

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Telomerbiologische Untersuchungen zum zellulären  
Umsatz hämatopoetischer Stammzellen nach haploidenter  
Transplantation mit hoher Dosis an Stammzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**HOLGER WOLKE**  
aus Stuttgart

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Kanz / Professor Dr. C. Bokemeyer

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer

**Für meine Eltern**



Als wir das Ziel aus den Augen verloren,  
verdoppelten wir die Anstrengungen.  
*Mark Twain*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>Seite</b>
1.1	Telomerbiologie	1
1.1.1	Telomere – Struktur und Funktion	1
1.1.2	Telomerase	6
1.1.3	Zelluläre Seneszenz, Immortalität und maligne Transformation	9
1.1.4	Telomere und Stammzellbiologie	10
1.1.5	Bestimmung der Telomerlängen	11
1.2	Stammzelltransplantation	13
1.2.1	Allogene Stammzelltransplantation	13
1.2.2	Haploidente Megadose Stammzelltransplantation	14
1.3	Stammzelltransplantation und Telomerbiologie	16
1.4	Aufgabenstellung	17
<b>2</b>	<b>Material</b>	
2.1	Allgemeines	19
2.2	Geräte	19
2.3	Verbrauchsmaterialien	19
2.4	Herstellung von Gebrauchslösungen	21
2.5	Blutproben des Patientenkollektivs	21
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	
3.1	Flow-FISH	26
3.1.1	Aufarbeitung der Zellen durch Ammoniumchlorid	26
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	27
3.1.3	Aufarbeitung der Zellen mittels Ficoll	27
3.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
3.1.5	Denaturierung der DNA und <i>in-situ</i> -Hybridisierung	28
3.1.6	DNA-Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI)	30
3.1.7	Messung	31
3.1.8	Auswertung	32

3.1.9	Plausibilitätskontrolle	34
3.1.10	Präzisionskontrolle	35
3.1.10.1	Präzisionskontrolle mittels peripherer mononukleärer Zellen	35
3.1.10.2	Berechnung der Kontrollgrenzen und Ausschlusskriterien von Testreihen	35
3.1.11	Statistische Auswertung der Studie	36
3.2	Telomerlängenbestimmung an phänotypisch definierten Leukozyten-Supopulationen mittels Multi-Color-Flow-FISH	36
3.2.1	Aufarbeitung der Zellen mittels Ficoll	37
3.2.2	Auftauen der Zellen	37
3.2.3	Nativ-Antikörperfärbung	38
3.2.4	Fluorochromfärbung	38
3.2.5	Crosslinking	38
3.2.6	Konventionelle Flow-FISH Methode	39
3.2.7	Messung und Auswertung	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	Telomerlänge in peripheren Blutleukozyten von Patienten nach haploidenter Stammzell-Transplantation	41
4.1.1	Vergleich der ermittelten Werte mit altersadaptierten Kontrollen	43
4.1.2	Telomerwerte versus Alter der Spender	48
4.2	Telomerlänge in peripheren Blutleukozyten von Spendern nach haploidenter Stammzell-Transplantation	48
4.2.1	Vergleich der ermittelten Telomerwerte mit altersadaptierten Kontrollen	50
4.2.2	Telomerwerte versus Alter der Spender	51
4.2.3	Auswirkungen der Stammzell-Mobilisation auf den Spender	51
4.3	Vergleich der Telomerlängen zwischen Empfänger und Spender nach allogene-haploidenter Megadose Stammzelltransplantation	54
4.4	Beziehung zwischen Telomerlänge, Anzahl der transplantierten Zellen, Alter der Spender, Tage nach Transplantation, HLA-Mismatch und hämatologischen Parametern	56

4.4.1	Auswirkungen der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf die Telomerlänge in myeloischen Zellen	56
4.4.2	Telomerlängenverlust in myeloischen Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Transplantation	57
4.4.3	Einfluß des Spenderalters auf den Grad des Telomerverlustes in myeloischen Zellen	58
4.4.4	Auswirkungen der HLA-Diskordanz auf die Telomerverkürzung in myeloischen Zellen	59
4.4.5	Einfluß der Telomerverkürzung auf hämatologische Parameter	60
4.5	Auswirkung der Transplantation auf Lymphozyten	63
4.5.1	Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf die Telomere in Lymphozyten	63
4.5.2	Beeinflussung des Telomerlängenverlustes in Lymphozyten durch die Zeit nach Transplantation	64
4.5.3	Auswirkungen des Telomerlängenverlustes in Lymphozyten durch das Alter des Spenders	64
4.6	Sequentielle Analysen <i>post transplantationem</i>	65
4.7	Multi-Color-Flow-FISH	67
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	Telomerlängendynamik nach allogren-haploidenter Stammzell-Transplantation	70
5.2	Auswirkungen der Stammzellldosis auf den Telomerverlust	78
5.3	Telomerverkürzung und die Zeit <i>post transplantationem</i>	81
5.4	Telomerbiologie in Lymphozyten	82
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	85
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	87
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	88

<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	107
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	108

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

T.H. Brümmendorf, H. Wolke, H. Einsele, A. Wahl, P.G. Schlegel, M. Eyrich, T. Klingebiel, W. Brugger, R. Handgretinger, C. Bokemeyer, L. Kanz und D. Niethammer  
2000

*Moderate telomere shortening in recipients of haploidentical megadose stem cell transplants.*

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Graz.  
Vortrag 10/2000.

T.H. Brümmendorf, H. Wolke, A. Wahl, P.G. Schlegel, H. Einsele, P. Lang, P. Bader,  
C. Bokemeyer, L. Kanz, R. Handgretinger und D. Niethammer 2001

*Degree of telomere shortening after haploidentical megadose stem cell transplantation is not correlated with the number of CD34+ cells infused.*

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Mannheim.  
Poster 10/2001.

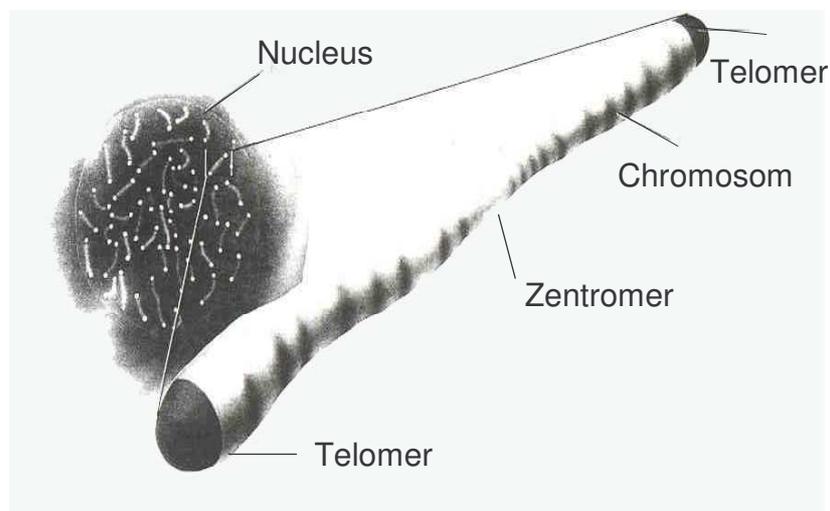


# 1 Einleitung

## 1.1 Telomerbiologie

### 1.1.1 Telomere – Struktur und Funktion

Die Chromosomen im Zellkern – die linearen, in Proteine verpackten Stränge der Erbsubstanz DNA – haben besondere stabilisierende Enden: die Telomere. Den Begriff Telomer prägte Hermann J. Muller 1938: nach griechisch *telos*, Ende, und *meros*, Teil.

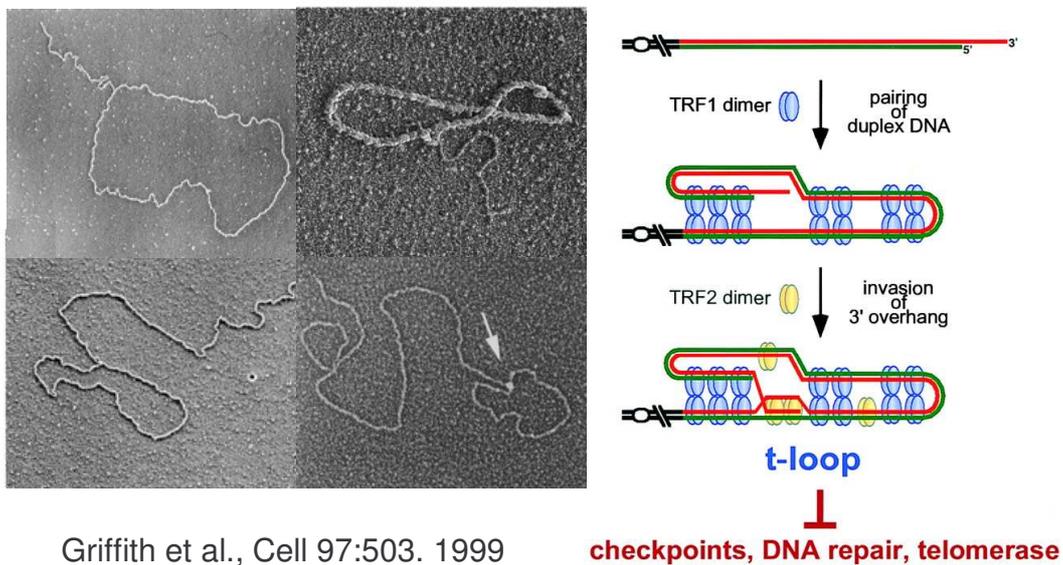


**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Metaphasechromosoms mit Telomeren**  
(aus „Spektrum der Wissenschaft“, April 1996)

Telomere setzen sich aus einer DNA-Komponente und verschiedenen Proteinen zusammen (Blackburn und Gall, 1978; Conrad *et al.*, 1990; Blackburn 1991; Zakian, 1995). Die DNA der Telomere besteht aus sich wiederholenden Nukleotidbaseneinheiten, wobei die Sequenz dieser „repeats“ und ihre Länge von Spezies zu Spezies variieren (Kalluri, 1996). Beim Menschen und allen anderen Wirbeltieren lautet diese Sequenz TTAGGG (Moyzis *et al.*, 1988) und besteht aus bis zu mehreren Tausend Wiederholungen pro Chromosomenende (Blackburn, 1991). An

die Telomere eines Chromosoms schließt sich in Richtung Zentromer ein subtelerischer Bereich an.

Die sogenannte „capping function“ der Telomere besteht darin, dass die replikative Verkürzung der DNA nicht zum Verlust von Gen-tragenden Sequenzen führt, sondern lediglich zum Verlust von Telomer-DNA. Morphologisch stellen sich die Chromosomenenden als Rückfaltung und Invasion des Einzelstranges in den Doppelstrang dar (Griffith *et al.*, 1999; Greider, 1999). Aufgrund der daraus resultierenden Loop-Struktur enden die Chromosomen und insbesondere deren 3'-Überhang nicht stumpf.



Griffith *et al.*, Cell 97:503. 1999

checkpoints, DNA repair, telomerase

**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Schemazeichnung der Telomerenden (nach Griffith *et al.*, 1999)

Eine Reihe sogenannter „Telomer-bindende Proteine“ (TBP) wurde jüngst beschrieben. Die beiden wichtigsten TBP sind TRF1 und TRF2. Beiden ist gemeinsam, dass sie an den T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-Doppelstrang binden. TRF1 ist sowohl während der Interphase als auch der Mitose aktiv (Chong *et al.*, 1995, Luderus *et al.*, 1996).

Van Steensel *et al.* konnten zeigen, dass TRF1 das Enzym Telomerase negativ beeinflusst, um so einem Übermaß an Telomerase zu begegnen (van Steensel *et al.*, 1997; Smogorzweska *et al.*, 2000). Die Aufgabe von TRF2 scheint zu sein, die

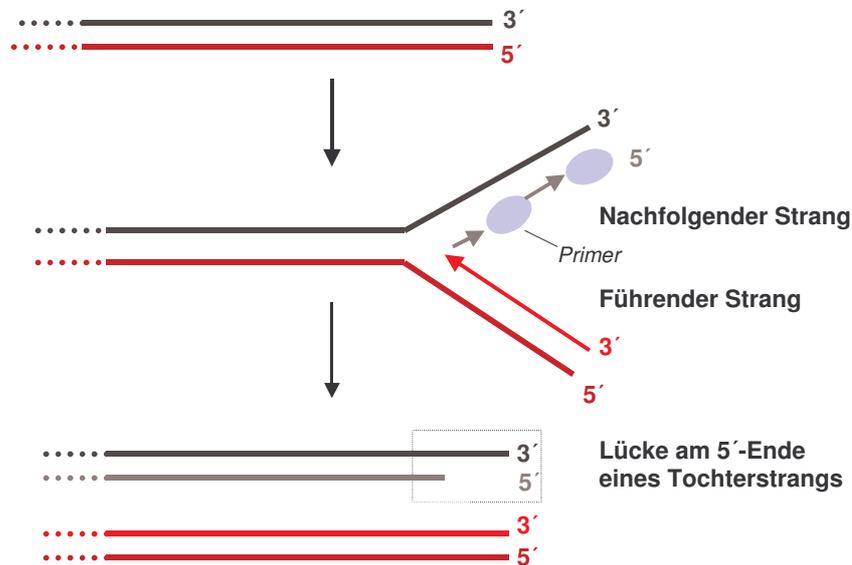
---

Chromosomen vor End-zu-End Fusionierung zu bewahren (van Steensel, 1998). Bei Inhibition von TRF2 wurde eine Verkürzung der Telomere gesehen, die schließlich zu Zellzyklus-Arrest und Einleitung von Apoptose, vermittelt über p53 und ATM-Kinase (ataxia telangiectasia mutated gene), führte (Marakov *et al.*, 1997; Karlseder *et al.*, 1999).

Telomere spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Chromosomen und der Kernmatrix im Rahmen der Zellteilung, (de Lange , 1992; Walker *et al.*, 1991; Mathog *et al.*, 1984), sie können Auswirkung auf die Transkription von subtelomerisch gelegenen Genen zeigen (Greider, 1996; Levis *et al.*, 1989; Gottschling *et al.*, 1990) und schützen die Genkodierende DNA vor enzymatischer Degradation (Blackburn, 1991; Sandell und Zakian, 1993). Ausreichend lange Telomere beugen einer Fusion zwischen Chromosomen vor und schützen das Erbmateriale vor sonstigen Aberrationen und Rekombinationen (McClintock, 1941; Tommerup *et al.*, 1994; Hande *et al.*, 1999 und 2000). Außerdem spielen die Telomere eine wichtige Rolle bei der Zellzyklusregulation (Sandell und Zakian, 1993; Schiesti *et al.*, 1989). Zusammengefasst bestehen die wichtigsten Funktionen der Telomere im Schutz der Chromosomenenden vor Degradation und vor End-zu-End Fusion. Sie sorgen für die korrekte Weitergabe der Erbinformation und garantieren damit das Überleben der Zellen.

Während jeder Zellteilung geht an allen Chromosomenenden eine geringe Menge an DNA-Sequenz verloren. Dieses Phänomen ist auf die Eigenschaften der DNA-Replikationsmaschinerie zurück zu führen (siehe Abbildung 3). Das „Endreplikationsproblem“ wurde zuerst und unabhängig voneinander von Olovnikov (Olovnikov, 1971 und 1973) und Watson (Watson, 1972) erkannt. Ursache hierfür ist die semi-konservative DNA-Replikation: Die für die DNA-Replikation verantwortliche DNA-Polymerase liest die beiden „elterlichen“, aufgetrennten Stränge lediglich in 5'-3'-Richtung ab. Der führende Strang (engl. „leading strand“) wird hierbei bis zum Ende vollständig repliziert. Aufgrund der Tatsache, dass die DNA-Polymerase am nachfolgenden Strang (engl. „lagging strand“) diskontinuierlich repliziert und deshalb wiederholt einen RNA-Primer benötigt, verkürzt sich der neusynthetisierte Tochterstrang des „lagging strand“ am 5'-Ende bei jeder DNA-Synthese gegenüber

dem Mutterstrang (Harley *et al.*, 1990), was zu einer replikationsabhängigen Verkürzung der Chromosomen führt.



**Abbildung 3: Das Endreplikationsproblem** Die getrennten Elternstränge dienen den Polymerasen als Matrizen, als komplementäre Vorlagen. Für den diskontinuierlich replizierten „Nachfolgenden Strang“ (grau) werden für die Polymerasen ständig sogenannte Primer (hellgrau) benötigt. Die ausgesiedelten Primer werden entfernt und die Lücken zwischen zwei DNA-Abschnitten geschlossen. Allerdings kann die einseitig begrenzte Lücke am 5'-Ende eines Tochterstranges nicht geschlossen werden – der Strang bleibt verkürzt.

Hier zeigt sich die Funktion der genfreien Telomer-DNA als Pufferzone zwischen Telomerende und Gen-kodierenden Nukleotidssequenzen. Der replikationsabhängige Verlust an Telomersequenzen wurde von Harley als das Modell der „mitotischen Uhr“ beschrieben (Harley, 1991). Hiernach stellt die Telomerlänge ein Maß für die Anzahl der bereits vollzogenen Zellteilungen einer Zelle dar. Dies lässt Rückschlüsse auf die replikative Vergangenheit der Zelle *in vitro* und *in vivo* zu (Allsopp *et al.*, 1992; Vaziri, 1994).

Der Verlust an Telomersequenz in somatischen Zellen wird auf 50 bis 200 Basenpaare (bp) pro Zellteilung geschätzt. Wichtig hierbei ist, dass dieser Verlust mit dem replikativen Altern einhergeht und nicht mit dem chronologischen Altern (Allsopp *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1992). Die Telomerlänge sowie die Verkürzungsrate

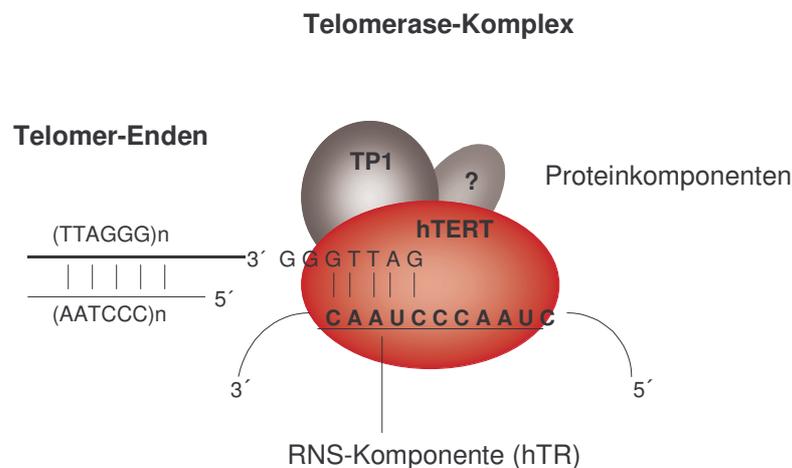
verschiedener Chromosomen in ein und derselben Zelle variiert stark (Martens *et al.*, 1998; Lansdorp *et al.*, 1996), außerdem finden sich Unterschiede in diversen Geweben und zwischen unterschiedlichen Individuen. Eine humane, neonatale, somatische Zelle verfügt zwischen acht und zehn Kilobasenpaaren (kb); im Vergleich hierzu verfügt eine Keimzelle über etwa zehn bis fünfzehn kb (Allshire *et al.*, 1989; Harley *et al.*, 1990; Lindsay *et al.*, 1991). Rufer, Brümmendorf *et al.* konnten konstatieren, dass sich in den ersten sechs Lebensmonaten die Telomere der Granulozyten mit einer 30-fach schnelleren Geschwindigkeit verkürzen als nach dem ersten halben Lebensjahr, wobei der Verlust an Telomersubstanz pro Zellteilung stets derselbe ist. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine gesteigerte Verkürzungsrate in peripheren Blutleukozyten während der Kindheit feststellen (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999; Zeichner *et al.*, 1999; Frenck *et al.*, 1998). Die hier gezeigten Verkürzungen betragen zwischen 300 und 3000 bp pro Jahr.

Tumorzellen zeichnen sich im allgemeinen durch eine erhöhte Zellteilungsrate aus. Demzufolge verkürzen sich die Telomere zunächst stärker als im angrenzenden normalen Gewebe. Verkürzte Telomere wurden zunächst in der Mehrzahl der bisher untersuchten Tumorarten gefunden (Hastie *et al.*, 1990; Dahse *et al.*, 1996): Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Basalzellkarzinom, etc. Tumorzellen mit verkürzten Telomeren haben wahrscheinlich eine große Zahl von Zellteilungen mit einer Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen durchlaufen, wobei an einem Punkt der kritischen Telomerverkürzung die Telomerase reaktiviert wurde, um die Telomere zu stabilisieren. Zellen, welche sich unbeschränkt teilen, wie eukaryotische Einzeller, Keimbahnzellen oder Tumorzellen, zeigen einen Erhalt ihrer Telomere auf einer konstanten Länge über die Zeit. Diese Beobachtung impliziert das Vorhandensein von Mechanismen, welche den Telomerverlust unter bestimmten Bedingungen kompensieren können.

Die Telomerbiologie bietet somit eine einzigartige Möglichkeit, die replikative Vergangenheit der telomerase-negativen Zellen *in vitro* wie *in vivo* zu untersuchen, und gleichzeitig Aussagen über ihre noch vorhandene Proliferationskapazität zu treffen.

### 1.1.2 Telomerase

Keimbahnzellen verfügen über ein hohes Proliferationspotential, welches eine Kompensation der replikationsabhängigen Telomerlängenverkürzung erforderlich macht. Ein solcher Kompensationsmechanismus wird der Telomerase zugeschrieben. Dieses Enzym besteht aus einem Ribonukleoproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von 300 kd. Die Telomerase setzt sich aus einer RNA-Matrize (hTR, human telomerase RNA) (Greider *et al.*, 1989; Blasco *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1995) und einer reversen Transkriptase, welche als katalytische Untereinheit des Enzyms fungiert, zusammen (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) (Harrington *et al.*, 1997; Greenberg *et al.*, 1998). Siehe hierzu Abbildung 4. Neben diesen Molekülen wurden mehrere Telomerase-bindende Proteine identifiziert, zum Beispiel TP1 (Harrington *et al.*, 1997).



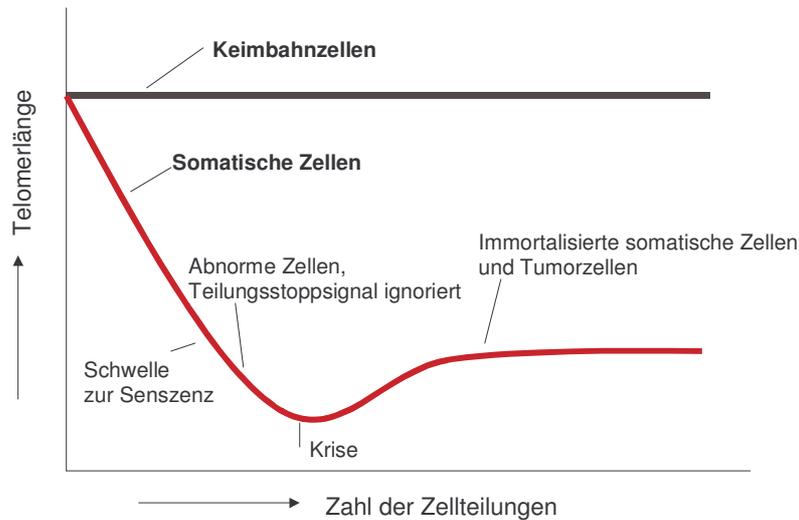
**Abbildung 4: Telomerase-Komplex** Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, dessen Aktivität von RNS- und Protein-Einheiten abhängig ist. (Abbildung nach Martens)

Im Gegensatz zu hTERT, dessen Expression vor allem in Keimzellen und malignen Zellen gefunden wird, wird hTR in allen bisher untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert (Feng *et al.*, 1995). Ein weiterer, telomerase-unabhängiger Mechanismus zur

Telomerverlängerung, ALT ('alternative lengthening of telomeres'), wurde kürzlich beschrieben (Reddel *et al.*, 1997; Bryan *et al.*, 1997). Dieser Mechanismus ist in der Lage, die Länge an Telomeren Telomerase-unabhängig zu erhalten und unter bestimmten Umständen sogar die Telomere zu verlängern (Wang *et al.*, 1990). In Hefen konnte gezeigt werden, dass blanke Chromosomenenden durch Rekombination über einen RAD52-induzierten Prozess eine Telomerverlängerung erzielen können (Redell *et al.*, 2000). Bei Säugetieren allerdings wird der Telomerase eine größere Bedeutung zugemessen: So sind 90% der Tumoren Telomerase-positiv und die restlichen 10% dürften über ALT und andere bisher unbekannte Mechanismen ihre Telomere verlängern bzw. stabilisieren.

Nachdem man eine kontinuierliche Telomerverkürzung in somatischen Zellen beobachten konnte, wurde vermutet, dass diese Zellen keine Telomeraseaktivität besitzen. Allerdings konnten einige Arbeitsgruppen kürzlich auch in peripheren Blutleukozyten sowie in Stamm- und Progenitorzellen Telomeraseaktivität nachweisen (Broccoli *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995). Vermutlich reicht die geringe Höhe der Expression nicht aus, um dem replikationsbedingten Telomerverlust entgegen zu wirken. Bei Zellen, für welche der Erhalt an Telomeren essentiell ist, wie zum Beispiel Keimbahnzellen, findet sich dagegen eine hohe Expressionsaktivität (Kim *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1996). Abbildung 5 zeigt dies noch einmal grafisch.

Die „Telomerase knock-out Maus“ von Blasco *et al.*, welcher das Gen für die RNA-Untereinheit der Telomerase fehlt, verdeutlicht noch einmal die Bedeutung der Telomerase für den Erhalt der Telomere (Blasco *et al.*, 1997, Hande *et al.*, 1999): Homozygote „knock-out Mäuse“ für mTER<sup>-/-</sup> (mice deficient for the mouse telomerase RNA) zeigten eine kontinuierliche Telomerverkürzung bis zum völligen Verschwinden der T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> repeats. Ab der sechsten Folgegeneration konnte eine Zunahme an End-zu-End Fusionen (größtenteils sogenannte Robertson-ähnlichen Fusionen) beobachtet werden, wobei diese Mäuse bis in die sechste Nachfolge-Generation lebensfähig und fertil blieben. In der sechsten Generation zeigten sich jedoch Defekte in der Spermio-genese bis hin zu Infertilität, sowie eine Milzatrophy. Ebenso kam es zu erhöhten Apoptoseraten innerhalb des hämatopoetischen Systems (Rudolph *et al.*, 1999; Blasco *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 1999).



**Abbildung 5: Modell zur Regulation der Telomerlängen beim Menschen** In Keimbahnzellen (schwarz) ist das Enzym Telomerase aktiv und die Telomere können erhalten bleiben. In somatischen Zellen (rot) ist die Telomerase inaktiv: Die Telomere verkürzen sich in Abhängigkeit der Zahl der Zellteilungen bis eine Schwelle zur Seneszenz erreicht wird und die meisten Zellen ihre Teilung einstellen. Es kann jedoch vorkommen, dass sich einige Zellen weiter teilen und die Telomere sich ohne Telomerase-Aktivität verkürzen. Ein Großteil dieser Zellen wird absterben (Krise). Kommt es zur Aktivierung von Telomerase bleiben die Telomere auf einem niedrigen Niveau erhalten: Die Zelle ist immortalisiert. (Abbildung nach „Spektrum der Wissenschaft“, 1996)

In den letzten Jahren wurden die meisten malignen Tumoren des Menschen auf Telomerase-Aktivität untersucht. Dabei zeigt sich eine hohe Enzymaktivität in den Tumoren im Vergleich zu keiner nachweisbaren Aktivität in Normalgeweben (Shay *et al.*, 1997). 85% aller untersuchten malignen Tumoren zeigten deutliche Telomerase-Aktivität (Langford *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995 und 1996; Nouse *et al.*, 1996; Sommerfeld *et al.*, 1996; Chadeneau *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1995). Für die klinische Onkologie könnte hierin eine Verwendung der Telomerase als molekularer, mit der Proliferationsaktivität assoziierter Marker maligner Erkrankungen liegen.

Zusammenfassend kann man konstatieren, dass die Länge der Telomere in malignen Tumoren, immortalen Zelllinien und Keimbahnzellen die Balance zwischen replikativem Verlust und telomerase-induziertem Zugewinn an Nukleotidbaseneinheiten durch das Enzym Telomerase reflektiert.

### 1.1.3 Zelluläre Seneszenz, Immortalität und maligne Transformation

Im Verlauf der zunehmenden Zahl an Zellteilungen verkürzen sich die Telomere und die betroffene Zelle altert. Ab einer kritischen Telomerverkürzung, diese liegt bei ungefähr 3 bis 6 kb, unterliegt die Zelle einem Wachstumsstopp, das sogenannte Hayflick limit M1 (Hayflick, 1965 und 1975). Durch Expression des Enzyms Telomerase werden die Telomere verlängert und die Zelle behält ihr Teilungspotential. Dies kann bis zur Immortalität führen (Bodnar *et al.*, 1998 und Vaziri *et al.*, 1998).

In somatischen Zellen sind Telomere stets signifikant kürzer als in Keimbahnzellen (15 kb versus 10 kb) oder fetalen Zellen, und ihre Länge nimmt in somatischen Zellen mit zunehmenden Alter ab.

