

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung Innere Medizin I
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Telomerlängendynamik
in Subpopulationen peripherer Blutlymphozyten
in vivo* und *in vitro

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2003
von Lucie Sedlacek
geboren in München

Dekan: **Prof. Dr. med. J. Zentner**
1. Gutachter: **Prof. Dr. med. W. Lange**
2. Gutachter: **Prof. Dr. med. F. von Weizsäcker**

Jahr der Promotion: **2005**

Ever tried.
Ever failed.
No matter.

Try again.
Fail again.
Fail better.

Samuel Beckett

Gewidmet
meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	9
I.1	Grundlagen der Telomerbiologie	9
I.1.1	Struktur und Funktion der Telomere	9
I.1.2	Telomerase	11
I.1.3	Alternative Telomer-Verlängerungsmechanismen (ALT)	12
I.2	Telomere, Altern und Krebs	12
I.2.1	Altern und die replikative Seneszenz	12
I.2.2	Krebs und die Immortalität maligner Zellen	14
I.3	Das Immunsystem: Telomerdynamik unter speziellen Anforderungen	16
I.3.1	Hämatopoietische Stammzellen	16
I.3.2	T-Lymphozyten	17
I.3.3	B-Lymphozyten	17
I.3.4	Immunoseneszenz	18
I.4	Fragestellung	20
II.	MATERIAL und METHODEN	21
II.1	Verzeichnis der verwendeten Materialien	21
II.1.1	Reagenzien und Kits	21
II.1.2	Einmalartikel, Plastik- und Glaswaren	23
II.1.3	Geräte	24
II.1.4	Zellen	26
II.2	Funktionsweise des Durchflusszytometers (FACS)	26
II.3	Isolierung von einzelnen Zellpopulationen	28
II.3.1	Isolierung von peripheren Blutleukozyten (PBLs)	28
II.3.2	Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs)	29
II.3.3	Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen	29
II.3.4	Reinheitsbestimmung der angereicherten Zellpopulationen	31
II.4	Telomerlängenmessung	33
II.4.1	Flow-FISH-Methode	33
II.4.1.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	33

II.4.1.2	Durchflusszytometrische Analyse (Flow Cytometry)	35
II.4.2	Q-FISH-Methode	40
II.4.2.1	Metaphasenpräparation	41
II.4.2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	42
II.4.2.3	Quantitative Analyse	44
II.5	Messung der Telomerase-Aktivität (TRAP-Assay)	45
II.6	<i>In vitro</i> Stimulation von B- und T-Zellen	48
II.6.1	Generelle Zellkulturtechniken	48
II.6.1.1	Kultivierung von Zellen	48
II.6.1.2	Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	49
II.6.1.3	Bestimmung der Populationsverdopplung	49
II.6.1.4	Einfrieren von Zellen	49
II.6.2	Kultivierung von B-Zellen	50
II.6.3	Kultivierung von T-Zellen	50
II.6.4	Proliferationsnachweis: [³ H]Thymidin-Inkorporation	50
II.7	Cytospin	51
III.	ERGEBNISSE	53
III.1	Telomerlängenheterogenität und -dynamik in Subpopulationen peripherer Blutlymphozyten – <i>in vivo</i>	53
III.1.1	Vergleich der Telomerlängen von peripheren MNCs, B- und T-Zellen beim Erwachsenen	55
III.1.2	Vergleich der Telomerlängen von peripheren MNCs, B- und T-Zellen beim Neugeborenen	57
III.1.3	Telomerlängendynamik von MNCs, B- und T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter	58
III.1.3.1	Telomerlängenprofile nach Altersgruppen sortiert	58
III.1.3.2	Altersabhängige Telomerlängendynamik von MNCs	59
III.1.3.3	Altersabhängige Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen	60
III.2	Telomerlängendynamik in Subpopulationen peripherer Blutlymphozyten – <i>in vitro</i>	63
III.2.1	Telomerlängendynamik von <i>in vitro</i> stimulierten B-Zellen	63
III.2.2	Telomerlängendynamik von <i>in vitro</i> stimulierten T-Zellen	66
III.2.3	Bestimmung der Telomerlängen mittels unterschiedlicher Messverfahren (Flow-FISH vs. Q-FISH vs. Southern Blot)	67

III.2.4	Zusammensetzung von Subpopulationen innerhalb der B-Zell-Kulturen	69
III.2.4.1	Anteil der B-Gedächtniszellen	69
III.2.4.2	Anteil der B-Plasmazellen	70
III.2.5	Telomerase-Aktivität in den <i>in vitro</i> stimulierten B-Zellen	71
IV.	DISKUSSION	73
IV.1	Telomerlängenanalyse von B- und T-Zellen <i>in vivo</i>	73
IV.1.1	Heterogenität der Telomerlängen von B- und T-Zellen <i>in vivo</i>	73
IV.1.2	Unterschiedliche Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen <i>in vivo</i>	74
IV.1.3	Interpretation und klinische Bedeutung	76
IV.1.3.1	<i>In vivo</i> Telomerdynamik von T-Zellen	76
IV.1.3.2	<i>In vivo</i> Telomerdynamik von B-Zellen	77
IV.1.3.3	Bedeutung der unterschiedlichen Telomerdynamik von T- und B-Zellen für die Immunoseneszenz	79
IV.2	Telomerlängenanalyse von B- und T-Zellen <i>in vitro</i>	81
IV.2.1	Unterschiedliche Telomerlängendynamik von <i>in vitro</i> stimulierten B- und T-Zellen	81
IV.2.2	Interpretation	83
IV.2.2.1	Telomerase-Aktivität ist nicht gleichbedeutend mit Telomerverlängerung	84
IV.2.2.2	Lange Telomere in Plasmazellen?	85
V.	ZUSAMMENFASSUNG	87
VI.	ABKÜRZUNGEN	89
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	93

I. EINLEITUNG

I.1 Grundlagen der Telomerbiologie

I.1.1 Struktur und Funktion der Telomere

Als Telomere (griechisch $\tau\epsilon\lambda\omicron\varsigma$: das Ende) werden die Enden linearer Chromosomen bezeichnet, die aus einem besonderen DNA-Protein-Komplex bestehen (Blackburn, 1991; Blackburn, 1994; Zakian, 1995).

Der DNA-Anteil der Telomere setzt sich aus sehr einfachen, repetitiven Basenabfolgen zusammen und ist mit spezifischen, telomerbindenden Proteinen assoziiert. Bei Wirbeltieren lautet die repetitive DNA-Sequenz $(TTAGGG)_n$ (Moyzis *et al*, 1988), wobei die Anzahl (n) ihrer Kopien unter den einzelnen Spezies variiert und beim Menschen zwischen 2.000 und 10.000 Basenpaaren (bp) umfasst (Engelhardt & Martens, 1998).

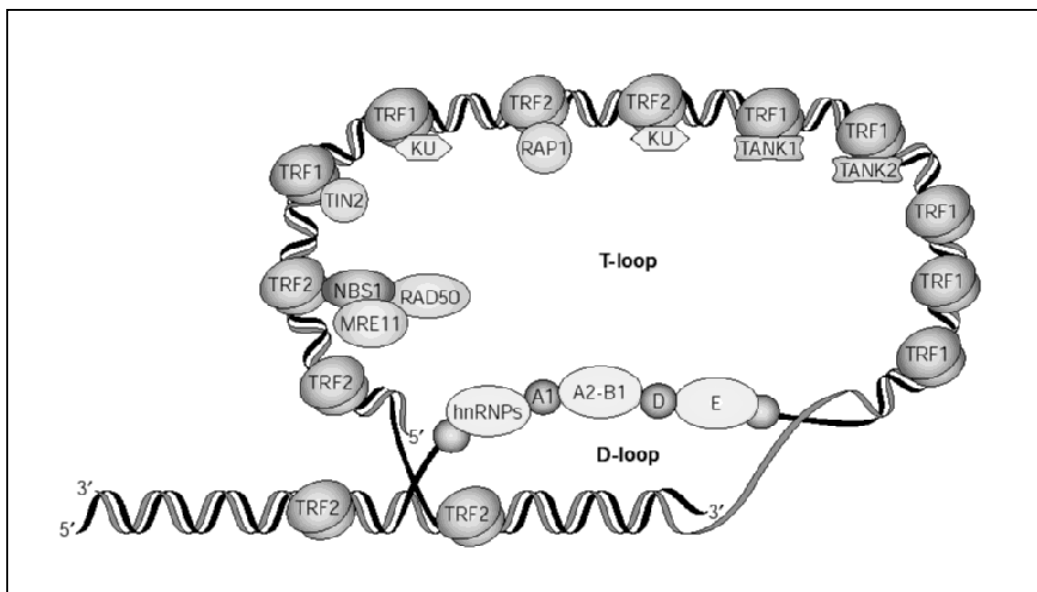


Abbildung I.1.1: Schematische Darstellung der putativen telomeralen Schleifenstruktur mit spezifischen telomerbindenden Proteinen. Die T-Loop ergibt sich durch die Einbettung des einzelsträngigen 3'-Überhangs in einen proximalen Abschnitt des telomeralen DNA-Doppelstrangs. An der Invasionsstelle (= Tail-Loop-Junction) entsteht durch Auftrennung des Doppelstrangs zusätzlich eine sogenannte Displacement (D)-Loop, weshalb auch von einer Doppelschleifen-Struktur (Duplex Loop) der Telomere gesprochen wird. Mit der telomeralen DNA ist eine Vielzahl telomerbindender Proteine assoziiert, denen unterschiedliche Funktionen (v.a. hinsichtlich der Stabilisierung bzw. dem Erhalt der Telomere) zugeschrieben werden (übernommen aus (Neumann & Reddel, 2002)).

Der guanosinreiche Strang der telomeralen DNA, der vom Zentrum des Chromosoms ausgehend in 5'-3' Richtung orientiert ist (Zakian, 1995), überragt mit seinem 3'-Ende den komplementären Strang um ca. 100-200 Basenpaare (McElligott & Wellinger, 1997). Durch Rückfaltung des Telomers und Einbettung dieses einzelsträngigen 3'-Überhangs in einen proximalen Abschnitt des telomeralen Doppelstrangs ergibt sich an den Chromosomenenden statt eines freiliegenden DNA-Endes eine Schleifenstruktur, die als *T-Loop* (*Telomere Loop*) bezeichnet wird (Griffith *et al*, 1999). (siehe Abbildung I.1.1)

Neben einem Minimum an TTAGGG-Sequenzen sind für die Ausbildung und Stabilisierung dieser Schleifenstruktur insbesondere die telomerbindenden Proteine von Bedeutung, zu denen beim Menschen in erster Linie die beiden sogenannten *TTAGGG Repeat-binding Factors* TRF 1 und TRF 2 gezählt werden (Chong *et al*, 1995; Broccoli *et al*, 1997; Griffith *et al*, 1998; Shay, 1999)

Die wichtigste Aufgabe der Telomere besteht darin, die Stabilität und Integrität der Chromosomen zu wahren (Muller, 1938; McClintock, 1941). Indem sie wie Kappen den Chromosomen „aufsitzen“, schützen sie diese vor Degradation, Fusion und Rekombination (Blackburn, 1991; Zakian, 1995; Engelhardt & Martens, 1998). Diese sogenannte Kappenfunktion (*capping function*) wird durch die spezielle Architektur der Telomere, die *T-Loop*-Struktur, gewährleistet (Griffith *et al*, 1999). Sie ermöglicht es der Zelle, zwischen natürlichen (intakten) Chromosomenenden und infolge von Strangbrüchen oder andern Schäden freiliegenden DNA-Enden zu unterscheiden (Zakian, 1995).

Ein Verlust der Schutzkappenfunktion hat schwerwiegende Auswirkungen auf das Genom, da durch Interaktionen zwischen den freiliegenden Telomerenden (in Form von End-zu-End-Fusionen) die Entstehung struktureller und numerischer Chromosomen-Aberrationen begünstigt wird (de Lange, 2002; Smogorzewska *et al*, 2002). Aus diesem Grund verfügen die Zellen über spezielle Kontrollmechanismen (*DNA damage checkpoints*), die – sobald Telomere mit freiliegenden DNA-Enden entdeckt werden – über die Aktivierung von Signalkaskaden wie ATM, p53 und p21 (*DNA damage response pathways*) zum Zellzyklus-Arrest oder sogar zur Apoptose der Zelle führen (Karlseder *et al*, 1999; de Lange, 2002).

Die Notwendigkeit der Existenz der Telomere ergibt sich aus dem sogenannten End-Replikations-Problem, welches alle Organismen mit linearen Chromosomen betrifft (Watson, 1972; Olovnikov, 1973): Da die Aktivität der DNA-Polymerasen unidirektional ist und nicht alle Basen nach Entfernung des Primers am 3'-Ende der DNA repliziert werden können, verlieren lineare Chromosomen mit jeder Teilung einige DNA-

Sequenzen an ihren Enden. Indem diese DNA-Verluste gleichsam einer Pufferzone von den Telomeren abgefangen werden (*buffer function*), bleibt das Genom vor dem Verlust essentieller, kodierender Sequenzen bewahrt (Blackburn, 1991; Engelhardt & Martens, 1998). Die Folge davon ist, dass die Telomere selbst bei jeder Teilung um ein Stück kürzer werden.

Wird bei fortschreitender Verkürzung der Telomere schließlich eine kritische Grenze erreicht, die den Verlust der Kappenfunktion bedeutet, so kommt es über entsprechende Signalkaskaden entweder zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose der Zelle (de Lange, 2002).

I.1.2 Telomerase

Einen bedeutenden Mechanismus zur Lösung des End-Replikations-Problems stellt die kompensatorische De-novo-Synthese von Telomersequenzen durch die reverse Transkriptase Telomerase dar (Greider & Blackburn, 1985; Morin, 1989). Das Telomerase-Enzym ist ein multimerischer Ribonucleoprotein (RNP)-Komplex, der sich aus einer essentiellen RNA-Komponente, einer katalytischen Untereinheit und weiteren Telomerase-assoziierten Proteinen zusammensetzt (Nugent & Lundblad, 1998).

Da die Telomerase eine RNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt, benötigt sie für die DNA-Synthese eine RNA-Matrize als Vorlage. Diese ist in der als hTR (*human Telomerase RNA*) bezeichneten RNA-Komponente des Enzyms enthalten (Greider & Blackburn, 1989; Yu *et al*, 1990): Sie umfasst 11 Basenpaare, und ihre Sequenz ist komplementär zum 3'-Strang der Telomere (Feng *et al*, 1995). Die katalytische Protein-Untereinheit der Telomerase entspricht einer reversen Transkriptase und wird hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) genannt (Lingner *et al*, 1997; Nakamura *et al*, 1997). Im Gegensatz zu allen bislang bekannten reversen Transkriptasen ist die Transkriptionsaktivität der hTERT jedoch ausschließlich auf den 11 bp langen Matrizenbereich der RNA-Komponente beschränkt (Nakamura *et al*, 1997; Nugent & Lundblad, 1998).

Gemeinsam mit der RNA-Komponente bildet die katalytische Untereinheit das Telomerase-Core-Enzym. Diese beiden Komponenten reichen aus, um *in vitro* Enzymaktivität herzustellen (Weinrich *et al*, 1997).

Während hTR in allen menschlichen Zellen vorhanden ist, stellt hTERT *in vivo* den limitierenden Faktor dar, dessen Genexpression einer strengen Regulation unterliegt (Meyerson *et al*, 1997; Nakayama *et al*, 1998; Nugent & Lundblad, 1998). So weisen

die meisten somatischen Zellen des erwachsenen Menschen keine Telomerase-Aktivität auf. Zu den Ausnahmen mit geringer Enzymaktivität gehören Zellen mit selbsterneuerndem Potential (wie z. B. die hämatopoietischen Stammzellen oder proliferierende Epithelzellen in der Basalschicht der Haut) und aktivierte Lymphozyten, bei welchen die Aktivierung der Telomerase jedoch nur vorübergehend (*transient*) erfolgt (Collins & Mitchell, 2002). Im Gegensatz dazu ist in den Keimbahnzellen und in 80-90% primärer Tumorzellen eine dauerhaft hohe Telomerase-Aktivität messbar (Allsopp *et al*, 1992; Kim *et al*, 1994; de Lange, 1994).

I.1.3 Alternative Telomer-Verlängerungsmechanismen (ALT)

Einige immortalisierte menschliche Zelllinien und Tumoren sind in der Lage, ihre Telomere in Abwesenheit von nachweisbarer Telomerase-Aktivität zu verlängern (Bryan *et al*, 1995). Dies spricht für die Existenz alternativer, telomerase-unabhängiger Telomer-Verlängerungsmechanismen, kurz ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) genannt (Bryan *et al*, 1997).

Es wird angenommen, dass die ALT-Mechanismen – analog zu Beobachtungen an telomerase-negativen Hefezellen (Lundblad & Blackburn, 1993) – auch beim Menschen auf Rekombinationsvorgänge zwischen den einzelnen Telomeren zurückzuführen sind (Dunham *et al*, 2000; Neumann & Reddel, 2002). In normalen Zellen werden entsprechende Rekombinationsvorgänge durch verschiedene Kontrollmechanismen (wie z.B. die Mismatch-Reparatur-Gene: *MMR genes* (Rizki & Lundblad, 2001)) unterdrückt. Die Bedingungen, unter welchen es zu einer Entthemmung dieser Repression kommt, sind bislang noch nicht bekannt, jedoch wurde festgestellt, dass die Telomere in Abwesenheit von Telomerase und ab einer kritischen Länge deutlich rekombinationsfreudiger sind (Henson *et al*, 2002; Lundblad, 2002).

I.2 Telomere, Altern und Krebs

I.2.1 Altern und die replikative Seneszenz

Normale menschliche Zellen besitzen in der Regel ein limitiertes Teilungspotential. Nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen scheiden sie irreversibel aus dem Zellzyklus aus, was als replikative Seneszenz oder *Mortality Stage 1* (M1) bezeichnet wird (Hayflick & Moorehead, 1961). Solche seneszenten Zellen sind zwar nicht mehr

teilungs-, aber weiterhin noch lebensfähig, und zeichnen sich durch alterstypische Veränderungen in ihrem Genexpressionsmuster, ihrer Morphologie und Funktionalität aus (Campisi, 1997; Ly *et al*, 2000).

Da sich Telomere in Abwesenheit von Telomerase – bedingt durch die physiologisch inkomplette DNA-Replikation – mit jeder Zellteilung verkürzen und somit ein gutes Maß für die replikative Kapazität einer Zelle darstellen, wurde ihnen die Funktion einer „mitotischen Uhr“ zugeschrieben, welche durch fortschreitenden DNA-Verlust die Anzahl der Zellteilungen „zählt“ und bei Erreichen einer kritischen Länge die replikative Seneszenz einleitet (sogenannte Telomerhypothese) (Harley *et al*, 1990; Harley, 1991; Allsopp *et al*, 1992).

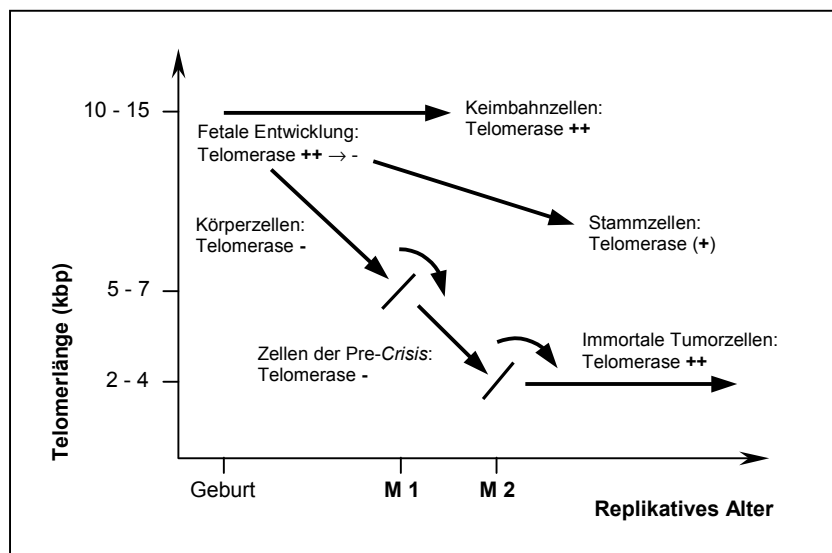


Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Telomerlänge, replikativer Seneszenz, Crisis und Immortalisierung (übernommen aus (Engelhardt & Martens, 1998)).

Für die Einleitung der Zellseneszenz sind die beiden Tumorsuppressorgene p53 und pRB zuständig. Falls diese durch Mutationen oder Onkogene (wie das SV40 T Antigen oder E6/E7 Papillomavirus-Proteine) inaktiviert werden, entkommen die Zellen der Zellseneszenz und teilen sich weiter (Shay *et al*, 1991; Counter *et al*, 1992). Die fortschreitende Telomerverkürzung führt zu zunehmender genomischer Instabilität und – über die Aktivierung entsprechender Signalkaskaden – letztendlich zur Auslösung massiven Zelluntergangs durch Apoptose, was als *Crisis* bzw. *Mortality Stage 2* (M2) bezeichnet wird (Wright & Shay, 1992). Nur sehr wenige Zellen (≤ 1 pro 10^7) überwinden dieses Stadium, indem sie durch Re-Aktivierung telomererhaltender

Mechanismen (meist Telomerase-Expression) die Fähigkeit erlangen, ihre Telomerlängen zu stabilisieren. Solche Zellen können dann uneingeschränkt proliferieren, was mit Immortalität verbunden ist (Counter *et al*, 1992). (siehe Abbildung I.2.1)

Die Zellseneszenz (M1) und die *Crisis* (M2) stellen somit zwei Proliferationsbarrieren für sich teilende Zellen dar und können als natürliche anti-neoplastische Mechanismen betrachtet werden. Durch sie werden alternde Zellen mit möglichen prämaligen Mutationen aus dem Zellzyklus ausgeschleust, bevor sie durch weitere Mutationen entarten und immortal werden können (Stewart & Weinberg, 2002). Diese Proliferationsbarrieren gelten für ausdifferenzierte, telomerase-negative Körperzellen. In Zellen, die Telomerase exprimieren, kann die proliferative Kapazität dagegen je nach Höhe und Dauer der Enzymaktivität unterschiedlich ausgedehnt werden (Bodnar *et al*, 1998; Vaziri & Benchimol, 1998) (siehe auch Kapitel I.1.2).

Im Lauf des Lebens häufen sich seneszente Zellen in den Geweben an und bilden durch Veränderungen des Gewebemilieus die Grundlage für viele altersbedingte, degenerative Erscheinungen u.a. des Bewegungsapparats, des kardiovaskulären Systems oder der Haut (Campisi, 1997).

Die Bedeutung der Telomere bei diesen Vorgängen konnte an Untersuchungen mit telomerase-defizienten Mäusen aufgezeigt werden: Der progrediente Telomerverlust führte in diesen Mäusen zu einer Reihe altersassoziierter Auswirkungen wie ergraute Haare, Alopezie, Störungen der Wundheilung, Immundefizienz, Infertilität und erhöhte Tumorzinzidenz (Blasco *et al*, 1997; Rudolph *et al*, 1999). Die gleiche Symptomatik zeichnet auch die Erbkrankheit Dyskeratosis congenita (DKC) aus, der eine partielle Telomerase-Defizienz zugrunde liegt (Mitchell *et al*, 1999; Collins & Mitchell, 2002).

I.2.2 Krebs und die Immortalität maligner Zellen

Uneingeschränkte Proliferationsfähigkeit bzw. Immortalität ist ein grundlegendes Kriterium maligner Zellen. Die Feststellung, dass 80-90% maligner Tumoren Telomerase exprimieren, legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Aktivierung des Telomerase-Enzyms eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung einnimmt (de Lange, 1994; Kim *et al*, 1994; Meyerson, 2000).

Hierbei sind jedoch folgende zwei Aspekte zu beachten:

Zum einen führt die Telomerase-Expression alleine zwar zur Immortalität, aber noch nicht zur malignen Entartung einer Zelle (Bodnar *et al*, 1998; Morales *et al*, 1999),

wie u.a. das physiologische Vorkommen telomerase-positiver Zellen im menschlichen Organismus zeigt. Für die Entstehung maligner Zellen sind weitere genetische Veränderungen notwendig, in erster Linie die Ausschaltung proliferationsregulierender Gene als Voraussetzung des für Krebszellen charakteristischen unkontrollierten Wachstumsverhaltens (Hanahan & Weinberg, 2000; Harley, 2002). So gelang es *in vitro* erst durch Expression von hTERT in Kombination mit RAS und viralen Onkoproteinen, die zur Inaktivierung von p53 und pRB (und somit zur Umgehung der Zellseneszenz) führen, vollständig transformierte menschliche Tumorzellen herzustellen (Hahn *et al*, 1999).

Zum anderen können Zellen auch in Abwesenheit von Telomerase immortal werden und maligne entarten. Beweise hierfür sind die Entstehung maligner Tumoren in telomerase-defizienten Mäusen (Blasco *et al*, 1997; Rudolph *et al*, 1999) sowie die 10-20% menschlicher Tumoren, die keine Telomerase exprimieren. Die für die Immortalität essentielle Fähigkeit der Telomerstabilisierung wird in diesen Zellen durch die Aktivierung alternativer Telomer-Verlängerungsmechanismen (ALT) erlangt (Bryan *et al*, 1995; Bryan *et al*, 1997).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Telomere für die Krebsentstehung in zweierlei Weise von Bedeutung sind: zunächst durch ihre Dysfunktion, später durch ihren Erhalt. Während die Telomerdysfunktion normalerweise – durch die Induktion von Wachstumshemmung oder Apoptose – eine Proliferationsbarriere darstellt, dient sie bei Verlust entsprechender Kontrollmechanismen dagegen als Ausgangspunkt für die Entstehung von neuartigen und zu neoplastischer Transformation prädisponierenden genetischen Konstellationen (de Lange, 1994; Maser & DePinho, 2002). Die Telomerdysfunktion und die nachfolgende genomische Instabilität sind durch extremen Telomerverlust (also zunächst die Abwesenheit telomerverlängernder Mechanismen) bedingt. In einem späteren Stadium des Entartungsprozesses dagegen stellt die Aktivierung solcher Mechanismen und die Stabilisierung der Telomere eine essentielle Voraussetzung für die Immortalität maligner Zellen dar (Counter *et al*, 1992).

I.3 Das Immunsystem: Telomerdynamik unter speziellen Anforderungen

Unser Immunsystem zeichnet sich durch eine enorme Dynamik und Plastizität aus: Einerseits muss für den Erhalt einer intakten Barriere- und Abwehrfunktion fortwährend ein ausreichend großer Pool an Immunzellen im Körper bereitstehen. Da die meisten dieser Zellen nur sehr kurzlebig sind (Granulozyten zum Beispiel leben nur einige Stunden lang), müssen sie kontinuierlich nachgebildet werden, was Aufgabe der zur Selbsterneuerung fähigen hämatopoietischen Stammzellen ist.

Andererseits ist für eine effektive Immunantwort nach Antigenkontakt eine rasche klonale Expansion und Ausdifferenzierung spezifischer B- und T-Lymphozyten mit dem Erhalt einiger langlebiger Gedächtniszellen für den Fall eines Zweitkontakts notwendig.

Für beide Eigenschaften, die kontinuierliche Erneuerung sowie die effektive Immunantwort ist eine hohe proliferative Aktivität Voraussetzung. Angesichts der in den vorhergehenden Kapiteln aufgezeigten Bedeutung der Telomere in Zusammenhang mit Proliferation ist die Untersuchung der Telomerdynamik in Zellen des Immunsystems daher von besonderem Interesse.

I.3.1 Hämatopoietische Stammzellen

Hämatopoietische Stammzellen sind multipotente Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, aus denen Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Zelllinie hervorgehen. Der Großteil der primitiven hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark befindet sich im Ruhezustand, nur ein kleiner Prozentsatz ist aktiviert und durchläuft den Zellzyklus. Dieser sich teilende Stammzellpool ist für die Produktion von ca. 10^{12} Blutzellen pro Tag zuständig (Lansdorp *et al*, 1997).

Hämatopoietische Stammzellen weisen eine niedrige basale Telomerase-Aktivität auf, die bei Proliferationsinduktion und Zellzyklusaktivierung kurzzeitig erhöht wird, im Lauf der nachfolgenden Differenzierung jedoch wieder auf nicht nachweisbare Werte absinkt (Hiyama *et al*, 1995; Broccoli *et al*, 1995). Die Beobachtung, dass auch Stammzellen einem progressiven wenngleich vergleichsweise verlangsamten altersabhängigen Telomerverlust unterliegen, führte zu der Schlussfolgerung, dass die transiente Telomerase-Aktivierung das proliferative Potential dieser Zellen zwar auszudehnen vermag, aber nicht ausreicht, um die replikationsbedingte Telomerverkürzung zu verhindern (Vaziri *et al*, 1994; Engelhardt *et al*, 1997).

I.3.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten stellen die Hauptvertreter der zellvermittelten spezifischen Immunität dar. Die aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgegangenen T-Vorläuferzellen wandern in den Thymus ein, wo sie durch weitere Differenzierung und Selektion zu $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen ausreifen. Diese verlassen den Thymus als naive T-Zellen, die sich nach Aktivierung durch Antigenkontakt in der Peripherie exzessiv vermehren und zu spezifischen (kurzlebigen) Effektorzellen und einigen wenigen langlebigen Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Wiederholter Kontakt mit demselben Antigen führt zu weiterer Differenzierung und Proliferation der Gedächtniszellen (und dadurch zu einer effektiveren Zweitantwort) (Weng *et al*, 1997b).

Auch die Telomere von T-Lymphozyten erfahren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen replikationsbedingten Längenverlust und stellen ein Maß für die replikative Vorgeschichte bzw. das noch verbleibende replikative Potential der Zellen dar (Vaziri *et al*, 1993). So weisen naive $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu den aus ihnen hervorgehenden $CD4^+$ Gedächtniszellen längere Telomere und *in vitro* eine ca. 128-fach höhere replikative Kapazität auf (Weng *et al*, 1995; Rufer *et al*, 1999). Die in T-Zellen nachgewiesene Telomerase-Aktivität unterliegt einer komplexen Regulation in Abhängigkeit vom jeweiligen Entwicklungs- und Aktivierungszustand der Zellen (Broccoli *et al*, 1995; Weng *et al*, 1996): Während alle Subpopulationen der unreifen Thymozyten hohe Aktivitätslevel aufweisen, ist in ausgereiften, peripheren T-Zellen nur geringe bis keine Aktivität messbar. Durch Antigenstimulation (*in vivo* wie *in vitro*) kommt es sowohl in $CD4^+$ als auch in $CD8^+$ T-Zellen jedoch zu einer vorübergehenden Re-Aktivierung der Telomerase (Plunkett *et al*, 2001).

