–756 (1998).
15. Hangody, L., Dobos, J., et al. Clinical experiences with autologous osteochondral mosaicplasty in an athletic population: a 17-year prospective multicenter study. *The American journal of sports medicine* **38**, 1125–1133 (2010).
16. Hangody, L., Kish, G., et al. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the* **5**, 262–267 (1997).
17. Simonian, P.T., Sussmann, P.S., et al. Contact pressures at osteochondral donor sites in the knee. *The American journal of sports medicine* **26**, 491–494 (1998).

18. O'Driscoll, S.W., Keeley, F.W., *et al.* Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *The Journal of bone and joint surgery* **70**, 595–606 (1988).
19. Homminga, G.N., Bulstra, S.K., *et al.* Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *The Journal of bone and joint surgery* **72**, 1003–1007 (1990).
20. Korkala, O.L., Kuokkanen, H.O. Autoarthroplasty of knee cartilage defects by osteoperiosteal grafts. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* **114**, 253–256 (1995).
21. Lorentzon, R., Alfredson, H., *et al.* Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the* **6**, 202–208 (1998).
22. 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 surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the* **7**, 232–238 (1999).
23. Hoikka, V.E., Jaroma, H.J., *et al.* Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta orthopaedica Scandinavica* **61**, 36–39 (1990).
24. Smith, G.D., Knutsen, G., *et al.* A clinical review of cartilage repair techniques. *The Journal of bone and joint surgery* **87**, 445–449 (2005).
25. Skalak, R., Fox, C. Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26–29, 1988. (Alan Liss, New York, 1988).
26. Peterson, L., Minas, T., *et al.* Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *The Journal of bone and joint surgery* **85-A Suppl 2**, 17–24 (2003).
27. Brittberg, M., Tallheden, T., *et al.* Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clinical orthopaedics and related research*, S337–348 (2001).
28. Johnstone, B., Hering, T.M., *et al.* In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* **238**, 265–272 (1998).
29. Lynn, A.K., Brooks, R.A., *et al.* Repair of defects in articular joints. Prospects for material-based solutions in tissue engineering. *The Journal of bone and joint surgery* **86**, 1093–1099 (2004).
30. Sharma, B., Elisseeff, J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Annals of biomedical engineering* **32**, 148–159 (2004).
31. Brittberg, M., Lindahl, A., *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine* **331**, 889–895 (1994).
32. Blackburn, E.H., Gall, J.G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of molecular biology* **120**, 33–53 (1978).
33. Kaulen, H. Das Unsterblichkeitsenzym. (faz.net, Frankfurt, 2009).
34. Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **85**, 6622–6626 (1988).
35. Allsopp, R.C., Chang, E., *et al.* Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Experimental cell research* **220**, 194–200 (1995).
36. Levy, M.Z., Allsopp, R.C., *et al.* Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of molecular biology* **225**, 951–960 (1992).
37. Blackburn, E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661–673 (2001).
38. de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* **19**, 2100–2110 (2005).
39. Griffith, J.D., Comeau, L., *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514 (1999).
40. Oeseburg, H., de Boer, R.A., *et al.* Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **459**, 259–268 (2010).
41. Hayflick, L., Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **25**, 585–621 (1961).
42. Harley, C.B., Futcher, A.B., *et al.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
43. Kolettas, E., Buluwela, L., *et al.* Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *Journal of cell science* **108 (Pt 5)**, 1991–1999 (1995).
44. Stewart, S.A., Weinberg, R.A. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 531–557 (2006).
45. Olovnikov, A.M. Printsip marginotomii v matrichnom sinteze polinukleotidov. *Doklady Akademii nauk SSSR* **201**, 1496–1499 (1971).
46. Watson, J.D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology* **239**, 197–201 (1972).
47. Harley, C.B., Vaziri, H., *et al.* The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental gerontology* **27**, 375–382 (1992).
48. Martin, J.A., Buckwalter, J.A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *The journals of gerontology* **56**, B172–179 (2001).
49. Vaziri, H., Dragowska, W., *et al.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **91**, 9857–9860 (1994).
50. Melk, A., Ramassar, V., *et al.* Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* **11**, 444–453 (2000).
51. Chang, E., Harley, C.B. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11190–11194 (1995).
52. Greider, C.W., Blackburn, E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–413 (1985).
53. Feng, J., Funk, W.D., *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science (New York, N* **269**, 1236–1241 (1995).
54. Nakayama, J., Saito, M., *et al.* TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* **88**, 875–884 (1997).
55. Nakamura, T.M., Morin, G.B., *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science (New York, N* **277**, 955–959 (1997).