Humane Fibroblasten durchlaufen in Kultur zwischen 50 und 80 Zellteilungen, bevor sie ein gewisses Stadium erreichen: 'Hayflick limit' oder Mortalitätsstadium (M1). Eine Hypothese besagt, dass die stetige Reduktion der Telomerrepeats im Genom an einem einzigen oder an wenigen Chromosomenenden dazu führen, dass diese Enden quasi „nackt“ vorhanden sind, was ein DNA-Schädigungssignal auslöst. Durch Interaktionen zwischen den Tumorsuppressorgenen p53, pRb und anderen kommt es zu einer Zellzyklusarretierung: Die Zelle bleibt am leben und geht in ein „postmitotisches“ Stadium über. Voraussetzung hierfür ist die fehlerfreie Funktion der Tumorsuppressorgene. Ist dies nicht gegeben, z. B. durch experimentelle Expression von SV40-large-T-Onkoproteinen (Ray *et al.*, 1998), teilt sich die Zelle bis zu einem kritischen Punkt der Telomerverkürzung weiter, bevor sie abstirbt: dem Mortalitätsstadium M2. Wird auch dieser Punkt überschritten, zum Beispiel mittels Expression von Telomerase, welche die Telomerlänge wieder stabilisieren kann, so kann ein Zustand erreicht werden, welcher der Zelle zur Immortalität verhilft (Wright *et al.*, 1995). Siehe hierzu Abbildung 5: Aszendierender Teil der roten Kurve nach der Krise. Neuere Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass eine kritische Telomerverkürzung in Tumorzelllinien mit einer Erhöhung der Telomeraseaktivität einhergehen, und obwohl keine direkte Verbindung zwischen dem Grad der Telomeraseexpression und der resultierenden Telomerlänge hergestellt werden konnte, könnte die Expression von Telomerase eine weitere Telomerverkürzung verhindern. Tatsächlich konnte Counter *et al.* zeigen, dass eine ektope Expression von hTERT es auch Zellen mit einer kritischen Telomerlänge ermöglicht, sich weiter zu teilen, am

wahrscheinlichsten dadurch, dass eine weitere Kürzung der Telomere verhindert wird (Counter *et al.*,1998). In der Tat führt eine Transfektion von Telomerase in retinales Pigmentepithel und Fibroblasten zu einem unbegrenzten Wachstum *in vitro*. Anhand von Studien mit analog hTERT-immortalisierten Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass diese keine Marker neoplastischer Zellen aufweisen und dass sie über ein normales Karyogramm und intakte DNA-Reparaturmechanismen verfügen. Folglich verleiht eine Erhöhung der Telomeraseaktivität noch keine onkogene Potenz.

Die Arbeitsgruppe um Weinberg und Hahn konnten zeigen, dass ein entscheidender Schritt zur Entwicklung einer Krebszelle darin besteht, dass sich diese Zelle die Möglichkeit zur unbegrenzten Replikation aneignet – dem Prozess der sogenannten Immortalisation (Lundberg *et al.*, 2002). Lundberg *et al.* beschreiben eine direkte Immortalisation von humanen Bronchialepithelzellen durch sukzessives Einbringen von SV40-Onkoproteine und hTERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase. So manipulierte Zellen können die Länge ihrer Telomere auf niedrigem Niveau halten und unterliegen so nicht mehr dem programmierten Zelltod. Zellen, welche auf diese Weise „unsterblich“ wurden, sind für die maligne Transformation durch H-ras oder K-ras Onkogene verantwortlich. Diese immortalisierten Zellen, hier am Beispiel von humanen Bronchialepithelzellen, die durch schrittweises Einbringen von genetischen Alterationen geschaffen wurden, stellen Modelle zum besseren Verständnis der molekularen Tumorgenesis dar.

#### 1.1.4 Telomere und Stammzellbiologie

Die Lebenszeit reifer Blutzellen beträgt durchschnittlich fünf bis acht Stunden für Granulozyten und zwölf bis hundert Stunden für einen Monozyten im peripheren Blut, dies macht deren kontinuierliche Neubildung erforderlich, welche bei Erwachsenen  $10^{12}$  Zellen pro Tag übersteigen kann. Auf die gesamte Lebenszeit eines Individuums hochgerechnet, bedeutet dies eine Leistung von ca.  $4 \times 10^{16}$  Zellen. Diese enorme Proliferationsleistung erfordert pluripotente hämatopoetische Stammzellen mit einem gewaltigen replikativen Potential (Lansdorp, 1997). Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind definiert als multipotente Zellen mit der Möglichkeit, selbsterneuernde

Teilungen („self-renewal“) zu durchlaufen. (Till *et al.*, 1961; Metcalf, 1977). Ihre Frequenz im Knochenmark wird mit  $1:10^4$  –  $1:10^5$  der kernhaltigen Zellen angegeben. In früheren Arbeiten von Lansdorp (Lansdorp, 1997; Lansdorp *et al.*, 1995) konnte gezeigt werden, dass sich HSCs unterschiedlichen ontogenetischen Alters, sowohl in ihrem Proliferationspotential als auch ihrer Zellzyklusaktivität signifikant unterscheiden. Diese Beobachtungen scheinen mit dem messbaren Verlust an Telomerlänge in HSC in fetaler Leber, Nabelschnurblut bis zu adultem Knochenmark zu korrelieren (Vaziri *et al.*, 1994; Lansdorp, 1995). In normalen hämatopoetischen Stammzellen scheint die Telomerase nicht in der Lage zu sein, den replikationsbedingten Telomerverlust auszugleichen – wahrscheinlich aufgrund des zu geringen Expressionsniveaus (Broccoli *et al.*, 1995; Chiu *et al.*, 1996; Yui *et al.*, 1998). Theoretisch sollte die Anzahl der Zellteilungen, welche für die Differenzierung der reifen peripheren Blutzelle aus einer primitiven multipotenten Stammzelle erforderlich sind, für das Individuum zeitlebens konstant bleiben. In Anbetracht der relativ kurzen Lebenszeit peripherer Blutzellen, reflektiert die Telomerlänge dieser Zellen, die Telomerlänge der jeweiligen hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark, von welcher sie abstammen. Somit kann man durch Messen der Telomerlänge in definierten Leukozytensubpopulationen, insbesondere an Granulozyten und Monozyten, Schätzungen über den Zellumsatz derjenigen HSC, welche zu einem definiertem Zeitpunkt zur Hämatopoese aktiv beiträgt, vornehmen.

### 1.1.5 Bestimmung der Telomerlänge

Seit Anfang der 90er Jahre erfolgte die Telomerlängenbestimmung in humanen Zellen über Southern-blotting (Allsopp *et al.*, 1992; Allshire *et al.*, 1989; Harley *et al.*, 1990; de Lange *et al.*, 1990). Dieses Verfahren erbrachte nach Verdau der zellulären DNA mittels Restriktionsenzyme Mittelwerte von Telomerfragmenten für die untersuchte Gesamtpopulation von Zellen. Aufgrund der subtelomerisch gelegenen Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme konnten die ermittelten Werte aber nur annäherungsweise die definitive Länge der Telomere wiedergeben, da die aufgetrennten Fragmente auch subtelomere DNA enthielten. Der Beitrag der subtelomeren Regionen

variiert jedoch zwischen 2,5 und 4 kb (de Lange, 1995). Trotzdem stellte die Methode des Southern-blotting mangels Alternativen über viele Jahre den Goldstandard zur Telomerlängenbestimmung dar. Einige andere alternativen Methoden wurden kürzlich beschrieben, darunter „pulsed-field“ Elektrophorese (Lauzon *et al.*, 2000), „slot blots“ (Lauzon *et al.*, 2000) und andere.

Eine alternative Methode zur Telomerlängenmessung, welches das Problem der subtelomerischen DNA umgeht, stellt die „quantitative Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (Q-FISH) an metaphasischen Zellen dar (Zijlmans *et al.*, 1997; Martens *et al.*, 1998). Diese Methode kann mittels Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildverarbeitung an Metaphasezellen auf Objektträger durchgeführt werden. Die Ergebnisse korrelieren gut mit denen des Southern-blots (Lansdorp *et al.*, 1996). Sie ermöglicht eine chromosomenarm-spezifischen Telomerlängenmessung, stellte sich aber sehr arbeits- und zeitintensiv dar, so dass sie für einen routinemäßigen klinischen Einsatz nicht geeignet ist. Hinzu kommt, dass man lediglich sich teilende, in der Mitose befindliche, Zellen untersuchen kann.

Als Weiterentwicklung der Q-FISH-Methode beschrieben Rufer *et al.* eine Kombination aus Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Durchflußzytometrie: Flow-FISH (Rufer *et al.*, 1998). Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Interphasezellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Zellmorphologie kann über die Lichtstreuung im Dunkelfeld nach Größe und Granularität beurteilt werden. Die Kombination aus FISH und Durchflußzytometrie ermöglichte Aussagen über die Telomere in individuellen Zellen und bringt den Vorteil mit sich, dass auch ruhende Zellen analysiert werden können. Die Ergebnisse korrelieren ebenfalls gut mit denen der Southern-blot Methode. Zur Hybridisierung wurden fluoreszenz-markierte Peptid-Nukleinsäuren (PNA) Proben verwendet, welche den Vorteil bieten, stärker, spezifischer und unter unterschiedlichen Bedingungen an die denaturierten DNA-Einzelstränge zu binden. So ist die Bindung wesentlich thermostabiler als DNA-DNA Bindungen. Der relativ geringere Zeitaufwand gegenüber Q-FISH und Southern-blot, ermöglichte den Einsatz zur Beurteilung von Fragestellungen, welche eine sehr große Zahl an Proben voraussetzen (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999). Sie ist damit für den Einsatz zur Beantwortung klinischer

Fragestellungen, zum Beispiel im Rahmen von hämatologischen Erkrankungen oder der allogenen bzw. autologen Stammzelltransplantationen, sehr gut geeignet.

Um Aussagen über Telomerlängen von Leukozytensubpopulationen treffen zu können, wurden Versuche unternommen, die konventionelle Oberflächenfärbung mit der Flow-FISH Methode zu kombinieren (siehe Multi-Color-Flow-FISH).

## 1.2 Stammzelltransplantation

### 1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation

Die Ära der allogenen Stammzelltransplantation begann in den späten 60er Jahren mit den ersten erfolgreichen Transplantationen bei Patienten mit schwerer Immundefizienz und Aplastischer Anämie. In der vergangenen Dekade hat sich die allogene Stammzelltransplantation als zunehmend etabliertes Verfahren in der Behandlung von Patienten mit malignen Erkrankungen der Hämatopoese (Akute und Chronische Leukämien, Lymphome) und nicht-malignen Erkrankungen der Hämatopoese (Thalassämie, Aplastische Anämie) bewährt.

Das Prinzip der allogenen Stammzelltransplantation besteht darin, ein krankes hämatopoetisches System durch ein funktionierendes neues zu ersetzen, welches von einem immungenetisch fremden Spender stammt. Einzige Ausnahme bildet hier die syngene Transplantation von eineiigen Zwillingen. Als Stammzellquellen können zum einem vom Spender, durch Punktion des Beckenkamms gewonnenes Knochenmark, und zum anderen nach Mobilisation mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren durch Leukapherese aus dem peripheren Blut gewonnene Stammzellen, dienen (Arcese *et al.*, 1998; Urban *et al.*, 1997; Bornhauser *et al.*, 2000).

Die individuelle Immunität wird in Form von Oberflächenproteinen, den Haupthistokompatibilitätsantigenen (engl. major histocompatibility complex, MHC) und den Nebenhistokompatibilitätsantigenen (engl. minor histocompatibility antigens, MiHA) zum Ausdruck gebracht. Durch Auswahl des Stammzellspenders nach Übereinstimmung der HLA-Antigene (engl. „human leucocyte antigen“) mit denjenigen des Patienten sind vor allem die Ergebnisse der Transplantation von einem unverwandtem, freiwilligen Spender in den letzten 10 Jahren verbessert worden.

Transplantationshochrelevante Loci sind HLA-A; HLA-B und HLA-DRB1. Ihre Typisierung wird derzeit von der World Marrow Donor Association für eine allogene Stammzelltransplantation gefordert (Hurley *et al.*, 1999).

### 1.2.2 Haploidente Megadose Stammzell-Transplantation

Nachdem die allogene Stammzelltransplantation als potentiell kurative Therapie anerkannt wurde, Spender aber mitunter knapp sind oder für bestimmte seltene HLA-Konstellationen nicht gefunden werden, wuchs die Nachfrage und das Interesse an alternativen Quellen zur Stammzellgewinnung. Es muss bedacht werden, dass nur 25-30% der Patienten, für die eine allogene Transplantation eine Therapieoption darstellt, über einen passenden HLA-identischen Familienspender verfügen, und sich nur in 50% über ein nicht-verwandter HLA-identischer Fremdspender finden läßt.

Mitte der Achtziger Jahre konnten Beatty *et al.* zeigen, dass Transplantationen, welche mit HLA-identischen Geschwisterzellen beziehungsweise mit partiell HLA-mismatched, also nicht genau passenden, Zellen unter den gleichen Bedingungen vollzogen wurden wie Transplantationen mit einem major HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger, ein vergleichbares Resultat erbrachten (Beatty *et al.*, 1985). Aus dieser Beobachtung heraus ergab sich ein neues Spenderkollektiv zur Rekrutierung von Stammzellen, denn nach ausgedehnter Familientypisierung ergab sich, dass 46% der Patienten über einen Familienspender verfügten, welcher sich nur in einem HLA-Antigen unterschied (Vowels *et al.*, 1990).

Vor allem in der Pädiatrie wird zunehmend die Transplantation von Stammzellen vom haploidenten Familienspender eingesetzt, da Eltern als Spender so gut wie immer rekrutierbar sind. Dabei werden Unterschiede in bis zu drei transplantationsrelevanten Antigenen (HLA-A, -B und -DR) (Hurley *et al.*, 1999) toleriert. Im Vergleich zu Transplantation mit HLA-identischen Stammzellen sind die Komplikationen bei haploidenten Transplantationen im allgemeinen höher, vor allem post transplantationem fallen die höhere Toxizität aufgrund des angepassten Konditionierungsschemas zur Vorbeugung einer Abstoßungsreaktion, (Aversa *et al.*, 1998), eine verzögerte und fehlgeschlagene Rekonstitution der Hämatopoese, ein höheres Risiko zur Entwicklung

einer akuten oder chronischen „graft-versus-host“ Reaktion, ein höheres Risiko gegenüber Infektionen (Anasetti et al., 1989; Henslee-Downey et al., 1996 und 1997) und nicht zuletzt eine verzögerte und inkomplette Immunrekonstitution auf.

Um diese oftmals fatalen Folgen auf ein Minimum zu reduzieren, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an: Zum einen kann das Zelltransplantat T-Zell depletiert werden (Lee et al., 1997; Lamb et al., 1998; Reisner et al., 1999) und zum anderen werden die CD34+-Stammzellen angereichert. Beide Strategien verfolgen das Ziel das Transplantat von immunkompetenten Zellen zu depletieren bzw. hämatopoetische Stammzellen anzureichern. Im Durchschnitt erhalten haploident transplantierte Kinder  $1,4 \times 10^7$  CD34+-Zellen/kg Körpergewicht (Schwinger et al., 2000). Diese Folgerungen stammen aus tierexperimentellen Beobachtungen (Reisner et al., 1995), in denen mit Megadosen an Stammzellen versucht wurde über die Histokompatibilitätsbarriere hinweg zu transplantieren. Die Transplantation von einem fast immer verfügbaren Familienspender konnte durch eine intensivierete Konditionierungstherapie, verbunden mit einer weitgehenden Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat mittels Immunaffinitätsanreicherung von CD34+ Zellen in hohem Reinheitsgrad und einer intensivierten Abstoßungsprophylaxe in der klinischen Praxis realisiert werden. Handgretinger und Mitarbeitern ist es gelungen, mit hohen Dosen CD34+ Stammzellen bei Kindern in hohem Prozentsatz (>70%) eine polyklonale Hämatopoese (Engraftment) zu erreichen (Peters et al., 1999; Handgretinger et al., 1998; Handgretinger et al., 1999). Außerdem wurden eine rasche Immunrekonstitution, verbunden mit geringeren infektiösen Komplikationen gegenüber einer autologen nicht-„megadose“ Stammzelltransplantation erreicht. Hinweise auf einen Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt wurden beschrieben (Handgretinger et al., 1998).

Die Verwendung von allogenen hämatopoetischen Stammzellen zur Induktion einer Transplantationstoleranz für eine nachfolgende Organtransplantation oder adoptive Zelltherapie bei Tumorerkrankungen stellt ein schwieriges Unterfangen dar. Eines der Haupthindernisse zur Verwirklichung dieser ebengenannten Ziele ist die Rolle, welche die T-Zellen des Spenders einnehmen. Neben den wertvollen Effekten der T-Zellen (v.a. der CD8+ Helferzellen), welche eine Knochenmarkstransplantation erleichtern, besteht auch immer die potentiell letale Gefahr der „graft-versus-host-disease“ (GVHD, Transplant-gegen-Wirt-Erkrankung), welche über alloreaktive T-Zellen vermittelt wird.

Um eine dauerhafte Etablierung des neuen allogenen hämatopoetischen Systems mit möglichst geringem Risiko einer GVHD zu erreichen, ist die Entwicklung neuer Strategien wünschenswert. Rachamim *et al.* zeigten, dass Zellen innerhalb der CD34+ Population mit einer „Veto“ Aktivität ausgestattet sind (Rachamim *et al.*, 1998). Die Bezeichnung „Veto“ bezieht sich auf die Möglichkeit dieser Zellen zytotoxische Vorläufer-T-Lymphozyten (CTL-p) zu neutralisieren, indem sie sich gegen deren Antigene richten. Außerdem können aufgereinigte CD34+ Zellen nicht nur die Funktion der CTL-p sondern auch deren Absolutzahl supprimieren. Erst vor kurzem ist es Gur *et al.* gelungen die Zahl dieser sogenannten Veto-Zellen zu erhöhen, indem sie *ex-vivo* die Zellen mittels Thrombopoetin, Stammzellfaktor und einer Zytokinmischung einschließlich Flt3-Ligand kultivierten und so die Zellen auf das 28- bis 80-fache anreichern konnten und somit mittels aufgereinigter Megadosis CD34+ Zellen eine Toleranz induzieren konnten, welche vor allem Patienten mit abgeschwächten Konditionierungsschemata (sog. „minitransplants“) zu Gute kommen konnte.

### **1.3 Stammzelltransplantation und Telomerbiologie**

Die Frage nach dem zellulären Umsatz hämatopoetischer Stammzellen nach allogener Transplantation führte zu Studien über die Telomerdynamik nach Knochenmark- und Stammzelltransplantation. Notaro *et al.* zeigten als erste einen signifikanten Telomerverlust von 79 bis zu 1446 kb in peripheren Granulozyten von allogentransplantierten Patienten im Vergleich zu deren Spendern (Notaro *et al.*, 1997). Interessanterweise konnte eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl der transplantierten Stammzellen und der Verkürzung der Telomere *post transplantationem* beobachtet werden. Dies spricht für eine zunehmende replikative Alterung der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in Abhängigkeit von der Menge der transplantierten Zellen, d.h. je weniger HSC transplantiert werden, umso häufiger müssen diese sich teilen, um die Empfängerhämatopoese zu rekonstituieren. Diese Korrelation sahen jedoch nicht alle Arbeitsgruppen (Wynn *et al.*, 1999). Wynn *et al.* bestimmten eine Telomerverkürzung für neutrophile Granulozyten von 0,6 kb und für Lymphozyten von 0,5 kb. Aber auch hier streuten die beobachteten Ergebnisse: Lee *et al.* konstatierten einen mittleren Verlust von 2,36 kb (Lee *et al.*, 1999), hingegen

konnten Akiyama *et al.* Verkürzungen lediglich bis zu 1,0 kb beschreiben. Hierbei muss man erwähnen, dass nicht alle Patienten eine nachweisbare Telomerverkürzung nach Transplantation zeigten. Die Arbeitsgruppe um Akiyama konnte eine Verkürzung der Telomere in Abhängigkeit vom Spenderalter aufzeigen (Akiyama *et al.*, 1998). Rufer *et al.* konnten zeigen, dass es insbesondere im ersten Jahr nach Transplantation zu einer massiven Verkürzung der Telomere zwischen einem und zwei kb kommt (Rufer *et al.*, 2000). Im zweiten Jahr nach Transplantation verlief der Telomerverlust im Empfänger parallel zu dem des Spenders. Dieser parallele Verlust mit 27 bis 59 bp pro Jahr entspricht dem graduellen Verlust im gesunden Kontrollkollektiv. Der akzellerierte Verlust an Telomeren bleibt somit in der Tat auf die Rekonstitution der Hämatopoese nach Transplantation beschränkt. In Untersuchungen an Langzeitüberlebenden nach allogener Knochenmarkstransplantation konnten Mathioudakis *et al.* diese Ergebnisse elegant bestätigen. Es fand sich nämlich bei diesem Patientenkollektiv keine ausgeprägtere Verkürzung der Telomere als bei den Patienten deren Transplantation erst einige Jahre zurücklag (Mathioudakis *et al.*, 2000).

## 1.4 Aufgabenstellung

Für hämatopoetische Stammzellen, welche im Rahmen einer Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation übertragen werden, bedeutet das Anwachsen und die Etablierung eines neuen, vollwertigen Knochenmarks eine enorme proliferative Belastung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten an peripheren Blutleukozyten eines Kollektives von pädiatrischen, sowie adulten Patienten nach allogen-haploidenter Stammzelltransplantation telomerbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, um die Auswirkungen einer Transplantation auf das hämatopoetische Stammzellkompartement besser verstehen zu können. Gerade bei pädiatrischen Patienten stellt sich die Frage nach der kritischen Telomerlängenverkürzung und den in den Folgejahren damit verbundenen chromosomalen Fehlfunktionen, die möglicherweise zur Entstehung von Sekundärmalignomen beitragen könnten, da die Kinder zwar hochaufgereinigte aber relativ zu ihrem eigenen Alter „vorgealterte“ Blutstammzellen der Eltern erhalten, die einem enormen hämatopoetischen Stress

ausgesetzt sind. Bei einer theoretisch möglichen Erschöpfung der Stammzellreserve aufgrund einer möglicherweise telomervermittelten Seneszenz hämatologischer Stammzellen („clonal exhaustion“) könnte es zur völligen Erschöpfung des blutbildenden Systems verbunden mit Immunsuffizienz kommen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund des jungen Alters der Empfänger und der Möglichkeit zusätzlich erforderlicher stammzelltoxischer Therapien im Rezidivfall von besonderer Bedeutung.

Die Mobilisation und Entnahme der CD34+ Stammzellen stellt für den Spender theoretisch eine hämatopoetische Stresssituation dar, die durch Proliferation der verbleibenden Stammzellen kompensiert werden muss und sich in einer replikationsabhängigen Verkürzung der Telomere in peripheren Blutzellen der Spender niederschlagen sollte. Mittels Telomerlängenmessungen vor und nach Mobilisation sollte sich das Ausmaß dieses proliferativen Stress abschätzen lassen.

Ziel dieser Arbeit sollte neben einer reinen Deskription der zellulären Dynamik nach Stammzelltransplantation der Versuch sein, Korrelationen zwischen Telomerverkürzung (nach Transplantation) und transplantierte Zellzahl, Alter des Spenders und dem Zeitpunkt der Immunrekonstitution aufzuzeigen. Ferner sollte eine Abschätzung der Proliferationsbelastung im Rahmen der haploidenten Stammzelltransplantation erfolgen und darüber hinaus ein Vergleich mit HLA-identischen Transplantationen gestellt werden.

## 2 Material

### 2.1 Allgemeines

Das zur Herstellung von Puffern und Lösungen verwendete Wasser war deionisiert und wurde über eine Millipore-Anlage filtriert. Alle Gefäße und Verbrauchsmaterialien wurden hitzesterilisiert.

### 2.2 Geräte

Geräte	Hersteller
FACS-Calibur	Beckton Dickison; San Jose, CA, USA
Heraeus Biofuge 15	Heraeus; Osterode
Heraeus Megafuge 3.0 R	Heraeus; Osterode
Thermoshaker	Schuttron Neolab; Emersacker

*Tabelle 1: Geräteliste*

### 2.3 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
alle verwendeten Reaktionsgefäße	Eppendorf; Hamburg
Pipetten	Gilson International Deutschland; Bad Camberg

*Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Ammonium-Chlorid-Solution	Stem Cell Technologies; Vancouver, B.C., Kanada
BEADS, Quantum TM 24 FITC	Flow Cytometry Standard Corportion; San Juan, Puerto Rico
Bis(sulfosuccinimidyl)suberate BS3	Pierce; Rockford, IL, USA
BSA, bovines Serum Albumin, Fraction V, fatty acid free	CalBioChem; San Diego, CA, USA
Cy-5	Caltag; Hamburg
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich; Steinheim
FCS, fetals Kälberserum	C.C. pro GmbH; Neustadt
Ficoll - Biocoll Separating Solution (isotonic; 1,077 Densitiy)	Biochrom; Berlin
Formamide 100%	Sigma-Aldrich; Steinheim
Formamide, deionisiert	GIBCO; Karlsruhe
PBS Dulbecco´s without Ca <sup>2+</sup> und MG <sup>2+</sup> , without sodiumbicarbonat	GIBCO; Karlsruhe
PNA Oligomer (C3TA2), FITC-markiert	PE-Biosystem; Weiterstadt
Propidium Iodide 25mg/ml	Sigma-Aldrich; Steinheim
Purified antibodies CD14, CD3, CD20, IgG1	Becton Dickinson Immunocytometry systems; San Jose, CA, USA
RNAse T1 500000U/ml from Aspergillus oryzae	Boehringer; Mannheim
RPMI 1640 with glutamax and HEPES	GIBCO; Karlsruhe
Seromed "Trypan blue" 0,5%	Biochrom; Berlin
TrizmaBase TRIS	Sigma-Aldrich; Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich; Steinheim

**Tabelle 3: Chemikalienliste**

## 2.4 Herstellung von Gebrauchslösungen

Lösung	Zusammensetzung
10% BSA	10 g BSA ad 100ml aqua bidest und anschließend steril filtriert
Deionisiertes Formamid	500 ml Ultrapure Formamide, redestilliert, wird mit 25 g Ionenaustauschharz Resin deionisiert und anschließend filtriert
Einfrierlösung für Zellen	40% FCS, 40% RPMI 1640 mit Glutamax und HEPES, 20% DMSO
PI 250 µg/ml	10 µl PI 25 mg/ml ad 1 ml PBS
PNA-F 30 µg/ml	20 µl Stocklösung PNA-F 1 mg/ml in 660 µl 1x TE-Puffer
RNAse T1 100.000 U/ml	200 µl Stocklösung RNAse T1 500.000 U/ml ad 1 ml PBS
1x TE	1 ml 100x TE, pH 8,0 ad 100 ml aqua bidest
1 M Tris-Puffer	12,11 g TrizmaBase TRIS ad 100 ml aqua bidest, mit HCL auf pH 7,1 eingestellt
10% Tween 20	10 ml Tween 20 ad 100 ml aqua bidest

**Tabelle 4:** Liste der Gebrauchslösungen

## 2.5 Blutproben des Patientenkollektivs

In der vorgelegten Studie wurden 17 Empfänger nach allogene-haploidenter Stammzelltransplantation mit einem mittleren Alter von 12,3 Jahren, sowie deren Spender im Zeitraum zwischen November 1999 und Juli 2001 untersucht. Zwei Patienten mussten aufgrund eines inkompletten Chimärismus (<95%) ausgeschlossen werden. Im Durchschnitt wurden die Empfänger- und Spenderzellen am 434. Tag nach Transplantation (zwischen Tag 28 und 1521) untersucht. Eine Übersicht über die Patientencharakteristika und die klinischen Daten geben die Tabellen 5 bis 7.

Ein Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen für telomerbiologische Analysen von peripheren Blutproben von Patienten und Spendern vor und nach allogener Knochenmarkstransplantation liegt vor. Das Blut wurde im Rahmen von Routineblutabnahmen entnommen und erfolgte im dokumentiertem Einverständnis der Patienten, bzw. deren Erziehungsberechtigten. Siehe Einverständniserklärung Abbildung 6.

<b>Empfänger</b>	<b>Alter in Jahren</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Konditionierung</b>
<b>1</b>	0,5	w	Osteopetrosis maligna	BU, CYC, Fludarabin, OKT-3, M-P
<b>2</b>	9	m	ALL	BU, TT, CYC, ALG
<b>3</b>	5	m	CML	BU, TT, CYC, ALG, OKT-3
<b>4</b>	12	w	MDS-Rezidiv	BU, TT, CYC, ALG, OKT-3
<b>5</b>	22	m	T-ALL	TBI, TT, CYC, ALG
<b>6</b>	59	m	ALL	TBI, VP16, CYC
<b>7</b>	5	w	Prä-T-ALL	TBI, ATG, CYC, Fludarabin
<b>8</b>	13	w	T-Zell-NHL	BU, CYC, Fludarabin, OKT-3, M-P
<b>9</b>	10	m	ALL-Rezidiv	TBI, TT, OKT3, VP16
<b>10</b>	3	w	Osteopetrosis maligna	TBI, TT, CYC, ALG
<b>11</b>	4	m	ALL	TBI, TT, OKT-3, VP16
<b>12</b>	29	m	AML	TBI, CYC,
<b>13</b>	2	w	AML	BU, TT, CYC, OKT-3
<b>14</b>	10	m	ALL, Monosomie 5,7	BU, TT, CYC, ATG
<b>15</b>	5	w	SAA	TNI, CYC, OKT-3

**Table 5: Liste der Stammzell-Empfänger mit kompletten Chimärismus Erklärungen**

Diagnosen: **AML**-Akute myeloische Leukämie, **ALL**-Akute lymphatische Leukämie, **CML**-Chronische myeloische Leukämie, **MDS**-Myelodysplastisches Syndrom, **NHL**-Non-Hodgkin Lymphom, **SAA**-Schwere Aplastische Anämie

Konditionierung:**ALG**-Antilymphozytenglobulin, **ATG**-Antithymozytenglobulin, **BU**-Busulfan, **CYC**-Cyclophosphamid, **M-P**-Methylprednisolon, **TBI**-Ganzkörperbestrahlung, **TT**-Thiotepa, **VP16**-Etophos

---

<b>Spender</b>	<b>Alter in Jahren</b>	<b>Verwandschaftsgrad</b>	<b>HLA-Diskordanz</b>	<b>Tage nach SZT</b>
<b>1</b>	27	Vater	3	116
<b>2</b>	35	Vater	3	569
<b>3</b>	37	Vater	2	784
<b>4</b>	48	Vater	2	1169
<b>5</b>	19	Bruder	2	1521
<b>6</b>	17	Tochter	2	1009
<b>7</b>	34	Mutter	3	28
<b>8</b>	33	Mutter	3	28
<b>9</b>	38	Mutter	3	28
<b>10</b>	26	Vater	3	269
<b>11</b>	32	Vater	3	76
<b>12</b>	25	Schwester	2	28
<b>13</b>	30	Vater	3	52
<b>14</b>	53	Vater	3	760
<b>15</b>	34	Vater	3	78

---

**Table 6: Liste der Stammzell-Spender Erklärung**  
**Tage nach SZT- Analyse der Proben in Tagen nach Stammzelltransplantation**

Patienten	CD34+x10 <sup>6</sup> pro kg KG	CD3+x10 <sup>3</sup> pro kg KG	Chimärismus in % des Spenders	Leukozyten take (>1000)	Granulozyten take (>500)
1	40	16,3	99	12	11
2	23		100	13	12
3	25		100	10	10
4	17		100	14	13
5	10,7		100	16	16
6	4,1		100	23	23
7	28,5	5,8	100	24	24
8	11,8	8,5	100	10	10
9	15,8		95	11	11
10	29	1,18	100	9	9
11	19	7,9	100	15	18
12	7,34	10	100	18	18
13	36	9	100	10	10
14	17,4		100	9	9
15	15	4,3	100	13	13

**Tabelle 7: Transplantationsdaten und klinische Angaben nach Transplantation**

„take“ (engraftment) steht für den Tag nach Transplantation, an welchem 1000 Leukozyten/ $\mu$ l bzw. 500 Granulozyten/ $\mu$ l im peripheren Blut gemessen werden konnten.