I.3.3 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten stellen durch die Produktion und Sekretion von Immunglobulinen die Basis der humoralen spezifischen Immunität dar. Nach Ausdifferenzierung aus B-Vorläuferzellen im Knochenmark verlassen sie dieses als reife, naive $CD19^+$ B-Zellen, die anschließend im peripheren Blut kreisen oder lymphatisches Gewebe besiedeln. Durch Antigenkontakt kommt es zur Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen mit nachfolgender Ausbildung sogenannter Keimzentren in sekundären lymphatischen Organen. Neben der durch Isotypen-Switch, somatische Hypermutation und Selektion bedingten Affinitätsreifung findet hier eine immense klonale Expansion und

die Ausdifferenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen einerseits und langlebigen B-Gedächtniszellen andererseits statt (Weng *et al*, 1997b).

Während naive und Gedächtnis-B-Zellen im Ruhezustand keine Telomerase-Aktivität aufweisen, kommt es im Rahmen der B-Zell-Aktivierung in den Keimzentren zu einer stimulationsbedingten Induktion der Telomerase-Expression (Norrback *et al*, 1996; Hu *et al*, 1997; Weng *et al*, 1997a). Dies hat zur Folge, dass die B-Zellen der Keimzentren trotz ihrer hohen Proliferationsrate im Vergleich zu naiven oder Gedächtnis-B-Zellen über deutlich längere Telomere verfügen (Weng *et al*, 1997a). Dennoch unterliegen B-Zellen ebenso wie T-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einem replikationsbedingten Telomerverlust. Die mit der Proliferationsinduktion einhergehende Telomerase-Expression scheint demnach einen Adaptations- bzw. Kompensationsmechanismus zur Sicherstellung der proliferativen Kapazität in klonal expandierenden B-Zellen und den aus ihnen hervorgehenden Gedächtniszellen darzustellen (Weng *et al*, 1998; Hodes *et al*, 2002).

I.3.4 Immunoseneszenz

Unter Immunoseneszenz versteht man das Altern des Immunsystems.

Dass es mit steigendem Alter zu einer Abschwächung des Immunsystems kommt, wird insbesondere an der Zunahme der infektionsbedingten Morbidität und Mortalität im Alter deutlich. Immunoseneszenz darf jedoch nicht einfach mit einer unidirektionalen, generalisierten Abnahme aller Immunfunktionen gleichgesetzt werden, sondern stellt vielmehr einen komplexen, entwicklungsbedingt gesteuerten Prozess dar, der mit einer Umstrukturierung und qualitativen Veränderung einzelner Funktionen des Immunsystems einhergeht (Globerson & Effros, 2000).

Zu den grundlegendsten Veränderungen gehören die abnehmende Anzahl von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut (= altersbedingte Lymphopenie) und die relative Zunahme unspezifischer zytotoxischer Natürlicher Killerzellen (= NK) (Sansoni *et al*, 1993). Im (CD3⁺) T-Zell-Kompartiment kommt es zu einer Verschiebung von naiven CD4⁺ hin zu Gedächtnis-T-Zellen, welche im Alter die Mehrzahl der CD4⁺ Zellen ausmachen. Bei den CD8⁺ T-Zellen überwiegen die ausgereiften CD8⁺CD28⁻ Zellen, die durch den differenzierungsbedingten Verlust des CD28 Oberflächenmarkers an Reaktivität und Proliferationskapazität einbüßen (Effros & Pawelec, 1997; Fagnoni *et al*, 2000). Die abnehmende Produktion naiver T-Zellen zusammen mit Veränderungen im Zytokinmilieu und in der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion im Alter führen in erster Linie zu einer verminderten Reaktionsfähigkeit gegenüber neuen Antigenkontakten. Auch die Fähigkeit der CD19⁺ B-Zellen, nach Antigen-

kontakt hochaffine Antikörper zu produzieren, nimmt bei älteren Individuen graduell ab (Miller, 1996; Hodes, 1997).

Die Fähigkeit der klonalen Expansion ist für den Erhalt einer effektiven, antigenspezifischen Immunantwort hochrelevant. Da auch Lymphozyten einem altersbedingten Telomerverlust unterliegen und sich im Alter größtenteils aus ausdifferenzierten Subpopulationen mit vergleichsweise kurzen Telomeren zusammensetzen, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die replikative Seneszenz einen wesentlichen Faktor der Immunoseneszenz darstellt (Hodes, 1997). Die sowohl bei Telomerase-knock-out Mäusen als auch bei Patienten mit der Erbkrankheit Dyskeratosis congenita auftretende Immunschwäche spricht für einen solchen Zusammenhang zwischen Telomerdysfunktion und Immunoseneszenz (siehe auch Kapitel 1.2.1) (Herrera *et al*, 2000; Lee *et al*, 1998).

Angesichts der stetig steigenden Lebenserwartung und dem damit verbundenen wachsenden Anteil der alternden Bevölkerung stellen altersbedingte Erkrankungen (basierend auf Degeneration, Infektion oder Entartung) ein zunehmendes Erscheinungsbild im klinischen Alltag dar. Die mit dem Alter abnehmende Funktionsfähigkeit des Immunsystems (= Immunoseneszenz) trägt einen wesentlichen Anteil zur Entstehung bzw. Progression vieler dieser Erkrankungen bei, weshalb das Verständnis der ihr zugrunde liegenden Vorgänge von allgemeinem klinischen Interesse ist. Auf diesem Forschungsgebiet stellen Telomere und ihre Dynamik – gerade hinsichtlich ihrer Beteiligung an Prozessen des Alterns bzw. der Krebsentstehung – einen besonders vielversprechenden Ansatzpunkt dar.

I.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Veränderungen der Telomerlängen (= die Telomerdynamik) von peripheren B- und T-Lymphozyten unter den folgenden zwei Gesichtspunkten analysiert werden:

Im ersten Abschnitt soll die *in vivo* Telomerdynamik von B- und T-Zellen im Verlauf des menschlichen Lebens untersucht werden. Hierfür sollen – einer Querschnittsstudie entsprechend – die Telomerlängen der beiden Subpopulationen bei möglichst vielen Individuen unterschiedlichen Alters gemessen werden. Das Ziel dieser Studie ist es, durch die parallele Analyse und die direkte Gegenüberstellung dieser Messdaten (die für beide Subpopulationen anhand desselben Probanden-Pools erhoben werden) die Unterschiede und/oder Gemeinsamkeiten zwischen B- und T-Lymphozyten sowohl bezüglich ihrer absoluten Telomerlängen als auch bezüglich ihrer Telomerlängendynamik *in vivo* zu erfassen.

Im zweiten Abschnitt soll die Telomerdynamik von aktivierten B- und T-Lymphozyten *in vitro* analysiert werden. Zu diesem Zweck sollen aus peripherem Blut isolierte B- und T-Zellen (in verschiedenen Ansätzen) unter *in vitro* Stimulation kultiviert werden, wobei in bestimmten Abständen die Messung ihrer Telomerlängen erfolgen soll. Es ist zu erwarten, dass die Ergebnisse dieser *in vitro* Analyse wesentlich zu einem besseren Verständnis der spezifischen Telomerdynamik in aktivierten B-Zellen einerseits und – durch den direkten Vergleich mit den T-Zellen – der Unterschiede zwischen den beiden Lymphozyten-Subpopulationen andererseits beitragen werden.

II. MATERIAL und METHODEN

II.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien

II.1.1 Reagenzien und Kits

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	MERCK, Darmstadt, Germany
Aqua ad injectabilia	DELTA-PHARMA von Boehringer Ingelheim, Pfullingen, Germany
B-B4-FITC	IQ Products, Groningen, Netherlands
BSA (Bovines Serumalbumin)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
CD3 Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
CD19 Micro Beads	
CD3-PE	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany
CD19-FITC	
CD20-PE	
CD27-PE	
CD38-PE	
CD45-PE u. -FITC	
Colcemid: KARYOMAX [®] -Colcemid [®] (10µg/ml)	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
Cyclosporin A	Novartis Pharma, Nürnberg, Germany
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
EDTA	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
Ethanol absolut	Mallinckrodt BAKER, Deventer, Netherlands
Eisessigsäure 100%	MERCK, Darmstadt, Germany
FCS (Fetal Calf Serum)	GIBCO BRL Life Technologies, Germany
Ficoll-Hypaque Separating Solution	BIOCHROM KG, Berlin, Germany
Fluorescence Beads: Linear Flow [™] Green, 2,5 µm	Component A von Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Formaldehyd min. 36,5%	RIEDEL-DE HAEN, Seelze, Germany
Formalin Solution 10%	SIGMA Diagnostics, St. Louis, MO, USA
Formamide ultra pure (für Q-FISH)	MERCK, Darmstadt, Germany

Formamid (für Flow-FISH)	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
Hepes Buffer (1M)	SIGMA-ALDRICH CO.LTD., Irvine, UK
Interleukin 2 (IL-2) PROLEUKIN[®] (IL-2)	CHIRON Behring, Marburg, Germany CHIRON, Ratingen, Germany
Ionenaustauscher: AG 501-X8 (D) Resin	BioRad, Hercules, CA, USA
Isopropanol (2-Propanol)	MERCK, Darmstadt, Germany
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK, Darmstadt, Germany
L-Glutamin 200 mM	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
Methanol zur Analyse	MERCK, Darmstadt, Germany
Microscint 20 (High Efficiency LSC Cocktail)	Packard, Cambere Company
Mouse IgG₁ control PE u. FITC	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany
Natriumchlorid (NaCl) 1,5 M	MERCK, Darmstadt, Germany
Natronlauge (NaOH) 5N	MERCK, Darmstadt, Germany
NEN blocking reagent	DuPont
OKT-3 , 1 mg/ml	Janssen-Cilag, Neuss, Germany
PBS (Phosphate buffered saline) DULBECCO's	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
Pepsin	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
PNA-Telomer-Sonden: FITC conjugated (C ₃ TA ₂) PNA probe, 0.3 µg/ml (für Flow-FISH) Cy-3 conjugated (C ₃ TA ₂) PNA probe (für Q-FISH)	Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA PBIO/Biosearch Product, Bedford, MA, USA
Propidiumiodid (PI) 10 µg/ml	aus Laborbeständen
RNase DNase free 500µg/1ml	Boehringer Mannheim, Germany
RPMI 1640 , Zellkulturmedium ohne Glutamin	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
SAC: Staphylococcus aureus cells, PANSORBIN [®] , Cowan I strain	CALBIOCHEM, Bad Soden, Germany
Salzsäure (HCl) 5M	MERCK, Darmstadt, Germany

TBE-Puffer 10X ultra pure	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
Telomerase PCR ELISA^{Plus} Kit	Boehringer Mannheim, Germany
[³H]thymidine	New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA
TRIS (Tris[hydroxymethyl]aminomethane)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
Tris-HCl pH 7,5 ultra pure	GIBCO BRL Life-Technologies, Grand Island, NY, USA
Trypan Blue Stain 0,4%	GIBCO BRL Life-Technologies, Paisley, Scotland, UK
TWEEN 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
Vectashield	VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA

II.1.2 Einmalartikel, Plastik- und Glaswaren

Adhäsionsobjektträger (12 Felder)	Superior MARIENFELD Laboratory Glassware, Langen, Germany
Combitips biopur plus (5-12,5-25 ml), steril, einzeln verpackt	Eppendorf, Hamburg, Germany
Combistrip für Multipette (5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Deckgläser für Objektträger (18x18mm)	ROTH, Karlsruhe, Germany
Einmalspritzen (2-5-10-20-50 ml)	Braun, Melsungen, Germany
Eppendorf-Röhrchen: Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5-1,5-2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Erlmeyer Kolben (300-500 ml)	Schott, Mainz, Germany
Faltfilter (Folded Filters, Ø 185 mm)	Schleicher & Schuell Dassel, Germany
Filter für Magnetsäulen: Pre-Separation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Filter für 50 ml Falcon-Röhrchen (30 µm)	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany
Glasflaschen (100-250-500-1000 ml)	Schott, Mainz, Germany
Kryobox mit Deckel (50 mm Höhe)	neoLab Heidelberg, Germany
Küvetten Halb-Mikro	Greiner, Frickenhausen, Germany
Objektträger (76 x 26 mm)	Langenbrinck, Emmendingen, Germany

Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Germany
PCR-Tubes: Micro Amp Reaction Tubes (0,2 ml)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Perfusorspritzen (50 ml)	Braun, Melsungen, Germany
Pipetten für Pipet-Boy (2-5-10-25-50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Pipettenspitzen (10-20-200-1000 µl)	ART Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
Polypropylenröhrchen konisch: „Falcon-Röhrchen“ (15-50-225 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Polypropylenröhrchen mit Rundboden (6-14 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Polystyrolröhrchen mit Rundboden: „FACS-Röhrchen“ (6 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Separationssäulen (magnetisch): MidiMACS (LS ⁺) und MiniMACS (MS ⁺)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Sterilfiltereinheiten: Millex-GV (0,22 µm) und Millex-HA (0,45 µm)	Millipore, Eschborn, Germany
Sterilfiltrationssystem CA (1000 ml)	Nalgene, Nalge Nunc, Wiesbaden, Germany
Trichter (Ø 100 mm)	Roth, Karlsruhe, Germany
Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe (15-75-175 cm ²)	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany
Zellkulturplatten Multiwell™ mit flachem Boden (6-12-24-48-96 Wells)	Falcon, Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany
Zylindergläser Duran (50-100-250-500-1000 ml)	Brand, Wertheim, Germany

II.1.3 Geräte

Absaugpumpe 4151	Eppendorf, Hamburg, Germany
Bakterienofen	GFL
Bakterienschaker 3032	GFL
Cryo-Einfriergerät (Abkühlrate: 1°C/min)	Nalgene, Nalge Nunc, Wiesbaden, Germany
Cytospin-Gerät	Shandon

Digitalthermometer AMA-Digit	A PRECISION
Durchflusszytometer: FACS Calibur, Software: Cell Quest	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Durchlichtmikroskope	Zeiss, Jena, Germany
ELISA-Reader, Software: Softmax	DPC
ELISA-Auswertcomputer	Zenith
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Germany
Fluoreszenzmikroskop Axioplan II + Digitalkamera + Workstation QUIPS	Zeiss, Jena, Germany Sensys, Photometrics Ltd., USA Vysis, Downers Grove, IL, USA
Heizblock	Liebisch, Bielefeld, Germany
Hybridisierungsöfen Hybridiser HB-1D	TECHNE, Wertheim, Germany
Inkubator	Heraeus, Stuttgart, Germany
Mikrotiterplatten-Shaker KS 125 basic	IKA Labortechnik
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Germany
PCR-Maschine GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Pipet-Boy acu	Integra Biosciences, Fernwald, Germany
Pipetten (1-10 µl, 1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)	Gilson Medical Electronics, Viliers-le-Bel, France
Säulenständer MACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Sicherheitswerkbänke: SterilGARDHood Laminair HBB 2448 S	Baker Company, Sanford, Maine Heraeus Instruments, Stuttgart, Germany
Stickstofftank Arpege 140	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf, Germany
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus SepaTech, Stuttgart, Germany
Vortexer Typ 750.02	Heidolph
Wasserbad 1083	GFL
Zentrifugen: Megafuge 3.0R und Omnifuge 2.0 RS	Heraeus SepaTech, Stuttgart, Germany
Zellseparationsmagnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany

II.1.4 Zellen

Als Studienmaterial dienten in der vorliegenden Arbeit humane periphere Blutlymphozyten. Diese wurden überwiegend aus jeweils 30-40 ml EDTA Blut von gesunden Spendern nach deren Aufklärung und Einwilligung gewonnen.

Für größere Mengen an peripheren Blutlymphozyten, wie sie für die Anreicherung und Kultivierung der B- und T-Zellen notwendig waren, wurden übriggebliebene Buffy Coats aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Uniklinik verwendet.

Nabelschnurblutproben stammen aus der Freiburger Nabelschnurblutbank, von wo sie für von der Ethikkommission der Freiburger Universitätsklinik genehmigte Projekte freigegeben werden, wenn die Zellzahl einen vorgegebenen Schwellenwert unterschritten hat.

II.2 Funktionsweise des Durchflusszytometers (FACS)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Suspension auf Einzelebene. Die zu messenden Partikel (zum Beispiel Leukozyten) müssen dafür als Einzelsuspension in Konzentrationen um 1 Million Partikel pro ml vorliegen und können mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt sein.

Für die Analyse am Durchflusszytometer (*Fluorescence Activated Cell Sort*: FACS) wird die Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt, und die Zellen bei Eintritt in die Messkammer durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt. So erreichen sie aneinandergereiht wie eine Perlenkette sequentiell den Analysepunkt (= „hydrodynamische Fokussierung“), wo sie in Sekundenbruchteilen einzeln(!) vom fokussierten Lichtstrahl eines Lasers (meist luftgekühlte Argon-Ionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm) erfasst und angeregt werden. Die so angeregte Zelle emittiert Licht, welches von unterschiedlichen, für bestimmte Wellenlängen spezifischen Detektoren (*Photomultiplier Tubes*: PMTs) empfangen wird. Das erfasste Signal wird dann über elektrische Schaltungen in Form von Pulsamplituden quantifiziert (linear oder logarithmisch) und kann letztendlich vom Computer in unterschiedlicher Form verarbeitet und wiedergegeben werden.

Das von der Zelle emittierte Licht setzt sich zusammen aus Streulicht und, bei Anfärbung mit Fluorochromen, Fluoreszenzlicht.

Streulicht entsteht durch die Interaktion des einfallenden Laserlichtstrahls mit einer Zelle, wobei nur die Richtung, nicht aber die Wellenlänge (d.h. Farbe) des anregenden Lichtes verändert wird. Man unterscheidet zwischen einer vorwärtsgerichteten Streuung entlang des auf die Zelle einfallenden Laserstrahls (*Forward Light Scatter*: FSC), die ein Maß für die Zellgröße darstellt, und einem Seitwärtsstreulicht im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl (*Side Scatter*: SSC), welches als Maß für die intrazelluläre Granularität gesehen wird. Mithilfe dieser beiden Lichtstreuparameter lassen sich zum Beispiel Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten voneinander unterscheiden. Die Streulichtdetektoren empfangen Wellenlängen im Bereich der Wellenlänge des erregenden Strahls (also bei 488 nm) und sind nicht sensitiv für Fluoreszenzlicht.

Unter Fluoreszenz versteht man das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes: Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen weiten, für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, ihrem sogenannten Absorptionsspektrum. Dadurch werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben. Mit dem Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon, was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Da beim Absorptionsvorgang mehr Energie aufgenommen als beim Fluoreszenzübergang später emittiert wird, ist das abgestrahlte Licht (= Emissionsspektrum) langwelliger als das Anregungslicht.

Für die Fluoreszenzmarkierungen sind alle Farbstoffe geeignet, deren Absorptionsspektrum die Wellenlänge des anregenden Laserstrahls enthält, d.h., die bei 488 nm angeregt werden können. Andererseits ist vor allem für die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse wünschenswert, dass die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima deutlich voneinander unterscheidbar sind zur getrennten Erfassung mit verschiedenen Detektoren (PMTs) (Raffael, 1988).

Die zur Zeit verwendeten Durchflusszytometer sind in der Lage, pro Zelle fünf verschiedene Parameter auf einmal zu messen: FSC (Zellgröße), SSC (intrazelluläre Granularität), und drei unterschiedliche Fluoreszenzen FL1, FL2 und FL3. Dabei erfasst der Fluoreszenzkanal FL1 Wellenlängen um 530(\pm 30) nm (FITC), FL2 Wellenlängen um 585(\pm 42) nm (PE oder PI) und FL3 Wellenlängen \geq 650 nm (PI und andere Farbstoffe, siehe Tabelle II.2.1) (Yokoyama & Otten, 1991).

Die am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, FITC und PE, werden überwiegend an monoklonale Antikörper gekoppelt zur Darstellung und Quantifizierung spezifischer Oberflächenmerkmale (Antigene) und somit bestimmter Subpopulationen von Zellen eingesetzt. Im Gegensatz dazu kann mithilfe des Farbstoffes PI (Propidium Iodid), welcher mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert, der DNA-Gehalt der Zellen gemessen werden.

Diese bis zu fünf erfassten Parameter pro Zelle ergeben einen enormen Datenpool, der von speziellen Computerprogrammen auf unterschiedliche Art aufgearbeitet und dargestellt werden kann: als Einparameterdarstellung in Form eines Histogramms (entspricht einer Häufigkeitsverteilung) oder als Zweiparameterdarstellung wie zum Beispiel dem „Punktplot“ (*dot plot*) oder der Konturliniendarstellung (*contour plot*). Mittels Vorgabe von Schwellenwerten (*thresholds*) oder Setzen von Filtern bzw. Auswertfenstern (*gates*) können Messbereiche gezielt eingeschränkt, d.h. bestimmte Subpopulationen von Zellen für die Messung bzw. weitere Analyse selektiert, und unerwünschte Zellen (wie auch Zelltrümmer und tote Zellen) eliminiert werden (Raffael, 1988).

Fluorochrom-Farbstoff	Emissionsmaximum (nm)	Fluoreszenzfarbe	Detektor
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	525	grün	FL1
R-Phycoerythrin (PE)	575	orange-rot	FL2
Propidiumiodid (PI)	620	rot	FL2, FL3
PerCP	>650	rot	FL3
CyChrome	>670	rot	FL3

Tabelle II.2.1: Häufig verwendete Fluorochrome am FACS

II.3 Isolierung von einzelnen Zellpopulationen

II.3.1 Isolierung von peripheren Blutleukozyten (PBLs)

Leukozyten aus peripherem Blut wurden durch osmotische Lyse der Erythrozyten (Erythrozytenlyse) mit 0,84% Ammoniumchlorid gewonnen.

Protokoll:

Heparinisiertes Blut wird mit Ammoniumchlorid (0,84% in Aqua ad injectabilia, pH 7,3) im Verhältnis 3:1 gemischt und für 10-12 min bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1200 U/min für 5 min wird der Überstand verworfen, das Pellet noch einmal in Ammoniumchlorid resuspendiert und wieder für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (1200 U/min, 5 min lang) und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen dreimal mit PBS + 0,1% BSA gewaschen.

II.3.2 Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs)

Die Anreicherung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut erfolgte mittels Ficoll-Dichtezentrifugation.

Protokoll:

Das heparinisierte Blut (ca. 10 ml pro Ansatz) wird ohne Vorbehandlung in einem 50-ml-Röhrchen mit PBS auf 35 ml aufgefüllt und resuspendiert. In ein zweites 50-ml-Röhrchen werden 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung vorgelegt, über die man dann langsam das Blut-PBS-Gemisch laufen lässt, so dass zwei klar getrennte Schichten übereinander entstehen. Nun wird das Röhrchen bei 900g 25 min lang bei 18-20°C ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind vier Schichten deutlich voneinander abgrenzbar: zuunterst das dunkelrote Pellet aus Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen, darüber die relativ klare Ficollschicht, darüber dann ein schmaler, gelblich-weißer Streifen (= Interphase), der die mononukleären Zellen enthält, und zuoberst der milchig-trübe Überstand aus Serum, PBS und Thrombozyten.

Der Überstand wird verworfen, danach wird vorsichtig mit einer Pipette die Interphase abgenommen und die darin enthaltenen Zellen dreimal mit PBS gewaschen (zwischen den Waschschritten jeweils Zentrifugation bei 1200 U/min für 12 min bei 20°C, mit Bremse). Zum Schluss werden die Zellen in PBS + 0,1% BSA aufgenommen und gezählt.

II.3.3 Isolierung von Lymphozyten-Subpopulationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den aus peripherem Blut gewonnenen mononukleären Zellen B- und T- Zellen mittels positiver magnetischer Säulenseparation (MACS-Separationssäule von *Miltenyi*) angereichert. Hierfür wurden für die jeweils erwünschte Subpopulation spezifische, mit Eisenpartikeln markierte Antikörper (*Micro Beads*) verwendet (CD19 für B-Zellen, CD3 für T-Zellen), die beim Durchlaufen der Suspension durch die an einer Magnetwand befestigte Säule in dieser hängenbleiben und in einem zweiten Schritt – außerhalb des Magneten – herausgespült werden können (deshalb „positive Selektion“ genannt: die gesuchten Zellen bleiben hängen, der unerwünschte Rest läuft durch).

Protokoll:

Die im nachfolgenden beschriebene Vorgehensweise entspricht weitläufig der von *Miltenyi* beigefügten Anleitung für die *MACS*-Separationssäulen, stellenweise modifiziert nach laboreigenem Standard.

Die Zellsuspension, die die anzureichernden Zellen enthält (in dieser Arbeit überwiegend isolierte MNCs), wird bei 1200 U/min 7 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen, das Zellpellet in 80 μ l *MACS*-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen und resuspendiert. Nun werden pro 10^7 Zellen 10 μ l der entsprechenden *Micro Beads* hinzugefügt, gut mit der Zellsuspension vermischt, und diese für 20 min bei 6-12°C inkubiert. Danach wäscht man die Zellen mit *MACS*-Puffer, mengenmäßig dem 15- bis 20-fachen Labeling-Volumen entsprechend. Nach Zentrifugation bei 300g für 10 min bei 10°C und Abnahme des Überstandes wird das Pellet in 500 μ l Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen. Für alle weiteren Schritte empfiehlt es sich, die Zellen im Eisbad aufzubewahren, da dadurch die dauerhafte Antikörperbindung unterstützt wird.

Für die magnetische Separation stehen – je nach erwarteter Menge von positiven (also anzureichernden) Zellen in der Gesamtsuspension – zwei Säulengrößen von *Miltenyi* zur Verfügung: Die MS^+ Separationssäule mit einer Kapazität von bis zu 10^7 positiven (d.h. mit *Micro Beads* markierten) Zellen und die LS^+ Separationssäule mit einer Kapazität von bis zu 10^8 positiven Zellen. Die entsprechend passende Säule wird in einem Haltemagneten fixiert und mit *MACS*-Puffer equilibriert (MS^+ mit 500 μ l Puffer, LS^+ mit mit 3 ml Puffer). Ohne die Säule „trockenlaufen“ zu lassen wird gleich im Anschluss die vorbereitete (mit Antikörpern markierte und in *MACS*-Puffer aufgenommene) Zellsuspension über einen Nylonfilter auf die Säule gegeben. Man lässt die gesamte Suspension durchlaufen und wäscht dann mit *MACS*-Puffer nach: für MS^+ mit 4 x 500 μ l, für LS^+ mit 4 x 3 ml Puffer. Somit sollten alle unerwünschten (unmarkierten) Zellen durchgelaufen, und nur noch die markierten, positiven Zellen in der Magnetsäule haftengeblieben sein. Um die Ausschöpfung zu steigern, kann man die durchgelaufenen und unten aufgefangenen Zellen auch noch einmal über die Säule laufen lassen.

Anschließend wird die Säule aus dem Magneten entnommen, und die „festgehaltenen“ Zellen werden mittels *MACS*-Puffer unter Zuhilfenahme eines Spritzenstempels aus der Säule eluiert. Die so erhaltene Zellsuspension kann nun gezählt und auf ihre Reinheit bezüglich der erwünschten Zellpopulation überprüft werden (siehe weiter).

MACS-Puffer: 0,5 % BSA
 5 mM EDTA
 in PBS (pH 7,2)
 Steril filtrieren und entgasen

II.3.4 Reinheitsbestimmung der angereicherten Zellpopulationen

Die Reinheit der angereicherten Zellpopulationen wurde mithilfe des Durchflusszytometers (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sort*) bestimmt.

Hierbei werden der angereicherten Zellsuspension fluorchrom-markierte Antikörper gegen jeweils spezifische Oberflächenmarker der zu untersuchenden Subpopulation beigefügt, und anschließend der prozentuale Anteil dieser bestimmten Subpopulation in den angereicherten Zellen am FACS gemessen. Es ist möglich, in einer Messung den prozentualen Anteil (Reinheit, *purity*) nicht nur einer, sondern auch zweier oder mehrerer enthaltener Subpopulationen zu bestimmen, indem zwei oder mehr unterschiedliche fluoreszierende Farbstoffe für die jeweiligen Antikörper verwendet werden (zum Beispiel PE- und FITC-markierte Antikörpern für die Doppelfluoreszenz). Zur Abgrenzung der unspezifischen Antikörperbindung wird als Isotop-Negativ-Kontrolle jeweils aus derselben Zellsuspension eine Gegenprobe mit Maus-IgG₁ inkubiert, das mit demselben Fluorchrom wie die positive Probe markiert ist.

Protokoll:

- Einfachfluoreszenz:

Für die zu messende Probe werden 5×10^4 bis 2×10^5 Zellen der Zellsuspension mit 10 μ l des entsprechenden fluorchrom-markierten Antikörpers gut vermischt und mindestens 20 min lang bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle, zur Abgrenzung der unspezifischen Antikörperbindung, wird in einem parallelen Ansatz die gleiche Zellzahl mit Maus-IgG₁, das mit demselben fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, in gleicher Weise prozessiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit werden nicht-gebundene Antikörper mit 1-2 ml 4°C-kaltem PBS ausgewaschen, die Proben bei 1200 U/min für 5 min bei 4°C mit Bremse zentrifugiert, und die Überstände abgekippt. Anschließend werden die Zellen zur sofortigen Messung am FACS in 300-500 μ l kaltes PBS aufgenommen und auf Eis gelagert, zur Aufbewahrung für maximal drei Tage in 300-500 μ l PBS + 0,1% Formalin fixiert und bei 4°C gelagert.

- Doppelfluoreszenz:

Der Ansatz und die Verarbeitung entsprechen denen bei der Einfachfluoreszenz. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass für die gleichzeitige Färbung der Zellen mit FITC und PE zusätzlich jeweils eine Positivkontrolle für jeden der Farbstoffe benötigt wird, um später bei der Messung am FACS den Überschneidungsbereich der beiden Fluoreszenzspektren kompensieren zu können (siehe unten). Hierfür werden die gleichen Zellen in parallelen Ansätzen noch jeweils mit anti-CD45-FITC bzw. anti-CD45-PE inkubiert und in gleicher Weise wie die restlichen Proben prozessiert.