56. Bodnar, A.G., Ouellette, M., *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N* **279**, 349–352 (1998).
57. Nakayama, J., Tahara, H., *et al.* Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature genetics* **18**, 65–68 (1998).
58. Takakura, M., Kyo, S., *et al.* Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer research* **58**, 1558–1561 (1998).
59. Allsopp, R.C., Vaziri, H., *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **89**, 10114–10118 (1992).
60. van Steensel, B., Smogorzewska, A., *et al.* TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401–413 (1998).
61. Harley, C.B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation research* **256**, 271–282 (1991).
62. von Zglinicki, T., Saretzki, G. Die molekularen Mechanismen der Seneszenz in Zellkultur. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie : Organ der Deutschen* **30**, 24–28 (1997).
63. Ben-Porath, I., Weinberg, R.A. The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 961–976 (2005).
64. Langley, E., Pearson, M., *et al.* Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO journal* **21**, 2383–2396 (2002).
65. Wright, W.E., Shay, J.W. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Experimental gerontology* **27**, 383–389 (1992).
66. Shay, J.W., Wright, W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**, 867–874 (2005).
67. Zhu, J., Wang, H., *et al.* Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **96**, 3723–3728 (1999).
68. Drayton, S., Peters, G. Immortalisation and transformation revisited. *Current opinion in genetics & development* **12**, 98–104 (2002).
69. Chen, Q.M., Prowse, K.R., *et al.* Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* **265**, 294–303 (2001).
70. Suzuki, K., Mori, I., *et al.* Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res* **155**, 248–253 (2001).
71. Toussaint, O., Remacle, J., *et al.* From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1415–1429 (2002).
72. Gronemeyer, H., Laudet, V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein profile* **2**, 1173–1308 (1995).
73. Kumar, V., Chambon, P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**, 145–156 (1988).

74. Tora, L., White, J., *et al.* The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* **59**, 477–487 (1989).
75. Köhrle, J., Petrides, P. Zielgewebe der Gonadotropine bei der Frau. in *Biochemie und Pathobiochemie* (Hrsg. Löffler, G., Petrides, P., *et al.*) (Springer, Heidelberg, 2007).
76. Carmeci, C., Thompson, D.A., *et al.* Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* **45**, 607–617 (1997).
77. Losel, R., Wehling, M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 46–56 (2003).
78. Perry, R.J., Farquharson, C., *et al.* The role of sex steroids in controlling pubertal growth. *Clinical endocrinology* **68**, 4–15 (2008).
79. Nilsson, O., Marino, R., *et al.* Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone research* **64**, 157–165 (2005).
80. Chagin, A.S., Savendahl, L. GPR30 estrogen receptor expression in the growth plate declines as puberty progresses. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 4873–4877 (2007).
81. Ding, C., Cicuttini, F., *et al.* Sex differences in knee cartilage volume in adults: role of body and bone size, age and physical activity. *Rheumatology (Oxford, England)* **42**, 1317–1323 (2003).
82. Nevitt, M.C., Felson, D.T. Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence. *Annals of the rheumatic diseases* **55**, 673–676 (1996).
83. Srikanth, V.K., Fryer, J.L., *et al.* A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **13**, 769–781 (2005).
84. Felson, D.T., Naimark, A., *et al.* The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis and rheumatism* **30**, 914–918 (1987).
85. Cicuttini, F.M., Wluka, A.E., *et al.* Effect of estrogen replacement therapy on patella cartilage in healthy women. *Clinical and experimental rheumatology* **21**, 79–82 (2003).
86. Wluka, A.E., Davis, S.R., *et al.* Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users. *Annals of the rheumatic diseases* **60**, 332–336 (2001).
87. Lai, L.C. Role of steroid hormones and growth factors in breast cancer. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* **40**, 969–974 (2002).
88. Saito, T., Schneider, A., *et al.* Proliferation-associated regulation of telomerase activity in human endometrium and its potential implication in early cancer diagnosis. *Biochemical and biophysical research communications* **231**, 610–614 (1997).
89. Buckler, H. The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms. *The journal of the British Menopause Society* **11**, 61–65 (2005).
90. Kato, K., Horiuchi, S., *et al.* Contribution of estrogen receptor alpha to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation and its implication for escape from senescence by modulating the p53 pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11217–11224 (2002).