### **Aufklärungsblatt: Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken**

Sehr geehrter Patient, sehr geehrte Patientin,

zur Behandlung Ihrer Erkrankung sind ärztliche Maßnahmen erforderlich, in deren Folge unter anderem auch Blutproben entnommen werden müssen. Die Abt. II der Medizinischen Universitätsklinik führt eine Untersuchung zur "Zellulären Alterung hämatopoetischer Stammzellen" durch. Für diese Untersuchung bitten wir Sie um eine Blutspende von insgesamt 5 ml Blut.

Sie werden keinen persönlichen Nutzen von der Blutspende haben, die Ergebnisse dieser Untersuchung werden jedoch möglicherweise dazu beitragen, Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems frühzeitig zu identifizieren bzw. bei bestehenden Erkrankungen bessere prognostische Aussagen über den Verlauf der Erkrankung treffen zu können.

Die zusätzliche Blutmenge soll während einer medizinisch notwendigen Routine-Blutentnahme entnommen werden. Daher ist die Blutspende für Sie mit keinen zusätzlichen Risiken oder Nebenwirkungen verbunden. Die Abnahme einer geringen Blutmenge führt zu keiner zusätzlichen Belastung für Ihren Körper (Vergleich: bei einer Blutspende für die Blutbank werden 500 ml Blut abgenommen). Die Blutzellen werden entweder sofort analysiert oder tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert. In diesem Fall geschieht dies in Verantwortung des behandelnden Arztes bzw. des ärztlichen Direktors. Ein Klonen der Zellen oder ähnliche gentechnologische Manipulationen werden ausdrücklich ausgeschlossen.

Ihre Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung ist vollkommen freiwillig. Sie können jederzeit das Einverständnis zur Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne das Ihnen daraus ein Nachteil für die weitere Behandlung entsteht. Die während dieser Untersuchung gesammelten Daten werden nur in anonymisierter Form weitergeleitet. Die Ergebnisse dieser Studie sollen publiziert werden.

Mit der Blutspende von 5 ml Blut für die Untersuchung "Zelluläre Alterung hämatopoetischer Stammzellen" bin ich einverstanden:

Name und Unterschrift des Patienten/Blutspenders: \_\_\_\_\_

**Universitätsklinikum Tübingen**  
Anstalt des öffentlichen Rechts  
Sitz Tübingen  
Geisweg 3 - 72076 Tübingen  
Telefon (0 70 71) 29-0  
Stadtbus - Linie 5

**Aufsichtsrat:**  
Helmut Meinhold (Vors.)

**Vorstand:**  
Prof. Dr. Michael Bamberg\* (Leitender Ärztlicher Direktor)  
Prof. Dr. Ludger Seipel (Stellv. Leitender Ärztlicher Direktor)  
Prof. Dr. Eberhart Zrenner (Dekan)  
Rüdiger Strehl\* (Kaufmännischer Direktor)  
Günther Brenzel (Pflegedirektor)

\* Gemeinsame Vertretungsbefugnis

**Banken:**  
**BW-Bank AG Tübingen**  
(BLZ 641 200 30) 1 208 075 000  
**KSK Tübingen**  
(BLZ 641 500 20) 14 144

### **Abbildung 6: Einverständniserklärung**

## 3 Methoden

Die durchschnittliche Länge der Telomersequenzen am Chromosomenende der einzelnen Zellen (beim Menschen TTAGGG) wurden mit der sogenannten Flow-FISH Methode bestimmt. Diese Methode stellt eine Kombination aus Durchflußzytometrie und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) dar. Zur Hybridisierung wurden fluoreszenz-markierte Peptid-Nukleinsäuren (PNA) verwendet, welche den Vorteil bieten, stärker und spezifischer an die denaturierten DNA-Einzelstränge zu binden. Darüber hinaus ist die Bindung wesentlich thermostabiler und erfolgte bei niedrigerer Ionenkonzentration als DNA-DNA Bindungen, so dass selektive Hybridisierungsbedingungen gewählt werden können (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999). Anstelle der Ribose bzw. Desoxyribose enthält die PNA das ungeladene, neutrale Glycin im Rückgrat des Einzelstranges (Lansdorp *et al.*, 1997; Egholm *et al.*, 1993). Die Telomerfluoreszenz war proportional zu der Länge der Telomere, welche über den terminalen Restriktionfragmentenverdau mittels Southern Blot, ermittelt wurden.

### 3.1 Flow-FISH

#### 3.1.1 Aufarbeitung der Zellen durch Ammoniumchlorid

Die EDTA-Blutproben wurden zur Gewinnung der peripheren Blutleukozyten mit Ammoniumchlorid im Verhältnis 1:4 gemischt und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Ammoniumchlorid erfolgte während dieser Zeit eine osmotische Lyse der Erythrozyten. Hieran schloss sich eine Zentrifugation (HERAEUS, Megafuge 3.0 R) bei 1200 U für zehn Minuten bei einer Temperatur von 4°C an. Der Überstand wurde dekantiert und die kernhaltigen Leukozyten wurden noch zweimal mit je 1 ml Ammoniumchlorid resuspendiert, für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 12000 U in der Tischzentrifuge (HERAEUS, Biofuge 15) für drei Sekunden abzentrifugiert. Diese Lyse- und Waschschrte sind wichtig, um sicherzugehen, dass keine Erythrozyten, Erythrozytenreste bzw. Hämoglobin in der Probe verblieben waren, welche bei der späteren durchflußzytometrischen Messung mit der Fluoreszenz der Telomere interferieren

könnten. Der im Anschluß an den dritte Lyseschritt gewonnene Überstand wurde erneut abgesaugt und das Pellet mit 1 ml PBS (phosphate-buffered saline Dulbecco's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat) und 0,1% BSA (Albumine, bovine serum) resuspendiert.

### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahl und die Zellvitalität wurde bestimmt, indem 10 µl der jeweiligen Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:5 resuspendiert wurden. Trypanblau färbte lediglich die toten Zellen, da lebende Zellen im Stande sind den Farbstoff aktiv zu eliminieren. Nach der Vitalfärbung wurden die Zellen in eine Neubauerzählkammer überführt und gezählt, wobei bei jeder Zählung auch der Prozentsatz lebender Zellen in der Probe („viability“) dokumentiert wurde. Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Multiplikation von Zellzahl, Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor ( $10^4$ ).

### 3.1.3 Aufarbeitung der Zellen mittels Ficoll

Mononukleäre periphere Zellen lassen sich durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Hypaque) isolieren: 5 ml EDTA-But wurden in 25 ml PBS gut resuspendiert und 15 ml Ficollösung (spezifische Dichte 1,077g/ml) wurden unterschichtet. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 1800 Umdrehungen, erhielt man aufgrund des Dichtegradienten der Ficollösung in der Interphase des Ansatzes - zwischen Überstand (Plasma und Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque - Lymphozyten und Monozyten. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, welche eine höhere Dichte besitzen. Der Interphasering wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in 45 ml RPMI 1640 mit Glutamax zweimal gewaschen und bei 1300 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellzahl, wie bereits beschrieben, in der Neubauerzählkammer bestimmt.

### 3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellsuspensionen, welche nicht am selben Tag verarbeitet werden sollten, wurden zuerst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur Analyse gelagert. Als Einfrierlösung wurde eine 10-%ige DMSO-Lösung verwendet, bestehend aus je 40% RPMI 1640 und FCS sowie 20% DMSO. Zellsuspension und Einfrierlösung wurden im Verhältnis 1:1 verwendet.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  FCS resuspendiert und bei 12000 U/min (Biofuge 15, Tischzentrifuge HERAEUS) für wenige Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, die Zellvitalität und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung und Neubauerzählkammer erneut bestimmt.

### 3.1.5 Denaturierung der DNA und *in-situ*-Hybridisierung

Für jede Probe wurden Doppelwerte angesetzt, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Telomerlängenbestimmung überprüfen zu können. Um die spezifische Telomerfluoreszenz der Zellen zu erhalten, muß von der gemessenen mittleren Fluoreszenz, der mit PNA-Probe hybridisierten Zellen, die Eigenfluoreszenz der Zellen subtrahiert werden, da Leukozyten ein hohes Maß an Eigenfluoreszenz besitzen, welches das Ergebnis falsch zu hoch erscheinen lassen würde. Deshalb wurde bei jeder Probe ein sogenannter „Leerwert“ („unstained“) immer mitgemessen. Somit wurden zur Telomerlängenbestimmung pro Probe vier 1,5 ml Eppendorf Röhrrchen mit je 500  $\mu\text{l}$  PBS und 0,1 %BSA beschickt: Je zwei Röhrrchen für den Ansatz mit („telomere“) bzw. ohne („unstained“) PNA-Probe. Hierin wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen eingesetzt, bei 12000 U (Biofuge 15) anzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, so daß das Pellet sehr trocken war. Die Zellen wurden im Hybridisierungsansatz resuspendiert. Zur Bestimmung der Telomerfluoreszenz enthielt der Hybridisierungsmix telomerspezifische Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte PNA-Probe. Man verwendete 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmix pro  $10^5$  Zellen. Im Hybridisierungsansatz sind enthalten:

Stock	Endkonzentration ohne PNA-Probe „unstained“	Endkonzentration mit PNA-Probe „telomere“
1M Tris pH 7,1	20mM (1:50)	20mM (1:50)
10 % BSA	1% (1:10)	1% (1:10)
Formamid 100%	70%	70 %
PNA-F 30 µg/ml	-	0,3µg/ml (1:100)
ddH2O	X	Y

**Tabelle 8: Hybridisierungsmix**

Der Ansatz wurde mit einer Pipettenspitze gut resuspendiert und im Thermoshaker für 10 Minuten bei 80°C denaturiert, so dass die doppelsträngige DNA in Einzelstränge auftrennten. Anschließend wurden die Zellen für wenigstens 1 ½ Stunden zur Hybridisierung bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen, um ein spezifisches Binden der im Überschuß vorhandenen FITC-markierten PNA-Probe an die Telomersequenzen zu ermöglichen.

Es folgten zwei Waschstapen mit Waschpuffer #1, um überschüssige, ungebundene sowie unspezifisch, gebundene PNA-Probe aus den Proben zu entfernen.

Waschpuffer # 1	Endkonzentration
Formamide 100 %	70%
1 M TRIS	10 mM (1:50)
10 % BSA	0,1% (1:100)
Tween 20 10%	0,1% (1:100)
dd H2O	X

**Tabelle 9: Waschpuffer 1**

Man fügte 1 ml Waschpuffer #1 pro Röhrchen hinzu und resuspendierte. Bei 2800 Umdrehungen und 10 Minuten wurden die Ansätze in der Megafuge (Heraeus) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 100 µl abgesaugt und nochmals mit einem Milliliter Waschpuffer #1 gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert (s.o.).

Wiederum wurde der Überstand abgenommen und mit 1 ml Waschpuffer #2 gewaschen.

Waschpuffer # 2	Endkonzentration
10 % BSA	0,1% (1:100)
Tween 20 10%	0,1% (1:100)
PBS	X

**Tabelle 10: Waschpuffer 2**

In der Megafuge (Heraeus) wurde für 10 Minuten bei 2000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 50 µl abgenommen.

### 3.1.6 DNA-Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI)

Es folgte die Färbung der DNA mit Propidiumiodid (PI). Pro  $10^5$  Zellen wurden 100µl Lösung verwendet. Da sich die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PI bei einer bestimmten Konzentration überschneiden, wurde die PI-Konzentration suboptimal gewählt, so dass eine Interaktion zwischen emittierter DNA-Fluoreszenz (PI) und spezifischer Fluoreszenz für Telomer-repeats (FITC) weitestgehend vermieden werden konnte. Aufgrund dieser Konzentration war die Trennung nach Leukozytensubpopulation bei der anschließenden Messung und Auswertung ein wenig eingeschränkt. In der Lösung sind enthalten:

Pi/RNase T1 Lösung	Endkonzentration
Pi 0,06 µg/ml	0,6% (1:167)
RNase T1 1000 U/ml	(1:100)
10 % BSA	0,1% (1:100)
PBS	X

**Tabelle 11: PI-Lösung**

Die Zellen wurden in der PI-Lösung gut resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Inkubiert wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach konnte man die Zellen bei 4°C für maximal zwei Tage bis zur durchflußzytometrischen Analyse aufbewahren.

### 3.1.7 Messung

Die Messung der Telomerfluoreszenz erfolgte am FACSCalibur (Becton Dickinson) mittels Durchflußzytometrie. Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Zellen können über die Lichtstreuung im Dunkelfeld nach ihrer Größe und Granularität beurteilt werden. In der Fluoreszenzbetriebsart werden Zelleigenschaften untersucht, die mit der Bindung von Fluorochromen über Antikörper an Oberflächenmolekülen assoziiert sind oder, wie in der vorliegenden Arbeit, über fluoreszenz-markierte Moleküle, welche intrazellulär binden.

Bei Leukozyten wird im Engwinkel zum Laserstrahl (forward scatter, FSC) die Zellgröße und im rechten Winkel (side scatter, SSC) die Zellgranularität bestimmt. Die FITC-markierte PNA-Probe wird mit dem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Telomerfluoreszenz im FL1-Kanal gemessen. Der DNA-Gehalt der Zellen, der durch die Propidiumiodid-Fluoreszenz wiedergegeben wird, wird im FL3-Kanal gemessen und lässt eine Abgrenzung der 2n-Population von den 4n-Populationen zu.

Zur Erhebung der Werte am Durchflußcytometer (FACSCalibur) wurden die Zellen unter folgendem Setting linear gemessen (FL3 je nach PI-Konzentration):

Signal	Spannung [Volt]	Signalverstärkung
FSC	E-1	8
SSC	345	4
FL1	775	4
FL3	500	4

**Tabelle 12: Setting**

Zur Darstellung der 2n-Population der Zellen wurde ein Streulichtdiagramm (Dot-Plot) gewählt, dabei wurde die FSC-Lichtintensität (Abszisse; lineare Darstellung) gegen die Lichtintensität des DNA-Farbstoffes im FL3-Kanal (Ordinate; lineare Darstellung) aufgetragen. Die gewünschte diploide Leukozytenpopulation stellt sich dabei als abgrenzbare, zusammenhängende Zellwolke in der Mitte des Diagramms dar. Diese Wolke wurde durch ein Fenster abgegrenzt (Region 1, R1 in Dot-Plot A, Abbildung 7)

und nur diese Zellen wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Um die Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten, wurden die Messungen solange fortgeführt, bis im Gate R1 50000 Ereignisse gezählt waren. Die Lichtintensitäten des FITC-Farbstoffes wurden jeweils für die unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen in einem Histogramm dargestellt. Dazu wurde die Lichtintensitäten des FITC-Farbstoffes im FL1-Kanal auf der Abszisse (lineare Darstellung) gegen die Anzahl der pro Intensität gemessenen Ereignisse auf der Ordinate (lineare Darstellung) aufgetragen.

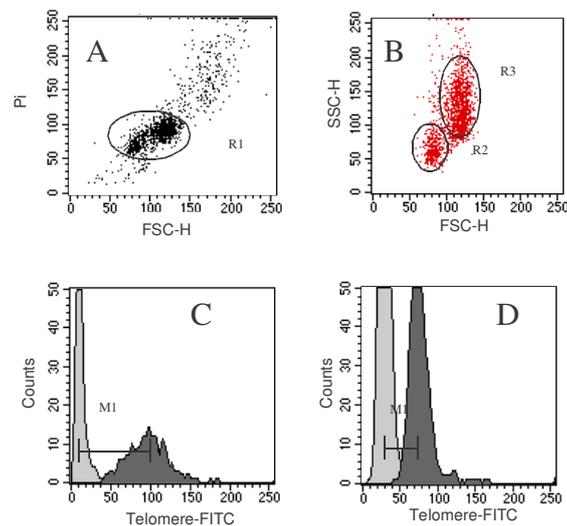
Um Daten verschiedener Experimente an diversen Tagen zu vergleichen und um die täglichen Schwankungen der einzelnen Komponenten des Durchflußzytometers, sowie Abweichungen der Laserintensität und -ausrichtung korrigieren zu können, wurden zu Beginn und am Ende eines jeden Experiments FITC-markierte 'beads' (Flow Cytometry Standards Corporation) in PBS 0,1% BSA gemessen. Die 'bead'-Lösung enthält vier Populationen FITC-markierter Teilchen, die alle mit einer unterschiedlichen definierten Anzahl von Fluoreszenzmolekülen (molecules of equivalent soluble fluorochrome, MESF) versehen sind (zwischen 3000 und 50000 MESF-Einheiten). Die vor und nach jedem Experiment gemessene mittlere Fluoreszenz für jede der vier verschiedenen Fluoreszenzpeaks wurde benutzt, um eine Kalibrationskurve zu erstellen und so die Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in die Fluoreszenzeinheit MESF zu ermöglichen.

### 3.1.8 Auswertung

Bei der Auswertung mit dem Programm Cell Quest (Becton Dickinson) wurde in Dot-Plot A die 2n-Population der Zellen untersucht (Region 1, R1 in Dot-Plot A), die bei ihrer Auftrennung nach unterschiedlicher Größe (forward scatter, FSC) und Granularität (side scatter, SSC) zwei Subpopulationen der Leukozyten, nämlich Lymphozyten (Region 2, R2 in Dot-Plot B) und Granulozyten (Region 3, R3 in Dot-Plot B) zeigte. Nur die Lichtintensitäten der in R2 und R3 enthaltenen Ereignisse wurden in Histogrammen dargestellt und geben zum einen die Eigenfluoreszenz (hellgrau) der Lymphozyten und zum anderen die Telomerfluoreszenz (dunkelgrau) der Lymphozyten

in Channels wieder (Histogramm C). Ebenso verhält es sich für die Granulozyten (Histogramm D), wobei die Granulozyten allerdings eine höhere Eigenfluoreszenz als die Lymphozyten zeigen.

Die mittlere spezifische Telomerfluoreszenz (M1) der Granulozyten bzw. Lymphozyten wurde durch Subtrahieren der durchschnittlichen Fluoreszenz der Leerwerte (Probenansatz ohne PNA-Telomerprobe, „unstained“) von den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten des gleichen, aber mit der FITC-markierten PNA-Probe („telomere“) hybridisierten Probenansatzes ermittelt.



**Abbildung 7: Beispiel einer Auswertung von Telomerfluoreszenzmessungen an Leukozytensubpopulationen**

Zur Umrechnung der mittleren Telomerfluoreszenz von Lymphozyten oder Granulozyten in kMESF wurden diese Differenzen durch  $10^3$  und durch die Steigung (slope) der Geraden, die aus den gemessenen Fluoreszenzen der FITC-markierten Kalibrationsbeads erhoben wurden, dividiert:

$$\text{Telomerlänge in kMESF} = \text{gemessene Channels} / 1000 / \text{slope}$$

(bei einer Messung in FL1 von  $775 \times 4$ )

Um die Telomerlänge in kb angeben zu können, muss die Telomerfluoreszenz – gemessen in kMESF Einheiten - anhand der folgenden Formel umgerechnet werden (Rufer *et al.*, 1998):

$$kb = \text{MESF-Einheiten} * 10^3 * 0,02604 * 0,019$$

Da die Telomerlänge einen altersabhängigen Parameter darstellt, ist es erforderlich eine Altersadaption der individuellen Messungen durch Vergleich mit Messungen in gesunden Kontrollindividue durchzuführen. Daher wurden die erhaltenen Ergebnisse der Proben mit den Telomerlängen der altersadaptierten gesunden Kontrollpopulation, die von Rufer und Brümmendorf *et al.* 1999 beschrieben wurde, verglichen. Errechnet wurden diese Werte der altersadaptierten Kontrolle mit den Formeln für

$$\text{Granulozyten} = 15,96 - 0,079 \times \text{Alter}$$

$$\text{Lymphozyten} = 18,48 - 0,119 \times \text{Alter}$$

Die Differenz (altersadaptierte Telomerlänge der Granulozyten,  $\Delta\text{Tel}_{\text{gran}}$  bzw. altersadaptierte Telomerlänge der Lymphozyten,  $\Delta\text{Tel}_{\text{lymph}}$ ) aus diesem Vergleich verdeutlichte dann das Ausmaß der individuellen Streuung innerhalb des Patientenkollektivs (Empfänger und Spender) und im Vergleich zur gesunden Kontrollpopulation (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999).

### 3.1.9 Plausibilitätskontrolle

Die Plausibilitätskontrolle betrifft die Kontrolle des Musters der Analysenwerte eines Patienten. Sie soll Diskrepanzen und unplausible Ergebniskonstellationen durch Extremwertkontrolle, Konstellationskontrolle oder Vorwertvergleich aufdecken und eliminieren dürfen.

In dieser vorliegenden Arbeit mussten keine Werte ausgeschlossen werden.

### 3.1.10 Präzisionskontrolle

#### 3.1.10.1 Präzisionskontrolle mittels peripherer mononukleärer Zellen

Zur Qualitätssicherung der erhobenen Ergebnisse wurde eine Präzisionskontrolle in Anlehnung an die CUL (Clinically useful limits-) Kriterien von Schoen *et al.* durchgeführt (Schoen *et al.*, 19989). Unter Präzision versteht man die gegenseitige Annäherung voneinander unabhängigen Messergebnissen bei mehrfacher Anwendung einer Methode und macht Aussagen über die Zuverlässigkeit einer Methode, die durch verschiedene Personen, mit verschiedenen Geräten und an verschiedenen Tagen durchgeführt wird. Sie dient als Kenngröße für den zufälligen Fehler, der prinzipiell bei jeder Analyse unvermeidbar ist und auf verschiedenen Faktoren, wie z.B. Temperaturschwankungen während der Inkubation, Anzahl der Pipettierschritte, Stabilität des Messgerätes und menschliche Fehler, beruhen kann. Ausgedrückt wird die Präzision durch Standardabweichungen und Variationskoeffizient. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte eines Kollektivs um den Mittelwert und der Variationskoeffizient gibt an, wie viel Prozent vom arithmetischen Mittelwert die Standardabweichung beträgt. Zur Durchführung der Präzisionskontrolle wurden periphere mononukleäre Zellen von Patienten mit Lymphomen und aus verschiedenen Buffy coats gesunder Spender gewonnen: Die durch Ficollisieren des Kontrollmaterials gewonnenen peripheren mononukleären Zellen stellten jedes für sich eine Kontrollpopulation dar, die bei bis zu 100 Testreihen mitgeführt werden konnten. Die ficollisierten mononukleären Zellen jedes einzelnen Kontrollmaterials wurden zu diesem Zweck in Aliquots mit etwa  $3 \times 10^7$  Zellen eingefroren und Aliquot von mindestens zwei Kontrollpopulationen zu jeder Probenmessreihe aufgetaut. Anschließend wurden sie genauso wie die Patientenproben weiterbehandelt (s.o.) und am Anfang jeder Testreihe am FACSCalibur gemessen und ausgewertet.

#### 3.1.10.2 Berechnung der Kontrollgrenzen und Ausschlusskriterien von Testreihen

Die mittlere gemessene Telomerlänge der mitgeführten Kontrollpopulationen wurden über die Zeit dokumentiert. Nachdem die Aliquots einer Kontrollpopulation verbraucht waren, wurde mittels dem Statistikprogramm SigmaStat (Version 2.0, SPSS Science) von den dokumentierten Ergebnissen der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung

(s) berechnet. Die Kontrollgrenzen wurden anschließend nach den CUL-Kriterien als zweimal die Standardabweichung ( $2s$ ) festgelegt (Schoen *et al.*, 1989; Fraser und Petersen, 1993). Dabei liegen bei normalverteilten Messwerten 95,5% aller Werte innerhalb von zwei Standardabweichungen zu beiden Seiten eines Mittelwertes.

Lagen die Kontrollwerte an einem Testtag außerhalb der  $2s$ -Grenzen, entfiel die gesamte Testreihe und die Ergebnisse der analysierten Proben wurden in keiner weiteren statistischen Auswertung mehr berücksichtigt.

Nach diesen Kriterien wurden im Zeitraum von November 1999 bis November 2001 12 (7%) von insgesamt 171 Testreihen unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen, d.h. 159 Experimente gingen in die weitere statistische Auswertung ein. Für diese vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass bei drei Patienten Experimente ausgeschlossen werden mussten, welche einen Verlauf über die Zeit (Folgewerte) demonstrieren sollten.

Der durch die Ergebnisse der einzelnen Kontrollpopulationen ermittelte Variationskoeffizient schwankte zwischen 17 und 27%.

### 3.1.11 Statistische Auswertung der Studie

Für die statistische Auswertung wurden folgende Methoden mittels den Statistikprogrammen SigmaStat (Version 2.0; SPSS Science) und Jump<sup>®</sup> (Version 4.0; SAS Institute Inc.) benutzt: Zum Vergleich der mittleren Telomerlängen der peripheren Blutleukozytensubpopulationen von Stammzellempfängern mit ihren korrespondierenden Spendern wurde der t-Test für verbundene Stichproben (paired t-Test) angewandt.

## 3.2 Telomerlängenbestimmung an phänotypisch definierten

### Leukozytensubpopulationen mittels Multi-Color-Flow-FISH

Die Telomerlänge der einzelnen Zellen wurde durch das oben beschriebene Flow-FISH Protokoll gemessen (Rufer *et al.*, 1998). Die Zellpopulationen im peripheren Blut wurden aufgrund ihrer Größe und Granularität getrennt. So war eine Unterscheidung zwischen lymphozytären und myeloischen Zellen möglich, nicht jedoch eine weitere

Differenzierung zwischen Subpopulationen dieser Zellreihen. Eine Aufreinigung der Subpopulationen, z.B. über immunogenetische Affinitätssonden, ist für die klinische Routine zu arbeitsintensiv. So wurde der Versuch unternommen, die Flow-FISH Methode mit Oberflächenfärbungen zu kombinieren. Die Eiweiß-denaturierenden Bedingungen des Flow-FISH Protokolls mit Inkubationen bei 80°C für 10 Minuten und Waschschritten mit 70% Formamid, schlossen eine konventionelle Oberflächenmarkierung im Anschluß an das Protokoll aus. Batliwalla *et al.* entwickelten eine neue Methode, welche eine Telomerlängenbestimmung mit Flow-FISH bei gleichzeitiger Analyse der Oberflächenmarker erlaubt. Diese neue Methode bedient sich kovalenter Bindungen zwischen der Zelloberfläche und Antikörperkomplexen, welche mit hitzestabilen Fluorochromen konjugiert sind. Im Anschluß wurde die Flow-FISH Methode, wie unter 3.1.5 beschrieben, durchgeführt. Das Protokoll sieht folgende Arbeitsschritte vor: Auftauen, Nativ-Antikörperfärbung, Fluorochromfärbung, Crosslinking und anschließender Flow-FISH. Dazwischen erfolgten diverse Waschschriffe.

### 3.2.1 Aufarbeitung der Zellen mittels Ficoll

Die Gewinnung der Zellen erfolgte mittels Ficoll-Paque (Gradienten Zentrifugation), Aufnahme in 10%iger DMSO-Lösung in Medium und Lagerung in flüssigem Stickstoff.

### 3.2.2 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 500 µl FCS resuspendiert und für wenige Sekunden bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 500 µl PBS und 5% FCS resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer die Zellzahl sowie die Vitalität der Zellen bestimmt.

### 3.2.3 Nativ-Antikörperfärbung

Zur Ermittlung der Telomerlänge wurden für jeden Ansatz jeweils in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen  $3 \times 10^5$  Zellen pipettiert, wiederum ein Röhrchen für die telomerspezifische Fluoresceininsothiocyant (FITC)-markierte PNA-Probe („telomere“, tel.) und ein Röhrchen für den Leerwert ohne PNA-Probe („unstained“, unst.).