Die Negativkontrolle enthält außerdem sowohl FITC- als auch PE-markierte Maus-IgG₁. Die zu messende Probe wird mit jeweils 10 µl der beiden ausgewählten Antikörper (einmal FITC- und einmal PE-markiert) versehen.

FACS-Analyse:

Die Negativkontrolle (mit Maus-IgG₁ versehen) dient der Ermittlung der Autofluoreszenz der Zellen und der unspezifisch gebundenen Antikörper. Mit ihrer Hilfe kann eine Schwelle der Fluoreszenzintensität eingestellt werden, die die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen bezüglich der Expression des Oberflächenantigens ermöglicht. Diese Schwelle wird so gewählt, dass möglichst > 99% der Zellen aus der Negativkontrolle ein Fluoreszenzsignal emittieren, das unterhalb dieser Schwelle liegt. Bei der Einfachfluoreszenz muss diese Schwelle nur für den einen Farbstoff, bei der Doppelfluoreszenz für beide Farbstoffe gesetzt werden (am besten mittels Koordinatenkreuz: die Negativkontrolle sollte zu > 99% im linken unteren Quadranten liegen).

Die Emissionsspektren von FITC und PE überlappen sich teilweise, d.h. ein Teil der FITC-Fluoreszenz wird auch vom FL2-Detektor und ein Teil der PE-Fluoreszenz auch vom FL1-Detektor miterfasst. Deshalb müssen für Messungen der Doppelfluoreszenz diese beiden Fluoreszenzkanäle am FACS gegeneinander kompensiert (und somit die Überschneidungen durch elektronische Subtraktion bestmöglich korrigiert) werden: Hierfür werden vor Durchführung der eigentlichen Messung die beiden Positivkontrollen (einmal für FITC, einmal für PE) eingesetzt. Die Verwendung von anti-CD45-Antikörpern bietet sich dabei an, da dieser Oberflächenmarker auf praktisch allen Leukozyten exprimiert wird. (Yokoyama & Otten, 1991)

Mithilfe dieser Einstellungen können nun die zu bestimmenden Proben gemessen werden: für die Einfachfluoreszenz wird dafür nur eine Koordinate gebraucht (für die Fluoreszenzintensität des einen eingesetzten Farbstoffs), für die Doppelfluoreszenz zwei Koordinaten (im Koordinatenkreuz z.B. eine Achse für FITC, die andere für PE).

II.4 Telomerlängenmessung

II.4.1 Flow-FISH-Methode

Die durchflusszytometrische Messung (*Flow*) der Telomerlängen nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (*FISH*) wurde gemäß der Erstbeschreibung der Gruppe von P. M. Landsorp durchgeführt (*Rufer et al, 1998*), mit geringfügigen laborinternen Modifikationen. Eine Besonderheit dieser Hybridisierung liegt darin, dass hier anstelle von DNA- oder RNA-Sonden PNA-Sonden, genauer: *peptide nucleic acid (PNA)-(C₃TA₂)₃-fluorescein isothiocyanate (FITC)*, verwendet werden: Peptid-Nukleinsäuren sind synthetisch nachgeahmte DNA-Einzelstränge, die über Basen an ein ungeladenes peptidähnliches Rückgrat gekoppelt sind. Der Vorteil dieser PNA-Sonden liegt in der höheren Stabilität von PNA/DNA-Komplexen bei niedrigen Salzkonzentrationen verglichen mit DNA/DNA- oder DNA/RNA-Komplexen.

II.4.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Protokoll:

1. Schritt: Aufnehmen der Zellen in Hybridisierungslösungen

Die gewünschten Zellen sollten in bekannter Konzentration in PBS + 0,1% BSA Suspension vorliegen. Von diesen werden in zwei 1,5-ml-Eppendorfröhrchen je 2×10^5 Zellen (mindestens 1×10^5) überführt und mit PBS + 0,1% BSA auf 1000 μ l aufgefüllt. Ein Ansatz dient als Negativkontrolle zur Ermittlung der Autofluoreszenz, der andere („Positivansatz“) wird mit der Telomer-PNA hybridisiert und dient zur Ermittlung der Telomerfluoreszenz. Hierfür werden entsprechend die beiden Hybridisierungslösungen (Negativ- und Positivansatz, siehe weiter) angesetzt, wobei für die Negativkontrollen statt der PNA-Sonde das gleiche Volumen Wasser verwendet wird. Die gefüllten Eppendorfröhrchen werden 15 Sekunden lang bei 13000 U/min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, und der Überstand möglichst vollständig abgesaugt. Dieser Absaugschritt erfordert besondere Vorsicht, da zum einen verbleibendes PBS die Salzkonzentration und damit das Hybridisierungsverhalten der Sonde beeinflussen kann, auf der anderen Seite aber das Verhältnis Zellzahl zu Propidiumiodidlösung die Autofluoreszenz der Zellen beeinflusst. Daher ist entscheidend, dass nicht mehr als 10 μ l PBS nach dem Absaugen im Röhrchen verbleiben.

Anschließend wird das Pellet in 200 µl Hybridisierungslösung (jeweils 100 µl pro 1×10^5 Zellen) resuspendiert und gründlich gevortext. Hierbei muss auf die korrekte Zuteilung – Negativkontrolle: ohne PNA-Sonde, Positivansatz: mit PNA-Sonde – geachtet werden! In diesem Zustand können die Proben vor der weiteren Prozessierung bei -80°C für einige Tage gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte sollten möglichst unter Lichtschutz erfolgen.

Hybridisierungslösungen:

Positivansatz:

0,02 M	TRIS (pH 7,2)
1 %	BSA
70 %	Formamide, deionisiert
0,3 µg/ml	PNA-Sonde (FITC-markiert)
	in dd Wasser

Negativansatz:

0,02 M	TRIS (pH 7,2)
1 %	BSA
70 %	Formamide, deionisiert
	in dd Wasser

2. Schritt: Denaturieren, Waschen und Aufnahmen der Zellen in PI-Mix

Die Proben werden im vorgeheizten Heizblock bei einer konstanten Temperatur von $+85^\circ\text{C}$ 10 min lang denaturiert. Hierbei werden die komplementären DNA-Stränge voneinander getrennt und eine anschließende Hybridisierung der PNA-Sonde ermöglicht. Die Temperatureinstellung und -kontrolle erfolgt mithilfe eines geeichten Digitalthermometers, dessen Messfühler sich in einem in den Heizblock eingesteckten 1,5-ml-Eppendorfröhrchen mit 200 µl Wasser befindet, um so die konstante Denaturierungstemperatur gewährleisten zu können. Vor und nach der Denaturierung sollten die Probenröhrchen gründlich gevortext werden. Anschließend lässt man die Proben 2 Stunden lang bei Raumtemperatur in Dunkelheit hybridisieren.

Nun folgen drei Waschschriffe: Zuerst wäscht man zweimal mit der Waschlösung 1, und zwar jeweils mit 1000 µl pro Röhrchen. Vor, zwischen und nach diesen Waschschriffen werden die Proben mit 1600g 7 min lang bei 16°C zentrifugiert. Diese starke Zentrifugation ist aufgrund der veränderten Zellmorphologie und der relativ hohen Viskosität des Formamides notwendig. Nach jeder Zentrifugation werden die Überstände bis auf einen kleinen Rest (ca. 30-50 µl) vorsichtig abgesaugt, wobei zu beachten ist, dass aufgrund der Formamide-Fixierung keine Zellpellets mehr sichtbar sind! Der letzte Waschschriff erfolgt mit jeweils 1000 µl Waschlösung 2 pro Röhrchen. Danach wird bei 1900 U/min 7 min lang bei 16°C zentrifugiert, der Überstand

wieder bis auf ein kleines – möglichst in allen Röhrrchen gleiches – Restvolumen abgesaugt, und die Proben leicht gevortext.

Zum Schluss werden die Zellen in jeweils 300 µl PI-Mix aufgenommen, kräftig gevortext und für 2-4 Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid mit doppelsträngiger DNA, wodurch später am Durchflusszytometer der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt werden kann. Die im PI-Mix enthaltene RNase dient dem Verdau von eventuell vorhandener doppelsträngiger RNA, mit der PI sonst auch interkalieren und die Messung somit verfälschen würde. Nach abgelaufener Inkubationszeit können die Proben entweder sofort am FACS analysiert oder bis zur Messung maximal zwei Tage lang bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt werden.

<i>Waschlösung 1:</i>	10 mM	TRIS (pH 7,2)
	0,1 %	BSA
	0,1 %	TWEEN 20
	70 %	Formamide
		in dd Wasser

<i>Waschlösung 2:</i>	0,1 %	BSA
	0,1 %	TWEEN 20
		in PBS

<i>PI-Mix:</i>	0,1 %	BSA
	10 µg/ml	RNase (DNase-frei)
	0,05 µg/ml	Propidiumiodid
		in PBS

II.4.1.2 Durchflusszytometrische Analyse (Flow-Cytometry)

Messung:

Für die Messung der Telomerlänge am Durchflusszytometer sind zunächst zwei Darstellungsarten von Bedeutung:

Als erstes werden die Zellen als *Dot Plot* (= Zweiparameterdarstellung) mit den Parametern FSC auf der x-Achse und FL3 (PI) auf der y-Achse dargestellt. Es werden also Zellgröße (FSC) gegen DNA-Gehalt (PI) der einzelnen Zellen aufgetragen. Hierbei bilden sich normalerweise zwei gut voneinander abgrenzbare Zellwolken aus,

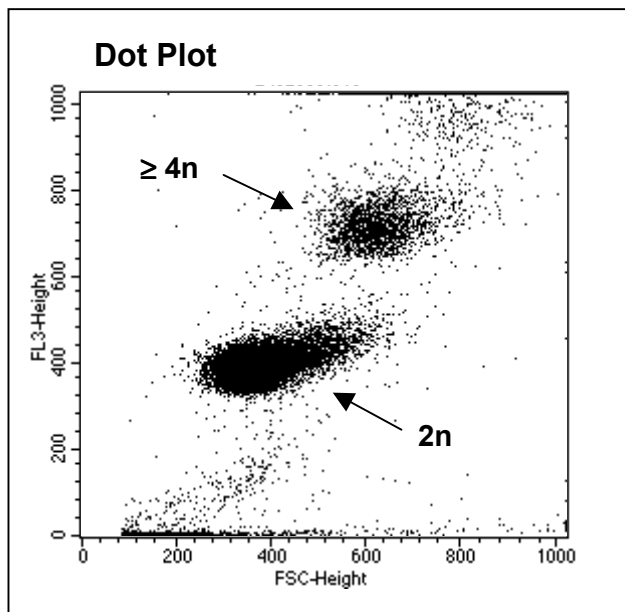


Abbildung II.4.1:

Zweiparameterdarstellung am FACS in Form eines Dot Plots: Auf der x-Achse wird die Zellgröße (FSC-Parameter), auf der y-Achse der DNA-Gehalt (FL3-Parameter) dargestellt. Die mit „2n“ beschriftete Zellwolke enthält die zu messenden Zellen mit einfachem Chromosomensatz, die mit „≥ 4n“ beschriftete Zellwolke setzt sich aus Zellen mit einem mindestens doppelten Chromosomensatz zusammen.

eine mit etwas kleineren Zellen und geringerem DNA-Gehalt, die dem 0-Punkt näher liegt, und eine mit jeweils höheren FSC- bzw. PI-Werten oben außen im Quadranten liegend (siehe Abbildung II.4.1). Die Zellpopulation mit niedrigeren PI-Werten setzt sich aus Zellen zusammen, die einen einfachen Chromosomensatz aufweisen (2n-Population), die andere wird von Zellen gebildet mit einem Chromosomensatz $\geq 4n$ (Zellen in Zellteilung oder Zellklumpen aus mehreren Zellen). Diese Unterscheidung ist wichtig, da für die Messung die 2n-Population wesentlich ist. Die Zellen der 4n-Population enthalten nämlich doppelte Chromosomensätze und somit auch doppelt so viele Telomere, so dass falsch hohe Werte gemessen würden. Aus diesem Grund setzt man ein *Gate* um die 2n-Population und schränkt die nachfolgenden Messungen auf die darin enthaltenen Zellen ein.

Für die Darstellung der Fluoreszenzintensität der Zellen wird ein FL1-Histogramm gewählt: Bei dieser Einparameterdarstellung findet sich auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität gemessen in FL1 (für FITC) und auf der y-Achse wird die Häufigkeit als Zellzahlen (*counts*) angegeben (siehe Abbildung II.4.2). Die gemessene Fluoreszenz (der Positivansätze) setzt sich aus der Fluoreszenz der spezifisch an die Telomere gebundenen FITC-markierten PNA-Sonde und der Autofluoreszenz der Zellen zusammen. Deshalb wird mit der jeweiligen Negativkontrolle die Autofluoreszenz ermittelt, die dann von der Fluoreszenzintensität der Positiv-Probe (mit Sonde) subtrahiert wird.

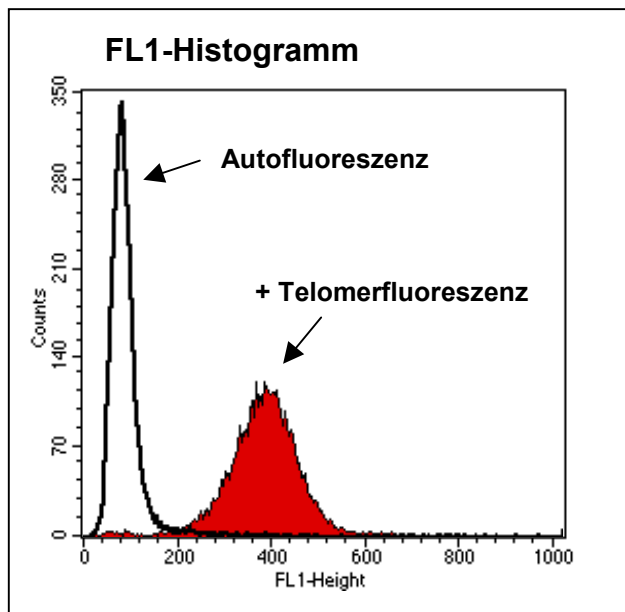


Abbildung II.4.2:

FL1-Histogramme zur Darstellung der am FACS gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Das ausgefüllte Histogramm stellt die Fluoreszenzintensität der mit der Telomer-sonde markierten Probe dar, das unausgefüllte Histogramm die Autofluoreszenz der Negativkontrolle (ohne Sonde). Die Differenz dieser beiden Fluoreszenzintensitäten ist direkt proportional zur Telomerlänge der gemessenen Zellen.

Daraus ergibt sich die folgende Gleichung:

$$\Delta FI = FI_S - FI_A$$

FI: Fluoreszenz-Intensität

S: Positiv-Probe mit Sonde

A: Negativkontrolle, entsprechend Autofluoreszenz ohne Sonde

Für FI_S und FI_A wird jeweils die mittlere Fluoreszenzintensitäten der Positiv-Probe bzw. Negativkontrolle eingesetzt. Die Differenz dieser beiden Mittelwerte, ΔFI , stellt dabei eine willkürliche, lineare Maßeinheit in Fluoreszenzwerten dar, die sich direkt proportional zur Länge der Telomersequenzen verhält.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, die gemessenen Zellen in einer Zweiparameterdarstellung bezüglich ihrer Größe (FSC, x-Achse) und intrazellulären Granularität (SSC, y-Achse) darzustellen. Für Leukozyten (PBLs aus Vollblut nach Erythrozytenlyse) ergibt sich hierbei ein typisches Bild (siehe Abbildung II.4.3): Es lassen sich zwei Zellpopulationen voneinander abgrenzen (entsprechend ihrer Größe und Granularität): Lymphozyten und Granulozyten. Diese können nun einzeln gated und so für jede Population getrennt die Telomerlänge (wie oben beschrieben) bestimmt werden.

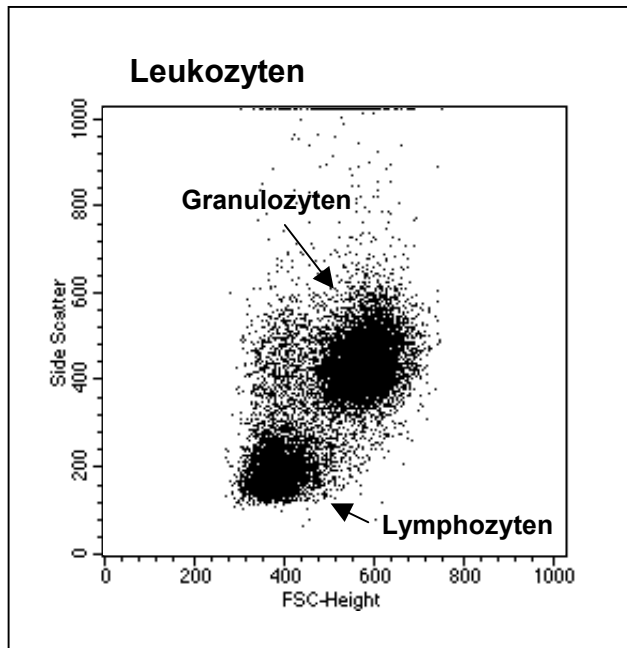


Abbildung II.4.3:

Darstellung von peripheren Blutleukozyten (PBLs) anhand der beiden Parameter Größe (FSC, x-Achse) und Granularität (SSC, y-Achse) am FACS.

Auswertung:

Ziel ist es, die erhaltenen willkürlichen Fluoreszenzwerte ΔFI in eine Größe umzuwandeln, deren Einheit die Telomerlänge exakt (als Anzahl von Basenpaaren) definiert, und die versuchsunabhängig als objektivierbare Eigenschaft einer bestimmten Zellpopulation für weitere Analysen und Vergleiche genutzt werden kann.

Hierfür wurde folgendes Eichungsexperiment durchgeführt:

Telomerlängen von Leukozyten (PBLs) oder mononukleären Zellen (MNCs) von 10 verschiedenen gesunden Spendern wurden sowohl mit Flow-FISH als auch durch Southern-Blot gemessen. (Die Southern-Blot-Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Engelhardt durchgeführt.) Die so erhaltenen Werte – beim Southern-Blot in Form von Telomerrestriktionsfragmenten TRF (angegeben in Kilobasenpaaren kbp), beim Flow-FISH als Telomerfluoreszenz ΔFI (angegeben in willkürlichen Fluoreszenzeinheiten) – wurden gegeneinander in ein Koordinatenkreuz aufgetragen, und aus den ermittelten Punkten eine Regressionsgerade berechnet (siehe Abbildung II.4.4).

Hierbei erweisen sich Telomerfluoreszenz und TRF-Länge direkt proportional zueinander ($R = 0,84$; $p < 0,0001$).

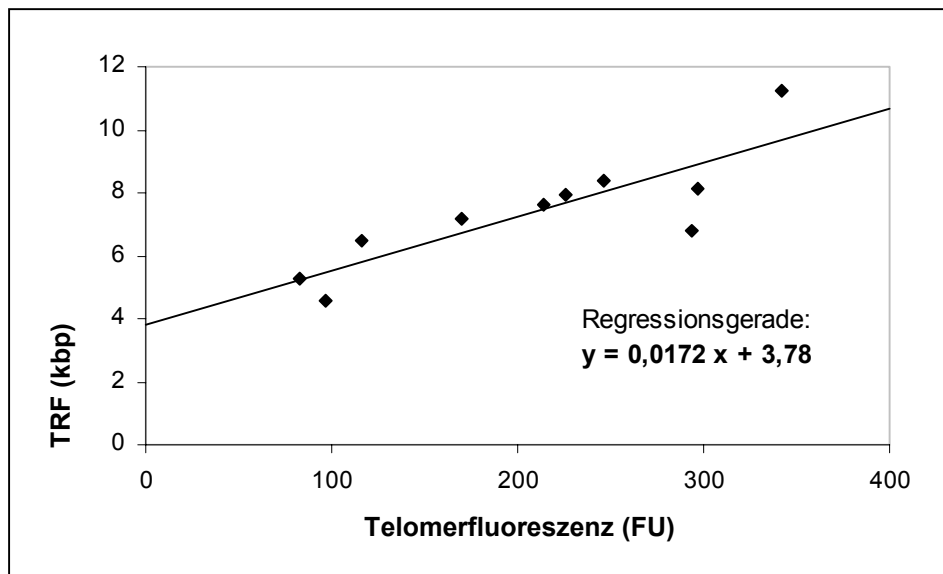


Abbildung II.4.4: Eichgerade für die Auswertung der Flow-FISH-Messergebnisse. Die Telomerlängen peripherer Blutzellen von 10 Individuen wurden sowohl mit Southern-Blot als auch mit der Flow-FISH-Methode bestimmt: Die am FACS gemessenen Telomerfluoreszenzen ΔFI (angegeben in Fluoreszenzeinheiten: Fluorescence Units, FU) sind auf der x-Achse aufgetragen, die durch Southern Blot erhaltenen Telomerrestriktionsfragmente TRF (angegeben in kbp) auf der y-Achse. Abgebildet ist die resultierende Regressionsgerade (mit einem Korrelationskoeffizient von $R = 0,84$).

Die resultierende Geradengleichung $y = 0,0172 x + 3,78$ zeigt, dass einer Fluoreszenzintensität von $x = 0$ eine TRF-Länge von $y = 3,78$ kbp im Southern-Blot entspricht. Diese, in ähnlicher Weise bereits bei früheren Kalibrierungsexperimenten (Hultdin *et al*, 1998) beschriebene Tatsache ist dadurch zu erklären, dass die verwendete PNA-Sonde nicht an Sequenzen des subtelomeralen Bereiches bindet (Martens *et al*, 1998). Bei den durch Southern-Blot gemessenen TRF's dagegen sind, bedingt durch die Restriktionsstelle der eingesetzten Endonuclease, Teile des subtelomeralen Bereiches enthalten, was der hier gemessenen DNA-Länge von 3,78 kbp entspricht. Dieser Wert wird deshalb zu den mit Flow-FISH ermittelten Messergebnissen addiert, so dass die resultierenden Telomerlängen beider Methoden untereinander bzw. mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen quantitativ verglichen werden können.

Somit ergibt sich aus der Geradengleichung der Regressionsgerade folgende Gleichung für die Berechnung der Telomerlänge:

$$\text{TFU (kbp)} = \Delta\text{FI} \times 0,0172 \times k + 3,78$$

TFU: Telomere Fluorescence Units, angegeben in kbp

ΔFI : Fluoreszenzintensität (willkürliche Einheit, gemessen am FACS)

k: Korrekturfaktor (siehe weiter)

Der Korrekturfaktor k dient der Optimierung von interexperimentellen Variationen, damit Telomerlängenmessungen mit Flow-FISH aus verschiedenen Experimenten miteinander verglichen werden können. Hierfür wurden bei jeder Messung als sogenannte „Kontrolle“ MNCs (nach Ficoll) eines gesunden Spenders mithybridisiert und mitgemessen, die in Aliquots à 3×10^6 Zellen bei -80°C in Einfriermedium gelagert und erst kurz vor der Hybridisierung aufgetaut wurden. Im Korrekturfaktor wird der jeweils aktuell gemessene Fluoreszenzwert der Kontrolle auf den zuvor in mehreren Messungen ($n = 14$) ermittelten Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Kontrolle bezogen:

$$k = \Delta\text{FI}_k (\text{Mittelwert}) / \Delta\text{FI}_k (\text{Messung})$$

ΔFI_k (Mittelwert): Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Kontrolle

ΔFI_k (Messung): Telomerfluoreszenz der Kontrolle bei der aktuellen Messung

Für einen Mittelwert ΔFI_k von 289,24 ergibt sich damit folgender Korrekturfaktor k, der für alle in dieser Arbeit angegebenen TFU-Werte verwendet wurde:

$$k = 289,24 / \Delta\text{FI}_k (\text{Messung})$$

II.4.2 Q-FISH-Methode

Bei der Quantitativen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Q-FISH) werden durch Metaphasenpräparation ausgebreitete Chromosomen mit einer PNA-Telomer-Sonde, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy-3 markiert ist, hybridisiert. Nach Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI können diese unter einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt, und die Fluoreszenzintensitäten der Telomere gemessen werden. Der Vorteil gegenüber der Flow-FISH-Methode besteht darin, dass Telomerlängen einzelner Chromosomen(arme) analysiert werden können. Die Q-FISH-Methode wurde wie vormals beschrieben durchgeführt (Lansdorp *et al*, 1996; Zijlmans *et al*, 1997), mit geringfügigen laborinternen Modifikationen.

II.4.2.1 Metaphasenpräparation

- für hohe Zellzahlen ($\geq 2 \times 10^6$):

Protokoll:

Die kultivierten Zellen werden in frisches Medium (siehe Kapitel II.6.1.1) aufgenommen und mit Colcemid (entspricht dem Spindelgift Colchizin) in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Medium für $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min wird der Überstand verworfen, und das Pellet in 75 mM KCl-Puffer (vorgewärmt in 37°C) aufgenommen und 15 min lang bei 37°C inkubiert. Hierbei kommt es zur erwünschten hypotonischen Schwellung der Zellen. Nachfolgend werden die Zellen mit reduzierter Umdrehungszahl (900 U/min, 5 min lang) abzentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes mit eisgekühltem Methanol/Eisessigsäure(3:1)-Fixativ tropfenweise und unter leichtem Schütteln des Röhrchens gemischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und Zentrifugation wird dieser Fixierungsschritt noch zweimal wiederholt. Zum Schluss werden die Zellen in kleine Mengen Fixativ aufgenommen (je nach Zelldichte) und auf einen mit Aceton/Ethanol (1:1) gereinigten Objektträger aufgetropft und an der Luft trocknen gelassen. Nun können die Metaphasen-Chromosomen unter dem Inversionsmikroskop betrachtet werden.

Für die FISH lässt man die Objektträger über Nacht weiterhin trocknen. Die restlichen Zellen können in Methanol/Eisessigsäure-Fixativ bei -20°C für eventuell weitere Metaphasenpräparationen aufbewahrt werden.

- für geringe Zellzahlen ($< 2 \times 10^6$): „*small scale*“-Metaphasenpräparation

Dieser Ansatz wurde in vorliegender Arbeit für die Metaphasenpräparation von kultivierten B-Zellen verwendet, da in Anbetracht der geringen Zellzahlen hiermit die Ausbeute an weiter verwendbaren Metaphasen deutlich höher als mit dem zuvor beschriebenen gängigen Verfahren war.

Protokoll:

1×10^6 Zellen aus der Zellkultur werden in 2 ml neues Medium aufgenommen und für $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden mit 20 μl Colcemid in einem Well einer 12-Well-Platte bei 37°C inkubiert. Danach zentrifugiert man die Zellen in einem 1,5-ml-Eppendorfröhrchen 5 min

lang in der Tischzentrifuge bei 1600 U/min, saugt den Überstand ab und wäscht sie mit 1 ml PBS. Nun werden langsam 200 µl 75mM KCl (vorgewärmt in 37°C) zupipettiert, und das Röhrchen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mithilfe einer Pipette wird die KCl-Zellsuspension dann tropfenweise auf die einzelnen Felder eines Marienfeld-Adhäsionsobjektträgers verteilt, wobei durch dessen adhäsive Oberfläche die Tropfenform gewahrt bleibt. Nach einer Wartezeit von 2 min tropft man vorsichtig eisgekühltes Methanol/Eisessigsäure(3:1)-Fixativ über die zuvor gesetzten Tropfen auf den Objektträger und wartet erneut 4 min ab. Danach steckt man die Objektträger senkrecht in eine mit Fixativ aufgefüllte Küvette und lässt sie 10 min lang darin inkubieren. Dieser Vorgang wird mit frisch ausgewechseltem Fixativ noch einmal wiederholt. Anschließend können die einzelnen ausgebreiteten Metaphasen unter dem Inversionsmikroskop betrachtet werden. Die Objektträger können – in Behälter mit Fixativ getaucht – bei -20°C aufbewahrt werden.

II.4.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Protokoll:

1. Schritt: Denaturieren und Hybridisieren

Die Objektträger mit den Metaphasen werden für 15 min in PBS rehydriert und nachfolgend 2 min lang in 4% Formaldehyd (in PBS) fixiert. Nach drei Waschgängen mit PBS à 5 min werden sie 10 min lang mit 550 U/ml Pepsin bei einem pH von 2,0 (dd Wasser + HCl) in 37°C behandelt. Wieder erfolgen zwei Waschgänge mit PBS à 2 min und Fixierung in 4% Formaldehyd (in PBS) für 2 min. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS à 5 min werden die Objektträger in drei Schritten in zunehmenden Konzentrationen Ethanol rehydriert: 5 min in 70% Ethanol, 5 min in 90% Ethanol und 5 min in 100% Ethanol, und anschließend an der Luft trocknen gelassen. Danach wird die frisch hergestellte und leicht anzentrifugierte Hybridisierungslösung hinzugefügt: für die einfachen Objektträger jeweils zwei Tropfen à 10 µl auf ein 22 x 60 mm Deckgläschen, welches dann mit dem Objektträger vorsichtig bedeckt wird, für die Marienfeld-Objektträger jeweils 2,5 µl pro Adhäsionsfeld und anschließende Abdeckung mit passenden Deckgläschen. Jetzt erfolgt im vorgeheizten Ofen 3 min lang die DNA-Denaturierung bei 76-80°C und nachfolgend 2 Stunden lang die Hybridisierung in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Alle weiteren Arbeitsschritte sollten unter Lichtschutz erfolgen, um möglichst wenig der Fluoreszenzstärke einzubüßen!