91. Tanaka, M., Kyo, S., *et al.* Expression of telomerase activity in human endometrium is localized to epithelial glandular cells and regulated in a menstrual phase-dependent manner correlated with cell proliferation. *The American journal of pathology* **153**, 1985–1991 (1998).
92. Yokoyama, Y., Takahashi, Y., *et al.* Telomerase activity is found in the epithelial cells but not in the stromal cells in human endometrial cell culture. *Molecular human reproduction* **4**, 985–989 (1998).
93. Yokoyama, Y., Takahashi, Y., *et al.* Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Molecular human reproduction* **4**, 173–177 (1998).
94. Williams, C.D., Boggess, J.F., *et al.* A prospective, randomized study of endometrial telomerase during the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 3912–3917 (2001).
95. Kyo, S., Takakura, M., *et al.* Estrogen activates telomerase. *Cancer research* **59**, 5917–5921 (1999).
96. Misiti, S., Nanni, S., *et al.* Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Molecular and cellular biology* **20**, 3764–3771 (2000).
97. Howell, A. Tamoxifen versus the newer SERMs: what is the evidence? *Ann Oncol* **11 Suppl 3**, 255-265 (2000).
98. Heerdt, A.S., Borgen, P.I. Current status of tamoxifen use: An update for the surgical oncologist. *J Surg Oncol* **72**, 42-49 (1999).
99. Burstein, H.J. Aromatase inhibitor-associated arthralgia syndrome. *Breast* **16**, 223-234 (2007).
100. Schwartz, Z., Sylvia, V.L., *et al.* Tamoxifen elicits its anti-estrogen effects in growth plate chondrocytes by inhibiting protein kinase C. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **80**, 401–410 (2002).
101. Berman, E., Adams, M., *et al.* Effect of tamoxifen on cell lines displaying the multidrug-resistant phenotype. *Blood* **77**, 818-825 (1991).
102. Huynh, H.T., Tetenes, E., *et al.* In vivo inhibition of insulin-like growth factor I gene expression by tamoxifen. *Cancer Res* **53**, 1727-1730 (1993).
103. Noguchi, S., Motomura, K., *et al.* Down-regulation of transforming growth factor- α by tamoxifen in human breast cancer. *Cancer* **72**, 131-136 (1993).
104. Calado, R.T., Yewdell, W.T., *et al.* Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood* **114**, 2236–2243 (2009).
105. Fridenshtein, A. Stromal'nye kletki kostnogo mozga i krovotvornoe mikrokruzhenie. *Arkhiv patologii* **44**, 3–11 (1982).
106. Caplan, A.I. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery* **21**, 429–435 (1994).
107. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N* **284**, 143–147 (1999).
108. Gronthos, S., Graves, S.E., *et al.* The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84**, 4164–4173 (1994).
109. Wakitani, S., Saito, T., *et al.* Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve* **18**, 1417–1426 (1995).
110. Reyes, M., Lund, T., *et al.* Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615–2625 (2001).