Es wurden die nativen Antikörper mit je 7  $\mu$ l IgG1 als Negativkontrolle, sowie CD14, CD3 und CD20, vorgelegt. Hinzukamen die  $3 \times 10^5$  Zellen und 50  $\mu$ l PBS. Es wurde gut resuspendiert und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Hieran schloss sich eine 5-minütige Inkubationszeit mit 1 ml PBS pro tube und Zentrifugation bei 1200U/min bei 4°C an.

### 3.2.4 Fluorochromfärbung

Der Überstand wurde bis auf 50  $\mu$ l abgesaugt und im abgedunkeltem Raum 7  $\mu$ l Cy-5 (Fluorochrom) aufpipettiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und auf 80 $\mu$ l abgesaugt.

### 3.2.5 Crosslinking

Nun folgte die kovalente Bindung mit dem BS3 (Bissulfosuccinimidylsuberate)-Antikörper: einem wasserlöslichen, nicht-spaltbaren Crosslinker, welcher mit primären Aminen reagiert und so eine kovalente Bindung zwischen Antikörper-Fluorochrom-Komplex und Zelloberfläche resultiert. BS3 wurde mit einer Endkonzentration von 1mM auf die Zellsuspension pipettiert, resuspendiert und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die überschüssige Reagenz wurde mit 1 ml Stoppreagenz ( 100 mM Tris und 150 mM NaCl) bei 30 Minuten Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde - soweit möglich - völlig entfernt.

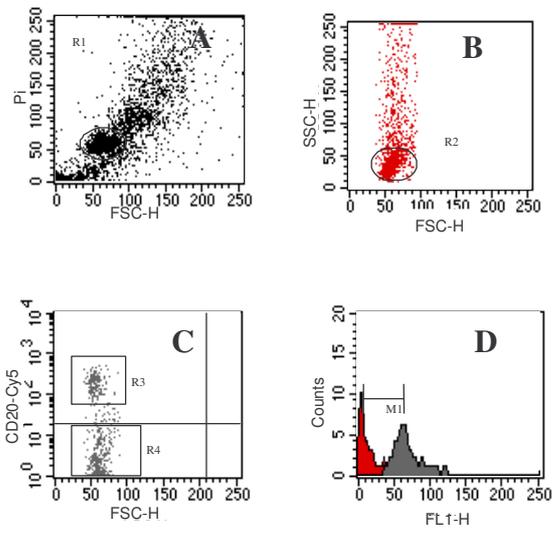
### 3.2.6 Konventionelle Flow-FISH Methode

Es folgten die in Kapitel 3.1.5 beschriebenen Schritte der Flow-FISH zur Ermittlung der Telomerlängen in den einzelnen Zellen.

### 3.2.7 Messung und Auswertung

Die Messung und Auswertung der Telomerlänge erfolgten am FACS-Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) und mit dem Auswertungsprogramm Cell Quest (Becton Dickinson) wie unter 3.1.7 bzw. 3.1.8 bereits beschrieben. Ergänzt werden sollte, dass in FL-1 das Telomerfluoreszenzsignal auf einer linearen Skala akquiriert wurde, während in FL-4 für das Oberflächenfluoreszenzsignal eine logarithmische Skala verwendet wurde.

Abbildung 8 zeigt ein Beispiel einer Auswertung von Telomerfluoreszenzmessungen an Leukozytensubpopulationen mittels Multi-Color-Flow-FISH. Bei der Auswertung mit dem Programm Cell Quest (Becton Dickinson) wurden in Plot A die  $2n$ -Population der Zellen untersucht, die bei ihrer Auftrennung nach unterschiedlicher Größe und Granularität zwei schwache Populationen in R2 zeigt (Plot B): Lymphozyten und myeloische Zellen. Aufgrund der Nativ-Antikörperfärbung zeigt Plot C in R3 die CD20 positiven Zellen der Region R2 in Plot B: die B-Lymphozyten. Hingegen zeigt R4 die CD20 negativen Zellen aus R2: T-Lymphozyten und myeloische Zellen. Mittels M1 in Histogramm E kann die mittlere spezifische Telomerfluoreszenz der CD20 positiven Zellen durch Subtrahieren der durchschnittlichen Fluoreszenz der Leerwerte (Probenansatz ohne PNA-Telomerprobe, rot dargestellt) von den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten des gleichen, aber mit der FITC-markierten PNA-Probe (grau dargestellt) ermittelt werden. Die Negativkontrolle wurde mittels IgG1-Färbung durchgeführt (nicht dargestellt).



**Abbildung 8:** Beispiel einer Auswertung von Telomerfluoreszenzmessungen an Leukozytensubpopulationen mittels Multi-Color-Flow-FISH

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Telomerlänge in peripheren Blutleukozyten von Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation

Die Telomerlängendynamik wurde an peripheren Blutleukozyten von Patienten nach allogenen haploidenten und allogenen familiären Stammzelltransplantation und deren Spendern untersucht. Zum Patientenkollektiv gehörten siebzehn überwiegend pädiatrische Patienten, von denen zwei aufgrund des fehlenden kompletten Spenderanteils (Chimärismus < 95%) von weiteren Analysen ausgeschlossen werden mussten.

Um sicher zu gehen, dass die untersuchten Zellen im Empfängerblut den transplantierten Spenderzellen entsprechen, stützte man sich auf die Ergebnisse der Chimärismusanalyse. Ziele der Transplantation sind ein dauerhafter Chimärismus und eine gegenseitige Immuntoleranz von Empfänger und Transplantat. Unter Chimären versteht man im medizinischen Sprachgebrauch Individuen mit zwei Blutgruppen bzw. immungenetisch unterschiedlichen hämatopoetischen Systemen. Durch Knochenmarktransplantation wird ein vollständiger Chimärismus (Chimärismus von 100%) angestrebt. Überleben hämatopoetische Stammzellen des Empfängers, entsteht ein gemischter Chimärismus. Die Chimärismusanalyse nach allogener Stammzelltransplantation erfolgte durch Darstellung von single-locus Polymorphismen nach PCR (Polymerasekettenreaktion) und Polyacrylamid-Elektrophorese aus peripherem Blut. Diese Analysen erfolgten am selben Tag wie die Untersuchungen zur Telomerlängenbestimmung.

In die Auswertung eingeschlossen wurden die verbleibenden fünfzehn Patienten im Alter zwischen sechs Monaten und fünfzig Jahren (durchschnittliches Alter 12,3 Jahre) im Durchschnitt am Tag 434 (zwischen Tag 28 und 1521) nach Transplantation. Die zugrunde liegenden Erkrankungen der Patienten können den Tabellen 5 bis 7 entnommen werden. Die transplantierte Zellzahl an CD34+ Zellen lag im Durchschnitt bei  $2 \times 10^7$  (zwischen  $4,2 \times 10^6$  und  $4 \times 10^7$ ). Die jeweiligen Spender waren zwischen 17 und 53 Jahre alt (Durchschnitt 32,9 Jahre).

<b>Empfänger</b>	<b>Myeloische Zellen in kMESF</b>	<b>SD</b>	<b>Lymphozyten in kMESF</b>	<b>SD</b>
<b>1</b>	15,4	0,5	12,0	1,0
<b>2</b>	9,2	0,9	15,7	1,2
<b>3</b>	7,5	0,1	12,7	1,1
<b>4</b>	13,6	0,1	16,0	0,5
<b>5</b>	12,0	0,6	17,3	0,0
<b>6</b>	15,0	2,5	-	-
<b>7</b>	14,1	1,7	-	-
<b>8</b>	12,0	0,2	-	-
<b>9</b>	13,0	0,7	13,1	0,4
<b>10</b>	8,2	0,8	8,0	0,5
<b>11</b>	13	2,2	12,4	0,3
<b>12</b>	14,6	1,1	-	-
<b>13</b>	17,0	0,2	16,4	0,5
<b>14</b>	6,6	0,2	13,0	0,8
<b>15</b>	10,3	0,3	9,0	1,0

**Tabelle 13a:** Länge der Telomerenden in Empfängerzellen nach allogren-haploidenter Stammzelltransplantation.

<b>Spender</b>	<b>Myeloische Zellen in kMESF</b>	<b>SD</b>	<b>Lymphozyten in kMESF</b>	<b>SD</b>
<b>1</b>	13,0	0,1	12,6	0,4
<b>2</b>	10,6	0,6	15,2	0,3
<b>3</b>	8,5	0,4	13,6	0,8
<b>4</b>	13,7	2,3	13,8	1,6
<b>5</b>	15,6	3,3	19,0	3,8
<b>6</b>	15,9	0,5	15,3	0,7
<b>7</b>	19,6	0,8	26,9	3,0
<b>8</b>	9,9	0,9	10,2	0,4
<b>9</b>	13,2	0,4	13,0	0,9
<b>10</b>	8,7	0,2	10,2	0,2
<b>11</b>	14,0	0,2	12,3	0,0
<b>12</b>	17,1	0,9	15,4	1,1
<b>13</b>	19,1	2,0	16,1	1,8
<b>14</b>	8,2	0,0	13,0	0,7
<b>15</b>	7,7	2,0	10,5	0,7

**Tabelle 13b:** Länge der Telomerenden in Spenderzellen nach allogren-haploidenter Stammzelltransplantation.

<b>Pärchen</b>	<b>Delta TEL Myeloische Zellen (Spender-Empfänger) in kMESF</b>	<b>Delta TEL Lymphozyten (Spender-Empfänger) in kMESF</b>
1	-2,4	0,6
2	1,4	-0,5
3	1,0	0,9
4	0,1	-2,2
5	3,6	1,7
6	0,9	-
7	5,5	-
8	-2,1	-
9	0,2	-0,1
10	0,5	2,2
11	1,0	-0,1
12	2,5	-
13	2,5	-0,3
14	1,6	0,0
15	-2,6	1,5

**Table 14: Vergleich der Telomerlängendynamik von Empfängern und Spendern (delta TEL) in Myeloischen Zellen und Lymphozyten**

#### 4.1.1 Vergleich der ermittelten Telomerwerte mit altersadaptierten Kontrollen

Die Telomerlänge der in Tübingen haploident-transplantierten Patienten, bestimmt durch die Flow-FISH Methode, betrug im Durchschnitt für myeloische Zellen  $12,1 \pm 3,22$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) und für Lymphozyten  $13,2 \pm 2,9$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD); siehe Abbildungen 9 und 10. Auch an diesem Patientengut lässt sich eine große interindividuelle Streubreite der Telomerenden konstatieren: Die Länge der Endkappen der Chromosomen variierten in myeloischen Zellen zwischen 6,6 und 17 kMESF und in Lymphozyten zwischen 8 und 17,3 kMESF.

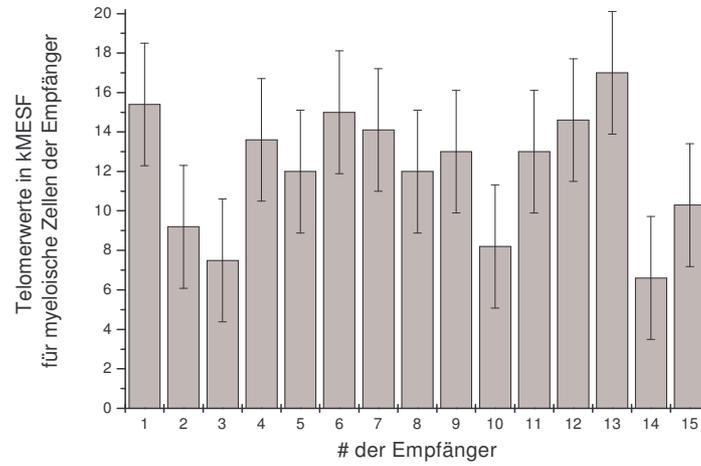


Abbildung 9: Telomerwerte in kMESF für Myeloische Zellen der Empfänger

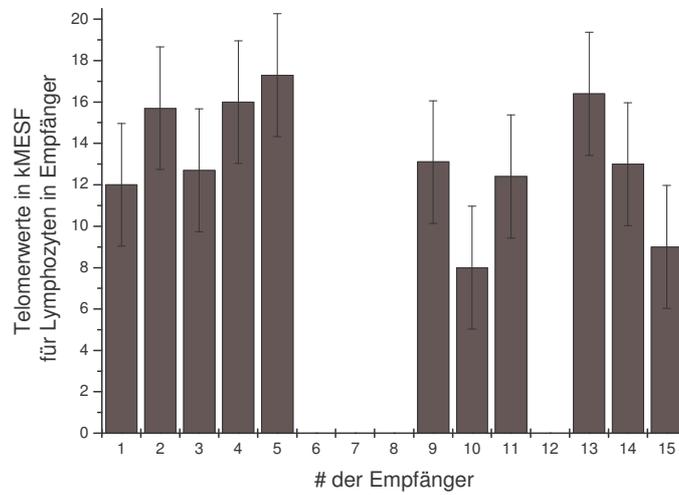
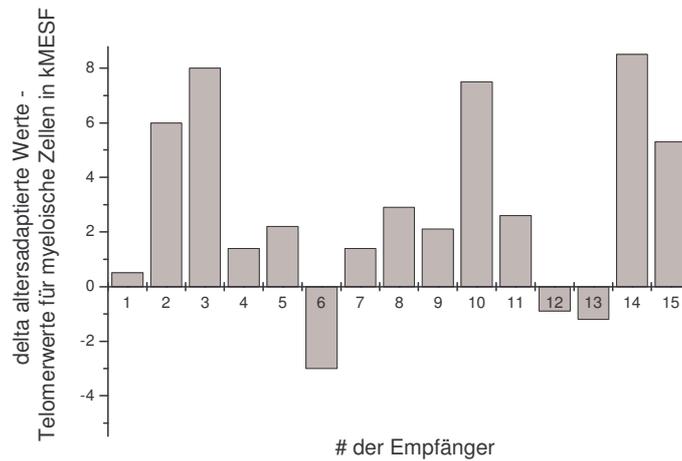


Abbildung 10: Telomerwerte in kMESF für Lymphozyten der Empfänger

Vergleicht man die gemessenen Telomerwerte mit einer altersadaptierten, gesunden Normalbevölkerung, so ergibt sich ein Defizit von 2,9 kMESF für myeloische Zellen und 4,3 kMESF für Lymphozyten. Errechnet wurden diese Werte der altersadaptierten Kontrolle nach Rufer, Brümmendorf *et al.*, mit den Formeln für

$$\text{Myeloische Zellen} = 15,96 - 0,079 * \text{Alter}$$

$$\text{Lymphozyten} = 18,48 - 0,119 * \text{Alter}$$



**Abbildung 11: Telomerlängen in myeloischen Zellen der Empfänger im Vergleich zur altersadaptierten Normalpopulation** Die Differenz wurde durch Subtrahieren der gemessenen Telomerwerte von den altersadaptierten Werten ermittelt. Positive Werte bedeuten, dass die Telomere nach Transplantation im Vergleich zur Normalbevölkerung verkürzt sind.

<b>Empfänger</b>	<b>Myeloische Zellen in kMESF</b>	<b>Altersadapierte Kontrolle</b>	<b>Delta Altersadapt.- myelo.Zellen</b>
1	15,4	15,9	0,5
2	9,2	15,2	6,0
3	7,5	15,5	8,0
4	13,6	15,0	1,4
5	12,0	14,2	2,2
6	15,0	12,0	-3,0
7	14,1	15,5	1,4
8	12,0	14,9	2,9
9	13,0	15,1	2,1
10	8,2	15,7	7,5
11	13	15,6	2,6
12	14,6	13,7	-0,9
13	17,0	15,8	-1,2
14	6,6	15,1	8,5
15	10,3	15,6	5,3

**Table 15a: Telomerlänge in Myeloischen Zellen des Empfängers im Vergleich zur altersadaptierten Kontrollpopulation**

<b>Empfänger</b>	<b>Lymphozyten in kMESF</b>	<b>Altersadapierte Kontrolle</b>	<b>Delta Altersadapt. - Lymphozyten</b>
1	12,0	18,4	6,4
2	15,7	17,3	1,6
3	12,7	17,8	5,1
4	16,0	17,0	-0,6
5	17,3	15,9	-1,4
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	13,1	17,3	4,2
10	8,0	18,0	10,0
11	12,4	18,0	5,6
12	-	-	-
13	16,4	18,2	1,8
14	13,0	17,2	4,2
15	9,0	17,9	8,9

**Table 15b: Telomerlänge in Lymphozyten des Empfängers im Vergleich zur altersadaptierten Kontrollpopulation**

Spender	Myeloische Zellen in kMESF	Altersadapierte Kontrolle	Delta Altersadapt. - myelo.Zellen
1	13,0	13,8	0,8
2	10,6	13,2	2,6
3	8,5	13,0	4,5
4	13,7	12,1	-1,6
5	15,6	14,5	-1,1
6	15,9	14,6	-1,3
7	19,6	13,3	-6,3
8	9,9	13,3	3,4
9	13,2	13,0	-0,2
10	8,7	13,9	5,2
11	14,0	13,4	-0,6
12	17,1	14,0	-3,1
13	19,1	13,6	-5,9
14	8,2	11,7	3,5
15	7,7	13,2	5,5

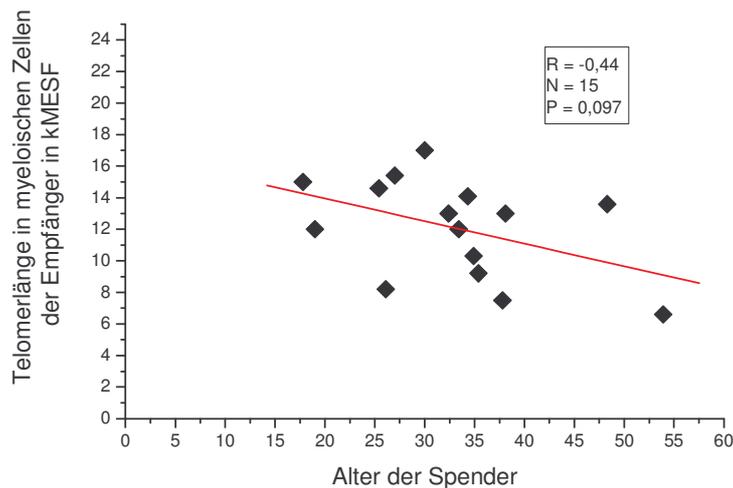
**Tabelle 16a: Telomerlänge in Myeloischen Zellen des Spenders im Vergleich zur altersadaptierten Kontrollpopulation**

Spender	Lymphozyten in kMESF	Altersadapierte Kontrolle	Delta Altersadapt. - Lymphozyten
1	12,6	15,3	2,7
2	15,2	14,3	-0,9
3	13,6	14,0	0,4
4	13,8	12,7	-0,6
5	19,0	16,2	-2,8
6	15,3	16,4	1,1
7	26,9	14,4	-12,5
8	10,2	14,5	4,3
9	13,0	13,9	0,9
10	10,2	15,4	5,2
11	12,3	14,6	2,3
12	15,4	15,5	0,1
13	16,1	14,9	-1,2
14	13,0	12,1	-0,9
15	10,5	14,3	3,8

**Tabelle 16b: Telomerlänge in Lymphozyten des Spenders im Vergleich zur altersadaptierten Kontrollpopulation**

#### 4.1.2 Telomerwerte versus Alter der Spender

Wie im letzten Abschnitt grafisch dargestellt, zeigte sich eine große Variabilität innerhalb der gemessenen Telomerlängen für myeloische Zellen: so konnten Werte zwischen 6,6 und 17 kMESF ermittelt werden. Unter Berücksichtigung des Modells von Harley („mitotic clock“, Harley, 1991), dass mit zunehmender Zellteilung eine progrediente Verkürzung der Telomere somatischer Zellen, hier am Beispiel peripherer Blutleukozyten, erfolgt und somit Zellen älterer Spender kürzere Telomere zeigen sollten. Die Werte korrelierten vermutlich aufgrund der kleinen Fallzahl nicht signifikant mit dem Alter der Spender, sondern zeigten lediglich einen Trend ( $p=0,09$ ): Je älter der Spender zum Zeitpunkt der Transplantation war, desto kürzer waren die Chromosomenenden in den Empfängern.

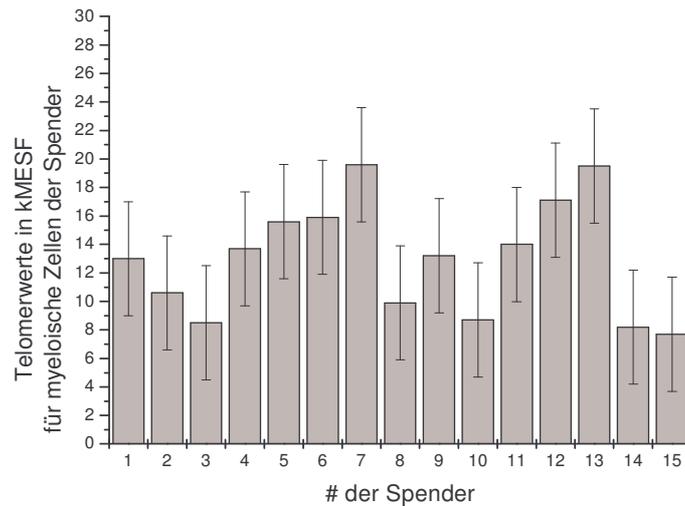


**Abbildung 12:** Telomerlänge in myeloischen Zellen der Empfänger versus Alter der Spender

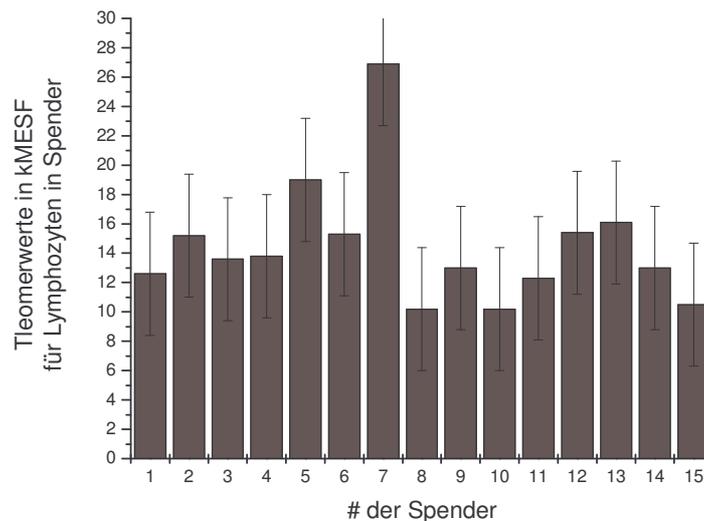
## 4.2 Telomerlänge in peripheren Blutleukozyten von Spendern nach Stammzelltransplantation

Die Spender der allogenen-haploidenten und allogenen-familiären zu transplantierenden Patienten waren Verwandte 1. Grades: Geschwister, Eltern und Kinder. Das Durchschnittsalter lag bei 32,9 Jahren (17 – 53 Jahre). Zur Stammzellsammlung wurden die Spender mit G-CSF (Granulozyten – Coloniestimulierende Faktoren) behandelt und

die mobilisierten Stammzellen wurden mittels Leukapherese gewonnen. Als durchschnittliche Länge der Telomere ergaben sich  $13,0 \pm 4,1$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) für myeloische Zellen (zwischen 7,7 und 19,5 kMESF) und  $14,5 \pm 4,2$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) für Lymphozyten (zwischen 10,2 und 26,9 kMESF), somit waren die myeloischen Zellen um 0,4 kMESF und die Lymphozyten um 0,1 kMESF kürzer als die Altersadaptierte Kontrollpopulation dies hätte erwarten lassen.



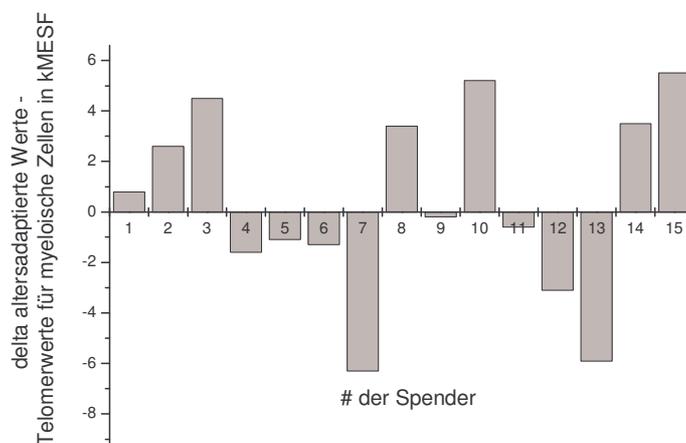
**Abbildung 13a:** Telomerwerte in kMESF für myeloische Zellen der Spender



**Abbildung 13b:** Telomerwerte in kMESF in Lymphozyten der Spender

#### 4.2.1 Vergleich der ermittelten Telomerwerte mit altersadaptierten Kontrollen

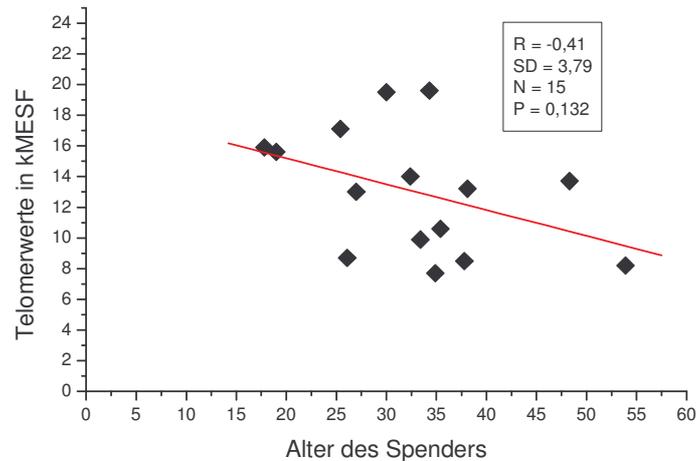
Im Vergleich der Spender mit altersadaptierten Kontrollen ergab sich für die myeloischen Zellen der Spender eine Verkürzung von  $0,4 \pm 3,7$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) und sowie für Lymphozyten von  $0,1 \pm 1,9$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). Diese Verkürzung ist nicht signifikant. Dies bedeutet, dass die Mobilisation keine detektierbare Auswirkung auf das replikative Potential der Stammzellreserve der Spender gegenüber der altersadaptierten Kontrollpopulation hat (kleine Fallzahl). Die Werte der altersadaptierten Kontrollen wurden mit der obengenannten Formel ermittelt. Allerdings ist ein großer interindividueller Unterschied innerhalb der Telomerlängen bekannt (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999). Abbildung 14 verdeutlicht diese Heterogenität deutlich, indem die Differenz zwischen altersadaptierten Kontrollen und myeloischen Zellen der Spender dargestellt wird.



**Abbildung 14: Telomerlängen in myeloischen Zellen der Spender im Vergleich zur altersadaptierten Normalpopulation.** Die Differenz wurde durch Subtrahieren der gemessenen Telomerwerte von den altersadaptierten Werten ermittelt. Positive Werte, dass die Telomere nach Transplantation im Vergleich zur Normalbevölkerung verkürzt sind.

#### 4.2.2 Telomerwerte versus Alter der Spender

Trägt man die ermittelte Telomerlänge für myeloische Zellen in kMESF der Spender gegen das Alter des Spenders auf, so ergibt sich eine negative Regressionsgerade: Mit zunehmenden Alter verkürzen sich die Enden der Chromosomen (Abbildung 15). Diese Beobachtung wurde für andere Kollektive bereits beschrieben (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2000).



**Abbildung 15: Telomerlänge in myeloischen Zellen der Spender versus Alter der Spender**

#### 4.2.3 Auswirkungen der Stammzell-Mobilisation auf den Spender

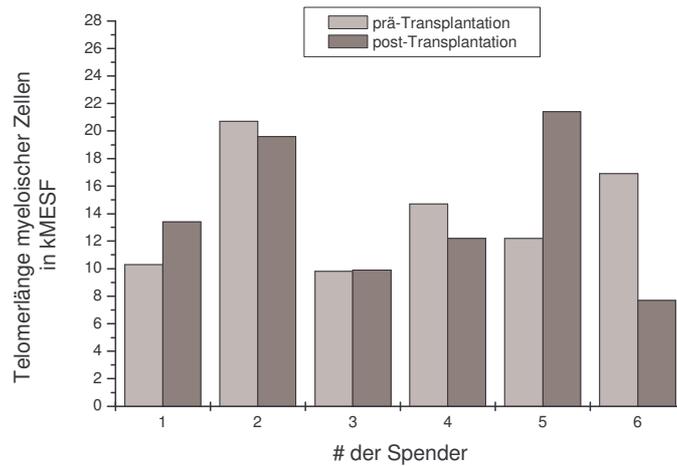
Im folgenden sollte versucht werden, die Auswirkungen der Stammzell-Mobilisation durch Wachstumsfaktoren (G-CSF: Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) auf die Telomerlänge zu detektieren. Die Entnahme stellt für den Spender eine hämatopoetische Stresssituation dar, die durch Expansion der verbleibenden Stammzellen kompensiert werden muss. Dazu konnten von sechs Spendern periphere Blutleukozyten vor und nach Mobilisation analysiert werden.

Spender	Differenz prä-post Mobilisation für myeloische Zellen in kMESF	Differenz prä-post Mobilisation für Lymphozyten in kMESF
1	-3,1	-2,1
2	1,1	-5,9
3	-0,1	4
4	2,5	-
5	-9,2	-5,9
6	9,2	7,6

**Table 17: Auswirkungen der Mobilisation peripherer Stammzellen des Spenders auf die Telomerlängen in Myeloischen Zellen und Lymphozyten**

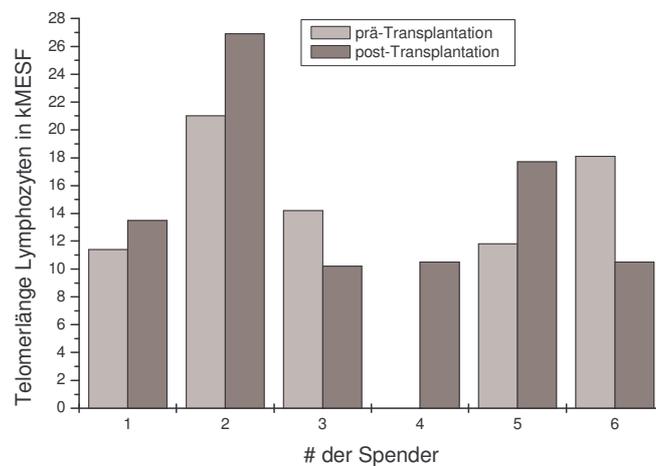
Dieses Kollektiv enthielt Spender im Alter zwischen 25 und 61 Jahren (Durchschnitt 36,2 Jahre). Die hier ermittelten Werte der Telomerlängen ergaben vor Mobilisation  $14,1 \pm 4,2$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) für myeloische Zellen und  $15,3 \pm 4,1$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) für Lymphozyten.