<i>Hybridisierungslösung:</i>	70 %	Formamid (ultra pure, pH 7,0-7,5)
	0,25 %	NEN
	10 mM	TRIS
	0,2 µg/ml	PNA-Sonde (Cy-3-markiert)
		in dd Wasser

2. Schritt: Waschen, DAPI-Anfärbung

Nach abgelaufener Hybridisierungszeit werden die Deckgläschen vorsichtig in Waschlösung 1 abgelöst, und die Objektträger zunächst zweimal je 15 min mit Waschlösung 1 und dann dreimal je 5 min mit Waschlösung 2 gewaschen. Danach erfolgt wieder die Dehydrierung mit Ethanol in drei fünfminütigen Schritten in zunehmender Konzentration (70% - 90% - 100% Ethanol). Nach Lufttrocknung der Objektträger fügt man *Antifade*-Lösung (zur Verzögerung der Ausbleichung) hinzu: Diese besteht aus dem Trägerstoff Vectashield und dem Farbstoff DAPI (= *4'-6-diamidino-2-phenylindole*) im Verhältnis Vectashield: DAPI = 50:2. DAPI färbt die Chromosomen an, was später für das Aufsuchen und die Darstellung der Metaphasen und ihrer einzelnen Chromosomen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgenutzt wird. Für jeden einfachen Objektträger werden 20 µl (= zwei Tropfen à 10µl) *Antifade*-Lösung, für die Marienfeld-Objektträger 5 µl pro Adhäsionsfeld eingesetzt. Nach Abdecken mit Deckgläschen können die Objektträger nun lichtgeschützt bis zur Betrachtung unter dem Lichtmikroskop aufbewahrt werden.

<i>Waschlösung 1:</i>	70 %	Formamid
	0,1 %	BSA
	0,01 M	TRIS
		in dd Wasser (pH 7,0-7,5)

<i>Waschlösung 2:</i>	0,1 M	TRIS
	0,15 M	NaCl
	0,08 %	TWEEN 20
		in dd Wasser (pH 7,0-7,5)

II.4.2.3 Quantitative Analyse

Die hybridisierten und angefärbten Metaphasen können am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mittels einer digitalen Kamera aufgenommen werden. Mithilfe vorge-schalteter Filter kann man entweder die DAPI-angefärbten ganzen Chromosomen oder die Cy-3 markierten Telomere darstellen (siehe Abbildung II.4.5).

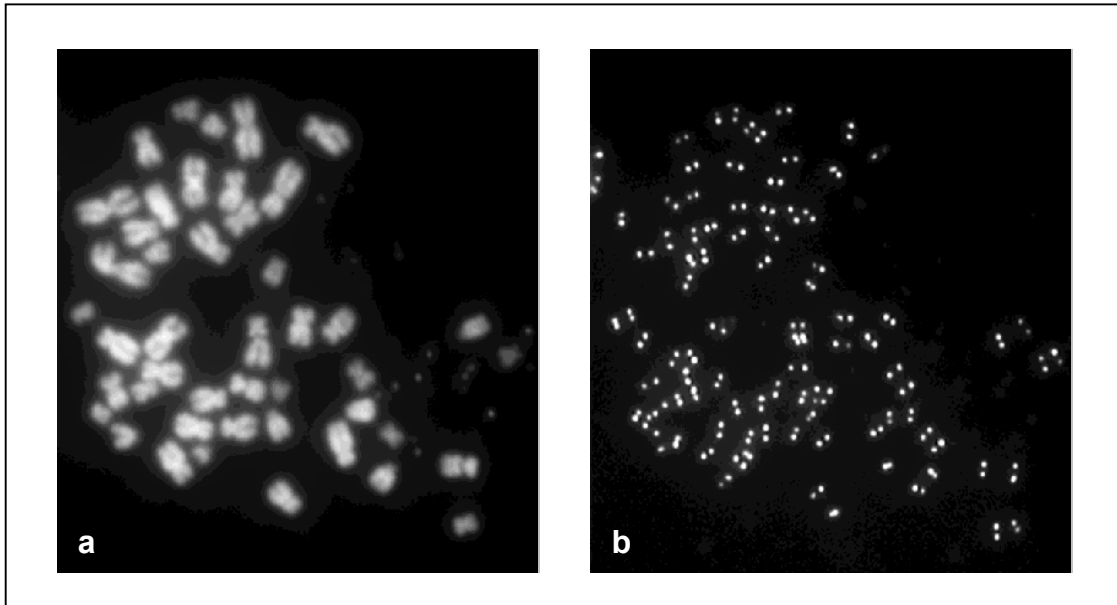


Abbildung II.4.5: Metaphasen nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (aufgenommen am Fluoreszenzmikroskop). Durch Vorschalten spezieller Filter können entweder die mit DAPI angefärbten Chromosomen (a) oder die mit Cy-3 markierten Telomere (b) dargestellt werden.

Diese Aufteilung ist notwendig, um zunächst über den DAPI-Filter geeignete, d.h. gut ausgebreitete Metaphasen auf dem Objektträger ausfindig zu machen und nachfolgend über den Cy-3-Filter die Fluoreszenzintensitäten der Telomere zu erfassen. Diese Reihenfolge sollte auch eingehalten werden, um so einen Selektionsvorteil zugunsten von heller leuchtenden Cy-3-Abbildungen zu vermeiden. Um interexperimentelle Schwankungen berücksichtigen zu können, werden bei jeder Messung *Beads* mit bekannter Fluoreszenzintensität mitgemessen.

Die Auswertung der so erhaltenen Aufnahmen (für jede Metaphase zwei: einmal DAPI, einmal Cy-3) erfolgt anschließend am Computer mit einer speziell hierfür entwickelten Software (TFL-TELO software) (Poon *et al*, 1999). Diese ordnet individuellen Chromosomen die zugehörigen vier Telomere zu und ermöglicht es, die integrierte Leuchtintensität (IOD: *Integrated Optical Density*) jedes Telomers – getrennt

für jeden einzelnen der beiden kurzen Arme p_1, p_2 und der beiden langen Arme q_1, q_2 – zu messen und in willkürlichen Fluoreszenzeinheiten auszudrücken. Außerdem können die beiden Aufnahmen (DAPI/Cy-3) einer Metaphase auch kombiniert werden, indem den beiden Leuchtstoffen Pseudofarben zugeordnet werden: Die DAPI-gefärbten Chromosomen leuchten dann blau, und die Cy-3 markierten Telomere gelb-orange (siehe Abbildung II.4.6).

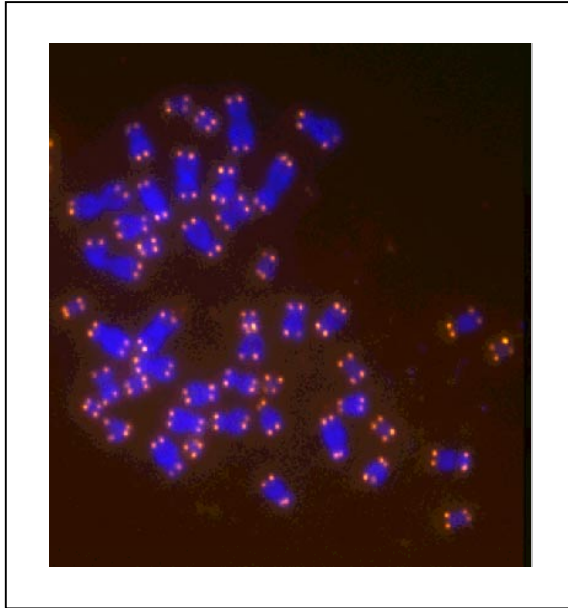


Abbildung II.4.6:

Kombination der DAPI- und Cy-3-Aufnahme einer Metaphase nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (vergleiche Abbildung II.4.5). Durch Zuordnung von Pseudofarben werden die DAPI-gefärbten Chromosomen blau und die Cy-3-markierten Telomere gelb-orange dargestellt.

Somit können auf diese Weise Telomerlängen bestimmter Chromosomenarme untersucht werden, aber auch die mittlere Telomerlänge aller Chromosomen der Metaphase, also einer Zelle, bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Q-FISH-Telomer-Analyse durchschnittlich an 10-15 Metaphasen einer Zellpopulation durchgeführt, und die Ergebnisse in willkürlichen Fluoreszenzeinheiten (IOD's) festgehalten.

II.5 Messung der Telomerase-Aktivität (TRAP-Assay)

Zum Nachweis von Telomerase-Aktivität in Zellen hat sich der sogenannte TRAP-Assay (*Telomere Repeat Amplification Protocol*) durchgesetzt (Kim *et al*, 1994). Diesem Verfahren liegt folgendes Prinzip zugrunde: Die in den eingesetzten Zellen

vorhandene (und durch Zellyse und Proteinextraktion gewonnene) Telomerase verlängert einen biotin-markierten Primer um repetitive Telomersequenzen (T_2AG_3). Anschließend wird das so erhaltene Produkt mithilfe eines zweiten Primers in einer PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifiziert, was der Methode die ihr eigene Sensitivität, Schnelligkeit und Effizienz verleiht.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Telomerase PCR ELISA^{Plus} Kit von Boehringer Mannheim handelt es sich um einen modifizierten und erweiterten TRAP-Assay: Nach der Amplifikation werden die PCR-Produkte denaturiert und danach mit einer telomerspezifischen Digoxigenin(DIG)-markierten Sonde hybridisiert. Die biotin-markierten Primer binden an die mit Streptavidin gecoateten Wells der Microtiterplatten und fixieren die hybridisierten PCR-Produkte auf diese Weise. Anschließend wird Peroxidase hinzugefügt, die über anti-DIG-Antikörper an die PCR-Produkte bindet und nach Substratbeigabe eine Farbreaktion erzeugt (= ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Dieser Farbumschlag kann dann am ELISA-Reader gemessen und quantifiziert werden.

Letzten Endes wird die Telomerase-Aktivität in semiquantitativer Weise als „relative Telomeraseaktivität“ (RTA) angegeben, da das vom ELISA-Reader erfasste Signal der zu messenden Probe auf das Signal einer Kontrolle, die eine bekannte Anzahl an Telomersequenzen beinhaltet, bezogen wird. In der vorliegenden Arbeit wurden ausserdem noch tiefgefrorene Aliquots von Phoenix-Ampho-Zellen, einer Retrovirus-produzierenden Zelllinie der zweiten Generation (von der 293T-Zelllinie abstammend), als zusätzliche Postivkontrolle bei jeder Messung mitanalysiert.

Protokoll:

1. Schritt: Proteinisolierung

2×10^5 Zellen werden in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation bei 3000g (≈ 5800 U/min) und 4°C für 10 min wird der Überstand abgenommen und verworfen. (An dieser Stelle können die Pellets bei -80°C gelagert werden.) Anschließend werden die Zellen lysiert, indem sie 30 min lang mit 200 μ l Lysierungspuffer auf Eis inkubiert werden. Nun wird bei 20.000g (≈ 1500 U/min) und 4°C 20 min lang der Zelldebris abzentrifugiert, welcher sich dadurch im Pellet sammelt. Der die Proteine enthaltende Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

Anschließend kann photometrisch die Proteinkonzentration der einzelnen Proben (nach Bradford) bestimmt werden.

2. Schritt: TRAP-Reaktion

In diesem Abschnitt sollten alle Pipettierschritte auf Eis ausgeführt werden.

Pro Ansatz werden 25 µl PCR-Reaktionsmix in ein Amplifikationsröhrchen (*PCR-Tube*) vorgelegt. Dazu gibt man 1-3 µl des Zellysats (entsprechend 1-50 µg Protein) und füllt das Volumen mit sterilem Wasser auf 50 µl auf. Als Negativkontrollen werden steriles Wasser und mit RNase inkubiertes Zellextrakt (5 µl Zellextrakt mit 5 µl RNase bei 37°C für 20 min inkubieren und davon 2 µl in ein Amplifikationsröhrchen überführen) verwendet. Da Telomerase die RNA-Komponente hTR für ihre Aktivität benötigt, dürfte nach Behandlung mit RNase (die diese Komponente degradiert) keine Telomerase-Aktivität mehr möglich sein. Als Positivkontrolle dient Zellextrakt aus der immortalen Phoenix-Ampho-Zelllinie (abgeleitet von einer humanen, embryonalen Nierenzelllinie).

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur	Durchgänge
1. Telomerasereaktion / Primer-Verlängerung	10-30 min	25°C	1
2. Telomeraseinaktivierung	5 min	94°C	1
3. Amplifikation			30
Denaturierung	30 s	94°C	
Annealing	30 s	50°C	
Polymerisation	90 s	72°C	
Extension	10 min	72°C	1
4. Stop, Lagerung	∞	4°C	

3. Schritt: Hybridisierung und ELISA

In ein Eppendorfröhrchen werden zu je 20 µl vorgelegtem Denaturierungsreagenz 5 µl des PCR-Produkts pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin fügt man 225 µl Hybridisierungspuffer hinzu und vortext das Röhrchen leicht. 100 µl dieser Lösung werden in ein gecoatetes Well der Mikrotiterplatte überführt, mit Klebefolie verschlossen und 2 Stunden lang bei 37°C auf einem Shaker (200 U/min) inkubiert. Anschließend entfernt man den Hybridisierungsmix vollständig aus den Wells (die hybridisierten PCR-Produkte sollten in den Mikrotiterplatten fixiert sein) und wäscht diese dreimal mit jeweils 250 µl Waschpuffer aus. Nach Entfernung der Waschlösung werden 100 µl anti-DIG-POD(= Peroxidase) pro Well hinzugefügt, die Wells wieder mit Klebefolie verschlossen und bei Raumtemperatur für 30 min auf

einem Shaker (300 U/min) inkubiert. Danach entfernt man die Antikörperlösung komplett und wäscht jedes Well fünfmal mit jeweils 250 µl Waschpuffer. Anschließend wird in jedes Well 100 µl der TMB(= 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-Substratlösung pipettiert, und das ganze 10-20 min lang bei Raumtemperatur auf einem Shaker (300 U/min) inkubiert. Zum Schluss fügt man pro Well 100 µl Stopreagenz hinzu, wodurch es zum Farbumschlag kommt.

Im Anschluss sollten die Proben innerhalb von 30 min an einem ELISA-Reader ausgewertet werden, wobei die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen wird.

Auswertung:

Als positives Ergebnis wird eine Absorption $> 0,2 A_{450nm} - A_{650nm}$ gewertet. Wasser als Negativkontrolle muss im negativen Bereich, nicht transfizierte Phoenix-Ampho-Zellen müssen im positiven Bereich liegen. Von dem Wert einer Probe wird der dazugehörige Wert des RNase-behandelten Aliquots subtrahiert.

II.6 *In vitro* Stimulation von B- und T-Zellen

II.6.1 Generelle Zellkulturtechniken

II.6.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit den in der vorliegenden Studie eingesetzten Zellen (PBLs, MNCs, isolierte B- und T-Lymphozyten) wurden unter sterilen Werkbänken mit laminarem Flow durchgeführt. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C mit 5% CO₂ zur Neutralisierung von sauren Stoffwechselprodukten kultiviert.

Für die Zellkulturen wurde dabei folgendes Medium verwendet:

- 10 % FCS
- 1 % Penicillin-Streptomycin
- 1 % L-Glutamin
- in RPMI 1640

II.6.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen in Suspension gebracht. Ein definiertes Aliquot wird entnommen und mit einer bestimmten Menge Trypanblau vermischt. Dadurch stellen sich die lebenden Zellen als schießscheibenähnliche Ringe mit heller Mitte dar, wohingegen sich die toten ganz mit dem Trypanblau anfärben. 10µl dieses Gemisches werden in eine Neubauer-Zählkammer unter das aufgesetzte Deckglas pipettiert. Alle vitalen Zellen der vier großen Quadranten, bestehend aus je 16 Kleinquadranten, werden mäanderförmig ausgezählt.

Die Zellzahl (bzw. zunächst Zelldichte) der Zellsuspension berechnet sich dann folgendermaßen:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{ausgezählte Zellzahl aus 4 Quadranten} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

II.6.1.3 Bestimmung der Populationsverdopplung

Um ein Maß für die Teilungsrate der Zellen über die gesamte Kulturzeit zu erhalten, bestimmt man die mittlere Populationsverdopplung (Population Doubling: PD) über bestimmte Zeitabschnitte und berechnet daraus dann den kumulativen Populationsverdopplungs-Level (Cumulative PD Level: CPDL) einer bestimmten Zellkultur:

$$PD = (\log \text{Endzahl} - \log \text{Ausgangszahl}) / \log 2$$

$$CPDL = \sum PD$$

II.6.1.4 Einfrieren von Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen abzentrifugiert, in 1,0 -1,5 ml Einfriermedium (= 90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in ein beschriftetes Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen werden in einer Einfrierbox in einen -80°C Gefrierschrank gesteckt. Dort erfolgt ein gleichmäßiger Temperaturabfall von -1°C pro min, bedingt durch die Isolierungseigenschaften der Einfrierbox. Zur längerfristigen Aufbewahrung können die Röhrchen anschließend in einen Stickstofftank (-196°C) überführt werden.

II.6.2 Kultivierung von B-Zellen

Frisch aus peripherem Blut isolierte B-Lymphozyten wurden folgendermaßen kultiviert: Die Zellen wurden in Medium (wie unter II.6.1.2 beschrieben) aufgenommen und einerseits in 12-Well-Platten mit einer Zelldichte von $3,75 \times 10^5$ Zellen/ml Medium, andererseits in Kulturflaschen mit einer Zelldichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml Medium als Kulturen angesetzt.

Alle Kulturansätze wurden einmalig mit $10 \mu\text{g/ml}$ SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan I Strain), und die Hälfte der Ansätze zusätzlich mit 20 U/ml IL-2 (Interleukin 2) stimuliert. Zur Unterdrückung der Vermehrung von eventuell zurückgebliebenen T-Zellen wurde dem Kulturmedium aller Ansätze $1 \mu\text{g/ml}$ Cyclosporin A hinzugefügt.

II.6.3 Kultivierung von T-Zellen

Die aus peripherem Blut isolierten T-Lymphozyten wurden als Kulturen mit einer Zelldichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium (wie unter II.6.1.2 beschrieben) angesetzt. 24 Stunden vor Ansetzen der Kulturen wurden die verwendeten Kulturflaschen mit $1 \mu\text{g/ml}$ OKT-3 in 100 mM HEPES-Puffer (in PBS) gecoatet und einen Tag bei 4°C aufbewahrt. Hierbei kommt es zu einer Beschichtung der Flascheninnenfläche mit dem T-Zell-stimulierenden CD3-Antikörper OKT-3. Vor Einfüllen der Zellkultur wird die Pufferlösung wieder abgenommen und die Flasche mit reinem PBS ausgewaschen. Da eine Stimulation mit zu hohen Konzentrationen an OKT-3 oder über eine längere Zeitspanne zur T-Zelldepletion führt, müssen die Zellen nach 24 Stunden Kultivierung in der gecoateten Flasche in eine neue, ungecoatete Flasche überführt werden. Neben dieser einmaligen Stimulation mit OKT-3 wurden die T-Zellen wiederholt mit 100 U/ml IL-2 stimuliert, und zwar am Tag 0, 3, 5, 7, 10 und 12. Diese Stimulation erfolgte jeweils nach Auszählen der Zellen und halbem Mediumwechsel entsprechend der Zelldichte (die Zelldichte war immer $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium), und richtete sich nach dem jeweils neuen Volumen.

II.6.4 Proliferationsnachweis: [^3H]Thymidin-Inkorporation

Dieses Verfahren, um Zellproliferation bzw. DNA-Synthese nachzuweisen, wurde wie auch andernorts beschrieben (Igarashi & Sakaguchi, 1997; Weng *et al*, 1997a) durchgeführt.

In vorliegender Arbeit wurde es zum Proliferationsnachweis der *in vitro* stimulierten B-Zellen eingesetzt. Hierfür wurden folgende Ansätze jeweils 6-fach mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen pro Well (in einer 96-Well-Platte) angelegt :

1. B-Zellen mit SAC und IL-2 stimuliert in Kulturmedium wie bereits beschrieben
2. B-Zellen mit SAC stimuliert in Kulturmedium wie bereits beschrieben
3. B-Zellen in reinem RPMI 1640 ohne Zusätze

Ansätze 1 und 2 stellten hierbei die Positivproben (= zu untersuchende Zellen), Ansatz 3 die Negativkontrolle dar.

Protokoll:

Die 96-Well-Platten mit den angesetzten Zellkulturen werden 48 Stunden lang bei +37°C inkubiert. Danach werden die Zellen mit [³H]Thymidin „gepulst“ (*³H-thymidine pulsing*): Hierfür pipettiert man in jedes Well 20 µl einer 50 µCi/ml [³H]Thymidin-Lösung (in RPMI-Medium), was einer Aktivität von 1µCi (bzw. 37 kBq) pro Well entspricht. Nun werden die Zellkulturen weitere 16 bis 20 Stunden inkubiert und anschließend mithilfe eines halbautomatischen Multiwell-Harvesters abgeerntet: Diese Vorrichtung aspiriert und lysiert die Zellen der einzelnen Wells und transferiert die freie DNA dann auf bestimmtes Filterpapier, wobei freies (nicht-inkorporiertes) [³H]Thymidin ausgewaschen wird. Nachdem die Filter zwei Stunden lang luftgetrocknet sind, fügt man pro Filter-Well zwei Tropfen Szintillationslösung *Microscint 20* hinzu und misst dann die Szintillationsfrequenzen in einem *Scintillation Counter* (in *counts per minute*: cpm).

II.7 Cytospin

Dieses Verfahren wurde angewendet, um Zellen – in vorliegender Arbeit handelte es sich dabei um B-Zellen nach *in vitro* Stimulation – auf einen Objektträger zu zentrifugieren, so dass sie nach Anfärbung unter dem Lichtmikroskop betrachtet und morphologisch beurteilt werden konnten.

Protokoll:

Pro Objektträger werden 20.000-25.000 Zellen in maximal 150 µl PBS + 3% BSA aufgenommen. Nach Beschriftung und Einlegen der Objektträger in die Halterungs-

klemme wird das Filterpapier mit der glatten Seite zum Objektträger hin auf diesen plaziert. Darüber wird die Plastikkammer in die Klemme eingespannt, und das Ganze in die Cytospin-Zentrifuge eingehängt. Pro Kammeröffnung werden nun 150 µl der Zellsuspension einpipettiert, und anschließend bei 800 U/min drei Minuten lang zentrifugiert. Hierbei werden die Zellen durch die Zentrifugalkraft aus der Plastikkammer über den Filter auf den Objektträger gepresst. Nach abgeschlossener Zentrifugation wird der Objektträger samt Filter aus der Klemme entnommen, und auf seiner Rückseite mit einem Diamantstift die Lage der aufzentrifugierten Zellen markiert. Daraufhin lässt man den Objektträger lufttrocknen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Objektträger anschließend nach Pappenheim gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

III. ERGEBNISSE

III.1 Telomerlängenheterogenität und -dynamik in Subpopulationen peripherer Blutlymphozyten – *in vivo*

Für diese Versuchsreihe wurden von insgesamt 38 gesunden Spendern im Alter von 12-92 Jahren MNCs aus frisch entnommenem, peripheren EDTA-Blut isoliert, und aus diesen anschließend durch magnetische positiv-Zellseparation B (CD19⁺)- und T (CD3⁺)-Zellen angereichert. Auf dieselbe Weise wurden auch B- und T-Zellen aus 15 Nabelschnurblutproben gewonnen. Der Erfolg der Anreicherung wurde mithilfe der am FACS durchgeführten Reinheitsbestimmung kontrolliert.

Die Telomerlängen von MNCs, B- und T-Zellen wurden in Doppelmessungen mit der Flow-FISH-Methode ermittelt. In nachstehenden Tabellen (III.1.1 und III.1.2) sind die Mittelwerte der Messungen aufgeführt:

a) Erwachsene Spender:

Alter (Jahre)	MNCs	T-Zellen		B-Zellen		ID
	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	
12	ND	100	8,0	60	8,1	38
20	7,7	99	7,5	99	8,6	11
20	9,2	98	9,1	93	10,0	23
23	7,3	97	7,3	94	9,4	1
23	7,4	ND	ND	82	7,8	7
23	7,6	99	7,6	99	9,3	10
24	8,3	96	8,2	96	10,7	3
25	7,5	99	7,4	76	8,1	4
26	7,6	96	7,8	84	9,2	5
27	7,1	99	7,3	99	8,4	12
33	7,8	98	7,9	93	8,8	29
34	7,7	98	8,0	85	9,2	9
35	ND	97	8,4	88	9,5	34
37	ND	100	8,8	77	9,4	37
39	6,8	ND	6,8	92	7,8	6
40	7,9	99	8,1	94	9,1	30
40	7,5	95	7,3	88	8,4	32

Alter (Jahre)	MNCs	T-Zellen		B-Zellen		ID
	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	
41	7,1	96	6,9	89	8,2	2
47	7,6	73	7,4	91	8,6	33
50	7,3	98	7,4	81	8,2	25
52	7,6	97	7,5	84	8,5	21
55	7,0	95	7,1	93	8,5	20
55	7,5	98	7,4	86	8,6	28
57	7,6	99	7,4	83	7,9	19
57	7,6	98	7,4	85	7,9	22
58	7,9	98	7,7	83	8,3	26
58	6,9	99	6,8	76	7,5	27
60	7,4	97	7,5	94	8,5	13
61	7,3	100	7,1	99	8,8	18
63	7,4	94	7,4	97	8,3	17
64	ND	98	7,5	82	8,6	36
68	6,4	99	6,5	82	7,7	14
71	ND	99	7,3	96	8,2	35
78	7,5	99	7,3	90	8,2	31
79	7,5	98	7,2	85	7,9	15
87	6,3	ND	ND	98	8,1	8
89	6,8	99	6,7	79	8,4	24
92	5,9	99	5,6	74	7,1	16

Tabelle III.1.1: Mittelwerte der Telomerlängen (Telomere Fluorescence Units) von MNCs, T- und B-Zellen aus Doppelmessungen mittels Flow-FISH, gemessen an n = 38 gesunden, „erwachsenen“ Spendern (12-98 Jahre alt). Für T- und B-Zellen sind jeweils die Reinheiten mitaufgeführt. (ND: nicht durchgeführt)

b) Neugeborene:

Alter (Jahre)	MNCs	T-Zellen		B-Zellen		ID
	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	
0	10,1	85	9,6	64	9,3	CB 1
0	8,8	99	9,0	82	9,0	CB 2
0	8,5	93	8,3	92	7,9	CB 3
0	8,8	88	9,0	98	8,8	CB 4
0	8,8	93	8,8	93	8,7	CB 5
0	ND	100	9,2	97	8,8	CB 6
0	ND	93	10,3	72	10,5	CB 7

Alter (Jahre)	MNCs	T-Zellen		B-Zellen		ID
	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	Reinheit (%)	Telomerlänge (kbp)	
0	ND	99	9,2	18	8,6	CB 8
0	ND	98	8,9	52	8,3	CB 9
0	ND	95	10,9	97	10,1	CB 10
0	ND	97	10,4	63	10,1	CB 11
0	ND	98	7,6	99	9,1	CB 12
0	ND	98	9,1	100	8,5	CB 13
0	ND	99	9,9	100	9,1	CB 14
0	ND	99	10,4	100	9,6	CB 15

Tabelle III.1.2: Mittelwerte der Telomerlängen (Telomere Fluorescence Units) von MNCs, T- und B-Zellen aus Doppelmessungen mittels Flow-FISH, gemessen an $n = 15$ Nabelschnurblutproben. Für T- und B-Zellen sind jeweils die Reinheiten mitaufgeführt. (ND: nicht durchgeführt)

III.1.1 Vergleich der Telomerlängen von peripheren MNCs, B- und T-Zellen beim Erwachsenen

Vergleicht man die Telomerlängen von MNCs, B- und T-Zellen einzeln bei jedem der 38 erwachsenen Spender, so ergibt sich für jeden ein individuelles Telomerlängenprofil (siehe die drei in Abbildung III.1.1 aufgeführten Beispiele). Allen individuellen Profilen ist gemeinsam, dass MNCs und T-Zellen ungefähr gleich lange Telomere aufweisen, wohingegen die Telomerlängen der B-Zellen jeweils auffallend höher liegen. Dieser Unterschied ist auch an den einzelnen FACS-Profilen der B- und T-Zellen deutlich erkennbar (siehe Abbildung III.1.2).

Fasst man dies für alle 38 Spender zusammen, so ergibt sich sowohl für die Differenz zwischen B-Zellen und MNCs ($mean \pm SD$: $8,5 \pm 0,7$ kbp vs. $7,4 \pm 0,6$ kbp), als auch für die Differenz zwischen B- und T-Zellen ($mean \pm SD$: $8,5 \pm 0,7$ kbp vs. $7,5 \pm 0,6$ kbp) ein Mittelwert von 1,1 kbp. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen statistisch signifikant (t-Test: $P < 0,001$).

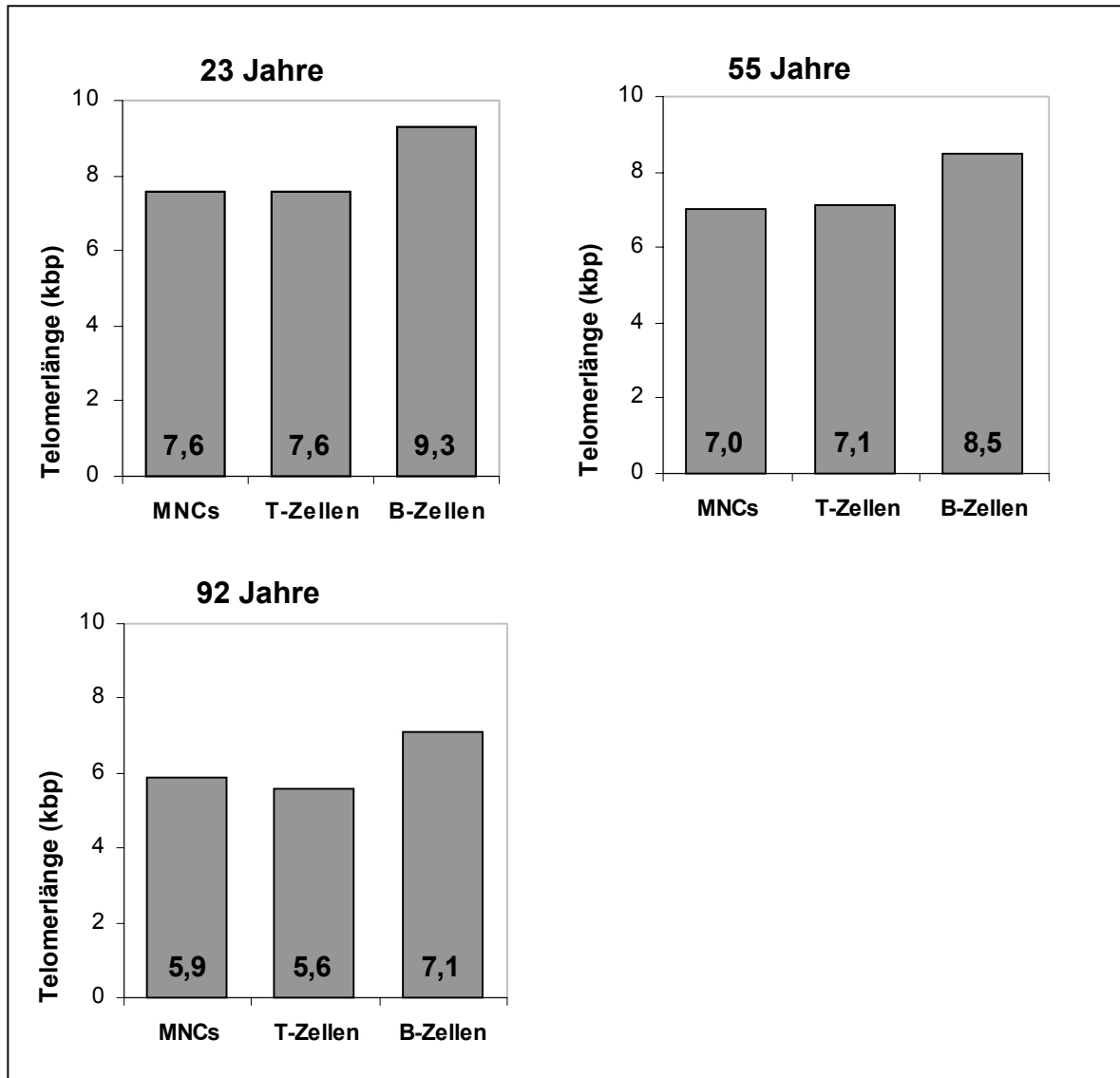


Abbildung III.1.1: Individuelle Telomerlängenprofile einzelner Spender. Abgebildet sind ein 23-jähriger (ID 10), ein 55-jähriger (ID 20) und ein 92-jähriger (ID 16) Spender. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten der in Doppelmessungen mit der Flow-FISH-Methode erfassten Telomerlängen (Telomere Fluorescence Units).