111. Petersen, B.E., Bowen, W.C., *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, N* **284**, 1168–1170 (1999).
112. Schwartz, R.E., Reyes, M., *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of clinical investigation* **109**, 1291–1302 (2002).
113. Wagner, W., Ho, A.D. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem cell reviews* **3**, 239–248 (2007).
114. Stenderup, K., Justesen, J., *et al.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33**, 919–926 (2003).
115. Simonsen, J.L., Rosada, C., *et al.* Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature biotechnology* **20**, 592–596 (2002).
116. Zimmermann, S., Voss, M., *et al.* Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia* **17**, 1146–1149 (2003).
117. Jenei-Lanzl, Z. Der Einfluss von Steroidhormonen auf die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen. Dissertation. Universität Regensburg (2010).
118. Reyes, M., Verfaillie, C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **938**, 231–233; discussion 233–235 (2001).
119. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49 (2002).
120. Caplan, A.L., Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* **98**, 1076–1084 (2006).
121. Kharaziha, P., Hellstrom, P.M., *et al.* Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *European journal of gastroenterology & hepatology* **21**, 1199–1205 (2009).
122. Vojtassak, J., Danisovic, L., *et al.* Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro endocrinology letters* **27 Suppl 2**, 134–137 (2006).
123. Falanga, V., Iwamoto, S., *et al.* Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue engineering* **13**, 1299–1312 (2007).
124. Lee, P.H., Kim, J.W., *et al.* Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clinical pharmacology and therapeutics* **83**, 723–730 (2008).
125. Macmillan, M.L., Blazar, B.R., *et al.* Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone marrow transplantation* **43**, 447–454 (2009).
126. Lee, M.S., Lill, M., *et al.* Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Reviews in cardiovascular medicine* **5**, 82–98 (2004).
127. Tse, H.F., Yiu, K.H., *et al.* Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Current vascular pharmacology* **5**, 103–112 (2007).

128. Le Blanc, K., Tammik, C., *et al.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* **31**, 890–896 (2003).
129. Le Blanc, K., Frassoni, F., *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**, 1579–1586 (2008).
130. Ringden, O., Uzunel, M., *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* **81**, 1390–1397 (2006).
131. Meyer, M. Zelluläre Seneszenz mesenchymaler Stammzellen unter oxidativem Stresseinfluss. Dissertation. Universität Regensburg (2011).
132. Brandl, A. Replikative Seneszenz humaner Chondrozyten und mesenchymaler Progenitorzellen während der in vitro Expansion. Dissertation. Universität Regensburg (2005).
133. Engelhardt, M., Drullinsky, P., *et al.* Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **3**, 1931–1941 (1997).
134. Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., *et al.* Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* **5**, 271–279 (1986).
135. Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., *et al.* Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli. *Gene* **35**, 249–258 (1985).
136. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
137. Dimri, G.P., Lee, X., *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **92**, 9363–9367 (1995).
138. Richette, P., Corvol, M., *et al.* Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* **70**, 257–262 (2003).
139. Kashiwakura, Y., Katoh, Y., *et al.* Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation* **107**, 2078–2081 (2003).
140. Kim, M.R., Jeon, E.S., *et al.* Thromboxane a(2) induces differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. *Stem Cells* **27**, 191–199 (2009).
141. Kurpinski, K., Lam, H., *et al.* Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* **28**, 734–742 (2010).
142. Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., *et al.* Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* **7**, 14 (2006).
143. Wagner, W., Horn, P., *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PloS one* **3**, e2213 (2008).
144. Colter, D.C., Class, R., *et al.* Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3213–3218 (2000).
145. Wagner, W., Bork, S., *et al.* How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging* **2**, 224–230 (2010).