Nach Mobilisation zeigte sich eine durchschnittliche Telomerverkürzung in myeloischen Zellen um  $0,1 \pm 6,1$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) gegenüber der Analyse vor Mobilisation. Die Lymphozyten hingegen verkürzten sich um  $0,5 \pm 6,0$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). Abbildung 17 zeigt die Telomerlängen in myeloischen Zellen der Spender vor und nach Mobilisation. Zu erkennen ist, dass die Mobilisation mit G-CSF unterschiedliche Konsequenzen auf die Telomerlängen der myeloischen Zellen zeigt: Drei von sechs Spendern zeigten eine Verkürzung ihrer Telomere. Diese betrug zwischen 1,1 und 9,2 kMESF. Bei zwei Spendern verlängerten sich die Telomere mobilisationsbedingt um 3,1 bzw. 9,2 kMESF. Die Telomere des letzten Spenders (Nummer 3) blieben in ihrer Länge konstant.



**Abbildung 16: Auswirkung der Mobilisation auf die Telomerlänge in myeloischen Zellen**

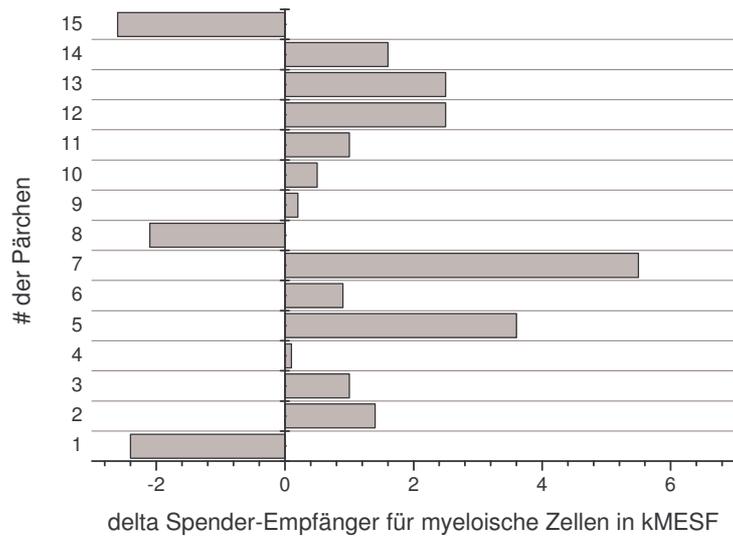
Abbildung 17 veranschaulicht die Wirkung der Mobilisation auf die Telomerlängen in Lymphozyten. Bei Spender # 4 konnte nur ein Wert erhoben werden, da bei der Analyse durch die Flow-FISH Methode vor Mobilisation die Lymphozytenpopulation nicht eindeutig von den myeloischen Zellen zu trennen waren. Bei den verbleibenden fünf Spendern mit Werten vor und nach Mobilisation zeigte sich eine Verkürzung von  $0,5 \pm 6,0$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). Der Abbildung 17 ist zu entnehmen, dass aufgrund der Heterogenität der Effekte keine definitive Aussage gemacht werden darf. Beobachtet wurden Verlängerung der Telomerrepeats zwischen 2,1 und 5,9 kMESF, aber auch Verkürzung zwischen 4 und 7,6 kMESF.



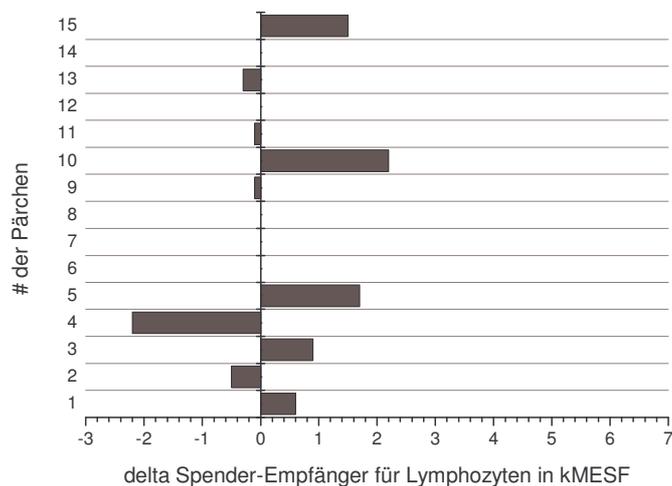
**Abbildung 17: Auswirkung der Mobilisation auf die Telomerlänge in Lymphozyten**

### **4.3 Vergleich der Telomerlängen zwischen Empfänger und Spender nach allogenen haploidenten Megadose-Stammzelltransplantation**

Um den *in vivo* Effekt der Transplantation auf die hämatopoetischen Stammzellen detektieren zu können, wurden am selben Tag die Telomere in Granulozyten und Lymphozyten von Empfängern und Spendern nach Transplantation gemessen. So lassen sich die Spenderzell-Telomere im Spenderblut mit den Spenderzell-Telomeren im Empfängerblut (bei einem Chimärismus von 100%) vergleichen. Außerdem stellt dieser paarweise Vergleich gleichzeitig eine interne Kontrolle über die verschiedenen Analysetage dar. Durch diesen Vergleich konnte gezeigt werden, dass die Telomerlänge in myeloischen Zellen der Empfänger um durchschnittlich  $0,9 \pm 0,6$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) kürzer ist als in denen der jeweiligen Spender (12,1 kMESF versus 13,0 kMESF) – siehe Abbildung 18a. Für Lymphozyten konnte ein Unterschied von  $1,3 \pm 1,2$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) gezeigt werden – Abbildung 18b. Überraschend war bei dieser Auswertung jedoch, dass drei der fünfzehn Empfänger eine Verlängerung ihrer Telomere um 2,5 kMESF im Vergleich zu ihren jeweiligen Spendern zeigten. Die Werte für delta (Spender-Empfänger) in myeloischen Zellen und Lymphozyten variierten stark: So wurden für myeloische Zellen Differenzen zwischen  $-2,6$  und  $+ 5,5$  kMESF und für Lymphozyten zwischen  $-2,2$  und  $+ 2,2$  kMESF gemessen. Die Zahl der detektierbaren Lymphozyten am Durchflußzytometer war bei einigen Empfängern kurz nach der Transplantation zu gering, um eine valide Aussage ihrer Telomerlänge treffen zu können, so dass hier nur zehn Differenzen gezeigt werden können.



**Abbildung 18a: Auswirkungen der Stammzelltransplantation auf die Spenderzellen im Empfänger am Beispiel der myeloischen Zellreihe.** Die Werte der gemessenen Telomersignale der Empfänger wurden von denen der Spender subtrahiert. Positive Werte bedeuten eine Verkürzung der Spendertelomere in Empfängerblutzellen gegenüber den Spenderblutzellen.



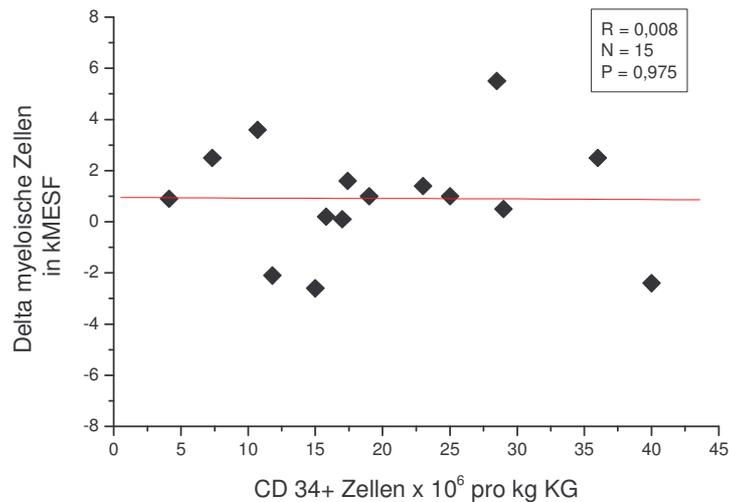
**Abbildung 18b: Auswirkungen der Stammzelltransplantation auf die Spenderzellen im Empfänger am Beispiel der lymphatischen Zellreihe.** Die Werte der gemessenen Telomersignale der Empfänger wurden von denen der Spender subtrahiert. Positive Werte bedeuten eine Verkürzung der Spendertelomere in Empfängerblutzellen gegenüber den Spenderblutzellen.

## **4.4 Beziehung zwischen Telomerlänge, Anzahl der transplantierten Zellen, Alter der Spender, Tage nach Transplantation, HLA-mismatch und hämatologischen Parametern**

### **4.4.1 Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf die Telomere in myeloischen Zellen**

Basierend auf den in Kapitel 1.3 geschilderten Vorarbeiten sollte untersucht werden, ob die Zellzahl der transplantierten CD34+ Stammzellen einen Effekt auf die Telomerlänge in peripheren Blutzellen *post transplantationem* hat. Die transplantierten Zellen sind im Empfänger, ihrem neuen Wirt, im Rahmen der Rekonstitution der Empfängerhämatopoese einem beträchtlichen proliferativen Stress ausgesetzt. Anforderungen an das replikative Potential der transplantierten Zellen könnten von der zur Verfügung stehenden Anzahl der transplantierten Zellen abhängen. Das Maß der damit verbundenen Alterung kann anhand von Telomerlängenmessungen an Subfraktionen von myeloischen und lymphozytären Zellen nach erfolgter allogener Stammzelltransplantation abgeschätzt werden.

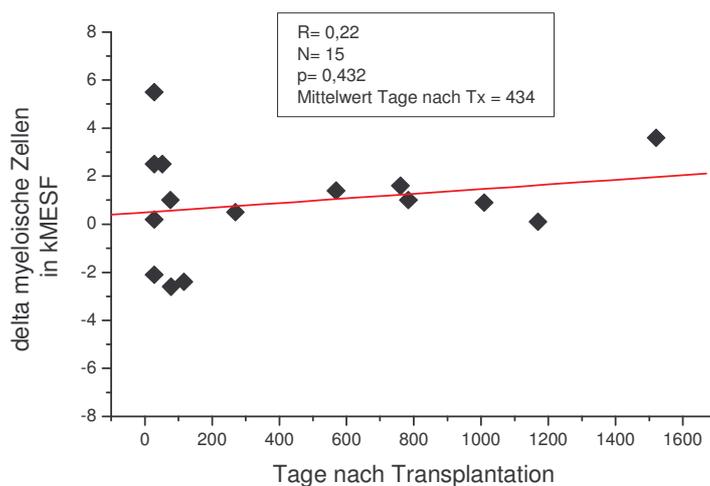
Die Patienten erhielten zwischen  $4,2 \times 10^6$  und  $4 \times 10^7$  aufgereinigte CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht. Im Durchschnitt  $2 \times 10^7$  pro kg KG. Abbildung 19 stellt grafisch die Beziehung zwischen transplantiertem Zellzahl an CD34+ Zellen und jeweiliger transplantationsbedingter Telomerverkürzung der einzelnen Patienten dar: Es zeigt eine Telomerlängenverkürzung in myeloischen Zellen von 0,9 kMESF. Die Verminderung an Telomersequenzen zeigte keine Korrelation mit der transplantierten Zellzahl ( $R=0,008$ ;  $p=0,98$ ).



**Abbildung 19: Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf die Telomere in myeloischen Zellen.** Subtraktion der Telomerlängen von myeloischen Zellen der Empfänger von denen der Spender versus transplantierte Zellzahl an CD34+ Zellen

#### 4.4.2 Telomerlängenverlust in myeloischen Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Transplantation

Zur Beantwortung der Frage nach der zeitlichen Entwicklung der Dynamik des Telomerverlustes im Zusammenhang mit der Rekonstitution der Empfängerhämatoopoese wurden Spender-Empfänger Pärchen nach Transplantation am selben Tag analysiert (zwischen 28 und 1521 nach Transplantation). Der durchschnittliche Tag nach Transplantation war Tag  $434 \pm 128$  (Mittelwert  $\pm$  SD). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Verkürzung der Telomere und Tage nach Transplantation nachgewiesen werden ( $R=0,22$ ;  $p=0,432$ ).

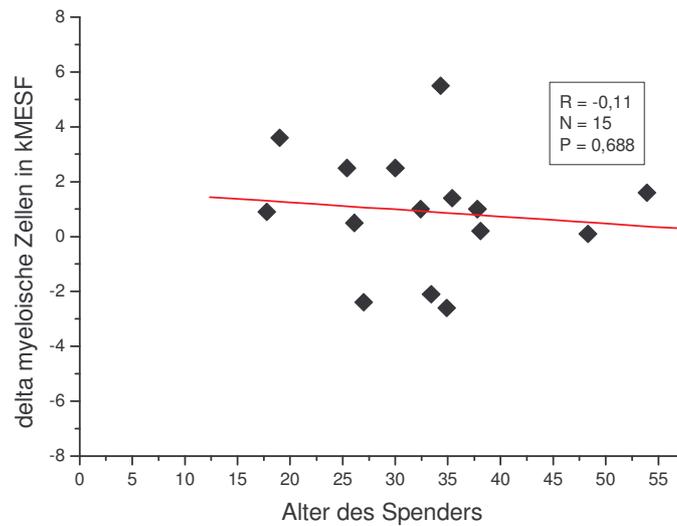


**Abbildung 20: Telomerlängenverlust in myeloischen Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Transplantation.** Subtraktion der Telomerlängen von myeloischen Zellen der Empfänger von denen der Spender versus Tage nach Transplantation

#### 4.4.3 Einfluss des Spenderalters auf den Grad des Telomerverlustes in myeloischen Zellen

Es wurde versucht einen eventuellen Einfluss des Spenderalters auf den Grad des Telomerverlustes zu detektieren. Zwölf der fünfzehn untersuchten Patienten erhielten relativ zu ihrem Alter vorgealterte Blutstammzellen ihrer Eltern. Ein Patient erhielt von seiner Tochter Stammzellen und zwei der Patienten von ihren gering jüngeren Geschwistern – siehe hierzu auch Tabelle 6.

Es ergab sich keine Korrelation für das Alter des Spenders und die Telomerverkürzung in Myeloische Zellen ( $R = -0,11$ ;  $p = 0,688$ ).

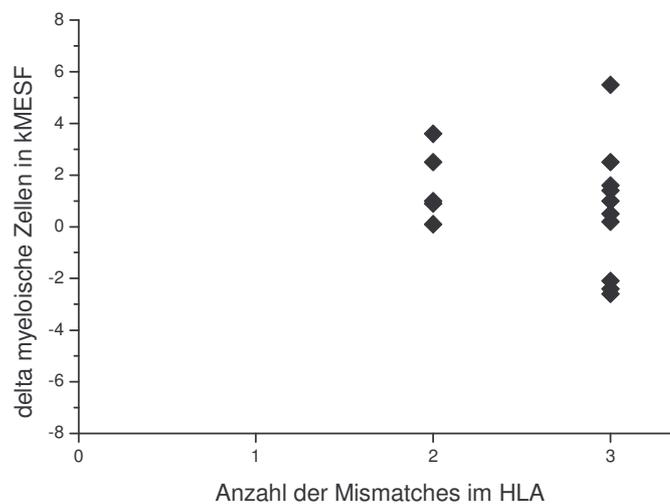


**Abbildung 21: Einfluss des Spenderalters auf den Grad des Telomerverlustes in myeloischen Zellen.** Subtraktion der Telomerlängen von myeloischen Zellen der Empfänger von denen der Spender versus Alter des Spenders

#### 4.4.4 Auswirkung der HLA-Diskordanz auf die Telomerverkürzung in myeloischen Zellen

Lediglich 25 – 30 % der Patienten, für welche eine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommt, verfügen über einen HLA-identischen Geschwisterspender und nur die Hälfte der verbleibenden Patienten finden einen HLA-identischen Fremdspender (Peters *et al.*, 1999). So wird den nichtidentischen Familienspendern als neue Quelle zur Gewinnung von Stammzellen eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Um gegen die HLA-Barriere hinweg transplantieren zu können, werden große Mengen an CD34+ Stammzellen pro Kilogramm Körpergewicht gewonnen, mittels Positivselektion angereichert und anschließend transplantiert. Zur HLA-Typisierung von Empfänger und Spender werden serologische Tests („microtoxicity assay“; Hansen *et al.*, 1992) verwendet, welche gemeinsame Merkmale in HLA-A, -B und C-Antigenen identifizieren, sowie PCR-Technik zur Identifikation von HLA-DRB1 und DRB3. Höhere Inzidenz an Abstoßungsreaktionen, langanhaltende Immundefizienz bis hin zum völligen Versagen des Transplantats sind beschriebene Folgen einer Transplantation gegen eine erhöhte HLA-Barriere (Lamb *et al.*, 1996; Kook *et al.*, 1996). Um zu

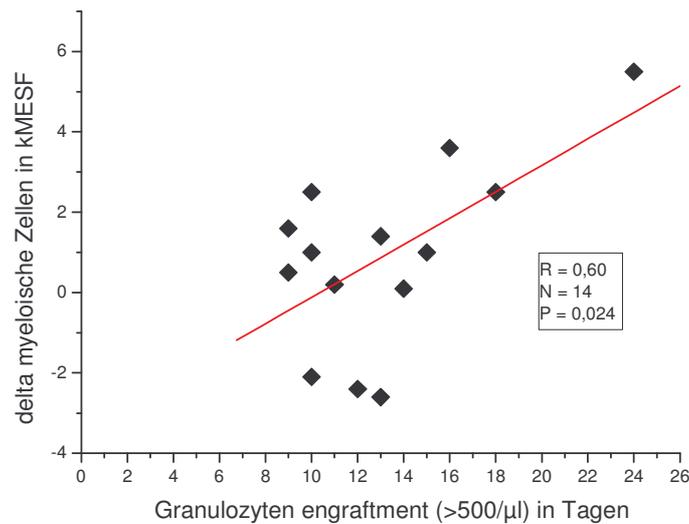
untersuchen, ob der HLA-Mismatch Auswirkungen auf die Stammzellen und deren Rekonstitution im Empfänger, verbunden mit höheren Anforderungen an das replikative Potential der Zellen hat, wurde der Verlust an Telomeren, ausgedrückt in der Differenz zwischen Spender und Empfänger, der Anzahl an HLA-mismatches gegenübergestellt. Abbildung 22 zeigt, dass sowohl bei zwei als auch bei drei Mismatches der Telomerverlust sehr heterogen ist. Eine Verlängerung der Telomersequenzen in Empfängern nach Transplantation im Vergleich zu ihren jeweiligen Spendern, wird jedoch nur bei einem Mismatch in drei Antigenen beobachtet.



**Abbildung 22: Auswirkung der HLA-Diskordanz auf die Telomerlängenverkürzung in myeloischen Zellen.** Subtraktion der Telomerlängen von myeloischen Zellen der Empfänger von denen der Spender versus HLA-Mismatches

#### 4.4.5 Einfluss der Telomerverkürzung auf hämatologische Parameter

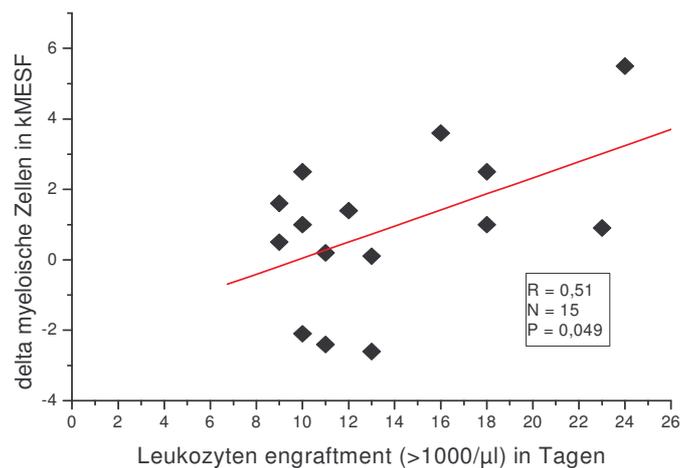
Trägt man Telomerlängendifferenz zwischen Spender und Empfänger nach Transplantation für myeloische Zellen gegen den Granulozyten take ( $>500/\mu\text{l}$ ) auf, so erhält man eine signifikante Korrelation mit  $p= 0,02$  ( $R= 0,60$ ). Abbildung 23. Aus dieser Beobachtung resultiert: Je früher der Granulozyten take mit mindestens 500 Granulozyten pro  $\mu\text{l}$  stattfindet, desto geringer ist auch die Telomerverkürzung der transplantierten Zellen. Oder anders ausgedrückt: Je größer die Verkürzung in den Telomeren der transplantierten Zellen ist, als Folge des hohen Maßes an replikativem Stress für die Zellen, desto länger ist der Zeitraum bis zum „engraftment“.



**Abbildung 23: Auswirkung der Stammzelltransplantation auf die Rekonstitution der Granulozyten.** Subtraktion der Telomerlängen von myeloischen Zellen der Empfänger von denen der Spender versus Granulozyten engraftment

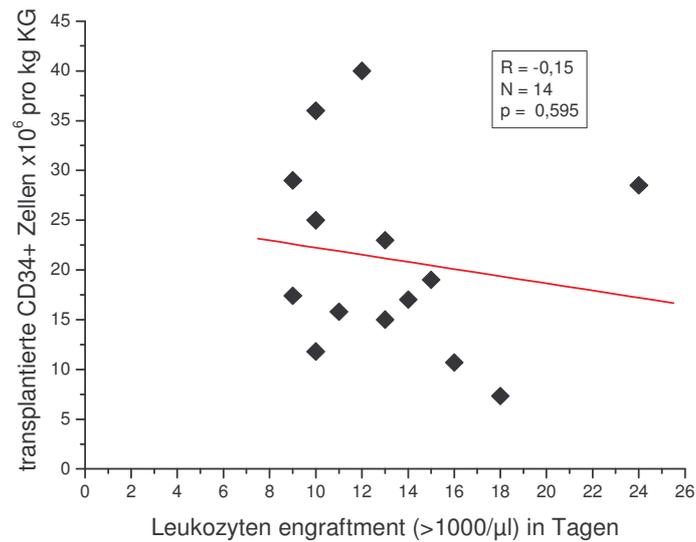
Die Rekonstitution der Leukozyten (>1000/µl) korreliert etwas schwächer mit der Telomerverkürzung (Abbildung 24), ausgedrückt in delta Myeloische Zellen (Don-Rec), ist aber dennoch signifikant:  $p < 0,05$ ;  $R = 0,51$

Je größer die Telomerverkürzung in den Spendern nach Transplantation war, desto später kam es zum engraftment der Leukozyten, besonders der Granulozyten.

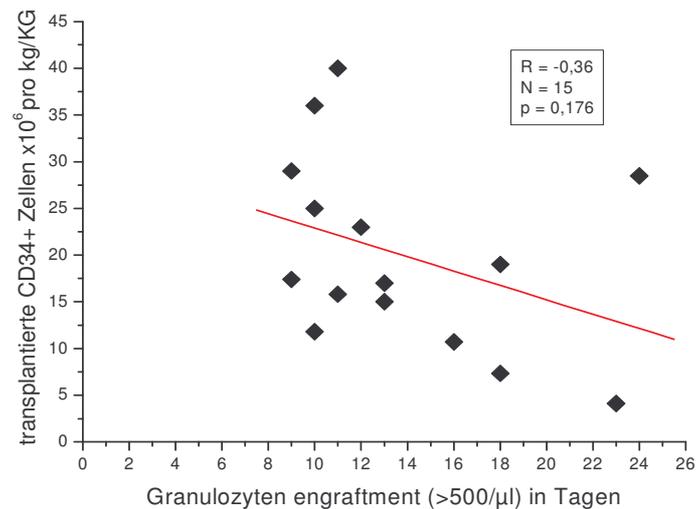


**Abbildung 24: Auswirkung der Stammzelltransplantation auf die Rekonstitution der Leukozyten.** Subtraktion der Telomerlängen von myeloischen Zellen der Empfänger von denen der Spender versus Granulozyten engraftment.

Vergleicht man die transplantierte Zellzahl an CD34+ Zellen mit dem Leukozyten engraftment, so zeigt sich lediglich ein Trend ( $R = -0,15$ ;  $p = 0,595$ ), Abbildung 25; ebenso für Granulozyten engraftment: Je höher die transplantierte Zellzahl, desto früher findet das engraftment, also die Rekonstitution der Hämatopoese, statt ( $R = -0,36$ ;  $p = 0,176$ ), Abbildung 26.



**Abbildung 25:** Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf das Leukozyten engraftment



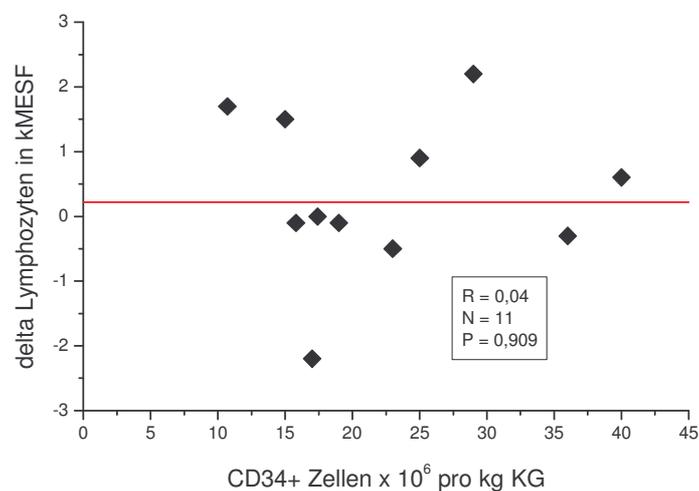
**Abbildung 26:** Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf das Granulozyten engraftment

In einer anschließenden Analyse wurden die Gruppen, welche kleiner bzw. größer als der Median waren, mittels t-Test miteinander verglichen: Für Leukozyten konnte ein Median von 12 Tagen ermittelt werden und für die Granulozyten ergab sich ein Median von 12,5 Tagen. Der Unterschied bei den Granulozyten beträgt für  $p = 0,049$  und ist damit signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei den Leukozyten ergab sich ein Unterschied für  $p$  von  $0,135$  und ist somit nicht signifikant.

## 4.5 Auswirkung der Transplantation auf die Telomere in Lymphozyten

### 4.5.1 Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf die Telomere in Lymphozyten

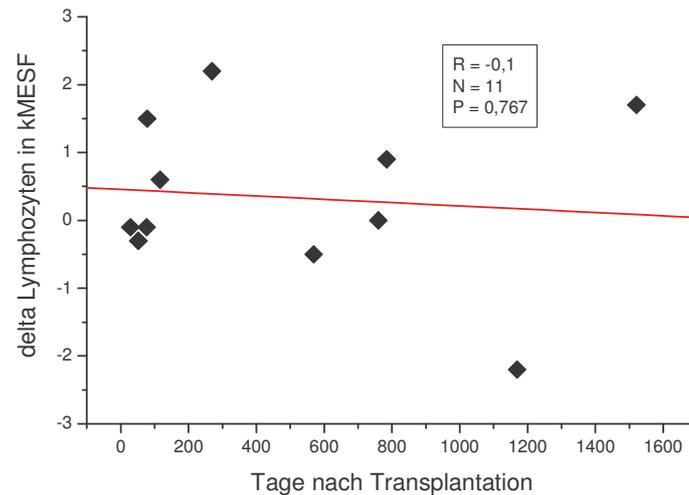
Die transplantierte Zellzahl an CD34+ Stammzellen hatte keinen Einfluss auf die Telomerlängen der Lymphozyten in den Empfängern nach Transplantation. Abbildung 27.



**Abbildung 27: Auswirkung der transplantierten Zellzahl an CD34+ Zellen auf die Telomere in Lymphozyten.** Subtraktion der Telomerlängen von Lymphozyten der Empfänger von denen der Spender versus transplantierte Zellzahl an CD34+ Zellen

#### 4.5.2 Beeinflussung des Telomerlängenverlustes in Lymphozyten durch die Zeit nach Transplantation

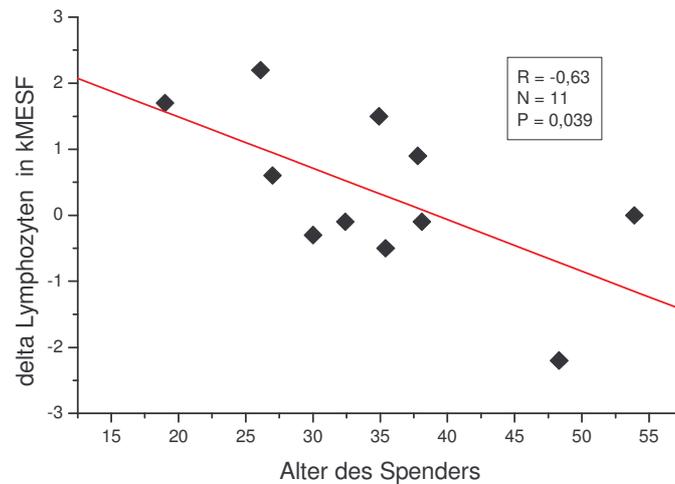
Es scheint auch keine Einflussnahme durch die Zeit *post transplantationem* auf die Telomerverkürzung zu geben. Untersucht wurden die Lymphozyten im Durchschnitt am Tag  $434 \pm 128$  (Mittelwert  $\pm$  SD) nach Transplantation (zwischen Tag 28 und 1521).