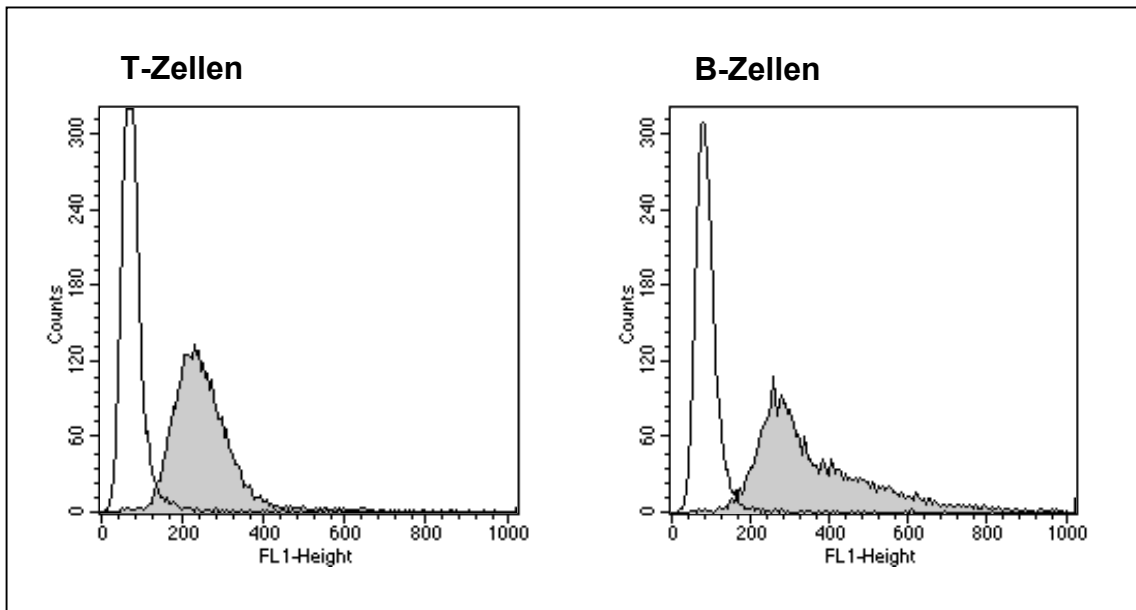


Abbildung III.1.2: FACS-Profile von T- und B-Zellen eines 55-jährigen Spenders (ID 20). In dieser Messung ergibt sich für die T-Zellen eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität ΔFI von 172,6 und für die B-Zellen eine durchschnittliche ΔFI von 267,2, was Telomerlängen von 7,0 kbp bzw. 8,7 kbp entspricht. Die auffällig asymmetrische Fluoreszenz-Verteilung der B-Zellen findet sich bei den FACS-Profilen aller Erwachsenen und deutet auf die Zusammensetzung der B-Zellen aus Subpopulationen mit unterschiedlichen Telomerlängen hin (Martens et al, 2002).

III.1.2 Vergleich der Telomerlängen von peripheren MNCs, B- und T-Zellen beim Neugeborenen

Überraschenderweise ergibt sich beim Vergleich der Telomerlängen von MNCs, B- und T-Zellen von Neugeborenen ein anderes Telomerlängenprofil als bei den adulten Zellen (siehe Abbildung III.1.3): Der signifikante Unterschied in den Telomerlängen von B- und T-Zellen ist hier nicht feststellbar, vielmehr weisen alle Zellgruppen ähnlich lange Telomere auf, wobei die Telomerlänge der T-Zellen im Durchschnitt sogar geringfügig über der Telomerlänge der B-Zellen liegt ($mean \pm SD$: $9,4 \pm 0,9$ kbp vs. $9,1 \pm 0,7$ kbp), ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (t-Test: $P = 0,35$).

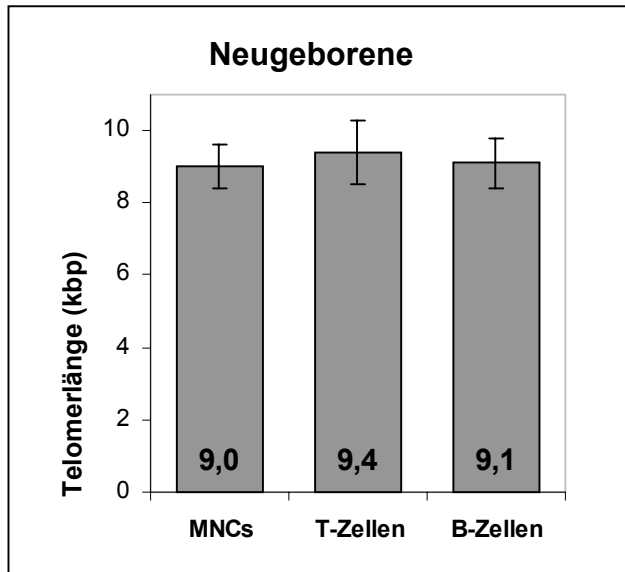


Abbildung III.1.3:

Telomerlängenprofil von Neugeborenen. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten der an 15 Neugeborenen mit der Flow-FISH-Methode gemessenen Telomerlängen (siehe auch Tabelle III.1.2).

III.1.3 Telomerlängendynamik von MNCs, B- und T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter

III.1.3.1 Telomerlängenprofile nach Altersgruppen sortiert

Um einen Überblick über die Telomerlängenheterogenität und -dynamik im Lauf des Lebens zu erhalten, wurden die Telomerlängenprofile aufsteigender Altersgruppen nebeneinander in einem Diagramm abgebildet (siehe Tabelle III.1.3 und Abbildung III.1.4).

Altersgruppen (Jahre)	MNCs (kbp)		T-Zellen (kbp)		B-Zellen (kbp)		Differenz (B-T) (kbp)	
	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD
0	9,0	± 0,6	9,4	± 0,9	9,1	± 0,7	-0,3	± 0,6
20-39	7,7	± 0,6	7,8	± 0,6	9,0	± 0,8	1,2	± 0,6
40-59	7,5	± 0,3	7,4	± 0,3	8,3	± 0,4	1,0	± 0,3
60-79	7,3	± 0,4	7,2	± 0,3	8,2	± 0,4	1,0	± 0,3
≥80	6,3	± 0,4	6,2	± 0,8	7,9	± 0,7	1,6	± 0,1

Tabelle III.1.3: Mittelwerte (grau unterlegt) ± Standardabweichungen der Telomerlängen von MNCs, T- und B-Zellen und der Differenz zwischen B- und T-Zellen der Altersgruppen 0 Jahre (n = 15), 20-39 Jahre (n = 14), 40-59 Jahre (n = 12), 60-79 Jahre (n = 8) und ≥80 Jahre (n = 3) gemessen mittels Flow-FISH.

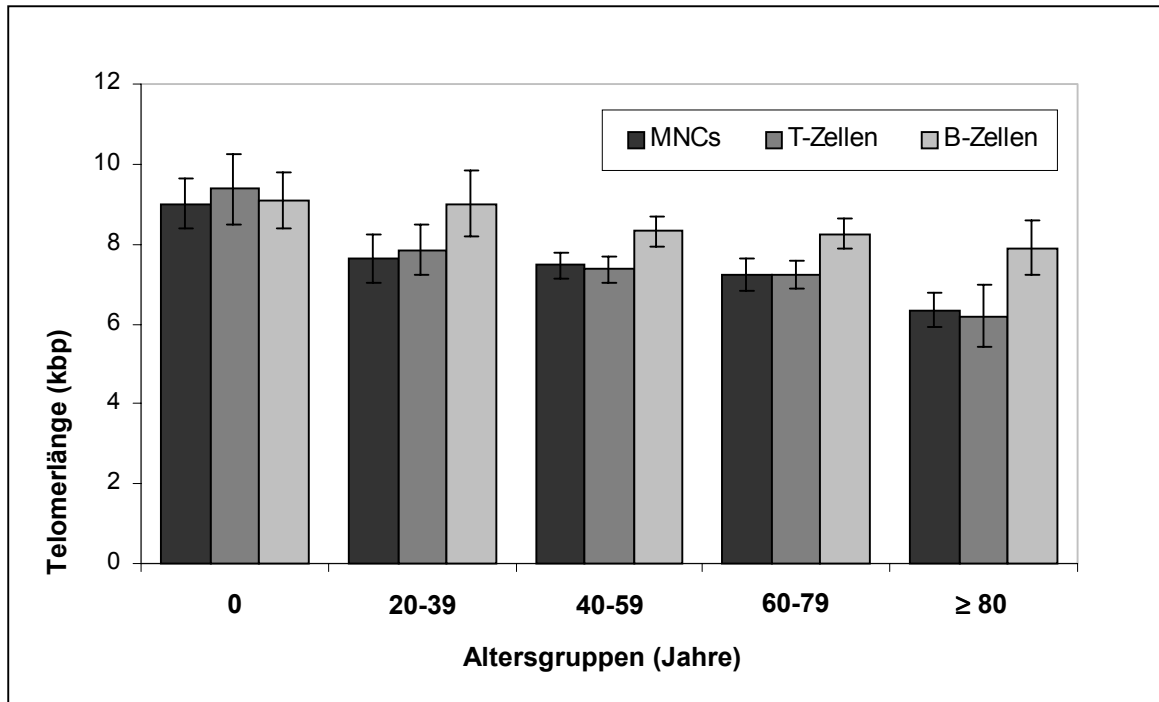


Abbildung III.1.4: Telomerlängenprofile aufsteigender Altersgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Telomerlängen von MNCs, T- und B-Zellen der Altersgruppen 0 Jahre ($n = 15$), 20-39 Jahre ($n = 14$), 40-59 Jahre ($n = 12$), 60-79 Jahre ($n = 8$) und ≥ 80 Jahre ($n = 3$). Vergleiche auch Tabelle III.1.3

Anhand dieser Darstellung lassen sich mehrere Schlüsse ziehen: Wie bereits beschrieben tritt bei allen Altersgruppen außer bei den Neugeborenen die Telomerlängendifferenz zwischen B- und T-Zellen auch hier noch einmal deutlich zutage. Die B-Zellen weisen dabei durchwegs die längsten Telomere der drei Zellgruppen auf. Für alle drei Zellpopulationen ist eine altersabhängige Abnahme der Telomerlängen erkennbar. Dieser Telomerlängenverlust scheint jedoch für die einzelnen Subpopulationen unterschiedlich rasch voranzuschreiten. Im folgenden sollen diese Beobachtungen genauer und für jede Subpopulation einzeln untersucht werden.

III.1.3.2 Altersabhängige Telomerlängendynamik von MNCs

Trägt man die gemessenen Telomerlängen der MNCs von 38 Spendern im Alter von 0-92 Jahren gegen das jeweilige Alter in ein Koordinatenkreuz auf, so lässt sich daraus eine Regressionsgerade berechnen (siehe Abbildung III.1.5). Dabei repräsentiert die Steigung der zugehörigen Geradengleichung die jährliche Telomerlängenveränderung *in vivo*: Für die MNCs ergibt sich hierbei ein Telomerlängenverlust von 23 ± 3 Basenpaaren pro Jahr ($R = 0,75$; t-Test: $P < 0,001$).

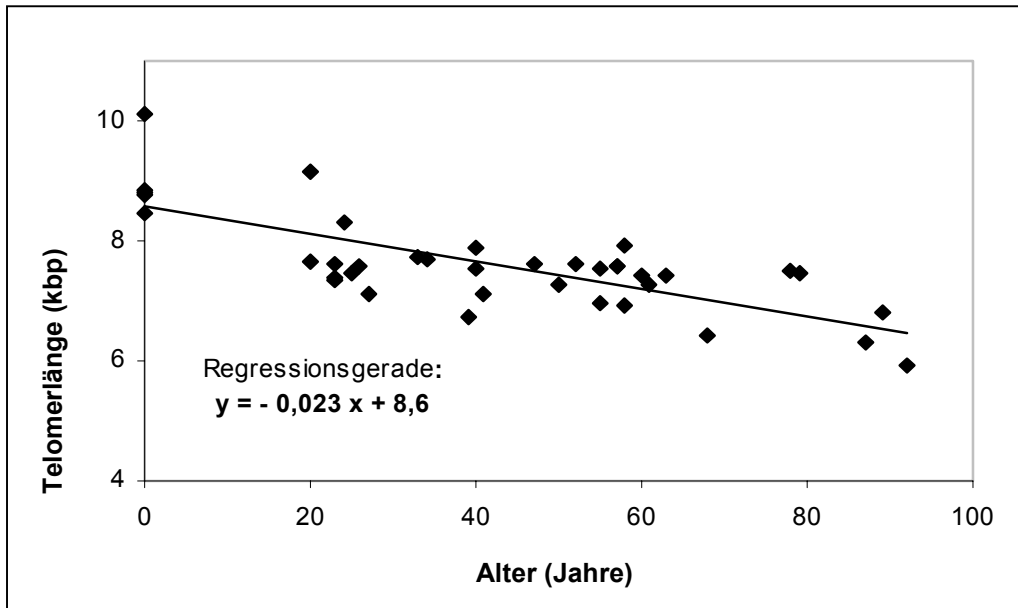


Abbildung III.1.5: Altersbedingte Telomerlängendynamik von MNCs: Telomerlängen gemessen an $n = 38$ gesunden Spendern im Alter von 0 bis 92 Jahren mit der Flow-FISH-Methode (vergleiche auch Tabelle III.1.1 und III.1.2). Eingetragen ist die für MNCs errechnete Regressionsgerade mit einem jährlichen Telomerlängenverlust von 23 ± 3 bp.

III.1.3.3 Altersabhängige Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen

Wie bei den MNCs lassen sich auch aus den erhaltenen Messwerten der B- und T-Zellen Regressionsgeraden für die beiden Subpopulationen erstellen (siehe Abbildung III.1.6). Hier beträgt der resultierende Telomerlängenverlust für die T-Zellen 32 ± 4 Basenpaare pro Jahr ($R = 0,80$; t-Test: $P < 0,001$), wohingegen die Telomere der B-Zellen sich langsamer, nämlich mit einem Verlust von nur 14 ± 3 Basenpaaren pro Jahr verkürzen ($R = 0,54$; t-Test: $P < 0,001$).

Diese ungleiche Längenabnahme der Telomere müsste mit steigendem Lebensalter eine stetige Zunahme der Differenz zwischen B- und T-Zellen nach sich ziehen, was sich jedoch nicht bestätigt (siehe Abbildung III.1.7). Vielmehr erscheint die Telomerlängendifferenz zwischen B- und T-Zellen ab dem 20. Lebensjahr relativ konstant ($mean \pm SD$: $1,1 \pm 0,5$ kbp). Erst für extrem hohes Alter (um das 90. Lebensjahr) beobachtet man einen leichten Anstieg dieser Differenz, dessen Aussagekraft jedoch aufgrund der geringen Anzahl an Spendern für diesen Altersbereich ($n = 2$) in Frage gestellt sei.

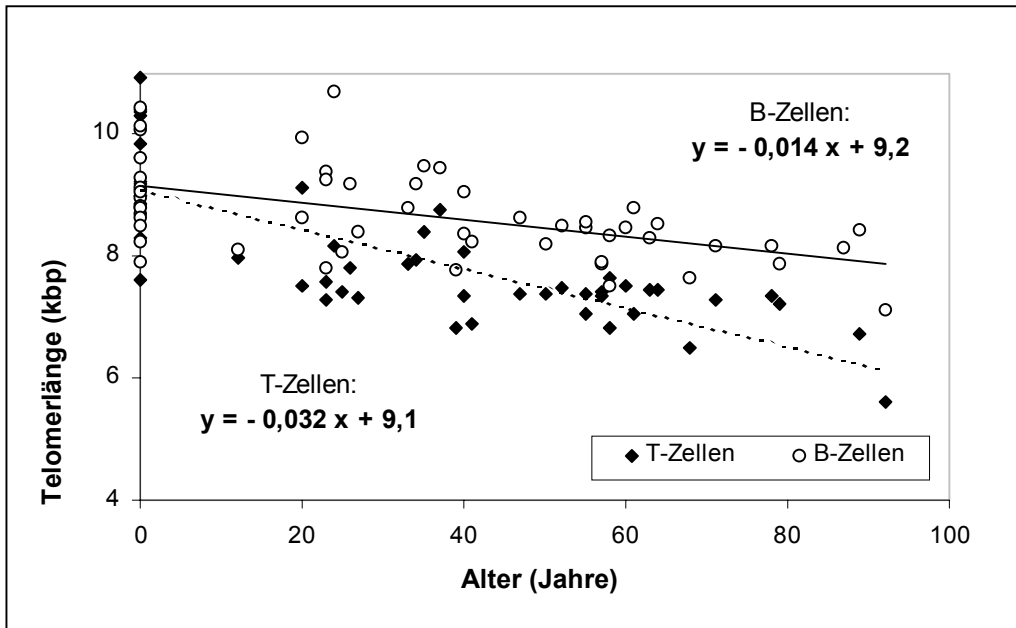


Abbildung III.1.6: Altersbedingte Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen: Telomerlängen gemessen an $n = 53$ gesunden Spendern im Alter von 0 bis 92 Jahren mit der Flow-FISH-Methode (vergleiche auch Tabelle III.1.1 und III.1.2). Eingetragen sind die für B- und T-Zellen errechneten Regressionsgeraden mit einem jährlichen Telomerlängenverlust von 14 ± 3 bzw. 32 ± 4 bp.

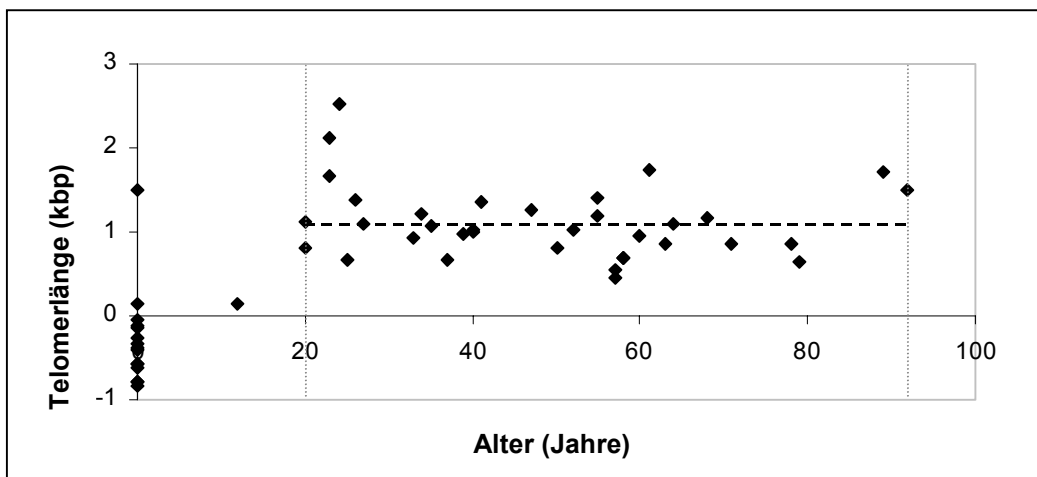


Abbildung III.1.7: Telomerlängendifferenz zwischen B- und T-Zellen im Verlauf des Lebens gemessen an $n = 51$ Spendern im Alter von 0 bis 92 Jahren. Für die Werte ab dem 20. Lebensjahr ist als gestrichelte Linie der Mittelwert von 1,1 kbp eingezeichnet.

Abbildung III.1.7 macht deutlich, dass zwischen dem Altersabschnitt von 0 bis 20 Jahren (Kindheit/Jugend) und dem Altersabschnitt ab dem 20. Lebensjahr (Erwachsenenalter) unterschieden werden muss: In den ersten 20 Lebensjahren wandelt sich das bei Neugeborenen noch umgekehrte Längenverhältnis (T-Zellen weisen hier geringfügig längere Telomere auf als B-Zellen) in das für Erwachsene typische Telomerlängenprofil (die Telomere der B-Zellen sind signifikant länger als die Telomere der T-Zellen) um. Folglich muss in diesem Lebensabschnitt die Telomerverkürzung der T-Zellen beachtlich schneller voranschreiten als die der B-Zellen. Genaue Aussagen über die Telomerlängendynamik in diesem Altersabschnitt lassen sich aus vorliegender Versuchsreihe jedoch nicht ableiten, da für den Bereich zwischen 0 und 20 Jahren nur ein Messwert vorliegt.

Im Gegensatz dazu weist die Abnahme der Telomerlängen für B- und T-Zellen ab dem 20. Lebensjahr einen nahezu parallelen Verlauf auf, was besonders deutlich wird, wenn man die Werte für diesen Altersabschnitt separat analysiert (siehe Abbildung III.1.8): Der Telomerlängenverlust für B- und T-Zellen beträgt hier 20 ± 4 bzw. 19 ± 4 Basenpaare pro Jahr, schreitet also praktisch mit gleicher Geschwindigkeit voran ($R = 0,58$ für B-Zellen bzw. $R = 0,61$ für T-Zellen; t-Test: für beide Regressionsgeraden jeweils $P < 0,001$).

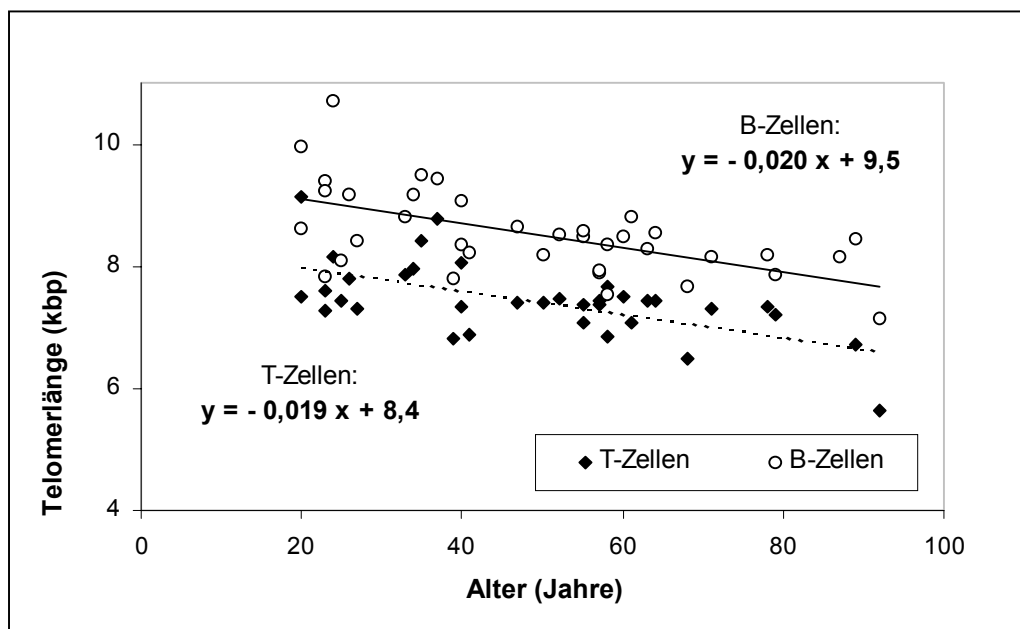


Abbildung III.1.8: Altersbedingte Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen ab dem 20. Lebensjahr: Telomerlängen gemessen an $n = 37$ gesunden Spendern im Alter von 20 bis 92 Jahren mit der Flow-FISH-Methode (vergleiche auch Tabelle III.1.1). Eingezeichnet sind die für B- und T-Zellen für diesen Altersabschnitt errechneten Regressionsgeraden mit einem jährlichen Telomerlängenverlust von 20 ± 4 bzw. 19 ± 4 bp.

III.2 Telomerlängendynamik in Subpopulationen peripherer Blutlymphozyten – *in vitro*

Um die Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen nach *in vitro* Stimulation zu analysieren, wurden aus drei *Buffy Coat*-Proben (BC 1, 2 bzw. 3) B-(CD19⁺)- und T-(CD3⁺)-Zellen durch magnetische positiv-Zellseparation isoliert und anschließend unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen in Kultur gehalten:

Die B-Zellen wurden 10 Tage lang kultiviert, wobei sie zur Hälfte nur mit SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan I strain), und zur Hälfte mit einer Kombination aus SAC und Interleukin 2 (IL-2) stimuliert worden sind. Die T-Zellen wurden 14 Tage in Kultur gehalten und sind einmalig mit OKT-3 und wiederholt mit IL-2 stimuliert worden.

III.2.1 Telomerlängendynamik von *in vitro* stimulierten B-Zellen

Für alle drei *Buffy Coats* wurden an den Tagen 0, 5 und 10 Zellen aus den B-Zell-Kulturen entnommen und deren Telomerlängen mittels der Flow-FISH-Methode bestimmt.

Wie aus Abbildung III.2.1 ersichtlich ist, bleibt die Telomerlänge der ausschließlich mit SAC stimulierten B-Zellen mehr oder weniger konstant mit einem geringen mittleren Längenzuwachs von 800 bp von Tag 0 auf Tag 5 und einer nachfolgenden mittleren Längenabnahme von 400 bp zwischen Tag 5 und Tag 10 (*mean ± SD* der Telomerlängen: *Tag 0*: $8,9 \pm 0,4$ kbp, *Tag 5*: $9,7 \pm 0,6$ kbp, *Tag 10*: $9,3 \pm 0,3$ kbp). Dagegen weisen die mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen einen beträchtlichen mittleren Telomerlängenzuwachs von 1,8 kbp innerhalb der ersten 5 Tage auf, gefolgt von einem mittleren Längenverlust von 700 bp bis zum Tag 10 (*mean ± SD* der Telomerlängen: *Tag 0*: $8,9 \pm 0,4$ kbp, *Tag 5*: $10,7 \pm 0,9$ kbp, *Tag 10*: $10,0 \pm 0,2$ kbp). Insgesamt sind die Telomere der B-Zellen bei der Kombination von SAC und IL-2 am Ende der Kultur im Mittel um 1,1 kbp länger als zu Beginn der Kultur.

Die auffällige Differenz im Längenzuwachs der Telomere innerhalb der ersten fünf Tage zwischen den beiden Stimulationsbedingungen ist auch an den jeweiligen FACS-Profilen deutlich erkennbar (siehe Abbildung III.2.2).

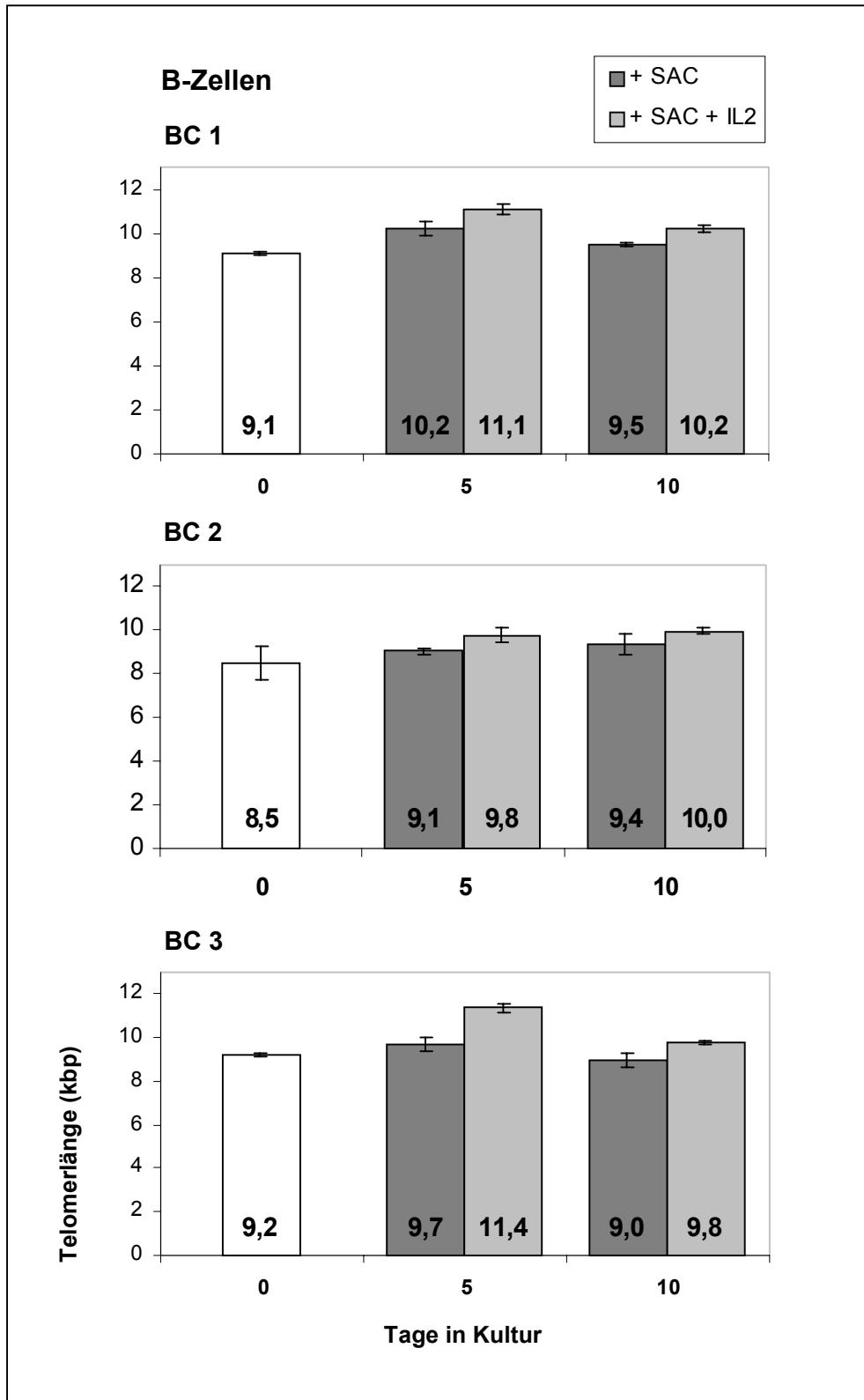


Abbildung III.2.1: Telomerlängendynamik von *in vitro* stimulierten B-Zellen: Abgebildet sind für die drei Buffy Coats (BC 1, 2 und 3) die durch Mehrfachmessungen mit der Flow-FISH-Methode ermittelten durchschnittlichen Telomerlängen der B-Zellen am Tag 0, 5 und 10 der Kultur ($n = 2-4$). Dabei sind die nur mit SAC stimulierten B-Zellen dunkelgrau, die mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen hellgrau dargestellt.