146. Straub, R.H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* **28**, 521-574 (2007).
147. Gray, A., Feldman, H.A., *et al.* Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 1016-1025 (1991).
148. Foresta, C., Zuccarello, D., *et al.* Oestrogen stimulates endothelial progenitor cells via oestrogen receptor-alpha. *Clin Endocrinol (Oxf)* **67**, 520-525 (2007).
149. Khalil, R.A. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension* **46**, 249-254 (2005).
150. Breu, A., Sprinzing, B., *et al.* Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Orthop Res* **29**, 1563-1571 (2011).
151. Baxter, M.A., Wynn, R.F., *et al.* Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* **22**, 675-682 (2004).
152. Kuilman, T., Michaloglou, C., *et al.* The essence of senescence. *Genes & Development* **24**, 2463-2479 (2010).
153. Ling, S., Zhou, L., *et al.* Effects of 17beta-estradiol on growth and apoptosis in human vascular endothelial cells: influence of mechanical strain and tumor necrosis factor-alpha. *Steroids* **71**, 799-808 (2006).
154. Imanishi, T., Hano, T., *et al.* Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *Journal of hypertension* **23**, 1699-1706 (2005).
155. Lee, B.Y., Han, J.A., *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195 (2006).
156. Severino, J., Allen, R.G., *et al.* Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* **257**, 162-171 (2000).
157. Itahana, K., Campisi, J., *et al.* Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* **371**, 21-31 (2007).
158. Yegorov, Y.E., Akimov, S.S., *et al.* Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Exp Cell Res* **243**, 207-211 (1998).
159. Krishna, D.R., Sperker, B., *et al.* Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? *Mech Ageing Dev* **109**, 113-123 (1999).
160. Kurz, D.J., Decary, S., *et al.* Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3613-3622 (2000).
161. Untergasser, G., Gander, R., *et al.* TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. *Exp Gerontol* **38**, 1179-1188 (2003).
162. Hornsby, P.J. Senescence and life span. *Pflugers Arch* **459**, 291-299 (2010).
163. Suzuki, Y. [Lysosomal enzymes, sphingolipid activator proteins, and protective protein]. *Nippon Rinsho* **53**, 2887-2891 (1995).
164. Hayflick, L. The illusion of cell immortality. *Br J Cancer* **83**, 841-846 (2000).
165. Hayflick, L. The cell biology of human aging. *N Engl J Med* **295**, 1302-1308 (1976).
166. von Zglinicki, T. Telomeres and replicative senescence: is it only length that counts? *Cancer Letters* **168**, 111-116 (2001).

167. Vaziri, H., Benchimol, S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* **8**, 279-282 (1998).
168. Meyerson, M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* **18**, 2626-2634 (2000).
169. Hahn, W.C., Stewart, S.A., *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* **5**, 1164-1170 (1999).
170. Zhang, X., Mar, V., *et al.* Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* **13**, 2388-2399 (1999).
171. Muntoni, A., Reddel, R.R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R191-196 (2005).
172. Saretzki, G., Von Zglinicki, T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 24-29 (2002).
173. Rodemann, H.P., Bayreuther, K., *et al.* Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res* **180**, 84-93 (1989).
174. Chen, Q., Ames, B.N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4130-4134 (1994).
175. von Zglinicki, T., Saretzki, G., *et al.* Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* **220**, 186-193 (1995).
176. Palmero, I., Pantoja, C., *et al.* p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**, 125-126 (1998).
177. Brandl, A., Hartmann, A., *et al.* Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res* **29**, 1114-1120 (2011).
178. Brandl, A., Meyer, M., *et al.* Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **317**, 1541-1547 (2011).
179. Kiyono, T., Foster, S.A., *et al.* Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-88 (1998).
180. Dickson, M.A., Hahn, W.C., *et al.* Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**, 1436-1447 (2000).
181. Ramirez, R.D., Morales, C.P., *et al.* Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* **15**, 398-403 (2001).
182. Rosano, G.M., Vitale, C., *et al.* Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric* **10 Suppl 1**, 19-24 (2007).
183. Shay, J.W., Zou, Y., *et al.* Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 677-685 (2001).
184. Castagnetta, L.A., Carruba, G., *et al.* Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **30**, 2597-2605 (2003).
185. Schmidt, M., Weidler, C., *et al.* Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther* **7**, R938-948 (2005).