**Abbildung 28: Beeinflussung des Telomerlängenverlustes in Lymphozyten durch die Zeit nach Transplantation.** Subtraktion der Telomerlängen von Lymphozyten der Empfänger von denen der Spender versus Tage nach Transplantation

#### 4.5.3 Auswirkung des Telomerlängenverlustes in Lymphozyten durch das Alter des Spenders

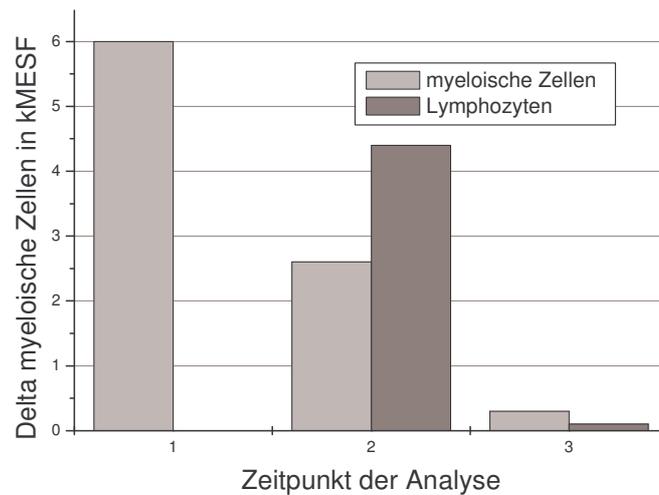
Eine scheinbare signifikante Korrelation fand sich für die Telomerlängenverkürzung in Lymphozyten, ausgedrückt durch delta Lymphozyten (Spender-Empfänger), gegenüber dem Alter der Spender:  $R = -0,63$ ;  $p = 0,04$ . Je jünger der Spender zum Zeitpunkt der Transplantation war, desto größer war die Differenz zwischen Spender und Empfänger. Allerdings war Anzahl der untersuchten Population mit 11 sehr gering.



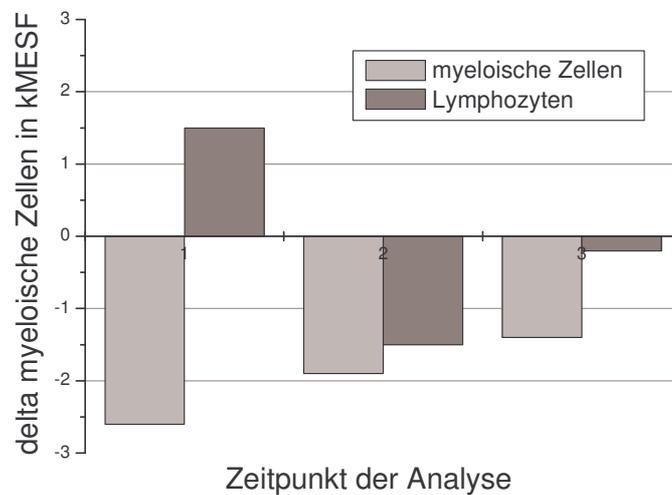
**Abbildung 29: Auswirkung des Telomerlängenverlustes in Lymphozyten durch das Alter des Spenders.** Subtraktion der Telomerlängen von Lymphozyten der Empfänger von denen der Spender versus Alter des Spenders

## 4.6 Sequentielle Analysen post transplantationem

Sieben der fünfzehn Pärchen konnten longitudinal analysiert werden. Die Telomersequenzen wurden zwischen Tag 78 und 1487 nach Transplantation gemessen. Interessant ist hierbei zu beobachten, dass delta Tel (Don-Rec) für myeloische Zellen sich nach circa einem Jahr angleicht. Beispiel Pärchen 7: Hier bestand 28 Tage *post transplantationem* im Spender eine Telomerverkürzung von 6 kMESF. Nach 77 Tagen waren es noch 2,6 kMESF und am Tag 277 lediglich 0,2 kMESF. Abbildung 30. Bei Pärchen 15 bestand am Tag 78 eine Telomerverlängerung im Empfänger von 2,6 kMESF. Diese Verlängerung nahm über 1,9 kMESF am Tag 141 auf 1,4 kMESF am Tag 377 ab – siehe Abbildung 31.



**Abbildung 30: Longitudinaler Verlauf der Dynamik der Telomere nach Transplantation am Beispiel Patient #7** Die Proben des Empfängers und des Spenders wurden an drei Tagen jeweils zusammen analysiert. 1 = Tag +28 post Transplantation (postT); 2 = Tag +77 postT und 3 = Tag +277 postT. An Tag 28 postT war die Lymphozytenpopulation zu klein, um genügend Ereignisse am Durchflußzytometer detektieren zu können.



**Abbildung 31: Longitudinaler Verlauf der Dynamik der Telomere nach Transplantation am Beispiel Patient #15** Die Proben des Empfängers und des Spenders wurden an drei Tagen jeweils zusammen analysiert. 1 = Tag +28 post Transplantation (postT); 2 = Tag +141 postT und 3= Tag +377 postT.

Bei zwei weiteren Spender-Empfänger-Pärchen (## 4 und 10) nahm das Telomerlängendefizit nach weiteren 100 bzw. 300 Tagen noch zu. Pärchen 14 zeigte zwischen Tag 760 und 866 eine kurzfristige weitere Telomerverkürzung im Empfänger. Am folgenden Analysetag (Tag 1072) verringerte sich jedoch das Defizit auf 1 kMESF. Zwei Pärchen zeigten inkonsistente Werte.

## 4.7 Multi-Color-Flow-FISH

Zur genaueren Bestimmung der Telomerlängen in Subpopulationen der Leukozyten wurde die Flow-FISH mit einer Methode der Oberflächenfärbung kombiniert. Mit Hilfe dieser Kombination war es möglich, aufgrund ihrer unterschiedlichen Epitope, innerhalb der Leukozyten zwischen myeloischen und lymphatischen Zellen zu unterscheiden und in Lymphozyten die Trennung zwischen T- und B-Zellen vorzunehmen. Die Tabellen 18 bis 20 zeigen die ermittelten Werte. Zeitgleich wurden die Zellen mit der konventionellen Flow-FISH Methode gemessen, um so eventuelle Unterschiede detektieren zu können.

Die Patienten, im zwischen einem halben Jahr und 13 Jahren, waren im Durchschnitt 7,4 Jahre alt. Ihre jeweiligen Spender hatten ein Alter von 38,6 Jahren (zwischen 27 und 54 Jahren). Der durchschnittliche Analysetag nach Transplantation lag bei  $678 \pm 187$  (Mittelwert  $\pm$  SD) (Tag 76 bis 1487 *post transplantationem*) und im Durchschnitt wurden  $2,31 \times 10^7$  CD34+ Zellen transplantiert (im Bereich zwischen  $1,5$  und  $4 \times 10^7$ ).

Die ermittelten Werte der Telomerlängen betragen mit der konventionellen Flow-FISH Methode in myeloischen Zellen  $12,7 \pm 0,5$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) und in Lymphozyten  $11,6 \pm 0,5$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) für die Empfänger. Die myeloischen Zellen der Spender hatten im Durchschnitt  $13,2 \pm 0,6$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) lange Telomere und die Lymphozyten  $11,6 \pm 0,5$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). Aus delta Tel für myeloische Zellen ergibt sich eine Verkürzung der Telomere in Empfängern von  $0,5 \pm 0,6$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). Kein Unterschied konnte zwischen den Lymphozyten festgestellt werden.

Mit Hilfe der Oberflächenfärbung mit CD14, einem Marker für Monozyten, konnte in Empfängern ein Telomerwert von  $14 \pm 1,3$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) gemessen werden. Hingegen ergab die Messung in Spendern eine Telomerlänge von  $12,6 \pm 0,7$

kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). Dies bedeutet eine Verlängerung der Telomere in den Empfängern oder eine deutlich raschere Verkürzung in den Spendern.

Für Lymphozyten ergab die Messung folgende Ergebnisse: Die T-Lymphozyten (CD3+) der Empfänger waren mit  $10 \pm 1,2$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD) um 0,9 kMESF länger als in ihren jeweiligen Spendern. In den B-Lymphozyten (CD20+) konnte kein Unterschied detektiert werden.

Vergleicht man nun die konventionelle Flow-FISH Methode mit der Kombination Flow-FISH und Oberflächenmarkierung (Multi-Color-Flow-FISH), so ergibt sich für die konventionelle Flow-FISH Methode eine Verkürzung der myeloischen Zellen in den Spendern von 0,5 kMESF; hingegen sind mit der Multi-Color-Flow-FISH die Telomere in den Empfängern um 1,4 kMESF länger als in ihren Spendern. Für Lymphozyten konnte mit der Flow-FISH Methode keine Differenz ermittelt werden. Mit der Multi-Color-Flow-FISH waren die Telomere der T-Lymphozyten der Empfänger um 1 kMESF länger und in den B-Lymphozyten um 0,1 kMESF kürzer.

<b>Empfänger</b>	<b>CD14+</b> in kMESF	<b>CD3+</b> in kMESF	<b>CD20+</b> in kMESF
<b>1</b>	17,4	12,2	10,8
<b>2</b>	13,1	11,9	-
<b>3</b>	11,8	6,3	8,8
<b>4</b>	16,8	-	-
<b>5</b>	18,0	-	-
<b>6</b>	13,0	7,6	-
<b>7</b>	8,2	12,2	11,4
<b>8</b>	-	-	-

**Tabelle 18: Telomerlängenbestimmung in Leukozytensubpopulationen in Empfängerzellen mittels Multi-Color-Flow-FISH**

Spender	CD14+ in kMESF	CD3+ in kMESF	CD20+ in kMESF
1	13,8	11,1	12,6
2	14,3	9,0	11,5
3	12,2	4,6	6,4
4	10,3	-	-
5	15,0	-	-
6	10,9	9,8	-
7	11,7	10,7	12,4
8	-	-	-

**Table 19: Telomerlängenbestimmung in Leukozytensubpopulationen in Spenderzellen mittels Multi-Color-Flow-FISH**

Delta Spender-Empfänger	CD14+ in kMESF	CD3+ in kMESF	CD20+ in kMESF
1	-3,6	-1,0	1,8
2	1,2	-2,9	-
3	0,4	-1,7	-2,5
4	-6,5	-	-
5	-3,0	-	-
6	-2,1	2,2	-
7	3,5	-1,4	1,0
8	-	-	-

**Table 20: Vergleich der Telomerlängenbestimmung in Leukozytensubpopulationen in Empfänger- und Spenderzellen mittels Multi-Color-Flow-FISH**

## 5 Diskussion

### 5.1 Telomerlängendynamik nach allogenen-haploidenten Stammzell-Transplantation

Telomere, die Nukleoproteinkomplexe am Ende eukaryotischer Chromosomen, bestehen aus sich wiederholenden Oligonukleotidsequenzen, beim Menschen  $T_2AG_3$ , an welche spezifische Proteine gebunden sind. Ihre Funktion ist es, die Chromosomenenden zu stabilisieren und sie vor enzymatischer Degradation zu bewahren (Blackburn, 1991 und 1994; Zakian, 1995). Aufgrund des Endreplikations-Problems (Watson, 1972) werden die Telomere in somatischen Zellen mit jeder Zellteilung fortschreitend kürzer. Dies geschieht bis zum Erreichen einer kritischen Länge, sog. „Hayflick limit“, welche zur zellulären Seneszenz führt (Shay *et al.*, 1996). Deshalb ist die Länge der Telomere ein Indikator für die replikative Vorgeschichte der Zellen, und veranschaulicht so das verbleibende Replikationspotential der Zellen auf molekularer Ebene (Allsopp *et al.*, 1992). In gesunden somatischen Zellen wird ein progressiver Telomerverlust zwischen 50 und 100 Basenpaaren pro Zellteilung beobachtet. Dies führt zu verkürzten Telomeren und in der Folge zu zellulärem Wachstumsarrest. Auf eine kritische Länge verkürzte Telomere, können die Ursache für chromosomale Fusionen und eine massive Instabilität des Genoms sein und können zu altersbedingten, klonalen Störungen führen, da die Zellen nicht mehr länger in der Lage sind, die Enden der Chromosomen zu schützen (Wynn *et al.*, 1998; Shay *et al.*, 1998; Curtis *et al.*, 1997).

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Hypothese, dass die Telomerlänge in reifen peripheren Blutleukozyten unmittelbar die replikative Vergangenheit der hämatopoetischen Stammzelle widerspiegelt, von welcher diese abstammen. Eine wichtige zugrundeliegende Annahme ist, dass die Zahl der Zellteilungen, welche zur Differenzierung von der Stammzelle zur reifen peripheren Blutzelle nötig ist, vom Alter des Patienten unabhängig ist.

So konnte die Arbeitsgruppe um Sakoff kürzlich in einer Korrelationsanalyse bestätigen, dass die mittleren Telomerlängen von Zellen aus Knochenmarkaspirationen äquivalent zu Telomerlängen von peripheren Blutzellen und von mononukleären Zellen sind (Sakoff *et al.*, 2002). Diese Beobachtung von Sakoff *et al.* stimmen auch mit

anderen Telomerlängenmessungen an gereinigten, gesunden Knochenmarkszellen (Vaziri *et al.*, 1994), an peripheren Blutzellen von Knochenmarkstransplantierten (Wynn *et al.*, 1998; Notaro *et al.*, 1997), an Granulozyten und T-Zell Populationen von gesunden Individuen (Rufer *et al.*, 1998; Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999) und an Patienten mit Chronisch myeloischer Leukämie (Brümmendorf *et al.*, 2000) überein.

Neben dem Stammzellumsatz bestimmen auch andere Faktoren die Telomerlänge in peripheren Blutzellen und die Messungen zur Telomerlängenbestimmung. Zum einem bestehen erhebliche, durch genetische Disposition bedingte Unterschiede in der Länge der Telomere zwischen Individuen desselben Alters (Slagboom *et al.*, 1994; Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999). Um Aussagen über die Biologie der Telomere und ihrer Variabilität machen zu können, wurden Studien an ein- und zweieiigen Zwillingen unternommen: Für eineiige Zwillinge bestanden hohe Korrelationen für Granulozyten und Lymphozyten, welche beide auch statistisch signifikant waren (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999). Lediglich für Granulozyten bestand bei zweieiigen Zwillingen eine hohe Korrelation mit Signifikanz. Zwischen nichtverwandten Individuen konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden. Slagboom spricht hier von genetischer Determinierung der Telomerlänge: So zeigt die Statistik von 115 Zwillingspärchen zwischen 2 und 63 Jahren ein Vererbbarkeit von 78% für die mittlere Telomerlänge (Slagboom *et al.*, 1994).

Möglicherweise könnten Telomerase und/oder andere zelluläre Regulatoren der Telomerlängen, d.h. replikations-unabhängige Mechanismen (Frenk *et al.*, 1998), zu den Schwankungen innerhalb der Messungen beitragen, welche nicht mit den Unterschieden aufgrund der „mitotischen Vorgeschichte“ der kernhaltigen Blutzellen und deren Vorläuferzellen im Zusammenhang stehen.

Die Beobachtung des Verlustes an Telomersequenzen nach allogener Stammzelltransplantation ist bei Forschern, welche sich für Immunrekonstitution *post transplantationem* interessieren, als auch bei Stammzellbiologen, auf großes Interesse gestoßen.

Einige Veröffentlichungen zum Thema Telomerlängendynamik nach allogener Transplantation sind bereits erschienen, allerdings basieren die Daten dieser Studien auf Proben von unfraktionierten peripheren Leukozyten bzw. mononukleären Zellen nach

allogener Stammzelltransplantation (Wynn *et al.*, 1998; Akiyama *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Telomerlängen an Subfraktionen von myeloischen und lymphozytären Zellen nach erfolgter allogen-haploidenter Stammzelltransplantation mittels der Flow-FISH Methode zu ermitteln. Diese Studie ist das Ergebnis einer Kooperation zwischen der Kinderklinik in Tübingen - mit dem Vorhandensein einer neuen Therapieoption (Handgretinger *et al.*, 1998 und 1999) - und der Medizinischen Klinik II, mit einer modernen molekularbiologischen Methode zur telomerbiologischen Untersuchung des zellulären Umsatz hämatopoetischer Stammzellen (Rufer, Brümmendorf *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Situation ist die vorliegende Studie die erste Arbeit zum Thema haploidente Stammzelltransplantation und Telomerbiologie.

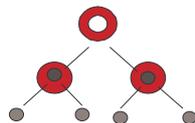
Um den *in vivo* Effekt der Proliferation auf die Telomerlängen von hämatopoetischen Stammzellen abschätzen zu können, wurden parallel die Telomerlängen in myeloischen Zellen und Lymphozyten von Spendern und Empfängern nach allogen-haploidenter Stammzelltransplantation gemessen. So ist man nach der Transplantation in der Lage, die Spendertelomere im Spenderblut mit den Spendertelomeren im Empfängerblut zu vergleichen, außerdem stellt dieser paarweiser Vergleich gleichzeitig eine interne Kontrolle dar. Für das untersuchte Kollektiv von 15 Patienten, welche allogen-haploident transplantiert wurden, ergab sich gegenüber ihren jeweiligen Spendern eine durchschnittliche Telomerverkürzung von 0,65 kb in Lymphozyten und 0,4 kb in myeloischen Zellen. In myeloischen Zellen wurden Verkürzungen zwischen 0,05 und 2,7 kb detektiert (allerdings wurden auch Verlängerungen der Telomere zwischen 1,0 und 1,3 kb beobachtet). Zur Rekonstitution der Hämatopoese im Empfänger, hatten sich die Stammzellen des Spenders wahrscheinlich einer größeren Zahl „telomerkonsumierender“ Zellteilungen zu unterziehen, als dies im Rahmen der „steady-state Hämatopoese“ im Spender notwendig gewesen wäre. Entsprechend derzeitiger Schätzung, dass der Telomerverlust pro Zellteilung zwischen 50 und 100 bp beträgt (Vaziri *et al.*, 1993 und 1994; Harley *et al.*, 1990), und unter der Vermutung, dass das Verkürzen der Telomere in der Tat proportional zu der Zahl an Zellteilungen ist, entspricht der mittlere Telomerverlust von 0,4 kb in myeloischen Zellen vier bis acht zusätzlichen Zellteilungen im Empfänger nach Transplantation, und damit einem Altern der Stammzelle um vier bis acht Jahre.

Diese Berechnungen gehen auf Beobachtungen von Rufer, Brümmendorf *et al.* zurück, wonach sich Stammzellen im ersten halben Lebensjahr 15 bis 30 mal teilen und danach ungefähr noch einmal im Jahr.

Die Arbeiten von Wynn und Notaro zeigten ähnliche Ergebnisse: Die Arbeitsgruppe um Wynn konzentrierte sich auf pädiatrische Patienten, da diese Empfänger über längere Zeit am ehesten durch klinische Konsequenzen der Transplantation betroffen sind. Wynn untersuchte die durchschnittlich Telomerlänge von allen Chromosomen (Wynn *et al.*, 1998). Notaro *et al.* (1997) betrachtete vorwiegend adulte Empfänger und untersuchte speziell die Telomere des langen Armes von Chromosom 7. Diese zwei Studien ergaben sehr ähnliche Resultate: Die Rekonstitution der Hämatopoese in Empfängern nach Transplantation ist in der Tat mit einem zusätzlichen Verlust an Telomerlänge von 0-1000 bp, im Durchschnitt 400 bp (Wynn *et al.*, 1998) beziehungsweise 79-1446 bp (Notaro *et al.*, 1997), verbunden. Eine weitere Arbeit (Akiyama *et al.*, 2000), welche sich mit Telomerverkürzung nach Stammzelltransplantation befasst, ergab für autologe Transplantation eine Verkürzung bis zu 1,9 kb ( $0,64 \pm 0,5$  kb (Mittelwert  $\pm$  SD)), und für allogene Transplantation bis zu 2,1 kb ( $0,6 \pm 0,5$  kb). Diese Werte bestätigten eine ältere Studie der Arbeitsgruppe von Akiyama (Akiyama *et al.*, 1998). Eine durchschnittliche Verkürzung von 2,01 kb in dem allogenen-transplantierten Patientenkollektiv konnte von Lee *et al.* beschrieben werden (Lee *et al.*, 1999). Somit waren die von Lee *et al.* beobachteten Telomerverluste um das zwei- bis dreifache höher als in vergleichbaren Kollektiven. Diese Verkürzung der Telomere ist einer Alterung von 40 Jahren im Spender äquivalent. Die gemessenen Differenzen zwischen Spender und Empfänger lagen zwischen 0,15 und 3,62 kb. Für die autolog-transplantierten Patienten ergab sich eine Verkürzung von 2,36 kb und entspricht einem Alterungsprozess von 50 Jahren. Kürzlich veröffentlichte Studien berichten wieder von Telomerverkürzung bis zu 1 kb (Rufer *et al.*, 2001; Mathioudakis *et al.*, 2001).

Innerhalb dieser Arbeit wurden überraschenderweise auch Verlängerungen der Telomere gemessen: Drei Empfänger zeigten um 1,2 kb längere Telomere als ihre jeweiligen Spender. Wie aber kann es sein, dass sich die Telomere der transplantierten Zellen bei einigen Empfängern während der Rekonstitutionsphase nach Stammzelltransplantation verlängern? Um diese Frage beantworten zu können, muß

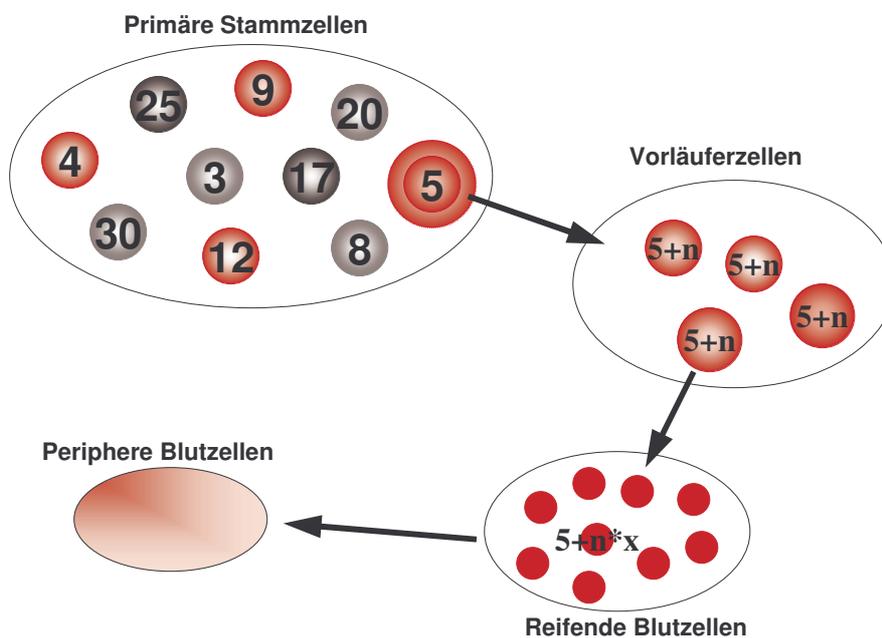
man sich die Theorien zur frühen Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen verdeutlichen. Eine Theorie besagt, dass die Stammzellen unbegrenzt zur Blutbildung beitragen können und sich selbst durch „self-renewal“ am Leben erhalten können ; siehe Abbildung 32 (Lemischka *et al.*, 1986; Keller *et al.*, 1990; Fraser *et al.*, 1992; Lansdorp, 1997). Nach dieser Theorie stammt das blutbildende System von einer kleinen Population an Stammzellen ab (Lemischka, 1992; Metcalf, 1993; Ogawa *et al.*, 1993). Die Hauptcharakteristika dieser Zellpopulation kann wie folgt zusammengefasst werden: Sie sind multipotent, d.h. aus einer einzelnen Zellen können sich alle weiteren Blutzelllinien entwickeln; sie sind in der Lage eine angemessene Zellzahl an reifen Blutzellen zu produzieren, um ein transplantiertes Individuum wieder mit peripheren Blutzellen auszustatten; sie haben die Möglichkeit zur „Selbsterneuerung“, diese ist nötig zur Aufrechterhaltung des Stammzellpools und der Sicherstellung der lebenslangen Blutzellproduktion; sie stehen am Gipfel einer Hierarchie von Blutvorläuferzellen und sind somit die primitivsten Zellen im Stammzellkompartement. Somit lässt sich zusammengefasst - nach der Theorie des „self-renewal“ - sagen, dass die Stammzellen ständig Vorläuferzellen zur Hämatopoese bereitstellen und außerdem gewährleisten, dass diese Quelle nicht erschöpft wird.



**Abbildung 32:** „Self-renewal“ Schematische Darstellung der Theorie des „Self-renewal“. Die primäre Stammzelle (roter Doppelkreis) trägt ständig zur Hämatopoese bei, indem aus ihr Vorläuferzellen (rot-graue Kreise) hervor gehen. Um nicht in die Seneszenz überzugehen, hat sich die Zelle Möglichkeiten zur Selbsterneuerung angeeignet (Telomerase, Beeinflussung durch Zytokine und andere).

Die zweite Theorie, welche sich mit der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen beschäftigt, ist die Theorie der „clonal succession“. Diese Theorie von Kay geht davon aus, dass die Hämatopoese von einer kleinen Einheit aktiver Stammzellen und von

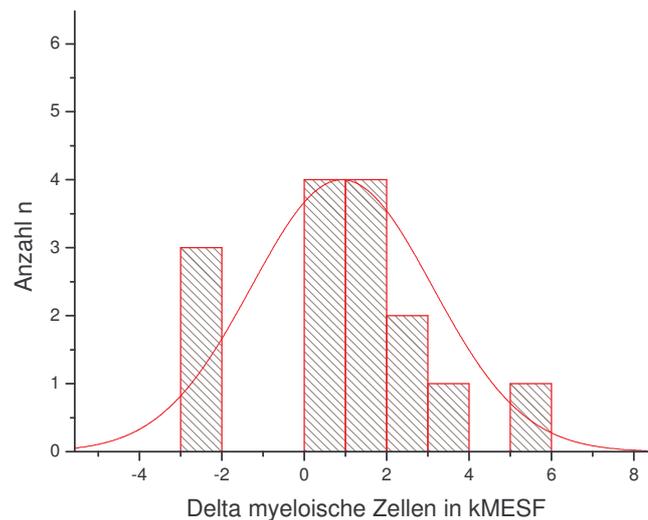
ruhenden Stammzellen aufrechterhalten wird (Kay, 1965; Brecher *et al.*, 1986). Sobald die Klone der aktiven Stammzellen erschöpft sind, z.B. durch Differenzierung, so werden die ruhenden Stammzellen aktiv und bringen weitere Vorläuferzellen hervor. Diese Theorien sind experimentell schwierig nachzuvollziehen und Studien mit Transplantationen an Mäusen sprechen sowohl für (Snodgrass *et al.*, 1987; Nakanon *et al.*, 1987; Capel *et al.*, 1989) als auch gegen die Theorie der „clonal succession“ (Harrison *et al.*, 1988 und 1989; Jordan *et al.*, 1990).



**Abbildung 33:** „Clonal succession“ Schematische Darstellung des primären Stammzellpools und weiterer Kompartimente der Hämatopoese. Die Zahlen der primären Stammzellen sollen deren replikative Vorgeschichte darstellen: Die aktive Zelle (dunkelrot eingekreist) hat bisher 5 mal zur Blutbildung beigetragen und hat im Vergleich zu anderen primären Stammzellen relativ lange Telomere (z.B. mit Zelle 30). Die Vorläuferzellen ( $5+n$ ), die reifenden Zellen ( $5+n*x$ ) und zuletzt die peripheren Blutzellen spiegeln die proliferative Geschichte ihrer primären Stammzelle, von welcher sie abstammen, wieder.

Die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse der relativen Telomerverlängerung in Empfängern gegenüber ihren jeweiligen Spendern, könnten auf die Theorie der „clonal succession“ nach Kay zurückzuführen sein: Je nach aktiv zur Hämatopoese beitragendem Stammzellklon unterscheiden sich auch die Telomere dieser Klone.

Klone, welche bisher nur wenig zur Hämatopoese beigetragen haben, teilten sich bisher kaum und verfügen damit über längere Telomere als ihre aktiveren Nachbarzellen im Stammzellkompartement. So dass im Empfänger sich vor allem primäre Stammzellen mit einer jungen replikativen Vorgeschichte teilten, wohingegen im Spender sich Stammzellen teilten, welche bisher aktiver an der Replikation beteiligten und demzufolge über kürzere Telomere verfügen. Die stochastische Komponente könnte dafür verantwortlich gemacht werden, dass es im Einzelfall auch zur Rekrutierung unreiferer hämatopoetischer Stammzellen im Empfänger kommen könnte (analog einer Gauss-Verteilung, Abbildung 34).



**Abbildung 34: Gauss-Verteilung** Dargestellt ist ein Histogramm mit delta Spender-Empfänger für myeloische Zellen in kMESF. Die durchschnittliche Verkürzung der Telomere nach Tranplantation beträgt  $0,9 \pm 0,6$  kMESF (Mittelwert  $\pm$  SD). In drei Fällen wurden in Empfängern längere Telomere dedektiert als in den jeweiligen Spendern.

Eine Arbeit von Wynn und Mitarbeitern über die Telomerverkürzung an Leukozytensubpopulationen bei Langzeitüberlebenden nach allogener Stammzelltransplantation zeigte bereits 1999 ebenfalls in einem von vierzehn

Empfängern längere Telomere als der zugehörige Spender, ohne dass dies in dieser Arbeit diskutiert worden wäre.