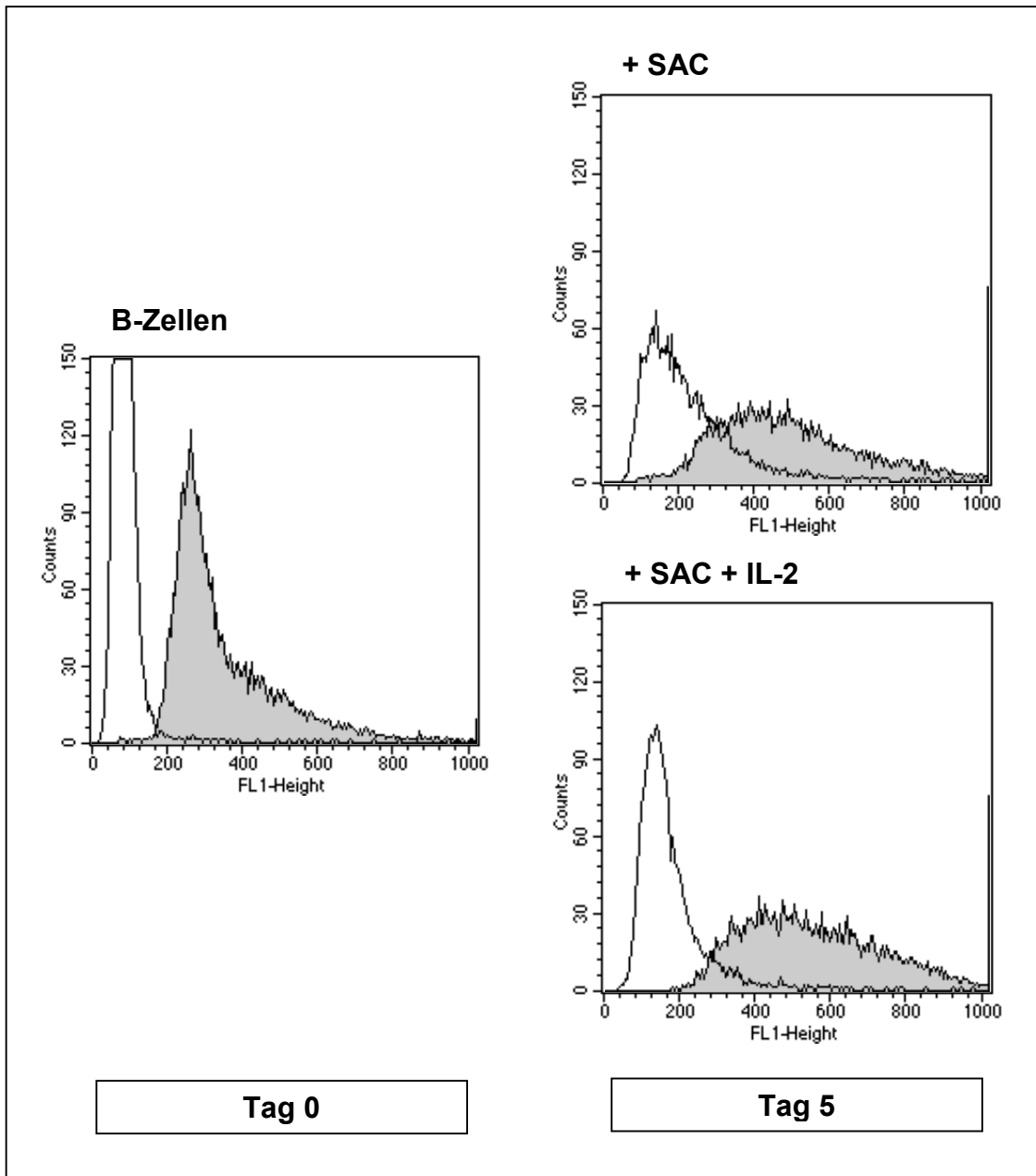


Abbildung III.2.2: FACS-Profile der *in vitro* stimulierten B-Zellen von Buffy Coat 3. Links sind die Fluoreszenzintensitäten der frisch isolierten B-Zellen am Tag 0 dargestellt, rechts die Fluoreszenzintensitäten der mit SAC (oberes Histogramm) bzw. mit SAC und IL-2 (unteres Histogramm) stimulierten B-Zellen am Tag 5 der Kultur. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten in dieser Messung betragen für die B-Zellen am Tag 0: 251,5, für die mit SAC stimulierten B-Zellen am Tag 5: 285,9, und für die mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen am Tag 5: 391,6.

Der Telomerlängenzuwachs der unterschiedlich stimulierten B-Zellen korreliert dabei gut mit der Höhe ihrer Proliferationsinduktion bzw. DNA-Synthese, wie mithilfe der [³H]Thymidin-Inkorporation nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle III.2.1).

Kulturbedingungen	³ H]Thymidin-Inkorporation	
	(cpm)	
Medium ohne Zusätze	891	± 426
+ SAC	84 029	± 13 431
+ SAC + IL-2	119 324	± 19 724

Tabelle III.2.1: Mittelwerte (grau unterlegt) ± Standardabweichungen der [³H]Thymidin-Inkorporation (Angaben in counts per minute), gemessen an *in vitro* stimulierten B-Zellen von Buffy Coat 2 und 3, als Maß für deren DNA-Syntheseleistung.

III.2.2 Telomerlängendynamik von *in vitro* stimulierten T-Zellen

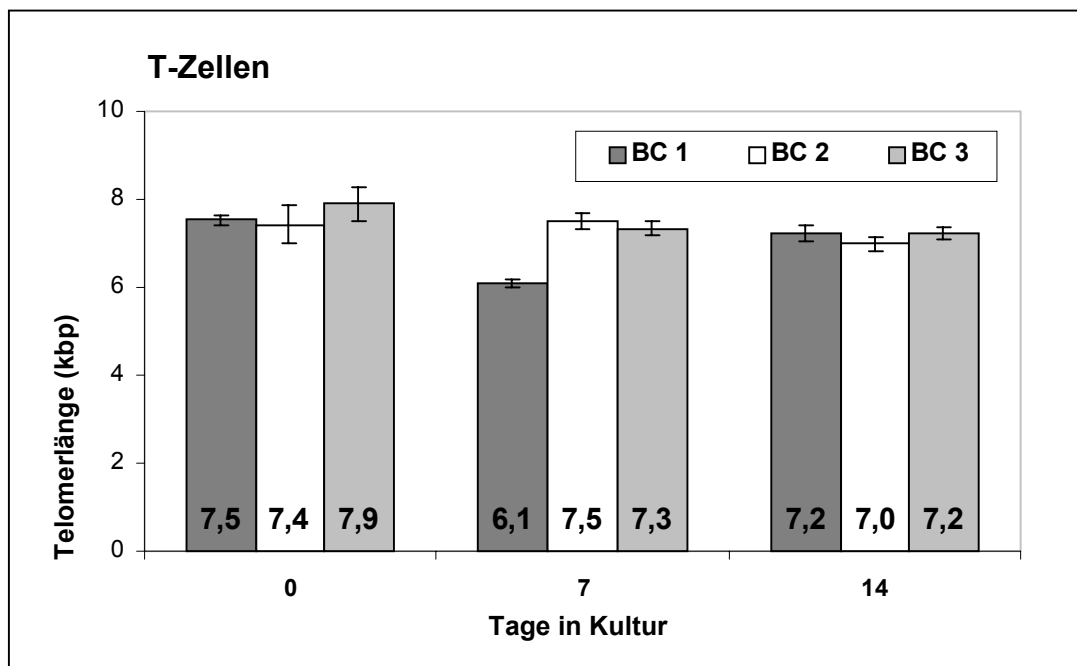


Abbildung III.2.3: Telomerlängendynamik von *in vitro* stimulierten T-Zellen: Abgebildet sind für die drei Buffy Coats (BC 1, 2 und 3) die durch Mehrfachmessungen mit der Flow-FISH-Methode ermittelten durchschnittlichen Telomerlängen der T-Zellen am Tag 0, 7 und 14 der Kultur (n = 2-4).

Die mit OKT-3 und IL-2 stimulierten T-Zellen der drei Buffy Coats wurden jeweils 14 Tage in Kultur gehalten. An den Tagen 0, 7 und 14 wurden den Kulturen Zellen zur Telomerlängenmessung (mittels Flow-FISH) entnommen.

Im Gegensatz zur eben beschriebenen Telomerlängendynamik der stimulierten B-Zellen bleiben die Telomerlängen der T-Zellen nach Stimulation eher gleich bzw. nehmen sogar geringfügig ab (siehe Abbildung III.2.3), mit einem mittleren Längenverlust von 500 bp im Lauf von 14 Tagen (*mean* \pm *SD* der Telomerlängen: *Tag 0*: $7,6 \pm 0,2$ kbp, *Tag 7*: $7,0 \pm 0,8$ kbp, *Tag 14*: $7,1 \pm 0,1$ kbp). Dabei weist die Proliferation der T-Zellen in Kultur ab dem 3. Tag durchwegs positive Populations-Verdopplungs- (= *PD*)-Werte auf, mit einem Verdopplungsmaximum zwischen Tag 5 und 10 für alle drei *Buffy Coats* (siehe Abbildung III.2.4: BC 1 und BC 2: 1,3 bzw. 1,8 *PD* von *Tag 7* auf *Tag 10*; BC 3: 1,3 *PD* von *Tag 5* auf *Tag 7*).

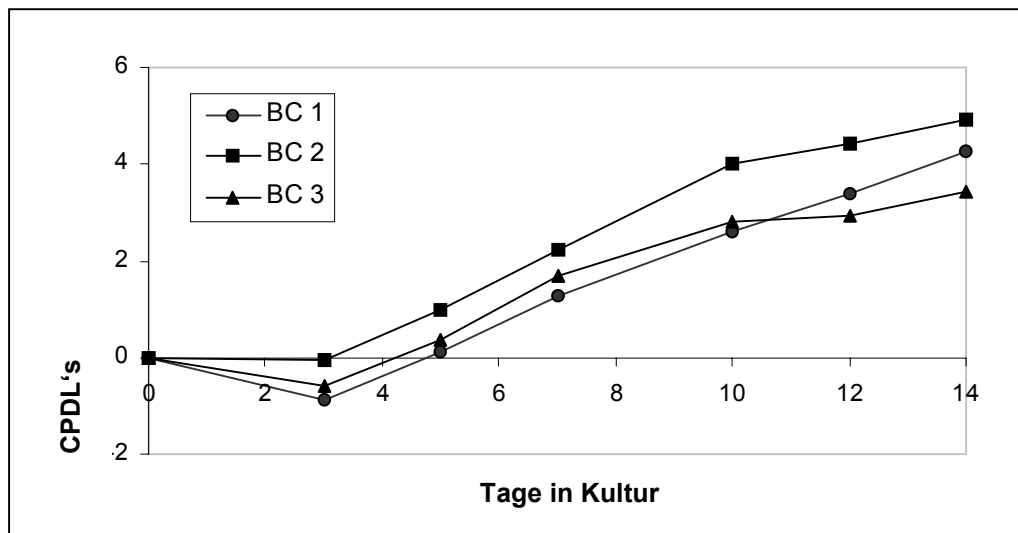


Abbildung III.2.4: Proliferation der T-Zellen in Kultur: Als Maß für die Teilungsrate der Zellen im Kulturverlauf ist hier für alle drei Buffy Coats (BC 1, 2 und 3) der sogenannte kumulative Populations-Verdopplungs-Level (CPDL) der T-Zellen dargestellt (siehe auch Kapitel II.6.1.3).

III.2.3 Bestimmung der Telomerlängen mittels unterschiedlicher Messverfahren (Flow-FISH vs. Q-FISH vs. Southern Blot)

Um oben aufgeführte Ergebnisse zu bestätigen und zu verifizieren, wurden, wenn genügend Zellen vorhanden waren, die Telomerlängen der stimulierten B- und T-Zellen außer mit Flow-FISH auch noch mit Southern Blot und/oder Q-FISH gemessen. Stellvertretend für alle drei Buffy Coats sind in Tabelle III.2.2 die Ergebnisse der drei

Messtechniken für *Buffy Coat* 3 nebeneinander aufgeführt, da diese *Buffy Coat*-Probe aufgrund ihrer hohen Zellzahlen den vollständigsten Vergleich ermöglicht.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind – für alle drei Messtechniken übereinstimmend – sowohl die Telomerlängen als auch der Längenzuwachs im Verlauf der Kultur (nach *in vitro* Stimulation) bei B-Zellen deutlich höher als bei T-Zellen. Innerhalb der B-Zellen wiederum ist der Telomerlängenzuwachs (vor allem innerhalb der ersten 5 Tage) bei der kombinierten Stimulation mit SAC und IL-2 auffällig größer als bei der Stimulation mit SAC allein (siehe auch Abbildung III.2.5). Dabei schreitet die Telomerverlängerung bei den mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen mit relativ hoher Geschwindigkeit voran: Am Tag 3 sind ihre Telomere im Vergleich zu der Stimulation mit SAC allein bereits um 15% länger (Q-FISH-Messung: 1045,8 vs. 905,8 IOD), am Tag 5 beträgt diese Längendifferenz zwischen den beiden Stimulationsbedingungen ganze 18% (Flow-FISH-Messung: 11,4 vs. 9,7 kbp).

B-Zellen	Tag	Flow-FISH (kbp)		Q-FISH (IOD)		Southern (kbp)
+ SAC	0	9,2	± 0,1	-	-	-
	3	-	-	905,8	± 291,3	-
	5	9,7	± 0,3	-	-	-
	10	9,0	± 0,3	-	-	9,9
+ SAC + IL-2	0	9,2	± 0,1	-	-	-
	3	-	-	1 045,8	± 363,5	-
	5	11,4	± 0,2	-	-	12,1
	10	9,8	± 0,1	-	-	11,1

T-Zellen

+ IL-2 + OKT-3	0	7,9	± 0,4	-	-	-
	5	-	-	666,1	± 346,0	-
	7	7,3	± 0,2	-	-	6,4
	12	-	-	679,5	± 345,8	-
	14	7,2	± 0,2	-	-	6,2

Tabelle III.2.2: Übersicht über die Messergebnisse der Telomerlängen der stimulierten B- und T-Zellen von *Buffy Coat* 3 anhand dreier unterschiedlicher Messtechniken (Flow-FISH, Q-FISH und Southern Blot). Die Q-FISH-Werte sind in willkürlichen Einheiten in Form der „integrierten optischen Dichte“ (IOD: Integrated Optical Density) ausgedrückt. Für Flow- und Q-FISH sind die Werte als Mittelwerte (grau unterlegt) ± Standardabweichungen aufgeführt.

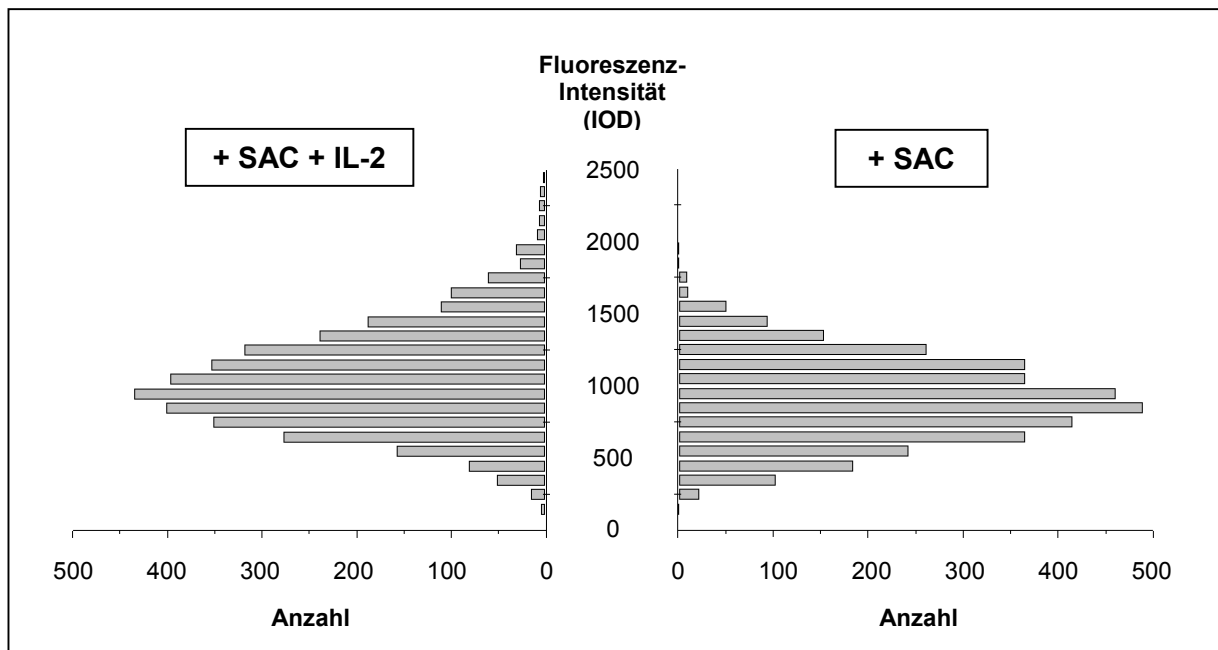


Abbildung III.2.5: Histogramme der mit der Q-FISH-Methode gemessenen Telomerfluoreszenzen der kultivierten B-Zellen von Buffy Coat 3 am Tag 3 (angegeben in integrierter optischer Dichte: Integrated Optical Density: IOD). Der Mittelwert für die mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen (linkes Histogramm) beträgt 1045,8 IOD, der Mittelwert für die ausschließlich mit SAC stimulierten B-Zellen (rechtes Histogramm) 905,8 IOD.

III.2.4 Zusammensetzung von Subpopulationen innerhalb der B-Zell-Kulturen

III.2.4.1 Anteil der B-Gedächtniszellen

Um den Anteil an B-Gedächtniszellen innerhalb der stimulierten B-Zellen festzustellen, wurde bei den Zellen von BC 2 und 3 zu bestimmten Zeitpunkten die Expression des CD27-Oberflächenantigens am FACS gemessen und quantifiziert.

Wie in Abbildung III.2.6 gezeigt wird, kommt es unter beiden Stimulationsbedingungen zu einem deutlichen Verlust an CD27⁺-Zellen (von 28,5% zu Kulturbeginn auf 1,5% für SAC allein bzw. 4,2% für SAC und IL-2 nach 10 Tagen in Kultur). Unter Stimulation mit SAC und IL-2 nimmt der Anteil an B-Gedächtniszellen eher gegen Ende der Kulturzeit ab (von 24,6% auf 4,2% zwischen Tag 5 und 10) und liegt zum Schluss geringfügig höher als unter ausschließlicher SAC-Stimulation, bei welcher der größte Verlust gleich innerhalb der ersten 5 Tage erfolgt (von 28,5% auf 6,0% zwischen Tag 0 und 5).

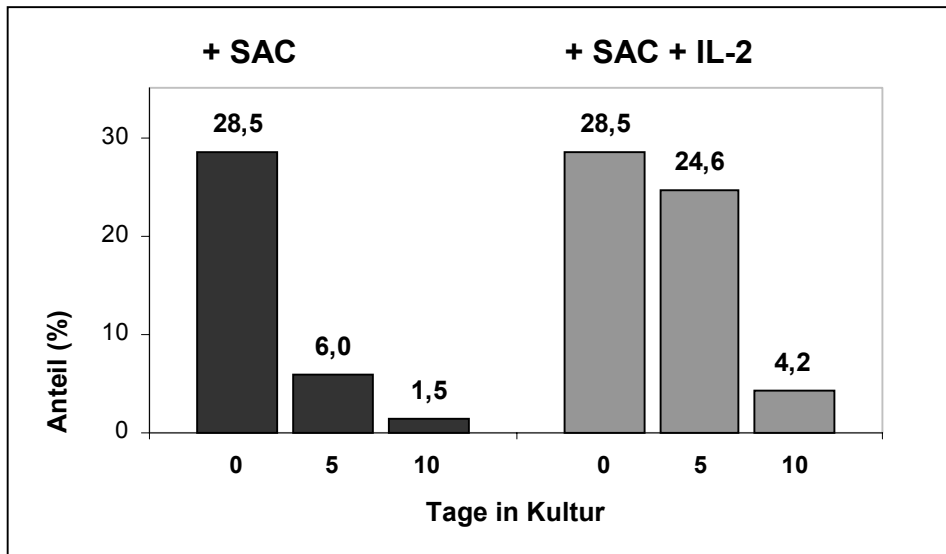


Abbildung III.2.6: Anteil der B-Gedächtniszellen in den stimulierten B-Zellkulturen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der am FACS gemessenen Reinheiten von $CD19^+CD27^+$ Zellen für Buffy Coat 1 und 2 (dementsprechend $n = 2$) am Tag 0, 5 und 10 der Kultur (dunkel: nur mit SAC, hell: mit SAC und IL-2 stimulierte B-Zellen).

III.2.4.2 Anteil der B-Plasmazellen

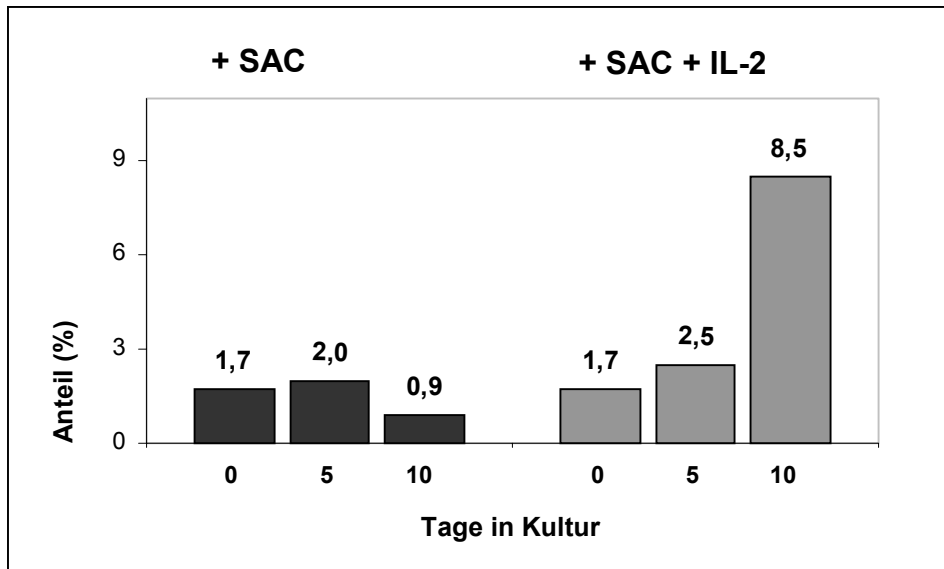


Abbildung III.2.7: Anteil der Plasmazellen in den stimulierten B-Zellkulturen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der am FACS gemessenen Reinheiten von $B4^+CD38^+$ Zellen für Buffy Coat 1, 2 und 3 (dementsprechend $n = 3$) am Tag 0, 5 und 10 der Kultur (dunkel: nur mit SAC, hell: mit SAC und IL-2 stimulierte B-Zellen).

Zusätzlich wurde das Differenzierungspotential der B-Zellen zu Plasmazellen unter SAC und IL-2 Stimulierung untersucht. Zu diesem Zweck wurde bei allen drei *Buffy Coats* an verschiedenen Tagen am FACS der Anteil an B-B4⁺CD38⁺-Zellen (welche Plasmazellen repräsentieren (Wijdenes *et al*, 1996)) innerhalb der stimulierten B-Zellen bestimmt (siehe Abbildung III.2.7).

Der Plasmazellanteil innerhalb der nur mit SAC stimulierten B-Zellen nimmt im Lauf der Kultur ab (von 1,7% zu Kulturbeginn auf 0,9% nach 10 Tagen). Im Gegensatz dazu kommt es bei den mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen zu einem Anstieg an B-B4⁺CD38⁺-Zellen bis zu einem Durchschnittswert von 8,5% (Mittelwerte: BC 1: 12,7%, BC 2: 5,7%, BC 3: 7,0%), was für eine partielle Ausdifferenzierung zu Plasmazellen unter diesen Stimulationsbedingungen spricht (siehe auch Abbildung III.2.8).

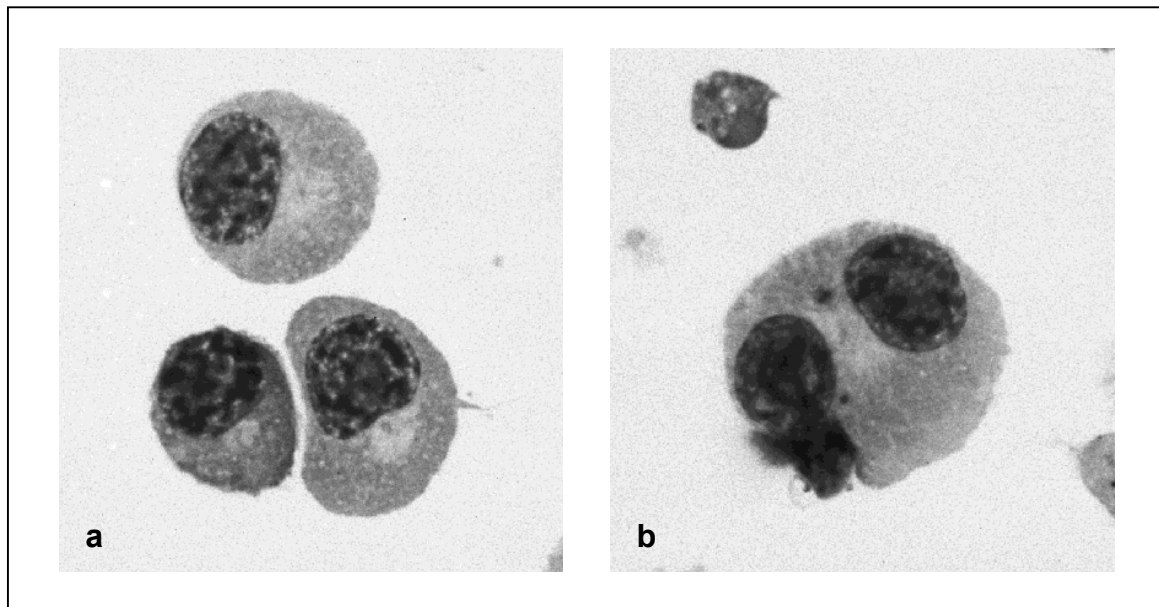


Abbildung III.2.8: Plasmazellen nach Cytospin der mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen (Buffy Coat 2) am Tag 5 der Kultur. **a:** drei einzelne Plasmazellen, **b:** Plasmazelle in Teilung.

III.2.5 Telomerase-Aktivität in den *in vitro* stimulierten B-Zellen

In unstimulierten, aus Tonsillen bzw. peripherem Blut isolierten B-Zellen ist keine Telomerase-Aktivität nachweisbar (Weng *et al*, 1997a; Igarashi & Sakaguchi, 1997). Durch bestimmte Stimulationsreize können Proliferation und Telomerase-Aktivität der B-Zellen jedoch in unterschiedlichem Ausmaß angeregt werden.

Um herauszufinden, ob die unterschiedliche Telomerverlängerung der nur mit SAC bzw. mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen auf eine entsprechende Aktivierung der Telomerase in diesen Zellen zurückgeführt werden kann, wurde für BC 2 und 3 an zwei verschiedenen Zeitpunkten die Telomerase-Aktivität mithilfe des TRAP-Assays gemessen.

Abbildung III.2.9 zeigt für den Tag 5 eine mäßig erhöhte Telomerase-Aktivität in den kultivierten B-Zellen, wobei jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Stimulationsbedingungen erkennbar ist. Nach 10 Tagen in Kultur konnte überhaupt keine Telomerase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Verglichen mit der immortalen Phoenix-Ampho-Zelllinie erreicht die Telomerase-Aktivität in den stimulierten B-Zellen – trotz der enormen Telomerverlängerung innerhalb kürzester Zeit – nur einen auffallend niedrigen Telomerase-Level (6-fach niedriger als in den Phoenix-Ampho-Zellen).