186. Song, J.Y., Kim, M.J., *et al.* Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **117**, 74-80 (2009).
187. Nejadnik, H., Hui, J.H., *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *The American journal of sports medicine* **38**, 1110–1116 (2010).
188. Bianchi, A., Smith, S., *et al.* TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* **16**, 1785-1794 (1997).
189. Xin, H., Liu, D., *et al.* The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol* **9**, 232 (2008).
190. Smogorzewska, A., van Steensel, B., *et al.* Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular and cellular biology* **20**, 1659–1668 (2000).
191. van Steensel, B., de Lange, T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740–743 (1997).
192. Palm, W., de Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* **42**, 301-334 (2008).
193. Reddel, R.R. Genes involved in the control of cellular proliferative potential. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 8-19 (1998).
194. Noda, A., Ning, Y., *et al.* Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**, 90-98 (1994).
195. Brown, J.P., Wei, W., *et al.* Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**, 831-834 (1997).
196. Duan, J., Zhang, Z., *et al.* Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1407-1420 (2005).
197. Imai, S., Johnson, F.B., *et al.* Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 297-302 (2000).
198. Kelly, G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev* **15**, 245-263 (2010).
199. Tissenbaum, H.A., Guarente, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230 (2001).
200. Frye, R.A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 793-798 (2000).
201. Michishita, E., Park, J.Y., *et al.* Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* **16**, 4623-4635 (2005).
202. Vaziri, H., Dessain, S.K., *et al.* hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149–159 (2001).
203. Mahaney, B.L., Meek, K., *et al.* Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* **417**, 639-650 (2009).
204. Helleday, T., Lo, J., *et al.* DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6**, 923-935 (2007).
205. Branzai, D., Foiani, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 297-308 (2008).
206. Smith, G.C., Divecha, N., *et al.* DNA-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem Soc Symp* **64**, 91-104 (1999).

- 207. Downs, J.A., Jackson, S.P. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 367-378 (2004).
- 208. Yoo, S., Dynan, W.S. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* **27**, 4679-4686 (1999).
- 209. Doherty, A.J., Jackson, S.P. DNA repair: how Ku makes ends meet. *Curr Biol* **11**, R920-924 (2001).
- 210. Cary, R.B., Peterson, S.R., *et al.* DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4267-4272 (1997).
- 211. Polotnianka, R.M., Li, J., *et al.* The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* **8**, 831-834 (1998).
- 212. Thacker, J., Zdzienicka, M.Z. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair (Amst)* **2**, 655-672 (2003).
- 213. Shackelford, D.A., Tobaru, T., *et al.* Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion. *J Neurosci* **19**, 4727-4738 (1999).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
μl	Mikroliter
A/C/G/T/N	Adenosin/ Cytosin/ Guanin/ Thymin/ Nukleotide
Abb	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozyten-Transplantation
ALT	alternative lengthening of telomeres
ATP	Adenosintriphosphat
BCIG	Bromo-chloro-indolyl-Galactopyranosid
BMI	body mass index
bp	Basenpaar
cDNA	complementary DNA
CFU-Fs	colony-forming unit fibroblasts
cm	Zentimeter
cpd	Zellpopulationsverdoppelung
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Dinukleotidphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	endothelial progenitor cell
ER α/β	Östrogenrezeptoren α und β
ERE	estrogen receptor responsive elements
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GPR30	G-protein coupled receptor 30
GTP	Guanosintriphosphat

GvHD	Graft-versus-Host-Disease
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Hepes	N-2-Hydroxyethyl Piperazine-N'-2-Ethan Sulfonic acid
HDR	homology directed repair
Hinf	Haemophilus influenzae
HLA	Human Leukocyte Antigen
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
hTR	human template RNA
K	Kontrollgruppe
kbp	Kilobasenpaare
LN	Labornummer
M, mM, μ M	Molar, Millimolar, Mikromolar
M1, M2	Mortalitätsstadium 1, Mortalitätsstadium 2
MAPC	multipotente adulte Progenitorzelle
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NHEJ	non-homologous end-joining
nm	Nanometer
Ö7	Östrogen 10^{-7} M- Gruppe
ÖT11	Östrogen/Tamoxifen 10^{-11} M-Gruppe
ÖT7	Östrogen/Tamoxifen 10^{-7} M-Gruppe
ÖT9	Östrogen/Tamoxifen 10^{-9} M-Gruppe
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PBS	phosphate buffered saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
POT1	protein protection of telomeres 1
r	Korrelationskoeffizient
R ²	Bestimmtheitsmaß
Rap1	repressor activator protein 1
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rt-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA-β-Gal	seneszenzspezifische-beta-Galaktosidase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SERM	selective Oestrogen Receptor Modulator
SIPS	stress-induced premature senescence
SIRT1	Sirtuin 1
SSC	Natriumhydroxid-Citrat-Lösung
T7	Tamoxifen 10 ⁻⁷ -Gruppe
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
TGF	transforming growth factor
TIN2	TRF1-interacting nuclear factor 2
TPP1	tripeptidyl peptidase 1
TRAP	Telomere Repeat Amplification Protocol
TRF1/2	telomeric repeat binding factor 1/2
TRF-Assays	Telomer-Restriktionsfragmente-Assay
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	unit (Enzymeinheit)
UV	ultraviolett
V	Volt
X-Gal	Bromo-chloro-indol-Galaktopyranosid

XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells	5
-------	----------------------------------------------------------------------	---

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Shelterin-Komplex, des T-Loop und des D-Loop ⁴⁰	5
Abb. 1.2: Telomerhypothese der Zellalterung und Immortalisierung modifiziert nach ⁴⁴	8
Abb. 1.3: Biosynthese des Östrogens ⁷⁵	11
Abb. 1.4: Schema der unterschiedlichen Signalwege von Steroidhormonen ⁷⁷	12
Abb. 1.5: Schematische Darstellung des ERE im hTERT-Promotor ⁹⁵	14
Abb. 1.6: Differenzierungspotential einer mesenchymalen Stammzelle ¹¹⁷	16
Abb. 3.1: Gelelektrophorese zur Überprüfung der Integrität der DNA. Zur Größenorientierung wurde zusätzlich der DNA-Ladder aufgetragen.	32
Abb. 3.2: Kontrollgel der DNA-Restriktion. Der Leerwert (LW) repräsentiert die ungeschnittene λ -DNA. Der Restriktionsansatz (RA) zeichnet sich durch den typischen Schmier im niedermolekularen Bereich aus, wohingegen der Kontrollansatz (KA) das charakteristische Schnittmuster von mit Hinf I verdauter λ -DNA zeigt.	34
Abb. 3.3a: Blotgel (LN 604), die beiden Längenstandards sind auf den ersten beiden Banden aufgetragen, die Übrigen zeigen die kurzen DNA-Fragmente, die als „Schmier“ sichtbar werden.	35
Abb. 3.3b: Die Signale sind nach vollständigem Southern Blot nicht mehr detektierbar.	35
Abb. 3.4: Aufbau des Southern Blots ¹³¹	36
Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Hybridisierungsvorrichtung ¹³¹	37
Abb. 3.6: Schematische Darstellung von Hybridisierung und Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente ¹³²	37
Abb. 3.7: Beispiel der Auswertung eines Southern Blots mit Hilfe des Programms Telometric 1.2 (Fox Chase Cancer Center) ¹³² .	39
Abb. 3.8: RNA-Kontrollgel nach DNase Verdau mit den typischen 18s- und 28s-Banden	42
Abb. 4.1: Typischer Verlauf der Proliferationsgeschwindigkeit am Beispiel LN619	49
Abb. 4.2: Proliferationsgeschwindigkeit aller jungen Kontrollgruppen	50