Die Arbeitsgruppe um Fibbe konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine transitorische Telomerverkürzung in myeloischen Zellen kurz nach allogener Stammzelltransplantation zeigen. Diese initial verkürzten Telomere hatten ein Jahr nach Transplantation eine ähnliche Länge wie die Telomere ihrer entsprechenden Zellen im Spender (Roelofs *et al.*, 2003). Diese Daten könnten zeigen, dass es im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution zu einer Reduzierung der Telomerlänge kommen kann und dass die anschließende Telomerlängenkontinuität durch Stammzellen aufrechterhalten wird, welche nicht an der transplantationsbedingten Rekonstitution teilgenommen hatten.

Eine weitere Studie, welche sich mit Langzeitüberlebenden nach allogener Transplantation beschäftigte, konnte bei einem von siebzehn untersuchten Pärchen im Empfänger längere Telomere als im Spender detektieren (Mathioudakis *et al.*, 2000). Auch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von de Pauw und Mitarbeitern konstatierten diese Beobachtung: So verfügten bei drei von zehn untersuchten Pärchen die Empfänger über längere Chromosomenenden in ihren Granulozyten. Zwei weitere Pärchen hatten gleiche lange Telomere (de Pauw *et al.*, 2002). Die vier genannten Publikationen bedienten sich zur Telomerlängenbestimmung Restriktionsenzyme, somit ist das Phänomen der Telomerverlängerung *post transplantationem* methodenunabhängig.

Auch die Telomerenden in T-Lymphozyten zeigten eine Verlängerung gegenüber ihren Spendern. Ein weiteres Indiz dafür, dass die Vorläuferzellen von unterschiedlichen primären Stammzellen abstammen und somit zu den jeweiligen Zeitpunkten der Messung unterschiedliche primäre Stammzellen zur Hämatopoese beitragen könnten. Diese Hypothese wird durch Experimente an Mäusen mit klonalen Markern unterstützt, wonach nur eine begrenzte Anzahl an Stammzellen aktiv zur Hämatopoese beitragen, während andere Stammzellen inaktiv sind (Drize *et al.*, 1996; von Kalle *et al.*, 2001 und 2002). Wieviel Stammzell-Klone jedoch tatsächlich zur Hämatopoese *in vivo* beitragen, konnte bis jetzt noch von keiner Studie beantwortet werden.

Obwohl im Mittel eine Telomerverkürzung bei Patienten nach Stammzelltransplantation beobachtet werden konnte, zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Ausmaß des Telomerverlustes innerhalb des Patientenkollektives sehr variabel war. Der

durchschnittliche Telomerverlust entsprach den bisher in der Literatur angegebenen Werten von Wynn, Notaro und Akiyama für allogene Stammzelltransplantationen und lag eher auf einem niedrigerem Niveau, so dass für haploident-transplantierte Patienten kein erhöhtes Risiko für kritische Telomerlängenverkürzung und den in den Folgejahren damit verbundenen chromosomalen Fehlfunktionen, die möglicherweise zur Entstehung von Sekundärmalignomen oder zu replikativer Erschöpfung der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen beitragen könnten.

Wenn man annimmt, dass das Verkürzen der Telomere die vermehrte Anzahl an Stammzellteilungen nach Transplantation widerspiegelt, dann deutet die beschriebene Variabilität unter den Empfängern entweder auf eine variable Zahl von Stammzellen hin, welche zur Repopulation des Knochenmarkes und damit zur hämatopoetischen Rekonstitution beitragen, oder sekundäre Anforderungen an die Blutbildung variieren unter diesen Patienten.

## **5.2 Auswirkung der Stammzell dosis auf den Telomerverlust im Empfänger**

Trotz der Fülle an Studien zur Verkürzung der Telomere *post transplantationem*, sind noch längst nicht alle Fragen zu diesem Thema beantwortet. Eine der wichtigsten Fragen, ist die, ob der Telomerverlust in den Zellen der transplantierten Patienten gegenüber den Spenderzellen das Resultat der reduzierten Zahl an hämatopoetischen Stammzellen ist, welche den Empfängern transplantiert wurden. So werden den Empfängern aktuell zwischen zwei und fünf Prozent des hämatopoetischen Systems des Spenders übertragen.

Man könnte die Hypothese aufstellen, dass der verringerte Stammzellpool eventuell zu einer stetigen Telomerverkürzung nach Transplantation, einer zunehmenden hämatopoetischen Insuffizienz - besonders in Situationen mit einem hohen Proliferationsstress (z.B. Blutungen, Chemotherapie bei Rezidiven) - und schließlich zu einer totalen Stammzellerschöpfung führen könnte. Die andere Möglichkeit wäre, dass die transplantationsbedingte Verminderung an Telomersequenzen lediglich die Folge der Stammzell expansion ist, welche zur Repopulation des Empfänger knochenmarks

durch die Zellen des Spenders nötig sind, ohne dass es zu weiteren zusätzlichen Verlusten kommt, nachdem die hämatopoetische Rekonstitution stattgefunden hat.

Ein Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob die Telomerverkürzung in Patienten nach Transplantation mit der transplantierten Zellzahl an Stammzellen korreliert. Notaro *et al.* berichteten über eine inverse Korrelation zwischen Telomerverlust und Zahl der transplantierten Zellen. Daraufhin wurde die Vermutung aufgestellt, dass je weniger Stammzellen dem Empfänger bei Transplantation infundiert werden, desto mehr Zellteilungen werden zur Rekonstitution der Hämatopoese benötigt. Deshalb könnte das Verwenden hoher Stammzell Dosen, wie z.B. in Megadose-Transplantations-Protokollen, dazu führen, dass die Telomere sich weniger ausgeprägt verkürzen und damit die Inzidenz klonaler Zweiterkrankungen, wie z.B. das Myelodysplastische Syndrom, reduziert wird (Notaro *et al.*, 1997; Wynn *et al.*, 1998; Shay, 1998; Witherspoon *et al.*, 1994; Deeg *et al.*, 1998; Lowsky *et al.*, 1994; Bhatia *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen transplantierte Zellzahl an CD34+ Zellen und Telomerverkürzung gezeigt werden, obwohl das Kollektiv der Patienten sehr unterschiedliche Mengen pro kg Körpergewicht, aufgrund ihres Alters und Körpergewichtes bzw. ihrer Spender, erhielten. Die Patienten im Alter zwischen einem halben Jahr und 50 Jahren bekamen im Durchschnitt  $2 \times 10^7$  CD34+ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht (zwischen  $4 \times 10^6$  und  $4 \times 10^7$  Zellen). Aufgrund der hohen Dosen an aufgereinigten CD34+ Zellen könnte man die Vermutung anstellen, dass das Knochenmark der Transplantierten regelrecht mit Stammzellen überflutet wurde und somit ein Schwellenwert existiert, ab welchem ein signifikanter Einfluss auf die Telomerlänge fehlt: Die Stammzellnischen waren demnach bereits mit Stammzellen besetzt.

Vielleicht konnte aufgrund von Unterschieden in der supportiven Therapie, welche die hämatopoetische Gesundheit auch beeinflusst, keine Korrelation gezeigt werden (Akiyama *et al.*, 1998). Auch andere Arbeitsgruppen konnten die von Notaro aufgestellte Korrelation nicht unterstützen (Wynn *et al.*, 1998 und 1999; Akiyama *et al.*, 2000; Mathioudakis *et al.*, 1998).

Bis heute ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, wieviele Klone hämatopoetischer Stammzellen zur Aufrechterhaltung der Hämatopoese unter normalen (physiologischen) Bedingungen bzw. unter pathologischen Belastungssituationen beitragen.

Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen transplantierte Stammzellendosis und Rekonstitution der Hämatopoese nach Transplantation, ausgedrückt durch Leukozyten- und Granulozyten-„engraftment“, besteht, diese Korrelation war mit  $p < 0,05$  bzw.  $0,02$  signifikant. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der Grad der Telomerverkürzung signifikant mit der Wiedererlangung hämatologischer Parameter korreliert: Je ausgeprägter der Telomerverlust war, desto länger war der Zeitraum zwischen Transplantation und Rekonstitution des Blutbildes. Diese Korrelation lässt die Schlussfolgerung zu, dass erst dann Blutzellen in die Peripherie gelangen dürfen, wenn das Knochenmark von den Spenderzellen repopuliert wurde, also entsprechend viele Zellteilungen vollbracht waren. Der nächste Gedanke war dann zu prüfen, ob die Zahl der transplantierten CD34+ Zellen einen Einfluß auf das Granulozyten-/Leukozyten-engraftment hat. Hierbei zeigte sich lediglich ein Trend, der besagt, je mehr Zellen transplantiert wurden, desto früher fand das „engraftment“ statt ( $p = 0,1$  bzw.  $0,5$ ). Hingegen konnten Mavroudis und Mitarbeiter zeigen, dass Patienten, welche mindestens  $2 \times 10^6$  CD 34+ Zellen pro kg Körpergewicht zur allogenen Transplantation bekamen, eine signifikant frühere Wiedererlangung ihrer Monozytenwerte, und einen Trend zur früheren Wiedererlangung ihrer Lymphozytenwerten zeigten (Mavroudis *et al.*, 1996). In der vorliegenden telomerbiologischen Untersuchung zum Umsatz hämatopoetischer Stammzellen erhielten jedoch alle Patienten mehr als  $2 \times 10^6$  CD 34+ Zellen pro kg Körpergewicht.

Obwohl das Risiko für sekundäre Malignome nach Transplantation deutlich erhöht ist, besonders für Myelodysplasien und Akute Leukämien, scheint eine totale Stammzellerschöpfung keine bedeutende Rolle für langzeitüberlebende transplantierte Kinder zu sein (Niethammer *et al.*, 1998).

Zusammenfassend lässt sich an diesen Daten zeigen, dass das Telomerlängendefizit der Empfänger gegenüber ihren Spendern nach der Rekonstitution der Hämatopoese nicht weiter zuzunehmen scheint. Die Daten sprechen auch gegen ein klinisch signifikantes Defizit des Replikationspotential der Stammzellen nach Transplantation.

### 5.3 Telomerverkürzung und die *Zeit post transplantationem*

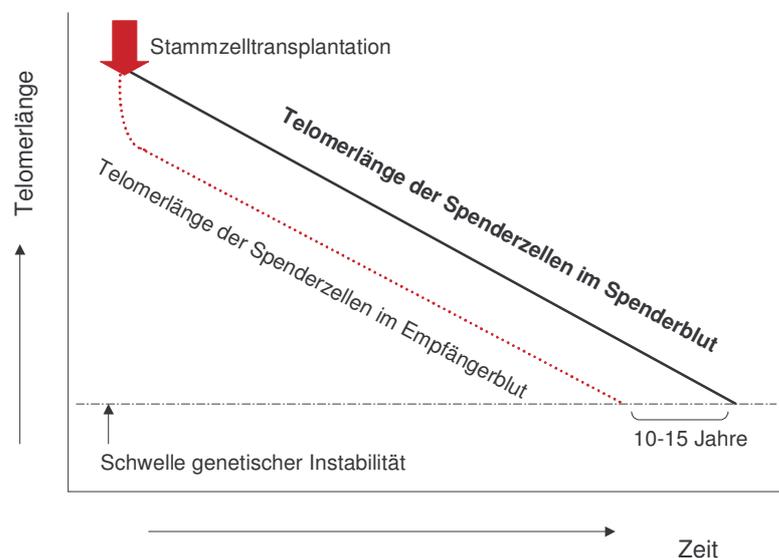
Innerhalb dieser Arbeit sollte darüber hinaus die Kinetik der Telomerverkürzung *post transplantationem* untersucht werden. Die Untersuchungen zur Telomerlängendynamik an Empfängern und Spendern erfolgte zwischen Tag +28 und +1521 nach allogenhaploidenter Transplantation (Mittelwert Tag +434). Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen Telomerverlust und Tagen nach Transplantation. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit anderen Studien (Lee *et al.*, 1999; Wynn *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass sich die Telomere bereits sehr rasch nach der Transplantation verkürzen, also im Rahmen der Repopulation des Empfänger Knochenmarks durch die transplantierten Stammzellen. Jedoch ist es nur schwer möglich den Patienten in relativer Aplasie genügend Blut zu entnehmen, dass es zur Bestimmung der Telomerlängen ausreichend ist. Dies ist selbst für die hier beschriebene Methode der Flow-FISH nicht möglich, obwohl hier nur wenige Zellen verwendet werden müssen: Für eine Doppelbestimmung waren  $8 \times 10^5$  Zellen nötig.

Rufer *et al.* beschrieben in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, dass der beschleunigte Telomerverlust auf das erste Jahr nach Transplantation beschränkt bleibt (Rufer *et al.*, 2001). Vier Patienten wurden zusammen mit ihren jeweiligen Spendern über mehrere Jahre auf ihre Telomerlängen untersucht. Bereits zu Beginn des zweiten Jahres nach Transplantation verkürzten sich die Telomere der Empfänger im vergleichbaren Maße wie die ihres Spenders. Siehe hierzu Abbildung 35.

Dieser allmähliche Verlust in Monozyten und Lymphozyten entsprach dem von gesunden Kontrollpatienten (Akiyama *et al.*, 1998; Wynn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Rufer *et al.*, 1999; Slagboom *et al.*, 1994). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass für die Differenz von 1 bis 2 kb, welche über die gesamte Zeit nach Transplantation beobachtet wurde, alleine der Telomerverlust während des ersten Jahres verantwortlich ist. Bei einigen der hier untersuchten Patientenpaaren zeigte sich, dass die Telomerlängen der Spender und Empfänger sich nach einem Jahr auf einem Niveau angeglichen hatten.

Die Hämatopoese wurde von Mathioudakis *et al.* an Patienten, welche zwischen 1971 und 1980 mittels HLA-identischer Geschwisterspende transplantiert wurden, untersucht (Mathioudakis *et al.*, 2001). Diese Studie konnte zeigen, dass 16 von 17 Patienten eine polyklonale Hämatopoese hatten. Somit konnte bewiesen werden, dass viele Jahre nach einer Stammzelltransplantation die Hämatopoese durch Spenderzellen aufrecht erhalten

werden kann und dies mit normalen Werten für Zellen aller drei Blutzelllinien. Außerdem konnte diese Arbeit zeigen, dass die Verkürzung der Telomere 20-30 Jahre nach Transplantation nicht größer ist als nach dem ersten Jahr (Rufer *et al.*, 2001); wie dies Abbildung 35 verdeutlicht. Das eben gesagte kann für das Patientenkollektiv der hier vorliegenden Arbeit nur bestätigt werden. Ein weiteres Indiz für die enorme replikative Potenz hämatopoetischer Stammzellen.



**Abbildung 35: Beziehung zwischen Stammzelltransplantation, Telomerlänge und altersbedingter genetischer Instabilität.** Der beschleunigte Telomerverlust scheint auf das Jahr nach Transplantation beschränkt zu sein. In den Jahren danach verkürzen sich die Telomere der Empfänger im gleichem Maße wie die ihrer Spender.

## 5.4 Telomerbiologie in Lymphozyten

Die kurz nach Transplantation einsetzenden, beschleunigten Verluste an Telomersequenzen in myeloischen Zellen und Lymphozyten sehen auf den ersten Blick recht ähnlich aus, dennoch liegen hier sehr wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen zu grunde. Während der Telomerverlust in myeloischen Zellen mit hoher

Wahrscheinlichkeit Folge der Telomerverkürzung in Stammzellen ist, wird der beschleunigte Verlust der Lymphozyten primär durch die zahlreichen Zellteilungen der reifen T-Zellen bedingt, wenn diese das T-Zell-Kompartiment wieder bevölkern (Rocha *et al.*, 1989; Roux *et al.*, 2000). Es ist offensichtlich, dass während der Phase der hämatopoetischen Rekonstitution der Telomerverlust in Stammzellen weniger zur Verkürzung in Lymphozyten beiträgt als durch die Expansion von T-Vorläuferzellen, da der Thymus, vor allem bei pädiatrischen Patienten, in den ersten sechs Monaten nach Transplantation keine T-Zellen produziert (Dumont-Girard *et al.*, 1998).

So konnte bei dem Patientenkollektiv eine Telomerverkürzung in Lymphozyten von 0,65 kb gegenüber ihren Spendern gemessen werden. Im Vergleich der absoluten Telomerlängen der Patienten zwischen myeloischen Zellen und Lymphozyten, konnte ermittelt werden, dass die Lymphozyten um 0,6 kb längere Chromosomenenden hatten. Diese Erkenntnis deckt sich mit den von Wynn veröffentlichten Daten: Auch in dieser Arbeit konnte eine Differenz von 0,5 kb detektiert werden (Wynn *et al.*, 1999).

Die Verkürzungen der Telomere in Lymphozyten der Empfänger gegenüber ihren Spendern war sehr heterogen ( $1,3 \pm 0,6$  kMESF). Die Ursache hierfür könnte sein, dass die Untersuchungen zur Telomerlängenbestimmungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation erfolgten und somit je nach Zeitpunkt unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen zum peripheren Lymphozytenpool beitragen, welche sich u.a. auch durch ihre Telomerlängen unterscheiden. So haben vor allem transplantationsbedingt verkürzte Chromosomenenden, aufgrund des erhöhten Proliferationsdruckes zur Etablierung eines neuen Immunsystems. Mehrere Arbeitsgruppen berichteten über die erhebliche Expansion von Memory-CD4+T-Zellen *post transplantationem* (Leino *et al.*, 1991; Vries *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe um de Pauw konnte zeigen, dass dieser Verlust an Telomeren nur auf das erste Jahr nach Transplantation beschränkt bleibt, da nach dieser Zeit eine schrittweise Wiederbevölkerung der Naiven-CD4+T-Zell Reserve durch T-Zellen aus dem Thymus möglich ist, und nachfolgend die antigen-vermittelte Neubildung von Memory-CD4+T-Zellen über Naive-CD4+T-Zellen, welche dann über längere Telomer verfügen können (de Pauw *et al.*, 2002). Gerade für das junge Kollektiv an haploident-transplantierten Patienten mit noch nicht in Involution befindlichem Thymus, dient dies dem besseren

Verständnis der Heterogenität in Lymphozytensubpopulationen und zeigt die Bedeutung und Dringlichkeit weiterer, hier ansetzender Studien.

## 6 Zusammenfassung

Telomere sind die Enden aller linearen eukaryotischer Chromosomen, welche aus repetitiven DNA-Sequenzen und aus spezifischen Proteinen bestehen. Die Funktion der Telomere besteht im Schutz der Chromosomenenden vor Degradation, Fusion und Rekombination. In den meisten somatischen Zellen verkürzen sich die Telomere mit jedem Zellzyklus. Dieser Verlust an telomeren DNA-Sequenzen, bei allen Vertebraten  $T_2AG_3$ , kann als mitotische Uhr aufgefasst werden, mit der eine Zelle die Anzahl der Zellteilungen zählt und Lebensspanne und Zellalterung dirigiert. Messungen der Telomerlängen in peripheren Blutzellen mit kurzer Lebensdauer, wie zum Beispiel Granulozyten und Monozyten, können als Surrogatmarker für den Umsatz an hämatopoetischen Stammzellen während der physiologischen Hämatopoese, aber auch nach Stammzelltransplantation dienen. Frühere Studien konnten zeigen, dass das Verkürzen der Telomere auf das erste Jahr nach Transplantation beschränkt ist. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Kombination aus quantitativer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Durchflußzytometrie, die sogenannte Flow-FISH Methode, verwendet, um Lymphozyten und myeloische Zellen von Empfängern und ihren jeweiligen Spendern nach allogren-haploidenter megadose Stammzelltransplantation zu analysieren. Es sollte untersucht werden, welche Auswirkung die Anzahl an transplantierten Stammzellen auf die Telomerverkürzung nach Transplantation hat. Die hier vorliegenden Daten sind bislang einzigartig, da zum einen die haploidente Stammzelltransplantation eine neuartige Therapieoption mit Schwerpunkt in Tübingen ist und zum anderen es bislang nur sehr wenige Daten zu telomerbiologischen Untersuchungen zum zellulären Umsatz hämatopoetischer Stammzellen nach Transplantation gibt, welche sich der Flow-FISH Methode bedienen.

Es wurden mononukleäre Zellen und periphere Blutleukozyten von insgesamt zwei adulten und fünfzehn pädiatrischen Empfänger-Spender-Pärchen zwischen dem 28. und dem 1487. Tag nach Transplantation untersucht (Durchschnitt Tag 434 nach Transplantation). Die transplantierte Zellzahl an CD34+ Stammzellen pro Kilogramm Körpergewicht lag im Bereich zwischen  $0,4$  und  $4 \times 10^7$  Zellen und die durchschnittlich transplantierte Zellzahl betrug  $2 \times 10^7$  Zellen. Zwei Patienten mussten aufgrund ihres inkompletten Chimerismus ( $< 95\%$ ) von weiteren Analysen ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse wurden als Differenz zwischen Spender und Empfänger (delta Tel) sowohl für myeloische Zellen als auch für Lymphozyten in „Molecular equivalents of soluble fluorochrome“ (kMESF) ausgedrückt. Für myeloische Zellen wurde eine durchschnittliche Verkürzung der Telomere um  $0,9 \pm 0,5$  kMESF (Durchschnitt  $\pm$  S.E.) gemessen. Dies entspricht fünf bis zehn zusätzlichen Zellteilungen im Empfänger nach Transplantation, und damit einem Altern der Stammzelle um bis zu zehn Jahren. Selbst für Patienten, welche in sehr jungen Jahren transplantiert wurden, sollte sich allein aus der Telomerverkürzung *post transplantationem* keine Erhöhung des Risikos der Entstehung von Sekundär malignomen, wie Myelodysplasien u.a., ergeben.

Überraschenderweise konnte bei drei Empfängern eine Verlängerung ihrer Telomere in myeloischen Zellen gegenüber ihren jeweiligen Spendern nach Transplantation detektiert werden. Keine signifikante Korrelation konnte zwischen dem Maß an Telomerverkürzung in myeloischen Zellen und der Anzahl an transplantierten CD34+ Stammzellen beobachtet werden. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass die Zahl der nach Transplantation zur Hämatopoese beitragenden Stammzellen nicht nur durch die transplantierten CD34+ Zellen geprägt ist, sondern auch durch Gegebenheiten im Empfänger selbst, wie zum Beispiel Anzahl der zur Verfügung stehenden Stammzellnischen, Immunphänomene und/oder andere noch unbekannte Einflussgrößen.

Die Verkürzung der Telomere in Lymphozyten der Empfänger gegenüber ihren Spendern war sehr heterogen ( $1,3 \pm 0,6$  kMESF). Diese Beobachtung könnte das Resultat der verschiedenen Zeitpunkte der Untersuchungen nach Transplantation sein, da je nach Zeitpunkt unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen zum peripheren Lymphozytenpool beitragen. Künftige Studien nach Transplantation werden eine separate Analyse der Telomerlängen in phänotypisch definierten Leukozytensubpopulationen (z.B. naive und memory T-Helferzellen (CD4+) sowie zytotoxische (Killer) T-Zellen (CD8+)) zum Ziel haben, indem die Flow-FISH Methode mit Oberflächenmarkierungen kombiniert wird, wie dies im Rahmen dieser Arbeit in Vorversuchen bereits geschehen ist.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ALT	alternative lengthening of telomeres
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FSC	forward light scatter
HLA	engl. human leucocyte antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
hTR	humane Telomerase RNA
kb	Kilobasenpaare
kd	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
kMESF	kilo molecules of equivalent soluble fluorochrome
KMT	Knochenmarkstransplantation
MHC	engl. major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätsantigene
PNA	Peptid-Nukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SSC	side scatter
SZT	Stammzelltransplantation
TBP	Telomerbindende Proteine

## 8 Literaturverzeichnis

1. Akiyama, M., Hoshi, Y., Sakurai, S., Yamada, H., Yamada, O., und Mizoguchi, H. 1998  
Changes of telomere length in children after hematopoietic stem cell transplantation.  
Bone Marrow Transplant. 21[2], 167-171
2. Akiyama, M., Asai, O., Kuraishi, Y., Urashima, M., Hoshi, Y., Sakamaki, H., Yabe, H., Furukawa, T., Yamada, O., Mizoguchi, H., und Yamada, H. 2000  
Shortening of telomeres in recipients of both autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.  
Bone Marrow Transplant. 25[4], 441-447
3. Allshire, R. C., Dempster, M., und Hastie, N. D. 1989  
Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly.  
Nucleic Acids Res. 17[12], 4611-4627
4. Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., und Harley, C. B. 1992  
Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89[21], 10114-10118
5. Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P. G., Appelbaum, F. R., Bensinger, W., Buckner, C. D., Clift, R., Doney, K., Martin, P. J., Mickelson, E., und . 1989  
Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma.  
N.Engl.J.Med. 320[4], 197-204
6. Arcese, W., Aversa, F., Bandini, G., De Vincentiis, A., Falda, M., Lanata, L., Lemoli, R. M., Locatelli, F., Majolino, I., Zanon, P., und Tura, S. 1998  
Clinical use of allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow.  
Haematologica 83[2], 159-182
7. Aversa, F., Terenzi, A., Tabilio, A., Velardi, A., Falzetti, F., Felicini, R., Carotti, A., Ruggeri, L., Reisner, Y., und Martelli, M. F. 1996  
Addition of PBPCs to the marrow inoculum allows engraftment of mismatched T cell-depleted transplants for acute leukemia.  
Bone Marrow Transplant. 17 Suppl 2, S58-S61
8. Aversa, F., Terenzi, A., Carotti, A., Felicini, R., Jacucci, R., Zei, T., Latini, P., Aristei, C., Santucci, A., Martelli, M. P., Cunningham, I., Reisner, Y., und Martelli, M. F. 1999  
Improved outcome with T-cell-depleted bone marrow transplantation for

- 
- acute leukemia.  
J.Clin.Oncol. 17[5], 1545-1550
9. Ball, S. E., Gibson, F. M., Rizzo, S., Tooze, J. A., Marsh, J. C., and Gordon-Smith, E. C. 1998  
Progressive telomere shortening in aplastic anemia.  
Blood 91[10], 3582-3592
  10. Batliwalla, F. M., Damle, R. N., Metz, C., Chiorazzi, N., and Gregersen, P. K. 2001  
Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsillar B cells.  
J.Immunol.Methods 247[1-2], 103-109
  11. Beatty, P. G., Clift, R. A., Mickelson, E. M., Nisperos, B. B., Flournoy, N., Martin, P. J., Sanders, J. E., Stewart, P., Buckner, C. D., Storb, R., and . 1985  
Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings.  
N.Engl.J.Med. 313[13], 765-771
  12. Bhatia, S., Ramsay, N. K., Steinbuch, M., Dusenbery, K. E., Shapiro, R. S., Weisdorf, D. J., Robison, L. L., Miller, J. S., and Neglia, J. P. 1996  
Malignant neoplasms following bone marrow transplantation.  
Blood 87[9], 3633-3639
  13. Blackburn, E. H. and Gall, J. G. 1978  
A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena.  
J.Mol.Biol. 120[1], 33-53
  14. Blackburn, E. H. 1991  
Telomeres.  
Trends Biochem.Sci. 16[10], 378-381
  15. Blackburn, E. H. 1991  
Structure and function of telomeres.  
Nature 350[6319], 569-573
  16. Blackburn, E. H. 1994  
Telomeres: no end in sight.  
Cell 77[5], 621-623
  17. Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B., and Greider, C. W. 1995  
Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA.  
Science 269[5228], 1267-1270

18. Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., und Greider, C. W. 1997  
Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA.  
*Cell* 91[1], 25-34
19. Bornhauser, M., Theuser, C., Soucek, S., Holig, K., Klingebiel, T., Blau, W., Fauser, A., Runde, V., Schwinger, W., Rutt, C., und Ehninger, G. 2000  
Allogeneic transplantation of G-CSF mobilized peripheral blood stem cells from unrelated donors: a retrospective analysis.  
*Haematologica* 85[8], 839-847
20. Brecher, G., Beal, S. L., und Schneiderman, M. 1986  
Renewal and release of hemopoietic stem cells: does clonal succession exist?  
*Blood Cells* 12[1], 103-127
21. Broccoli, D., Young, J. W., und de Lange, T. 1995  
Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92[20], 9082-9086
22. Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M., und de Lange, T. 1997  
Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains.  
*Hum.Mol.Genet.* 6[1], 69-76
23. Brummendorf, T. H., Dragowska, W., und Lansdorp, P. M. 1999  
Asymmetric cell divisions in hematopoietic stem cells.  
*Ann.N.Y.Acad.Sci.* 872, 265-272
24. Brummendorf, T. H., Holyoake, T. L., Rufer, N., Barnett, M. J., Schulzer, M., Eaves, C. J., Eaves, A. C., und Lansdorp, P. M. 2000  
Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry.  
*Blood* 95[6], 1883-1890
25. Brummendorf, T. H., Rufer, N., Baerlocher, G. M., Roosnek, E., und Lansdorp, P. M. 2001  
Limited telomere shortening in hematopoietic stem cells after transplantation.  
*Ann.N.Y.Acad.Sci.* 938, 1-7
26. Bryan, T. M. und Reddel, R. R. 1997  
Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells.  
*Eur.J.Cancer* 33[5], 767-773