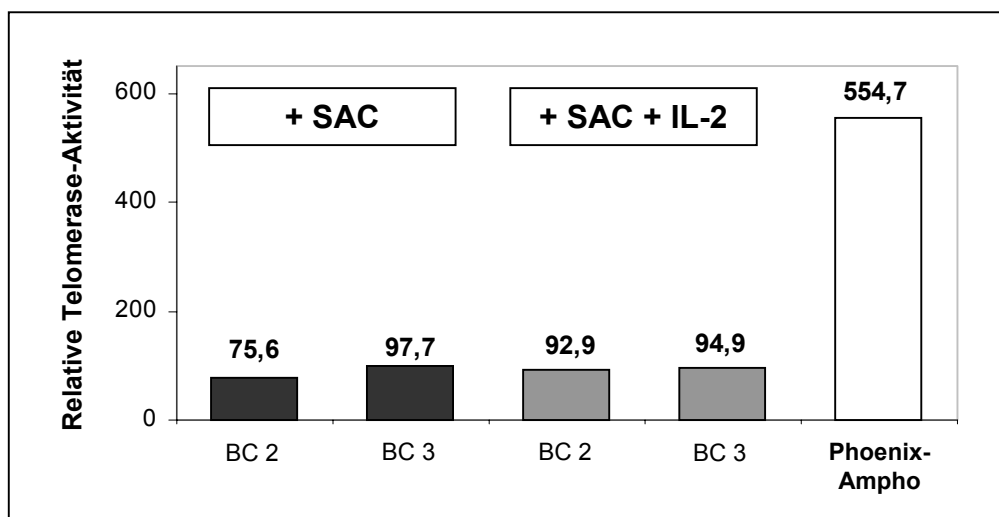


Abbildung III.2.9: Telomerase-Aktivität in den *in vitro* stimulierten B-Zellen. Dargestellt sind die mit dem TRAP-Assay gemessenen relativen Telomerase-Aktivitätslevel der B-Zellen von Buffy Coat (BC) 1 und 2 (dunkel: nur mit SAC, hell: mit SAC und IL-2 stimulierte B-Zellen). Als positive Kontrolle dienen Aliquots der transformierten Phoenix-Ampho-Zelllinie (ganz hell).

IV. DISKUSSION

IV.1 Telomerlängenanalyse von B- und T-Zellen *in vivo*

Der fortschreitende Verlust telomerer Sequenzen stellt ein allgemeines Phänomen in sich teilenden menschlichen Körperzellen dar, welches auch in Lymphozyten nachweisbar ist. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass hierbei jedoch deutliche Unterschiede zwischen B- und T-Lymphozyten bestehen, sowohl bezüglich der absoluten Telomerlängen (bei einzelnen Individuen) als auch bezüglich der Telomerlängendynamik im Verlauf des menschlichen Lebens.

IV.1.1 Heterogenität der Telomerlängen von B- und T-Zellen *in vivo*

Die Messung der Telomerlängen in peripheren B-(CD19⁺)- und T-(CD3⁺)-Zellen von 53 Spendern im Alter von 0 bis 92 Jahren mit der Flow-FISH-Methode ergab, dass die Telomere der B-Zellen bei allen erwachsenen Individuen (≥ 20 Jahre) deutlich länger als die der T-Zellen sind, mit einer durchschnittlichen Differenz von 1,1 kbp.

In einer kürzlich von Son *et al* veröffentlichten Arbeit wurden ebenfalls mittels Flow-FISH die Telomerlängen in CD4⁺, CD8⁺ und CD19⁺ Lymphozyten von 121 Individuen im Alter von 0 bis 94 Jahren bestimmt (Son *et al*, 2000). Bezogen auf die gesamte Alterspopulation weisen in dieser Studie die CD4⁺ T-Zellen im Durchschnitt die längsten Telomere auf (7,6 kbp), gefolgt von den CD19⁺ B-Zellen (7,1 kbp) und den CD8⁺ T-Zellen (6,3 kbp), was zunächst kontrovers zu unseren Ergebnissen erscheint. Ein direkter Vergleich der von Son *et al* präsentierten Daten mit unseren Ergebnissen ist jedoch vor allem deswegen schwierig, weil in unserer Studie die gesamte CD3⁺ T-Zellpopulation erfasst wird, wohingegen deren Messungen sich auf einzelne CD3⁺ Subpopulationen (CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ T-Effektorzellen) beziehen.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich die CD3⁺ T-Zellpopulation zu 95% aus CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten zusammensetzt und das Verhältnis dieser beiden Subpopulationen im peripheren Blut etwa 2:1 beträgt (Parslow, 2001), lassen sich aus deren Telomerlängen annähernde Schätzwerte für die durchschnittliche Telomerlänge der gesamten CD3⁺ Population extrapolieren. Rechnet man die von Son *et al*. angegebenen durchschnittlichen Telomerlängen bestimmter Altersgruppen (20-39 Jahre / 40-59 Jahre / 60-79 Jahre und ≥ 80 Jahre, vergleiche auch Tabelle III.1.3 und

Abbildung III.1.4) entsprechend um, so weisen auch hier die CD19⁺ B-Zellen zumindest für alle Altersgruppen ≥ 40 Jahre längere Telomere als die CD3⁺ T-Zellen auf, wobei die Differenz jedoch – verglichen mit unseren Ergebnissen – nur sehr gering ausfällt.

Möglicherweise ist für die abweichenden Resultate auch die unterschiedliche Ausführung der Flow-FISH-Methode (zum Beispiel die bei Son *et al.* um 5°C niedrigere Hybridisierungstemperatur als in unserem Protokoll) mit verantwortlich. Als positive Bestätigung unserer (auf Flow-FISH-Messungen basierenden) Ergebnisse dienen die zusätzlich durchgeführten Telomerlängenbestimmungen mit der Southern Blot- und Q-FISH-Methode, welche ebenfalls ergaben, dass die Telomere in B-Zellen deutlich länger als in T-Zellen sind (vergleiche Tabelle III.2.2).

Interessanterweise liegt dieser signifikante Unterschied zwischen den Telomerlängen von B- und T-Zellen bei Neugeborenen nicht vor (wie wir anhand von 15 Nabelschnurblutproben feststellen konnten). Vielmehr weisen hier beide Subpopulationen annähernd gleich lange Telomere auf, wobei die T-Zellen im Durchschnitt sogar geringfügig über den B-Zellen liegen (9,4 kbp vs. 9,1 kbp). Der gegenüber B-Zellen deutlich größere Telomerlängenunterschied zwischen den T-Zellen von Neugeborenen und Erwachsenen deutet auf eine unterschiedliche Telomerlängendynamik dieser beiden Subpopulationen hin (vergleiche Tabelle III.1.3: die durchschnittliche Telomerlängendifferenz zwischen Neugeborenen und der Altersgruppe „20-39 Jahre“ beträgt für B-Zellen nur 0,1 kbp, für T-Zellen dagegen 1,6 kbp).

IV.1.2 Unterschiedliche Telomerlängendynamik von B- und T-Zellen *in vivo*

Basierend auf unseren Flow-FISH-Messergebnissen ergibt sich für die gesamte Altersspanne (0-92 Jahre) ein durchschnittlicher jährlicher Telomerlängenverlust von 32 bp für die CD3⁺ T-Zellen, wohingegen die CD19⁺ B-Zellen eine nur rund halb so große Telomerverlustrate von 14 bp pro Jahr aufweisen.

Während der durchschnittliche Telomerverlust der T-Zellen – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen ähnlicher Studien – in der auf die meisten somatischen Zellen zutreffenden Größenordnung von 30-50 bp pro Jahr liegt (Vaziri *et al.*, 1993; Vaziri *et al.*, 1994; Slagboom *et al.*, 1994; Son *et al.*, 2000), heben sich die B-Zellen durch ihren auffallend langsamer voranschreitenden Telomerverlust dagegen deutlich von dieser relativ einheitlichen Telomerlängendynamik der übrigen Körperzellen ab.

Angesichts der aufgezeigten Unterschiede in den Telomerlängenprofilen von Neugeborenen und Erwachsenen und der in unserer Versuchsreihe fehlenden Messwerte für den Altersbereich zwischen 0 und 20 Jahren, erschien es sinnvoll, die Telomerlängendynamik für das Erwachsenenalter (≥ 20 Jahre) separat zu analysieren. Dabei stellten wir fest, dass der Telomerverlust in B- und T-Zellen ab dem 20. Lebensjahr praktisch gleich schnell voranschreitet und in beiden Subpopulationen bei etwa 20 bp pro Jahr liegt. Der auf die gesamte Alterspopulation bezogene Durchschnittswert des jährlichen Telomerverlusts setzt sich aus den Werten einzelner Altersabschnitte zusammen. Da diese im Erwachsenenalter für B- und T-Zellen annähernd gleich sind (~ 20 bp/Jahr), muss die signifikante Differenz in der Telomerdynamik der beiden Subpopulationen (14 vs. 32 bp/Jahr) auf dementsprechend ausgeprägte Unterschiede innerhalb der ersten 20 Lebensjahre zurückzuführen sein. Dies deutet darauf hin, dass die T-Zellen in der Kindheit eine extrem beschleunigte Telomerverkürzung erfahren, wohingegen die B-Zellen in derselben Zeitspanne kaum einen Nettoverlust ihrer Telomere aufweisen.

Entsprechende Unterschiede in der Telomerlängendynamik von Erwachsenen und Kindern wurden auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt, die ähnliche Messungen in peripheren Blutleukozyten (PBLs) (Frenck *et al*, 1998), mononukleären Zellen (MNCs) (Iwama *et al*, 1998; Zeichner *et al*, 1999), Granulozyten und Lymphozyten (Rufer *et al*, 1999) durchführten. Für alle diese Zellpopulationen ergab sich dabei ein rapider Telomerverlust in der Kindheit – vornehmlich im 1.-3. Lebensjahr –, gefolgt von einer deutlich niedrigeren Telomerverlustrate mit zunehmendem Alter. Rufer *et al*, deren Studie an 500 Individuen durchgeführt wurde und im Vergleich zu unseren Daten vor allem genauere Aussagen bezüglich der frühen Altersabschnitte erlaubt, stellten fest, dass die bisegmentale Analyse der Messdaten einer adäquaten Charakterisierung der Telomerdynamik am ehesten gerecht wird, und dass der für Lymphozyten optimale Einschnitt (*cut-off point*) bei 1,5 Jahren liegt (Rufer *et al*, 1999). Daraus ergibt sich in ihrer Studie für Lymphozyten ein Telomerverlust von über 1000 bp pro Jahr innerhalb der ersten 1,5 Lebensjahre, der sich mit fortschreitendem Alter auf Werte um 30 bp pro Jahr einpendelt. Die Arbeitsgruppe von Frenck *et al* kommt zu ähnlichen Ergebnissen, postuliert aber zwischen der extremen Telomerverkürzung in der Kindheit und dem mäßigeren Telomerverlust im Erwachsenenalter noch eine dritte, sogenannte Plateauphase mit stabilisierten Telomerlängen (vom 5. Lebensjahr bis ins junge Erwachsenenalter reichend) (Frenck *et al*, 1998). Übereinstimmend lässt sich schlussfolgern, dass eine lineare Verteilung der auf die gesamte Altersspanne bezogenen Messdaten keinesfalls ausreicht, um die differenzierte Telomerdynamik einer Zellpopulation angemessen zu beschreiben.

Der von uns für die segmentale Analyse gewählte Einschnitt bei 20 Jahren ist auf das Fehlen von Messdaten für die Altersabschnitte < 20 Jahre zurückzuführen, da leider kaum Blutproben aus der Kinderklinik zu gewinnen waren. Dies ermöglicht zwar relativ genaue Aussagen über die Telomerdynamik von B- und T-Zellen im Erwachsenenalter, lässt jedoch bezüglich der interessanten frühen Altersabschnitte nur Spekulationen zu. Es ist aber anzunehmen, dass entsprechend den aufgezeigten Ergebnissen vergleichbarer Studien (Rufer *et al*, 1999; Frenck *et al*, 1998) die (für eine differenzierte Analyse) optimalen Einschnitte auch für B- und T-Lymphozyten innerhalb der ersten Lebensjahre zu setzen sind, und sich die angedeuteten Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen bereits in dieser frühen Phase (≤ 3 . Lebensjahr) etablieren.

IV.1.3 Interpretation und klinische Bedeutung

Aus unserer *in vivo* Telomerlängenanalyse von B- und T-Zellen lassen sich folgende drei Schlussfolgerungen ableiten:

- 1) Sowohl T- als auch B-Lymphozyten erfahren mit fortschreitendem Alter einen graduellen Telomerverlust.
- 2) Die Telomerdynamik der beiden Subpopulationen weist in der Kindheit deutliche Unterschiede auf (bedingt durch den von allen anderen Leukozyten abweichenden Verlauf in den B-Zellen), mit dem Ergebnis, dass
- 3) die Telomere der B-Zellen im Erwachsenenalter um eine konstante Differenz von etwa 1 kbp länger sind als die der T-Zellen.

Diese drei Punkte stellen die Grundlage für die nachfolgende Interpretation unserer Ergebnisse dar.

IV.1.3.1 *In vivo* Telomerdynamik von T-Zellen

Das menschliche Immunsystem ist in den ersten Lebensjahren tiefgreifenden Veränderungen unterworfen, die mit der Ausreifung des funktionell noch mangelhaften, frühkindlichen Immunsystems in Zusammenhang stehen (Zeichner *et al*, 1999). In dieser Phase wird das noch ungeprägte Immunsystem des Neugeborenen einer Vielzahl neuer Antigene ausgesetzt, was im Rahmen der dadurch ausgelösten Proliferation, Ausdifferenzierung und Apoptose einen immensen Zellumsatz (sowohl der hämatopoietischen Stammzellen als auch der peripheren Lymphozyten) zur Folge hat.

Der beschleunigte Telomerverlust der T-Zellen in der Kindheit lässt sich dementsprechend auf zwei wesentliche Vorgänge zurückführen: Einerseits auf die enorme Zellproliferation in dieser Zeitspanne, die mit einer replikationsbedingten Telomerverkürzung einhergeht, und andererseits – als Folge der vermehrten Aktivierung naiver T-Zellen durch neue Antigene – auf die Ausreifung zahlreicher T-Gedächtniszellen, die ebenfalls an einen definierten Telomerverlust gekoppelt ist (Weng *et al*, 1995) (siehe auch Einleitung, Kapitel I.3.2).

Nachdem das Immunsystem im 1.-3. Lebensjahr seine volle funktionale Kapazität erreicht hat, kommt es (unter anderem aufgrund der abnehmenden Anzahl neuer Antigene) zu einem gemäßigten Zellumsatz und einem entsprechend geringeren, wenngleich kontinuierlich voranschreitenden Telomerverlust mit wachsendem Alter. Dieser basiert einerseits auf einer prozentualen Verschiebung innerhalb der CD3⁺ Subpopulationen im Verlauf des Lebens, bedingt durch die stetige Zunahme von CD4⁺ Gedächtniszellen und CD8⁺CD28⁻ T-Zellen, die beide kürzere Telomere als ihre naiven (CD4⁺ bzw. CD8⁺CD28⁺) Vorläuferzellen aufweisen (Rufer *et al*, 1999; Effros & Pawelec, 1997; Fagnoni *et al*, 2000; Monteiro *et al*, 1996), und andererseits auf einer entsprechenden Telomerverkürzung in den hämatopoietischen Stammzellen, aus denen die T-Zellen hervorgehen (Vaziri *et al*, 1994).

IV.1.3.2 *In vivo* Telomerdynamik von B-Zellen

Einen auffällig anderen Verlauf weist dagegen die Telomerdynamik der B-Zellen auf. Auch die B-Zellen unterliegen in den ersten Lebensjahren einer immensen Proliferation und vermehrten Ausdifferenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen bzw. langlebigen B-Gedächtniszellen. Der hierzu scheinbar konträre, nur minimale Telomerverlust der B-Zellen in dieser Phase könnte auf deren Fähigkeit zurückzuführen sein, stimulationsbedingt hohe Level an Telomerase zu exprimieren (Norrback *et al*, 1996; Igarashi & Sakaguchi, 1997; Hu *et al*, 1997). So wiesen Weng *et al* zum Beispiel nach, dass es während der Ausdifferenzierung aktivierter B-Zellen in den Keimzentren durch die Induktion von Telomerase sogar zu einer Telomerverlängerung kommt (Weng *et al*, 1997a). Von unserer Arbeitsgruppe wurde zudem festgestellt, dass (CD19⁺CD27⁺) B-Gedächtniszellen deutlich längere Telomere als (CD19⁺CD27⁻) naive B-Zellen aufweisen und somit maßgeblich für die vergleichsweise hohen durchschnittlichen Telomerlängen der gesamten CD19⁺ Population bei Erwachsenen verantwortlich sind (Martens *et al*, 2002). Ausgehend von diesen Erkenntnissen und den in vorliegender Arbeit präsentierten Daten ließe sich die Telomerdynamik der B-Zellen anhand des folgenden Modells erklären:

Während der Ausreifung und Differenzierung der B-Zellen in den ersten Lebensjahren kommt es im Gegensatz zu den T-Zellen durch die Expression von Telomerase zu einer Telomerverlängerung, wodurch sich zwischen den beiden Subpopulationen eine entsprechende Telomerlängendifferenz ausbildet (vergleiche Abbildung III.1.7). Nach Abschluss der zellteilungsaktiven, frühkindlichen Phase erfahren jedoch auch die B-Zellen mit zunehmendem Alter einen fortschreitenden Telomerverlust, der wie bei den T-Zellen zumindest teilweise auf einen entsprechenden Verlust in den hämatopoietischen Stammzellen zurückzuführen ist. Aber auch in den – zunächst mit überdurchschnittlich langen Telomeren ausgestatteten – langlebigen B-Gedächtniszellen findet durch Re-Aktivierung infolge wiederholter Antigenkontakte und nachfolgender klonaler Expansion im Laufe des Lebens ein gradueller Telomerverlust statt. Dennoch bleibt die in der Kindheit etablierte Telomerlängendifferenz zwischen B- und T-Zellen (mit deutlich längeren Telomeren in den B-Zellen) auch mit zunehmendem Alter bestehen, da die Telomerdynamik beider Subpopulationen im Erwachsenenalter einen annähernd parallelen Verlauf aufweist (vergleiche Abbildung III.1.8).

Für die Ausreifung von B-Lymphozyten und insbesondere die Entwicklung eines effektiven Immungedächtnisses in Form von langlebigen B-Gedächtniszellen (mit entsprechend langen Telomeren) scheint die Telomerase-Expression also eine wichtige Rolle zu spielen. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Untersuchungen an Telomerase-knock-out Mäusen (Herrera *et al*, 2000): In den späten Generationen solcher telomerase-defizienter Mäuse kommt es infolge extrem kurzer Telomere der Lymphozyten zu einer deutlich verminderten Ausbildung von Keimzentren im Rahmen einer Immunantwort und somit in erster Linie zu einer Abschwächung der (B-Zell-vermittelten) humoralen Immunität. Die funktionelle Bedeutung der Telomerase für B-Zellen stellt hinsichtlich des potentiellen klinischen Einsatzes von Telomerase-Inhibitoren in der Krebstherapie einen wichtigen Aspekt dar, da eine entsprechende Immundefizienz im B-Zell-System als schwerwiegende Nebenwirkung während einer solchen Therapie zu erwarten wäre.

IV.1.3.3 Bedeutung der unterschiedlichen Telomerdynamik von T- und B-Zellen für die Immunoseneszenz

Eine weitere interessante Frage, die sich bei der Interpretation der vorliegenden Daten stellt, ist, inwiefern sich die unterschiedliche Telomerdynamik der B- und T-Zellen auf den Prozess der Immunoseneszenz auswirkt. Ausgehend von der Tatsache, dass die altersbedingte Telomerverkürzung in T-Zellen bereits in der Kindheit von kürzeren Telomeren ihren Ausgang nimmt als in B-Zellen und anschließend in beiden Subpopulationen mit ähnlicher Geschwindigkeit voranschreitet, müssten die T-Zellen ihre replikative Kapazität früher als die B-Zellen aufgebraucht haben und somit vor diesen den Zustand der Zellseneszenz erreichen.

Hierzu würde auch die auf mehreren Studien basierende Beobachtung gut passen, dass sich die Alterungsvorgänge bei immunkompetenten Zellen in erster Linie im T-Zell-System abspielen (Miller, 1996; Hodes, 1997). Ob diese unter dem Begriff Immunoseneszenz zusammengefassten Vorgänge *in vivo* jedoch eine direkte Folge der replikativen Seneszenz von Immunzellen sind, ist bislang nicht erwiesen. Geht man vielmehr von dem in unserer Arbeit für die gesamte Alterspopulation errechneten durchschnittlichen jährlichen Telomerverlust von 32 bp in T-Zellen und einer durchschnittlichen Telomerlänge von 9,4 kbp bei Geburt aus, so würden die T-Zellen ihre Telomere erst nach mehr als 150 Jahren aufgebraucht haben, und bei den B-Zellen wäre diese Zeitspanne sogar noch länger (hierbei wurden gemäß unserer Eichgerade 3,78 kbp als subtelomeraler Bereich berücksichtigt). Laut dieser Berechnung dürfte es im Laufe des menschlichen Lebens in keiner der beiden Zellpopulationen zur replikativen Erschöpfung kommen. Da jedoch nicht die durchschnittliche Telomerlänge einer Zelle, sondern das kürzeste in der Zelle vorkommende Telomer für die Einleitung der Zellseneszenz verantwortlich ist (Hemann *et al*, 2001), stellt diese Kalkulation nur eine Annäherung dar. Ausgehend von der Tatsache, dass die Telomere einzelner Chromosomen beträchtliche Längenunterschiede aufweisen (Lansdorp *et al*, 1996; Martens *et al*, 1998), ist es somit wahrscheinlich, dass die kürzesten von ihnen noch innerhalb der menschlichen Lebensspanne ihr replikatives Potential verbraucht haben und zum endgültigen Teilungs-Stop der Zelle führen. Eine Untersuchung der Lymphozyten älterer Individuen mit der Q-FISH-Methode, welche die Messung der Telomere jedes einzelnen Chromosoms in einer Zelle ermöglicht (Martens *et al*, 1998), könnte diesbezüglich genauere Aussagen liefern, bedarf jedoch verglichen mit der Flow-FISH-Technik weit höherer Zellzahlen (was bei der Gewinnung und Verarbeitung von Blutproben älterer Individuen häufig problematisch ist).

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen replikativer Telomerverkürzung in Immunzellen und Immunoseneszenz wäre eine longitudinale Studie an Patienten nach Knochenmarkstransplantation von besonderem Interesse, da die transplantierten Knochenmarkszellen in der Phase der Restitution des Immunsystems einem extremen Proliferationsschub und dementsprechend rapiden Telomerverlust unterliegen (Notaro *et al*, 1997; Lee *et al*, 1999). Somit sind auch die peripheren Lymphozyten dieser Patienten im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen mit kürzeren Telomeren ausgestattet, weshalb eine frühere (also vorzeitige) Erschöpfung ihres replikativen Potentials zu erwarten wäre.

Abschließend lässt sich sagen, dass vor allem in Hinsicht auf die in der vorliegenden Arbeit beschriebene *in vivo* Telomerdynamik von B-Zellen eine genauere (d.h. auf ausreichend Messdaten beruhende) Untersuchung der diesbezüglich besonders interessanten frühen Lebensabschnitte notwendig ist.

IV.2 Telomerlängenanalyse von B- und T-Zellen *in vitro*

Für die klonale Expansionsfähigkeit aktivierter Lymphozyten spielt ihre Fähigkeit, stimulationsbedingt Telomerase zu re-aktivieren und somit ihre proliferative Kapazität zu erweitern, eine entscheidende Rolle (Hiyama *et al*, 1995). Diese transiente Telomerase-Expression reicht langfristig nicht aus, um B- bzw. T-Lymphozyten vor einem mit zunehmendem Alter fortschreitenden replikativen Telomerverlust zu bewahren, führt jedoch – wie im ersten Abschnitt unserer Studie gezeigt wurde – gegenüber anderen somatischen Zellen zu einer Verlangsamung dieses Alterungsprozesses. Um die unmittelbaren (d.h. kurzfristigen) Auswirkungen der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten in Bezug auf ihre Telomerdynamik zu untersuchen, wurden im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit die Telomere von *in vitro* stimulierten Zellen beider Subpopulationen gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen lassen auf deutliche Unterschiede der Telomerdynamik aktivierter B- und T-Lymphozyten schließen.

IV.2.1 Unterschiedliche Telomerlängendynamik von *in vitro* stimulierten B- und T-Zellen

Während der Kultur von stimulierten B-Zellen erfolgte innerhalb der ersten fünf Tage eine rapide Telomerverlängerung, die in eindrucksvollem Kontrast zu der in stimulierten T-Zellen beobachteten Telomerverkürzung steht (siehe Abbildung III.2.1 und III.2.3). Dabei kam es bei der kombinierten Stimulation der B-Zellen mit SAC (*Staphylococcus aureus Cowan strain 1*) und IL-2 (*Interleukin 2*) zu einem weit deutlicheren Telomerzuwachs als bei dem alleinigen Einsatz von SAC (1,8 kbp vs. 0,8 kbp zwischen Tag 0 und 5).

Eine Telomerverlängerung ähnlichen Ausmaßes wurde von Weng *et al* in tonsillären B-Lymphozyten nach *in vivo* Aktivierung beobachtet (Weng *et al*, 1997a): Seine Arbeitsgruppe stellte fest, dass die aktivierten B-Zellen der Keimzentren über deutlich längere Telomere als ruhende naive oder Gedächtnis-B-Zellen desselben Gewebes verfügen, und führte dies auf die in stimulierten Keimzentrum-Zellen (insbesondere Zentrozyten und Zentroblasten) nachgewiesene hohe Telomerase-Expression zurück (Norrback *et al*, 1996). Messungen der Telomerase-Aktivität von *in vitro* stimulierten B-Zellen mehrerer Arbeitsgruppen ergaben, dass mitogene Stimuli zugleich auch Telomerase induzieren, und dass das Ausmaß der Telomerase-Expression in aktivierten Zellen mit deren Proliferationsrate korreliert (Weng *et al*, 1997a; Hu *et al*, 1997; Igarashi & Sakaguchi, 1997).

Eine entsprechende proliferationsinduzierte Aktivierung des Telomerase-Enzyms (oder eines anderen telomerverlängernden Mechanismus) bietet sich somit als mögliche Erklärung für den von uns beobachteten rapiden Telomerzuwachs der *in vitro* stimulierten B-Zellen an. Dies scheint umso wahrscheinlicher, da die von uns eingesetzten Stimulationsansätze (SAC allein bzw. in Kombination mit IL-2) sich in voneinander unabhängigen Studien als die potentesten Induktoren der Proliferation und Telomerase-Aktivierung erwiesen (Weng *et al*, 1997a; Hu *et al*, 1997). Im Vergleich zeigte die Kombination von SAC und IL-2 eine stärkere mitogene Wirkung als die alleinige Stimulation mit SAC (siehe Tabelle III.2.1). Unter der Annahme einer positiven Korrelation ließe sich daraus auch auf eine vergleichsweise höhere Telomerase-Aktivität in den mit SAC und IL-2 stimulierten B-Zellen schließen, was mit dem rapiden Telomerzuwachs unter diesen Stimulationsbedingungen übereinstimmen würde. Entgegen dieser Vermutung und den Ergebnissen anderer Studien wurde in den von uns stimulierten B-Zellen jedoch nur eine mäßig erhöhte Telomerase-Aktivität festgestellt, die sich hinsichtlich der beiden Stimulationsbedingungen nicht unterscheidet und für eine Telomerverlängerung beobachteten Ausmaßes nicht ausreichend hoch erscheint. Für diese von uns erfassten, vergleichsweise niedrigen Aktivitätslevel (die nur einem Sechstel der für immortale Zelllinien oder maligne Tumoren typischen Aktivität entsprechen) ist möglicherweise der relativ spät nach Stimulationsbeginn gewählte Zeitpunkt der Messung verantwortlich: Wie aus Untersuchungen der Kinetik der Telomerase-Aktivität nach mitogener Stimulation hervorgeht, erreicht diese ihren maximalen Level bereits innerhalb von 12 bis 72 Stunden nach Stimulation und sinkt ab dem 4. Tag wieder auf kaum bis nicht mehr nachweisbare Werte ab (Igarashi & Sakaguchi, 1997; Hu *et al*, 1997). Somit könnten die von uns am Tag 5 gemessenen Werte auch noch die minimale Restaktivität einer zum früheren Zeitpunkt viel höheren Telomerase-Expression darstellen (also quasi den absteigenden Ast der Kurve), deren Ausmaß bzw. Verlauf aufgrund fehlender Messdaten jedoch nicht nachvollziehbar ist.

Alternativ könnte der von uns beobachtete Telomerzuwachs in den *in vitro* stimulierten B-Zellen auch die Folge einer selektiven Expansion von B-Zell-Subpopulationen mit besonders langen Telomeren sein. Eine Anreicherung der mit überdurchschnittlichen Telomerlängen ausgestatteten CD27⁺ B-Gedächtniszellen scheint jedoch nicht vorzuliegen, da deren prozentualer Anteil unter beiden Stimulationsbedingungen im Lauf der Kultur deutlich abnimmt (siehe Abbildung III.2.6). Dagegen kommt es unter der kombinierten Stimulation zu einer relativen Zunahme von Plasmazellen (siehe Abbildung III.2.7), deren vermehrte Ausreifung auf den Zusatz des potenten Differenzierungsfaktors IL-2 (zu dem mitogenen SAC) zurückzuführen ist (Falkoff *et al*, 1982; Nakagawa *et al*, 1985). Über die Telomerbiologie von Plasmazellen, die normaler-

weise nicht im peripheren Blut, sondern überwiegend im Knochenmark oder in lymphatischen Geweben zu finden sind, ist bislang noch wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe von Weng stellte in tonsillären Plasmazellen jedoch eine gegenüber naiven B-Zellen 16-fach höhere Telomerase-Aktivität fest (Weng *et al*, 1997a). Auch wenn dies nur einem Bruchteil der Aktivität in stimulierten Keimzentrums-Zellen entspricht, könnte es angesichts der Tatsache, dass es sich bei Plasmazellen um ausdifferenzierte, post-mitotische Zellen handelt, die sich nicht mehr bzw. nur äußerst selten teilen (Calame, 2001), ausreichen, um einen unseren Ergebnissen entsprechenden Telomerzuwachs zu bewirken.