Abb. 4.3: Proliferationsgeschwindigkeiten unter Hormoneinfluss (LN 604): keine Unterschiede. Kontrollgruppe (K), Tamoxifen 10^{-7} M (T7), Östrogen 10^{-7} M (Ö7), Östrogen 10^{-9} M (Ö9), Östrogen 10^{-11} M (Ö11), Östrogen/Tamoxifen 10^{-7} M (ÖT7), Östrogen/Tamoxifen 10^{-9} M (ÖT9), Östrogen/Tamoxifen 10^{-11} M (ÖT11).....	51
Abb. 4.4: Reduktion des Zellwachstums von seneszenten im Vergleich zu jungen Zellen.....	52
Abb. 4.5: Junge Zellen (LN604) zu Beginn des Versuchs mit fibroblastoider Morphologie (J), sowie negativem SA- β -Galaktosidase-Nachweis (J:X-Gal) mit Phasenkontrast.....	53
Abb. 4.6: Veränderungen der Morphologie präseneszenten Zellen (PS) und seneszenten Zellen (S) (LN 604).....	54
Abb. 4.7: SA- β -Galaktosidase-Expression (blau) seneszenten Zellen (LN 604)	54
Abb. 4.8: Absolute Telomerlängen im Verlauf des Versuchs (LN 604)	55
Abb. 4.9: Relative Telomerlängen der zunehmend seneszenten MSCs.....	56
Abb. 4.10: Relative Telomerverkürzung mesenchymaler Stammzellen unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol in 10^{-7} (Ö7), 10^{-9} (Ö9) und 10^{-11} (Ö11) M, sowie der Kontrollgruppe (K)	57
Abb. 4.11: Relativer Telomerverlust (bp/cpd)	58
Abb. 4.12: Relativer Telomerverlust der MSCs, die mit Tamoxifen 10^{-7} (T), Östrogen/Tamoxifen 10^{-7} (ÖT7), 10^{-9} (ÖT9) und 10^{-11} (ÖT11) M kultiviert wurden. Für jede Gruppe ist die Regressionsgerade dargestellt.	60
Abb. 4.13: Expression von TRF1 in jungen und seneszenten (s) MSCs mit und ohne Hormonsubstitution.....	62
Abb. 4.14: Expression von TRF2 in jungen und seneszenten (s) MSCs mit und ohne Hormonsubstitution.....	62
Abb. 4.15: Expression von p21 in jungen und seneszenten (s) MSCs mit und ohne Hormonsubstitution.....	63
Abb. 4.16: XRCC-Expression in jungen und seneszenten (s) MSCs. Darstellung aller Versuchsgruppen	64
Abb. 4.17: SIRT1-Expression junger und seneszenten (s) MSCs unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen	65

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Zusammensetzung des Master-Mix.....	44
Tab. 4.1: Werte der Korrelationskoeffizienten der Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen cpd und Kultivierungsdauer	51
Tab. 4.2: Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferation über 28 Tage. Die Signifikanzen des T-Test zur Analyse der Unterschiede hinsichtlich Proliferation zwischen jungen und seneszenten Zellen können der letzten Spalte entnommen werden.....	52
Tab. 4.3: Telomerlängen zu Beginn und am Ende der Kultivierung und mittlere Telomerverkürzung (bp/cpd) der Tamoxifen-Kontrollgruppe und der drei Östrogen/Tamoxifen-Gruppen.....	59
Tab. 4.4: Relative Telomerlängenverkürzung (%) der Tamoxifen-Kontrollgruppe und der drei Östrogen/Tamoxifen-Gruppen, sowie Korrelation zwischen relativer Telomerverkürzung und kumulativer Zellpopulationsverdoppelung.....	60
Tab. 4.5: Signifikanzen der seneszenten (s) Gruppen.....	64

8.4 Danksagung

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. M. Nerlich für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Themas, sowie für sein stetig gezeigtes Interesse und wertvolle Tipps für die Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Angele danke ich ebenfalls besonders für die wertvollen Hilfestellungen bei jeglichen Fragen, sein stetig gezeigtes Interesse, sowie seine konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Persönlich bedanken möchte ich mich bei Frau Daniela Drenkard und Herrn Dr. R. Kujat, die mir unermüdlich den Rücken gestärkt und in jeder Situation und Problemen verschiedenster Art als Ansprechpartner treu zur Seite standen.

Ich danke Frau Dr. Anita Breu ganz besonders für die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit. Sie hat durch ihre Hilfsbereitschaft und ihren unaufhörlichen Einsatz diese Arbeit erst möglich gemacht.

Last but not least bedanke ich mich bei meinen Mitstreitern, Herrn Andreas Hartmann, Herrn Matthias Meyer und meinem Mann, Herrn Benedikt Sprinzing. Sie standen mir tatkräftig zur Seite und sorgten für ein angenehmes und nettes Arbeitsklima.

8.5 Veröffentlichung

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes

Anita Breu, Benedikt Sprinzing, Katharina Merkl, Volker Bechmann, Richard Kujat, Zsuzsa Jenei-Lanzl, Lukas Prantl, and Peter Angele

JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, Vol.29, Issue 10, Oktober 2011, pp. 1563-1571

8.6 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.