- 
27. Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., und Reddel, R. R. 1997  
Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines.  
Nat.Med. 3[11], 1271-1274
  28. Capel, B., Hawley, R., Covarrubias, L., Hawley, T., und Mintz, B. 1989  
Clonal contributions of small numbers of retrovirally marked hematopoietic stem cells engrafted in unirradiated neonatal W/W<sup>v</sup> mice.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 86[12], 4564-4568
  29. Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H. W., Gallinger, S., und Bacchetti, S. 1995  
Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer.  
Cancer Res. 55[12], 2533-2536
  30. Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S. L., Gottlieb, G. J., Greider, C. W., und DePinho, R. A. 1999  
p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis.  
Cell 97[4], 527-538
  31. Chiu, C. P., Dragowska, W., Kim, N. W., Vaziri, H., Yui, J., Thomas, T. E., Harley, C. B., und Lansdorp, P. M. 1996  
Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow.  
Stem Cells 14[2], 239-248
  32. Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., und de Lange, T. 1995  
A human telomeric protein.  
Science 270[5242], 1663-1667
  33. Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J., und Zakian, V. A. 1990  
RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability.  
Cell 63[4], 739-750
  34. Counter, C. M., Hahn, W. C., Wei, W., Caddle, S. D., Beijersbergen, R. L.; Lansdorp, P. M., Sedivy, J. M. und Weinberg, R. A., Jr. 1998  
Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization.  
Proc Natl Acad Sci USA. 95[25], 14723-14728
  35. Curtis, R. E., Rowlings, P. A., Deeg, H. J., Shriner, D. A., Socie, G., Travis, L. B., Horowitz, M. M., Witherspoon, R. P., Hoover, R. N., Sobocinski, K. A., Fraumeni, J. F., Jr., und Boice, J. D., Jr. 1997  
Solid cancers after bone marrow transplantation.  
N.Engl.J.Med. 336[13], 897-904

- 
36. Dahse, R., Fiedler, W., Ernst, G., Kosmehl, H., Schlichter, A., Schubert, J., und Claussen, U. 1996  
Changes in telomere lengths in renal cell carcinomas.  
*Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 42[4], 477-485
  37. Dahse, R., Fiedler, W., und Ernst, G. 1997  
Telomeres and telomerase: biological and clinical importance.  
*Clin.Chem.* 43[5], 708-714
  38. de Lange, T. 1992  
Human telomeres are attached to the nuclear matrix.  
*EMBO J.* 11[2], 717-724
  39. Deeg, H. J. und Socie, G. 1998  
Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers.  
*Blood* 91[6], 1833-1844
  40. Drize, N. J., Keller, J. R. and Chertkov, J. L., Jr. 1996  
Local clonal analysis of the hematopoietic system shows that multiple small short-living clones maintain life-long hematopoiesis in reconstituted mice.  
*Blood* 88[8], 2927-2938
  41. Dumont-Girard, F., Roux, E., van Lier, R. A., Hale, G., Helg, C., Chapuis, B., Starobinski, M., und Roosnek, E. 1998  
Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants.  
*Blood* 92[11], 4464-4471
  42. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B., und Nielsen, P. E. 1993  
PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules.  
*Nature* 365[6446], 566-568
  43. Einsele, H. und Kanz, L. 1999  
[Allogeneic transplantation of stem cells].  
*Internist (Berl)* 40[12], 1249-1256
  44. 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 und Yu, J. 1995  
The RNA component of human telomerase.  
*Science* 269[5228], 1236-1241
  45. Fibbe, W. E., Noort, W. A., Schipper, F. und Willemze, R. 1997  
Ex vivo expansion and engraftment potential of cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice.  
*Ann N Y Acad Sci.* 938, 9-17

- 
46. Fraser, C. C., Szilvassy, S. J., Eaves, C. J., und Humphries, R. K. 1992  
Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstituting ability.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89[5], 1968-1972
  47. Fraser, C. G. und Petersen, P. H. 1993  
Desirable standards for laboratory tests of they are to fulfill medical needs.  
Clin Chem. 39[7], 1447-1455
  48. Fraser, C. G. und Petersen, P. H. 1993  
Quality goals in external quality assessment are best based on biology.  
Scand J Clin Lab Invest Suppl. 212, 8-9
  49. Frenck, R. W., Jr., Blackburn, E. H., und Shannon, K. M. 1998  
The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95[10], 5607-5610
  50. Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., und Zakian, V. A. 1990  
Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription.  
Cell 63[4], 751-762
  51. Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B., und DePinho, R. A. 1998  
Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation.  
Oncogene 16[13], 1723-1730
  52. Greider, C. W. und Blackburn, E. H. 1985  
Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts.  
Cell 43[2 Pt 1], 405-413
  53. Greider, C. W. und Blackburn, E. H. 1989  
A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis.  
Nature 337[6205], 331-337
  54. Greider, C. W. 1996  
Telomere length regulation.  
Annu.Rev.Biochem. 65, 337-365
  55. Greider, C. W. 1999  
Telomeres do D-loop-T-loop.  
Cell 97[4], 419-422
  56. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., und de Lange, T. 1999

- 
- Mammalian telomeres end in a large duplex loop.  
Cell 97[4], 503-514
57. Gur, H., Krauthgamer, R., Berrebi, A., Klein, T., Nagler, A., Tabilio, A., Martelli, M. F. und Reisner, Y. 2002  
Tolerance induction by megadose hematopoietic progenitor cells: expansion of veto cells by short-term culture of purified human CD34(+) cells.  
Blood. 99[11], 4174-4181
  58. Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. und Blasco, M. A. 1999  
Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice.  
J Cell Biol. 144[4], 589-601
  59. Handgretinger, R., Lang, P., Schumm, M., Taylor, G., Neu, S., Koscielnak, E., Niethammer, D., und Klingebiel, T. 1998  
Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting.  
Bone Marrow Transplant. 21[10], 987-993
  60. Handgretinger, R., Schumm, M., Lang, P., Greil, J., Reiter, A., Bader, P., Niethammer, D., und Klingebiel, T. 1999  
Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells.  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 872, 351-361
  61. Handgretinger, R., Lang, P., Schumm, M., Pfeiffer, M., Gottschling, S., Demirdelen, B., Bader, P., Kuci, S., Klingebiel, T., und Niethammer, D. 2001  
Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children.  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 938, 340-357
  62. Harley, C. B., Futcher, A. B., und Greider, C. W. 1990  
Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.  
Nature 345[6274], 458-460
  63. Harley, C. B. 1991  
Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?  
Mutat.Res. 256[2-6], 271-282
  64. Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D. S., Mar, V., Bass, M. B., und Robinson, M. O. 1997  
Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits.  
Genes Dev. 11[23], 3109-3115
  65. Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I., und Robinson, M. O. 1997

- 
- A mammalian telomerase-associated protein.  
*Science* 275[5302], 973-977
66. Harrison, D. E., Astle, C. M., und Lerner, C. 1984  
Ultimate erythropoietic repopulating abilities of fetal, young adult, and old adult cells compared using repeated irradiation.  
*J.Exp.Med.* 160[3], 759-771
  67. Harrison, D. E., Astle, C. M., und Stone, M. 1989  
Numbers and functions of transplantable primitive immunohematopoietic stem cells. Effects of age.  
*J.Immunol.* 142[11], 3833-3840
  68. Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., und Allshire, R. C. 1990  
Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing.  
*Nature* 346[6287], 866-868
  69. Hayflick, L. 1965  
Mycoplasmas and human leukemia.  
*Wistar.Inst.Symp.Monogr* 4, 157-165
  70. Hayflick, L. 1965  
Tissue cultures and mycoplasmas.  
*Tex.Rep.Biol.Med.* 23, Suppl
  71. Hayflick, L. 1975  
Current theories of biological aging.  
*Fed.Proc.* 34[1], 9-13
  72. Hayflick, L. 1979  
The cell biology of aging.  
*J.Invest Dermatol.* 73[1], 8-14
  73. Hayflick, L. 1991  
Aging under glass.  
*Mutat.Res.* 256[2-6], 69-80
  74. Henslee-Downey, P. J., Parrish, R. S., MacDonald, J. S., Romond, E. H., Marciniak, E., Coffey, C., Ciocci, G., und Thompson, J. S. 1996  
Combined in vitro and in vivo T lymphocyte depletion for the control of graft-versus-host disease following haploidentical marrow transplant.  
*Transplantation* 61[5], 738-745
  75. Henslee-Downey, P. J., Abhyankar, S. H., Parrish, R. S., Pati, A. R., Godder, K. T., Neglia, W. J., Goon-Johnson, K. S., Geier, S. S., Lee, C. G., und Gee, A. P. 1997  
Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic

- marrow transplant.  
Blood 89[10], 3864-3872
76. Henslee-Downey, P. J. und Gluckman, E. 1999  
Allogeneic transplantation from donors other than HLA-identical siblings.  
Hematol.Oncol.Clin.North Am. 13[5], 1017-1039
77. Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Lee, H. W., und Blasco, M. A. 1999  
Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres.  
EMBO J. 18[11], 2950-2960
78. Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokoyama, T., Gazdar, A. F., Hiyama, K., Piatyszek, M. A., und Shay, J. W. 1996  
Telomerase activity in human breast tumors.  
J.Natl.Cancer Inst. 88[2], 116-122
79. Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A. F., Piatyszek, M. A., und Shay, J. W. 1995  
Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers.  
J.Natl.Cancer Inst. 87[12], 895-902
80. Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S., und Yamakido, M. 1995  
Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells.  
J.Immunol. 155[8], 3711-3715
81. Hurley, C. K., Wade, J. A., Oudshoorn, M., Middleton, D., Kukuruga, D., Navarrete, C., Christiansen, F., Hegland, J., Ren, E. C., Andersen, I., Cleaver, S. A., Brautbar, C., und Raffoux, C. 1999  
A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. Quality Assurance and Donor Registries Working Groups of the World Marrow Donor Association.  
Hum.Immunol. 60[4], 347-360
82. Jordan, C. T. und Lemischka, I. R. 1990  
Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse.  
Genes Dev. 4[2], 220-232
83. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., und de Lange, T. 1999  
p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2.  
Science 283[5406], 1321-1325

- 
84. Kay, H. E. M. 1965  
How many generations.  
, 418-419
  85. Keller, G. und Snodgrass, R. 1990  
Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo.  
J.Exp.Med. 171[5], 1407-1418
  86. 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., und Shay, J. W. 1994  
Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.  
Science 266[5193], 2011-2015
  87. Kook, H., Goldman, F., Padley, D., Giller, R., Rumelhart, S., Holidia, M., Lee, N., Peters, C., Comito, M., Huling, D., und Trigg, M. 1996  
Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery.  
Blood 88[3], 1089-1097
  88. Lamb, L. S., Jr., Gee, A. P., Parrish, R. S., Lee, C., Walker, M., Geier, S., Harris, G., Pati, A., Godder, K., und Henslee-Downey, P. J. 1996  
Acute rejection of marrow grafts in patients transplanted from a partially mismatched related donor: clinical and immunologic characteristics.  
Bone Marrow Transplant. 17[6], 1021-1027
  89. Lamb, L. S., Jr., Gee, A. P., Henslee-Downey, P. J., Geier, S. S., Hazlett, L., Pati, A. R., Godder, K., Abhyankar, S. A., Turner, M. W., Lee, C., Harris, W. G., und Parrish, R. S. 1998  
Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors.  
Bone Marrow Transplant. 21[5], 461-471
  90. Langford, L. A., Piatyszek, M. A., Xu, R., Schold, S. C., Jr., und Shay, J. W. 1995  
Telomerase activity in human brain tumours.  
Lancet 346[8985], 1267-1268
  91. Lansdorp, P. M., Dragowska, W., und Mayani, H. 1993  
Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells.  
J.Exp.Med. 178[3], 787-791
  92. Lansdorp, P. M. 1995  
Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells.  
Exp.Hematol. 23[3], 187-191

93. Lansdorp, P. M. 1995  
Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells.  
*J.Cell Sci.* 108 ( Pt 1), 1-6
94. Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., van de Rijke, F. M., Dragowska, V., Little, M. T., Dirks, R. W., Raap, A. K., und Tanke, H. J. 1996  
Heterogeneity in telomere length of human chromosomes.  
*Hum.Mol.Genet.* 5[5], 685-691
95. Lansdorp, P. M. 1997  
Self-renewal of stem cells.  
*Biol.Blood Marrow Transplant.* 3[4], 171-178
96. Lansdorp, P. M., Poon, S., Chavez, E., Dragowska, V., Zijlmans, M., Bryan, T., Reddel, R., Egholm, M., Bacchetti, S., und Martens, U. 1997  
Telomeres in the haemopoietic system.  
*Ciba Found.Symp.* 211, 209-218
97. Lauzon, W., Sanchez Dardon, J., Cameron, D. W. und Badley A. D. 2000  
Flow cytometric measurement of telomere length.  
*Cytometry.* 42[3], 159-164
98. Lee, J., Kook, H., Chung, I., Kim, H., Park, M., Kim, C., Nah, J., und Hwang, T. 1999  
Telomere length changes in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation.  
*Bone Marrow Transplant.* 24[4], 411-415
99. Lee, S. J., Weller, E., Alyea, E. P., Ritz, J., und Soiffer, R. J. 1998  
Efficacy and costs of granulocyte colony-stimulating factor in allogeneic T-cell depleted bone marrow transplantation.  
*Blood* 92[8], 2725-2729
100. Lemischka, I. R., Raulet, D. H., und Mulligan, R. C. 1986  
Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells.  
*Cell* 45[6], 917-927
101. Lemischka, I. R. 1992  
The haematopoietic stem cell and its clonal progeny: mechanisms regulating the hierarchy of primitive haematopoietic cells.  
*Cancer Surv.* 15, 3-18
102. Levis, R. W. 1989  
Viable deletions of a telomere from a *Drosophila* chromosome.  
*Cell* 58[4], 791-801
103. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W., und Harley, C. B. 1992

- 
- Telomere end-replication problem and cell aging.  
J.Mol.Biol. 225[4], 951-960
104. Lowsky, R., Lipton, J., Fyles, G., Minden, M., Meharchand, J., Tejpar, I., Atkins, H., Sutcliffe, S., und Messner, H. 1994  
Secondary malignancies after bone marrow transplantation in adults.  
J.Clin.Oncol. 12[10], 2187-2192
105. Luderus, M. E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F., und de Lange, T. 1996  
Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex.  
J.Cell Biol. 135[4], 867-881
106. Lundberg, A. S., Randell, S.H., Stewart, S. A., Elenbaas, B., Hartwell, K. A., Brooks, M. W., Fleming, M. S., Olsen, J. C., Miller, S. W., Weinberg, R. A. und Hahn, W. C. 2002  
Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer.  
Oncogene 21[29], 4577-4586
107. Makarov, V. L., Hirose, Y., und Langmore, J. P. 1997  
Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening.  
Cell 88[5], 657-666
108. Martens, U. M., Zijlmans, J. M., Poon, S. S., Dragowska, W., Yui, J., Chavez, E. A., Ward, R. K., und Lansdorp, P. M. 1998  
Short telomeres on human chromosome 17p.  
Nat.Genet. 18[1], 76-80
109. Martens, U. M., Brass, V., Engelhardt, M., Glaser, S., Waller, C. F., Lange, W., Schmoor, C., Poon, S. S., und Lansdorp, P. M. 2000  
Measurement of telomere length in haematopoietic cells using in situ hybridization techniques.  
Biochem.Soc.Trans. 28[2], 245-250
110. Martens, U. M., Chavez, E. A., Poon, S. S., Schmoor, C., und Lansdorp, P. M. 2000  
Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence.  
Exp.Cell Res. 256[1], 291-299
111. Mathioudakis, G., Storb, R., McSweeney, P. A., Torok-Storb, B., Lansdorp, P. M., Brummendorf, T. H., Gass, M. J., Bryant, E. M., Storek, J., Flowers, M. E., Gooley, T., und Nash, R. A. 2000  
Polyclonal hematopoiesis with variable telomere shortening in human long-term allogeneic marrow graft recipients.  
Blood 96[12], 3991-3994

- 
112. Mathog, D., Hochstrasser, M., Gruenbaum, Y., Saumweber, H., und Sedat, J. 1984  
Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei.  
*Nature* 308[5958], 414-421
113. Mavroudis, D., Read, E., Cottler-Fox, M., Couriel, D., Molldrem, J., Carter, C., Yu, M., Dunbar, C., und Barrett, J. 1996  
CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies.  
*Blood* 88[8], 3223-3229
114. Metcalf, D. 1977  
Hemopoietic colonies: in vitro cloning of normal and leukemic cells.  
*Recent Results Cancer Res.* [61], Title-227
115. Metcalf, D. 1993  
Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?  
*Blood* 82[12], 3515-3523
116. Morin, G. B. 1989  
The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats.  
*Cell* 59[3], 521-529
117. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., und Wu, J. R. 1988  
A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85[18], 6622-6626
118. Nakano, T., Waki, N., Asai, H., und Kitamura, Y. 1987  
Long-term monoclonal reconstitution of erythropoiesis in genetically anemic W/W<sup>v</sup> mice by injection of 5-fluorouracil-treated bone marrow cells of P<sub>gk</sub>-1b/P<sub>gk</sub>-1a mice.  
*Blood* 70[6], 1758-1763
119. Niethammer, D. und Mayer, E. 1998  
Long-term survivors: an overview on late effects, sequelae and second neoplasias.  
*Bone Marrow Transplant.* 21 Suppl 2, S61-S63
120. Notaro, R., Cimmino, A., Tabarini, D., Rotoli, B., und Luzzatto, L. 1997  
In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94[25], 13782-13785
121. Nouse, K., Urabe, Y., Higashi, T., Nakatsukasa, H., Hino, N., Ashida, K., Kinugasa, N., Yoshida, K., Uematsu, S., und Tsuji, T. 1996

- 
- Telomerase as a tool for the differential diagnosis of human hepatocellular carcinoma.  
Cancer 78[2], 232-236
122. Ogawa, M. 1993  
Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.  
Blood 81[11], 2844-2853
123. Olovnikov, A. M. 1971  
[Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides].  
Dokl.Akad.Nauk SSSR 201[6], 1496-1499
124. 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[1], 181-190
125. de Pauw, E. S., Otto, S. A., Wijnen, J. T., Vossen, J. M., van Weel, M. H., Tanke, H. J., Miedema, F., Willemze, R., Roelofs, H. und Fibbe, W. E. 2002  
Long-term follow-up of recipients of allogeneic bone marrow grafts reveals no progressive telomere shortening and provides no evidence for haematopoietic stem cell exhaustion.  
Br J Haematol. 116[2], 491-496
126. Peters, C., Matthes-Martin, S., Fritsch, G., Holter, W., Lion, T., Witt, V., Hocker, P., Fischer, G., Dieckmann, K., Handgretinger, R., Klingebiel, T., und Gadner, H. 1999  
Transplantation of highly purified peripheral blood CD34+ cells from HLA-mismatched parental donors in 14 children: evaluation of early monitoring of engraftment.  
Leukemia 13[12], 2070-2078
127. Ray, F. A., Waltman, M. J., Lehman, J. M., Little, J. B., Nickoloff, J. A. und Kraemer, P. M. 1998  
Identification of SV40 T-antigen mutants that alter T-antigen-induced chromosome damage in human fibroblasts.  
Cytometry. 31[4], 242-250
128. Reddel, R. R., Bryan, T. M., und Murnane, J. P. 1997  
Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review.  
Biochemistry (Mosc.) 62[11], 1254-1262
129. Reisner, Y. und Martelli, M. F. 1995  
Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells.  
Immunol.Today 16[9], 437-440

- 
130. Reisner, Y., Bachar-Lustig, E., Li, H. W., Aversa, F., Velardi, A., und Martelli, M. F. 1999  
The role of megadose CD34+ progenitor cells in the treatment of leukemia patients without a matched donor and in tolerance induction for organ transplantation.  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 872, 336-348
131. Rocha, B., Dautigny, N., und Pereira, P. 1989  
Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo.  
Eur.J.Immunol. 19[5], 905-911
132. Roelofs, H., de Pauw, E. S. D., Zwindermann, A. H., Opdam, S. M., Willemze, R., Tanke, H. J. und Fibbe, W. E. 2003  
Homeostasis of telomere length rather than telomere shortening after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.  
Blood 101[1], 358-362
133. Roux, E., Dumont-Girard, F., Starobinski, M., Siegrist, C. A., Helg, C., Chapuis, B., und Roosnek, E. 2000  
Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity.  
Blood 96[6], 2299-2303
134. Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., und DePinho, R. A. 1999  
Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice.  
Cell 96[5], 701-712
135. Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E., und Lansdorp, P. M. 1998  
Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry.  
Nat.Biotechnol. 16[8], 743-747
136. Rufer, N., Brummendorf, T. H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M., und 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[2], 157-167
137. Rufer, N., Brummendorf, T. H., Chapuis, B., Helg, C., Lansdorp, P. M., und Roosnek, E. 2001  
Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation.  
Blood 97[2], 575-577

- 
138. Sakoff, J. A., de Waal, E., Garg, M. B., Denham, J., Scorgie, F. E., Enno, A., Lincz, L. F. und Ackland, S. P. 2002  
Telomere length in Haemopoietic Stem Cells can be Determined from that of Mononuclear Blood Cells or Whole Blood.  
Leukemia and Lymphoma 43[10], 2017-2020
139. Samper, E., Goytisolo, F. A., Slijepcevic, P., van Buul, P. P., und Blasco, M. A. 2000  
Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang.  
EMBO Rep. 1[3], 244-252
140. Samper, E., Fernandez, P., Eguia, R., Martin-Rivera, L., Bernad, A., Blasco, M. A. und Aracil, M. 2002  
Long-term repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells.  
Blood 99[8], 2767-2775
141. Sandell, L. L. und Zakian, V. A. 1993  
Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss.  
Cell 75[4], 729-739
142. Sandell, L. L., Gottschling, D. E., und Zakian, V. A. 1994  
Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91[25], 12061-12065
143. Schmidt, M., Glimm, H., Lemke, N., Muessig, A., Speckmann, C., Haas, S., Zickler, P., Hoffmann, G. und von Kalle, C. 2001  
A model for the detection of clonality in marked hematopoietic stem cells.  
Ann N Y Acad Sci 938, 146-155
144. Schmidt, M., Zickler, P., Hoffmann, G., Haas, S., Wissler, M., Muessig, A., Tisdale, J. F., Kuramoto, K., Andrews, R. G., Wu, T., Kiem, H. P., Dunbar, C. E. und von Kalle, C. 2002  
Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model.  
Blood 100[8], 2737-2743
145. Schoen, I., Graham, G. A., Custer, E., Gandi, Z. und Georgewill, D. 1989  
Clinically useful limits (CUL) criteria as a basis for quality control including minimal and optimal goals for quality control.  
Am J Clin Pathol. 91[2], 172-181
146. Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuci, S., Klingebiel, T., Buhning, H. J., Geiselhart, A., Niethammer, D., und Handgretinger, R. 1999  
Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device.  
J.Hematother. 8[2], 209-218

- 
147. Schwartz, H. S., Juliao, S. F., Sciadini, M. F., Miller, L. K., und Butler, M. G. 1995  
Telomerase activity and oncogenesis in giant cell tumor of bone.  
*Cancer* 75[5], 1094-1099
148. Schwinger, W., Urban, C., Mache, C. J., Resch, B., Lackner, H., Hofler, G., Beham-Schmid, C., Gilli, R., Wagner, K., Haas, O. A., und . 1995  
Adoptive immunotransfer with viable donor mononuclear cells for recurrent chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation in two children.  
*Pediatr.Hematol.Oncol.* 12[1], 47-54
149. Shay, J. W., Werbin, H., und Wright, W. E. 1996  
Telomeres and telomerase in human leukemias.  
*Leukemia* 10[8], 1255-1261
150. Shay, J. W. und Bacchetti, S. 1997  
A survey of telomerase activity in human cancer.  
*Eur.J.Cancer* 33[5], 787-791
151. Shay, J. W. 1998  
Accelerated telomere shortening in bone-marrow recipients.  
*Lancet* 351[9097], 153-154
152. Slagboom, P. E., Droog, S., und Boomsma, D. I. 1994  
Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups.  
*Am.J.Hum.Genet.* 55[5], 876-882
153. Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., und de Lange, T. 2000  
Control of human telomere length by TRF1 and TRF2.  
*Mol.Cell Biol.* 20[5], 1659-1668
154. Snodgrass, R. und Keller, G. 1987  
Clonal fluctuation within the haematopoietic system of mice reconstituted with retrovirus-infected stem cells.  
*EMBO J.* 6[13], 3955-3960
155. Sommerfeld, H. J., Meeker, A. K., Piatyszek, M. A., Bova, G. S., Shay, J. W., und Coffey, D. S. 1996  
Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue.  
*Cancer Res.* 56[1], 218-222
156. Tommerup, H., Dousmanis, A., und de Lange, T. 1994  
Unusual chromatin in human telomeres.  
*Mol.Cell Biol.* 14[9], 5777-5785

- 
157. Urban, C., Schwinger, W., Benesch, M., Lackner, H., Kerbl, R., Gilli, R., Patzold, U., und Burdach, S. 1997  
Feasibility of peripheral blood stem cell (PBSC) and peripheral blood mononuclear cell (PBMNC) separation in children with a body weight below 20 KG.  
Med.Pediatr.Oncol. 29[2], 115-120
  158. van Steensel, B. und de Lange, T. 1997  
Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1.  
Nature 385[6618], 740-743
  159. van Steensel, B., Smogorzewska, A., und de Lange, T. 1998  
TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions.  
Cell 92[3], 401-413
  160. Vaziri, H., Schachter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D., und Harley, C. B. 1993  
Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes.  
Am.J.Hum.Genet. 52[4], 661-667
  161. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., und 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[21], 9857-9860
  162. Vowels, M., Lam-Po-Tang, R., Mameghan, H., Honeyman, M., und Russell, S. 1990  
Bone marrow transplantation in children using closely matched related and unrelated donors.  
Transplant.Proc. 22[5], 2172
  163. Vowels, M., Honeyman, M., Ziegler, J., White, L., Doran, T., Lane, J., und Lam-Po-Tang, R. 1990  
Searches for matched and closely matched marrow donors undertaken in a paediatric unit.  
Transplant.Proc. 22[5], 2171
  164. Vowels, M. R., Lam-Po-Tang, R., Mameghan, H., Ford, D., Trickett, A., White, L., Marshall, G., und Brown, R. 1990  
Bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia after marrow relapse.  
Med.J.Aust. 152[8], 416-418
  165. Wang, S. S. und Zakian, V. A. 1990  
Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition.  
Nature 345[6274], 456-458

166. Watson, J. D. 1972  
Origin of concatemeric T7 DNA.  
Nat.New Biol. 239[94], 197-201
167. Witherspoon, R. P., Deeg, H. J., und Storb, R. 1994  
Secondary malignancies after marrow transplantation for leukemia or aplastic anemia.  
Transplant.Sci. 4[1], 33-41
168. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., und Shay, J. W. 1996  
Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells.  
Dev.Genet. 18[2], 173-179
169. Wynn, R., Thornley, I., Freedman, M., und Saunders, E. F. 1999  
Telomere shortening in leucocyte subsets of long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation.  
Br.J.Haematol. 105[4], 997-1001
170. Wynn, R. F., Cross, M. A., und Testa, N. G. 1998  
Telomeres and haemopoiesis.  
Br.J.Haematol. 103[3], 591-593
171. Wynn, R. F., Cross, M. A., Hatton, C., Will, A. M., Lashford, L. S., Dexter, T. M., und Testa, N. G. 1998  
Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants.  
Lancet 351[9097], 178-181
172. Yui, J., Chiu, C. P., und Lansdorp, P. M. 1998  
Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow.  
Blood 91[9], 3255-3262
173. Zakian, V. A. 1995  
Telomeres: beginning to understand the end.  
Science 270[5242], 1601-1607
174. Zeichner, S. L., Palumbo, P., Feng, Y., Xiao, X., Gee, D., Sleasman, J., Goodenow, M., Biggar, R., und Dimitrov, D. 1999  
Rapid telomere shortening in children.  
Blood 93[9], 2824-2830
175. Zijlmans, J. M., Martens, U. M., Poon, S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., und 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[14], 7423-7428

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Carsten Bokemeyer und Herrn Dr. Tim Brümmendorf für die Überlassung des interessanten Themas. Herrn Dr. Tim Brümmendorf danke ich außerdem für die außergewöhnlich engagierte Betreuung und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Kanz danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung II, Hämatologie und Onkologie, der Universitätsklinik, durchführen zu können.

Bei Frau Alexandra Wahl möchte ich mich für die kompetente Einführung und die ständige Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

Allen anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre im Labor.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei dem Transplantationsteam der Abteilung II unter Herrn Prof. Dr. Einsele und Herrn Dr. Faul bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung I für Hämatologie und Onkologie der Universitäts-Kinderklinik unter Prof. Dr. Niethammer für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt den Pflegeteams der Hämatologischen Poliklinik und der Hämatologischen Tagesklinik für ihr absolutes Engagement im Rahmen dieser Arbeit und nicht zuletzt für die hervorragende Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt allen „kleinen“ und „großen“ Patienten, sowie ihren jeweiligen Stammzell-Spendern, für ihre Bereitschaft an dieser Studie teilzunehmen.

Meinen Eltern, meiner Familie und allen Freunden danke ich für die große Unterstützung, die einen nicht unwesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

## 10 Lebenslauf

Name	Holger Wolke
Geburtsdatum	10. August 1975
Geburtsort	Stuttgart

### Schulbildung

1982	Einschulung
1995	Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

1995 – 1996	Städtische Kliniken Esslingen, Abteilung für Innere Medizin
-------------	---

### Universitätsausbildung

WS 96/97	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
1998	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002	Beginn des Praktisches Jahres an den Städtischen Kliniken Esslingen
8. Mai 2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotionsarbeit

Oktober 1999	Beginn des experimentellen Teils der Dissertation im Labor von Dr. Brümmendorf; Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Prof. Dr. Kanz Teilprojekt von A6 und B6 des Sonderforschungsbereich SFB510
--------------	---

**Veröffentlichungen**

- 2000                    *Moderate telomere shortening in recipients of haploidentical megadose stem cell transplants.*  
Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
- 2001                    *Telomere length dynamics in normal individuals and in disease states associated with increased stem cell turnover.*  
Vortrag, Conference on Basic Biology and Clinical Impact
- Degree of telomere shortening after haploidentical megadose stem cell transplantation is not correlated with the number of CD34+ cells infused.*  
Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
- 2003                    *Normalisation of previously shortened telomere length under treatment with Imatinib against a preexisting telomere length deficit in normal hematopoietic stem cells from patients with chronic myeloid leukemia.*  
Annals of the New York Academy of Science 2003 in press