Im Gegensatz zu der rapiden Telomerverlängerung der B-Zellen kam es bei den *in vitro* stimulierten T-Zellen zu einem mäßigen Telomerverlust im Verlauf der Kultur (durchschnittlich 500 bp innerhalb von 14 Tagen). Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach zyklischer *in vitro* Stimulation sowohl in naiven als auch in T-Gedächtniszellen einen Telomerverlust von 50-100 bp pro Zellteilung beobachteten (Weng *et al*, 1995; Rufer *et al*, 1998). Die paradox erscheinende Tatsache, dass diese replikative Telomerverkürzung in aktivierten T-Zellen trotz nachweisbar erhöhter Telomerase-Aktivität im Rahmen der Proliferationsinduktion erfolgt (Weng *et al*, 1996), lässt eine unterschiedliche Regulation der Telomerase-Aktivität in B- und T-Lymphozyten vermuten.

IV.2.2 Interpretation

Aus unserer – erstmalig an stimulierten B-Zellen durchgeführten – *in vitro* Telomerlängenanalyse sind im wesentlichen die folgenden drei Befunde hervorzuheben:

- 1) Unter der kombinierten Stimulation mit SAC und IL-2 kommt es in B-Zellen zu einer rapiden Telomerverlängerung.
- 2) Dieselbe Stimulationskombination induziert auch die Ausreifung von Plasmazellen.
- 3) In den stimulierten B-Zellen ist Telomerase-Aktivität nachweisbar, deren Level jedoch für einen Telomerzuwachs beobachteten Ausmaßes eindeutig zu niedrig erscheint.

Die nachfolgende Interpretation unserer Ergebnisse soll in erster Linie auf die Frage nach möglichen kausalen Zusammenhängen zwischen den aufgeführten drei Punkten eingehen.

IV.2.2.1 **Telomerase-Aktivität ist nicht gleichbedeutend mit Telomerverlängerung**

Der Punkt 3) stellt durch seine scheinbar widersprüchliche Aussage (geringe Telomerase-Aktivität vs. rapide Telomerverlängerung) einen besonders diskutablen Aspekt dar. Auch wenn die Telomerase-Aktivität zu einem früheren (als dem von uns gewählten) Zeitpunkt – entsprechend den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen – deutlich höher wäre, würde dies angesichts der Tatsache, dass es in stimulierten T-Zellen unter vergleichbarer Telomerase-Induktion zu einer Telomerverkürzung kommt, offenbar keine ausreichende Erklärung für den in stimulierten B-Zellen beobachteten Telomerzuwachs darstellen. Für die resultierende Auswirkung der Telomerase an den Telomeren scheinen demnach noch andere Faktoren (als nur die messbaren Aktivitätslevel) verantwortlich zu sein.

In der Tat geht aus Untersuchungen der Telomerase-Regulation hervor, dass die Telomerase-Aktivität *in vivo* außer durch das Vorhandensein bzw. die Verfügbarkeit der beiden essentiellen Komponenten des Telomerase-Core-Enzyms, hTERT und hTR, in einem gewissen Ausmaß auch durch die Telomere selbst gesteuert wird (Mergny *et al*, 2002). Einerseits erfolgt diese telomere Regulation durch den dynamischen Wechsel der Telomere zwischen zwei strukturell unterschiedlichen Zustandsformen (der „geschlossenen“ bzw. *capped* T-Loop-Form einerseits und der „offenen“ bzw. *uncapped* Form mit freiliegendem Ende andererseits), wodurch die Zugänglichkeit des einzelsträngigen 3'-Endes, das dem Telomerase-Enzym als Ansatzpunkt dient, entsprechend beeinflusst wird (Blackburn, 2001). Andererseits scheinen auch einige der telomerbindenden Proteine an der Regulation der Telomerase beteiligt zu sein, sowohl in Form einer Aktivitäts-Hemmung, wie die beiden mit menschlichen Telomeren assoziierten Proteine *TRF 1* und *2*, die eine negative Feedback-Wirkung auf das Telomerase-Enzym ausüben (van Steensel & de Lange, 1997; Smogorzewska *et al*, 2000), als auch in Form einer Aktivitäts-Verstärkung, wie das in Sprossspitzen vorkommende *Cdc 13* Protein, welches in dieser Spezies unter anderem für die telomere Rekrutierung des Enzyms zuständig ist (Grandin *et al*, 2000). Auch bei einer Reihe weiterer telomerassoziierter Proteine, von denen viele, wie zum Beispiel die *Ku*-Proteine (siehe weiter), erst kürzlich entdeckt wurden, wird eine direkte oder indirekte regulatorische Wirkung auf die Telomerase vermutet, deren Ausmaß und genauer Mechanismus derzeit jedoch noch nicht vollständig bekannt sind (Boulton & Jackson, 1998; Hsu *et al*, 1999; Chai *et al*, 2002; Baumann & Cech, 2001; Mergny *et al*, 2002).

Ganz allgemein lässt sich somit die Schlussfolgerung ziehen, dass man keinesfalls von einer eindeutigen Korrelation zwischen der Höhe der Telomerase-Aktivität und der resultierenden Längenveränderung an den Telomeren ausgehen darf, da die Effektivität des Telomerase-Enzyms von einer Vielzahl zusätzlicher Faktoren reguliert wird. Dementsprechend sind möglicherweise auch die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Unterschiede der *in vitro* Telomerdynamik von B- und T-Zellen auf eine in den beiden Zellpopulationen unterschiedlich ausgeprägte Beeinflussung durch eben diese Faktoren zurückzuführen.

In diesem Zusammenhang erscheinen die erst kürzlich als telomerbindende Proteine entdeckten *Ku*-Proteine besonders interessant: Neben ihrer (derzeit noch nicht vollständig bekannten) regulatorischen Funktion an den Telomeren (Chai *et al*, 2002) und ihrer Mitwirkung an Reparaturprozessen von DNA-Doppelstrangbrüchen sind sie außerdem maßgeblich an den Prozessen der VDJ-Rekombination und des Isotypen-Switch beteiligt (Casellas *et al*, 1998). Der letztgenannte Vorgang wird – ebenso wie die somatische Hypermutation – im Rahmen einer Immunantwort in aktivierten B-Zellen induziert. Daher ist es vorstellbar, dass die von uns beobachtete, spezifische Telomerdynamik in aktivierten B-Zellen aus einer Überlappung zwischen den molekularen Mechanismen resultiert, die für die Regulation des Isotypen-Switch einerseits und der an den Telomeren ausgeführten Funktionen der *Ku*-Proteine andererseits zuständig sind. Um diesbezüglich jedoch eindeutiger Aussagen machen zu können, bedarf es in erster Linie der Erweiterung unseres derzeit nur lückenhaften Verständnisses hinsichtlich der genauen Rolle, die die *Ku*-Proteine in Assoziation mit den menschlichen Telomeren übernehmen.

IV.2.2.2 Lange Telomere in Plasmazellen?

Zuletzt bleibt noch die Frage offen, ob und inwiefern ein kausaler Zusammenhang zwischen der vermehrten Ausreifung von Plasmazellen und der rapiden Telomerverlängerung in den stimulierten B-Zellen besteht. Die Beobachtung, dass beide Prozesse durch die Stimulation mit SAC und IL-2 induziert werden, verleitet jedenfalls dazu, sie miteinander in Verbindung zu setzen. Dies würde implizieren, dass die Ausdifferenzierung von aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen mit einer entsprechenden Telomerverlängerung verbunden ist, und ausgereifte Plasmazellen, ähnlich wie B-Gedächtniszellen, über längere Telomere als naive B-Zellen verfügen. So verlockend diese These erscheint, berechtigen die von uns erhaltenen Ergebnisse jedoch nicht dazu, von einer solchen Annahme auszugehen. Denn obwohl es im Verlauf der Kultur zu einer deutlichen Zunahme der Plasmazell-Population kommt, beträgt deren

Anteil an der Gesamtheit der stimulierten B-Zellen – und somit auch an den mit der Flow-FISH-Methode erfassten durchschnittlichen Telomerlängen – immer noch weniger als 10%. Um die individuelle Telomerlänge der Plasmazellen zu bestimmen, müssten diese zuvor isoliert werden, was sich angesichts der sehr geringen Zellzahlen technisch als äußerst schwierig erweist.

In erster Linie stellt sich in diesem Zusammenhang jedoch die Frage, was für eine Funktion lange Telomere in Plasmazellen hätten. Der Großteil der im Rahmen einer Immunantwort ausgereiften Plasmazellen ist nur sehr kurzlebig und geht spätestens nach Elimination des immunisierenden Antigens zugrunde (Parslow, 2001). Es gibt zwar einige wenige Plasmazellen, die unabhängig von der Anwesenheit immunisierenden Antigens mehrere Jahre, eventuell sogar Jahrzehnte lang im Knochenmark weiterbestehen und durch kontinuierliche Sekretion von Serumantikörpern für den Erhalt eines „humoralen Immungedächtnisses“ verantwortlich sind (Manz & Radbruch, 2002). Im Gegensatz zu den ebenfalls langlebigen B-Gedächtniszellen, die auf erneuten Antigenkontakt jeweils mit klonaler Expansion reagieren, gehen Plasmazellen jedoch bisherigen Kenntnissen zufolge nach Abschluss ihrer Ausreifung keine weiteren Zellteilungen mehr ein (Calame, 2001). Folglich würde die gemeinhin postulierte Funktion langer Telomere, nämlich das replikative Potential sich teilender Zellen aufrechtzuhalten, in Plasmazellen keine Rolle spielen.

Allein aufgrund der bereits erwähnten Tatsache, dass in Plasmazellen eine deutlich erhöhte Telomerase-Aktivität festgestellt wurde (Weng *et al*, 1997a), lässt sich jedoch behaupten, dass eine genauere Untersuchung der Telomerdynamik dieser B-Zellsubpopulation durchaus lohnenswert wäre und zu einem besseren Verständnis sowohl der Telomerfunktion als auch der Plasmazellen selbst beitragen könnte.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse sowohl der *in vivo* als auch der *in vitro* Analyse darauf hin, dass sich die B-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Telomerdynamik deutlich von den T-Lymphozyten und anderen hämatopoietischen Zelllinien unterscheiden. Eine weiterführende Untersuchung der für diese Unterschiede verantwortlichen Faktoren könnte wesentlich zum Verständnis der an der Telomerlängenregulation beteiligten Mechanismen beitragen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Telomerdynamik von peripheren B- und T-Lymphozyten unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten untersucht:

Im ersten Abschnitt wurde die *in vivo* Telomerdynamik von B- und T-Zellen im Verlauf des menschlichen Lebens analysiert: Hierzu wurden die Telomerlängen der beiden Subpopulationen bei 53 Individuen im Alter von 0 bis 92 Jahren mit der Flow-FISH-Methode gemessen. Dabei zeigte sich, dass sowohl B- als auch T-Zellen zwar (wie bereits mehrfach festgestellt wurde) mit zunehmendem Alter einen graduellen Telomerverlust erfahren, die Telomerlängendynamik sich jedoch in den beiden Subpopulationen deutlich unterscheidet. Während bei den Neugeborenen die Telomere beider Subpopulationen ungefähr gleich lang waren, wiesen bei allen erwachsenen Spendern (≥ 20 Jahre) dagegen die B-Zellen signifikant längere Telomere als die T-Zellen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in T-Zellen im Verlauf der Kindheit zu einer rapiden Telomerverkürzung kommt, wohingegen B-Zellen in dieser Phase kaum einen Nettoverlust ihrer Telomere erfahren; im Erwachsenenalter dagegen schreitet der Telomerverlust in beiden Subpopulationen mit annähernd gleicher Geschwindigkeit voran, so dass die in der Kindheit etablierte Längendifferenz (mit deutlich längeren Telomeren in den B-Zellen) bis ins Alter bestehen bleibt.

Im zweiten Abschnitt wurde die Telomerdynamik von aktivierten B- und T-Lymphozyten *in vitro* untersucht. Hierfür wurden die aus peripherem Blut isolierten B- und T-Zellen jeweils mit potenten Mitogenen stimuliert und anschließend mehrere Tage lang in Kultur gehalten, wobei zu bestimmten Zeitpunkten ihre Telomerlängen gemessen wurden (mit Flow-FISH, Q-FISH und Southern Blot). Im Gegensatz zu den T-Zellen, welche im Verlauf der Kultur einen mäßigen Telomerverlust aufwiesen, kam es in den B-Zellen unter der kombinierten Stimulation mit SAC und IL-2 zu einem rapiden Telomerzuwachs innerhalb der ersten fünf Tage. Dabei erscheint die in den B-Zellen nachgewiesene Telomerase-Aktivität für das Ausmaß der resultierenden Telomerverlängerung jedoch eindeutig zu niedrig. Gemeinsam mit der Tatsache, dass die Telomerverkürzung in stimulierten T-Zellen trotz nachweisbar erhöhter Telomerase-Expression erfolgt, deutet dies darauf hin, dass die Telomerase-Aktivität in stimulierten B-Zellen auf eine besonders effektive Weise reguliert wird.

VI. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin (Purinbase der DNA)
ALT	alternative lengthening of telomeres
ATM	Ataxia teleangiectatica mutiert
BC	buffy coat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel (Einheit für Radioaktivität)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Pyrimidinbase der DNA)
°C	Grad Celsius
CB	cord blood (Nabelschnurblut)
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
Ci	Curie (frühere Einheit für Radioaktivität)
CO ₂	Kohlendioxid
CPDL	cumulative population doubling level
cpm	counts per minute
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
dd Wasser	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Δ	Differenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sort
FCS	fetal calf serum
FI	Fluoreszenzintensität
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocynat
FSC	forward light scatter
FU	Fluoreszenz-Units
G	Guanin (Purinbase der DNA)
g	Erdbeschleunigung (Norm: 9,80665 m/s ²)

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
hTR	human telomerase RNA
ID	Identifizierungsnummer
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IOD	integrated optical density
kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
M	Mol/molar
m	milli
mean	Mittelwert
min	Minute
MNCs	mononukleäre Zellen
μ	mikro
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ND	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
OKT 3	monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten
P	Wahrscheinlichkeit
p	Wahrscheinlichkeitsbelegung
p53	Tumorsuppressorgen
PBLs	periphere Blutleukozyten
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD	population doubling
PE	R-Phycoerythrin
pH	pondus hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PMT	photomultiplier tube
PNA	peptide nucleic acid (Peptidnukleinsäure)
POD	Peroxidase
pRB	(Retinoblastoma-)Tumorsuppressorgen
Q-FISH	quantitative Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

R	Korrelationskoeffizient
RAS	(rat sarcoma) Proto-Onkogen
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTA	relative Telomerase-Aktivität
SAC	Staphylococcus aureus Cowan I Strain
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SSC	side scatter
SV 40	Simian Virus 40
Σ	Summe
T	Thymin (Pyrimidinbase der DNA)
TFU	Telomer-Fluoreszenz-Units
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TRAP	telomere repeat amplification protocol
TRF	Telomerrestriktionsfragment
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethane
U	units
U/min	Umdrehungen pro Minute
VDJ	Gensequenzen für die Synthese der variablen Region schwerer Immunglobulinketten
vs.	versus

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. & Harley, C.B. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10114-10118.
- Baumann, P. & Cech, T.R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, **292**, 1171-1175.
- Blackburn, E.H. (1991) Structure and function of telomeres. *Nature*, **350**, 569-573.
- Blackburn, E.H. (1994) Telomeres: no end in sight. *Cell*, **77**, 621-623.
- Blackburn, E.H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**, 661-673.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A. & Greider, C.W. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, **91**, 25-34.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
- Boulton, S.J. & Jackson, S.P. (1998) Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J*, **17**, 1819-1828.
- Broccoli, D., Young, J.W. & de Lange, T. (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9082-9086.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, **17**, 231-235.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R.R. (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, **14**, 4240-4248.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A. & Reddel, R.R. (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, **3**, 1271-1274.
- Calame, K.L. (2001) Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol*, **2**, 1103-1108.
- Campisi, J. (1997) The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*, **33**, 703-709.

- Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K. & Nussenzweig, M.C. (1998) Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J*, **17**, 2404-2411.
- Chai, W., Ford, L.P., Lenertz, L., Wright, W.E. & Shay, J.W. (2002) Human Ku70/80 Associates Physically with Telomerase through Interaction with hTERT. *J Biol Chem*, **277**, 47242-47247.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. & de Lange, T. (1995) A human telomeric protein. *Science*, **270**, 1663-1667.
- Collins, K. & Mitchell, J.R. (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene*, **21**, 564-579.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. & Bacchetti, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, **11**, 1921-1929.
- de Lange, T. (1994) Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2882-2885.
- de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, **21**, 532-540.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L. & Reddel, R.R. (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*, **26**, 447-450.
- Effros, R.B. & Pawelec, G. (1997) Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today*, **18**, 450-454.
- Engelhardt, M., Kumar, R., Albanell, J., Pettengell, R., Han, W. & Moore, M.A. (1997) Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*, **90**, 182-193.
- Engelhardt, M. & Martens, U.M. (1998) The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality (Review). *Oncol Rep*, **5**, 1043-1052.
- Fagnoni, F.F., Vescovini, R., Passeri, G., Bologna, G., Pedrazzoni, M., Lavagetto, G., Casti, A., Franceschi, C., Passeri, M. & Sansoni, P. (2000) Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood*, **95**, 2860-2868.
- Falkoff, R.J., Zhu, L.P. & Fauci, A.S. (1982) Separate signals for human B cell proliferation and differentiation in response to *Staphylococcus aureus*: evidence for a two-signal model of B cell activation. *J Immunol*, **129**, 97-102.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C. & Yu, J. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**, 1236-1241.

- Frenck, R.W.J., Blackburn, E.H. & Shannon, K.M. (1998) The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5607-5610.
- Globerson, A. & Effros, R.B. (2000) Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today*, **21**, 515-521.
- Grandin, N., Damon, C. & Charbonneau, M. (2000) Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase recruitment. *Mol Cell Biol*, **20**, 8397-8408.
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, **43**, 405-413.
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, **337**, 331-337.
- Griffith, J., Bianchi, A. & de Lange, T. (1998) TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol*, **278**, 79-88.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503-514.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. & Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Harley, C.B. (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*, **256**, 271-282.
- Harley, C.B. (2002) Telomerase is not an oncogene. *Oncogene*, **21**, 494-502.
- Hayflick, L. & Moorehead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621.
- Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y. & Greider, C.W. (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, **107**, 67-77.
- Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R. & Reddel, R.R. (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, **21**, 598-610.
- Herrera, E., Martinez, A. & Blasco, M.A. (2000) Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres. *EMBO J*, **19**, 472-481.

- Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. & Yamakido, M. (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*, **155**, 3711-3715.
- Hodes, R.J. (1997) Aging and the immune system. *Immunol Rev*, **160**, 5-8.
- Hodes, R.J., Hathcock, K.S. & Weng, N.P. (2002) Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol*, **2**, 699-706.
- Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E.H. & Chen, D.J. (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12454-12458.
- Hu, B.T., Lee, S.C., Marin, E., Ryan, D.H. & Insel, R.A. (1997) Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *J Immunol*, **159**, 1068-1071.
- Hultdin, M., Gronlund, E., Norrback, K., Eriksson-Lindstrom, E., Just, T. & Roos, G. (1998) Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3651-3656.
- Igarashi, H. & Sakaguchi, N. (1997) Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood*, **89**, 1299-1307.
- Iwama, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J.H., Hayashi, S., Yahata, N., Ando, K., Toyama, K., Hoshika, A., Takasaki, M., Mori, M. & Shay, J.W. (1998) Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet*, **102**, 397-402.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*, **283**, 1321-1325.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. & Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.K. & Tanke, H.J. (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*, **5**, 685-691.
- Lansdorp, P.M., Poon, S., Chavez, E., Dragowska, V., Zijlmans, M., Bryan, T., Reddel, R., Egholm, M., Bacchetti, S. & Martens, U. (1997) Telomeres in the haemopoietic system. *Ciba Found Symp*, **211**, 209-218.
- Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., Greider, C.W. & DePinho, R.A. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, **392**, 569-574.

- Lee, J.J., Kook, H., Chung, I.J., im, H.J., Park, M.R., Kim, C.J., Nah, J.A. & Hwang, T.J. (1999) Telomere length changes in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **24**, 411-415.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. & Cech, T.R. (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, **276**, 561-567.
- Lundblad, V. & Blackburn, E.H. (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, **73**, 347-360.
- Lundblad, V. (2002) Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*, **21**, 522-531.
- Ly, D.H., Lockhart, D.J., Lerner, R.A. & Schultz, P.G. (2000) Mitotic misregulation and human aging. *Science JID - 0404511*, **287**, 2486-2492.
- Manz, R.A. & Radbruch, A. (2002) Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol*, **32**, 923-927.
- Martens, U.M., Zijlmans, J.M., Poon, S.S., Dragowska, W., Yui, J., Chavez, E.A., Ward, R.K. & Lansdorp, P.M. (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet*, **18**, 76-80.
- Martens, U.M., Brass, V., Sedlacek, L., Pantic, M., Exner, C., Guo, Y., Engelhardt, M., Lansdorp, P.M., Waller, C.F. & Lange, W. (2002) Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol*, **119**, 810-818.
- Maser, R.S. & DePinho, R.A. (2002) Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*, **297**, 565-569.
- McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes of *Zea mays*. *Genetics*, **26**, 234-282.
- McElligott, R. & Wellinger, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J*, **16**, 3705-3714.
- Mergny, J.L., Riou, J.F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M.P. & Gilson, E. (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res*, **30**, 839-865.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A. & Weinberg, R.A. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, **90**, 785-795.
- Meyerson, M. (2000) Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol*, **18**, 2626-2634.

- Miller, R.A. (1996) The aging immune system: primer and prospectus. *Science*, **273**, 70-74.
- Mitchell, J.R., Wood, E. & Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, **402**, 551-555.
- Monteiro, J., Batliwalla, F., Ostrer, H. & Gregersen, P.K. (1996) Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. *J Immunol*, **156**, 3587-3590.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E. & Shay, J.W. (1999) Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet*, **21**, 115-118.
- Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, **59**, 521-529.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. & Wu, J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6622-6626.
- Muller, H.J. (1938) The remaking of chromosomes. *Collecting Net*, **13**, 181-195.
- Nakagawa, T., Hirano, T., Nakagawa, N., Yoshizaki, K. & Kishimoto, T. (1985) Effect of recombinant IL 2 and gamma-IFN on proliferation and differentiation of human B cells. *J Immunol*, **134**, 959-966.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. & Cech, T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, **277**, 955-959.
- Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Ide, T. & Ishikawa, F. (1998) Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet*, **18**, 65-68.
- Neumann, A.A. & Reddel, R.R. (2002) Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer JID - 101124168*, **2**, 879-884.
- Norrback, K.F., Dahlenborg, K., Carlsson, R. & Roos, G. (1996) Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, **88**, 222-229.
- Notaro, R., Cimmino, A., Tabarini, D., Rotoli, B. & Luzzatto, L. (1997) In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13782-13785.
- Nugent, C.I. & Lundblad, V. (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev*, **12**, 1073-1085.

- Olovnikov, A.M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*, **41**, 181-190.
- Parslow, T.G. (2001) Lymphocytes & lymphoid tissues. In: Parslow, T.G., Stites, D.P., Terr, A.I. & Imboden, J.B. (eds.) *Medical Immunology*. 10th ed. Lange Medical Books, McGraw-Hill, pp. 40-60
- Plunkett, F.J., Soares, M.V., Annels, N., Hislop, A., Ivory, K., Lowdell, M., Salmon, M., Rickinson, A. & Akbar, A.N. (2001) The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8⁺ T cells during acute Epstein-Barr virus infection. *Blood*, **97**, 700-707.
- Poon, S.S., Martens, U.M., Ward, R.K. & Lansdorp, P.M. (1999) Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry*, **36**, 267-278.
- Raffael, A. (1988) Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. *Labor - Medizin* **11**, 89-97.
- Rizki, A. & Lundblad, V. (2001) Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation. *Nature*, **411**, 713-716.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C. & DePinho, R.A. (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, **96**, 701-712.
- Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E. & Lansdorp, P.M. (1998) Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol*, **16**, 743-747.
- Rufer, N., Brummendorf, T.H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M. & Lansdorp, P.M. (1999) Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med*, **190**, 157-167.
- Sansoni, P., Cossarizza, A., Brianti, V., Fagnoni, F., Snelli, G., Monti, D., Marcato, A., Passeri, G., Ortolani, C. & Forti, E. (1993) Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood*, **82**, 2767-2773.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M. & Wright, W.E. (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*, **196**, 33-39.
- Shay, J.W. (1999) At the end of the millennium, a view of the end. *Nat Genet*, **23**, 382-383.
- Slagboom, P.E., Droog, S. & Boomsma, D.I. (1994) Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet*, **55**, 876-882.

- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G. & de Lange, T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, **20**, 1659-1668.
- Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A. & de Lange, T. (2002) DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol*, **12**, 1635-1644.
- Son, N.H., Murray, S., Yanovski, J., Hodes, R.J. & Weng, N. (2000) Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J Immunol*, **165**, 1191-1196.
- Stewart, S.A. & Weinberg, R.A. (2002) Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene*, **21**, 627-630.
- van Steensel, B. & de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, **385**, 740-743.
- Vaziri, H., Schachter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D. & Harley, C.B. (1993) Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet*, **52**, 661-667.
- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B. & Lansdorp, P.M. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9857-9860.
- Vaziri, H. & Benchimol, S. (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*, **8**, 279-282.
- Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, **239**, 197-201.
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. & Morin, G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*, **17**, 498-502.
- Weng, N.P., Levine, B.L., June, C.H. & Hodes, R.J. (1995) Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11091-11094.
- Weng, N.P., Levine, B.L., June, C.H. & Hodes, R.J. (1996) Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med*, **183**, 2471-2479.
- Weng, N.P., Granger, L. & Hodes, R.J. (1997a) Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10827-10832.

- Weng, N.P., Palmer, L.D., Levine, B.L., Lane, H.C., June, C.H. & Hodes, R.J. (1997b) Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. *Immunol Rev*, **160**, 43-54.
- Weng, N.P., Hathcock, K.S. & Hodes, R.J. (1998) Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity*, **9**, 151-157.
- Wijdenes, J., Vooijs, W.C., Clement, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R.X., Klein, B. & Dore, J.M. (1996) A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol*, **94**, 318-323.
- Wright, W.E. & Shay, J.W. (1992) The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol*, **27**, 383-389.
- Yokoyama, W.M. & Otten, G. (1992) Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan. In: *Current Protocols in Immunology : Immunofluorescence and Cell Sorting*. pp. 5.4.1-5.4.19
- Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D. & Blackburn, E.H. (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*, **344**, 126-132.
- Zakian, V.A. (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, **270**, 1601-1607.
- Zeichner, S.L., Palumbo, P., Feng, Y., Xiao, X., Gee, D., Sleasman, J., Goodenow, M., Biggar, R. & Dimitrov, D. (1999) Rapid telomere shortening in children. *Blood*, **93**, 2824-2830.
- Zijlmans, J.M., Martens, U.M., Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K. & Lansdorp, P.M. (1997) Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7423-7428.

DANKSAGUNGEN

Mein ganz besonderer Dank gilt all denen, ohne deren Unterstützung und Hilfe diese Arbeit nie zustande gekommen wäre:

Professor Dr. Winand Lange

für seine Bereitschaft, die Rolle des Doktorvaters zu übernehmen

Dr. Uwe Martens

für die Idee und seine kontinuierliche fachliche Betreuung und konstruktive Unterstützung bei ihrer Realisierung

dem gesamten Laborteam, namentlich V. Brass, H. El-Daly, C. Exner, S. Glaser, M. Pantic, A. Rosenstiel, I. Skatulla, I. Wingert und S. Zimmermann

für die Einführung ins „Laborleben“, die bereitwillige Weitergabe ihres Wissens und ihrer Erfahrungen, ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung bestimmter Experimente und ganz besonders für die freundliche Atmosphäre und gute Zusammenarbeit im Labor

der Arbeitsgruppe von PD Dr. Monika Engelhardt

für die hilfreiche Zusammenarbeit bei der Durchführung der Southern Blot Experimente

Toshiro Kurokawa und Ou Cao

für ihre Unterstützung bei der Durchführung des [³H]Thymidin-Proliferationsnachweises in der Tumorbilogie

Dr. Matthias Ölke

für seine wertvollen Tips zur Bedienung des FACS-Gerätes

Dr. Michael Schlesier

für seine hilfreichen Anregungen bei immunologischen Fragestellungen

allen Blutspenderinnen und -spendern

für ihre Bereitschaft, sich der Wissenschaft zur Verfügung zu stellen

Milena Pantic,

die mir während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit weit über den fachlichen Bereich hinaus zur Seite stand und mich immer wieder zum Weitermachen ermutigte

Tilo Breidert

für sein aufrichtiges Interesse, seine wertvollen Ratschläge und seine intensive Betreuung in der Ausarbeitungsphase

Patrick Zöllner

für seine Korrekturen und Anregungen, seine Geduld, sein Verständnis und seinen immerwährenden psychischen und moralischen Beistand

LEBENS LAUF

Name: **Lucie Marie Beatrix Sedlacek**
Geburtsdatum: 15. Oktober 1974
Geburtsort: München

AUSBILDUNG:

Gymnasium: 1985-1994 Maximiliansgymnasium München,
humanistisches Gymnasium

Juni 1994 Abitur

- Max-Planck-Preis für hervorragende schulische Leistungen
- Hochbegabtenstipendium des Bayerischen Staates für die Länge eines Studiums

Studium: 1994-2002 Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität in
Freiburg

Aug. 1996 Ärztliche Vorprüfung
Sept. 1997 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
Okt. 1997 – Juni 1998 Auslandsstudium an der 2. Medizinischen Fakultät der
Karlsuniversität Prag / Tschechien;
Jahresstipendium des DAAD

April 1999 Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. W.
Lange / Dr. U. Martens in der Abteilung für Hämatologie /
Onkologie der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg

April 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Mai 2001 – März 2002 **Praktisches Jahr:**

- Chirurgie: Fakultätsklinik Motol, Prag / Tschechien
- Innere Medizin: Long Island Jewish Medical Center,
New York / USA und University of New Mexico
Hospital, Albuquerque, New Mexico / USA
- Gynäkologie (Wahlfach): Städtisches Klinikum
Karlsruhe

April 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Abschluss des Medizinstudiums

BERUFLICHE WEITERBILDUNG:

seit Feb. 2003 Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des St. Vincentius-
Krankenhauses in Karlsruhe