

**Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik (Department)
Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Untersuchung zur Telomerbiologie hämatopoetischer
Zellen in Patienten mit Paroxysmaler Nächtlicher
Hämoglobinurie (PNH)
mittels Proaerolysin *multi-color flow-FISH***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Fabian Johannes Alfred Beier

aus

Filderstadt

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Brümmendorf

2. Berichterstatter:

Professor Dr. L. Kanz

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
AA	Aplastische Anämie
bp	Basenpaare
BS3	BIS-(Sulfo-succimidyl)-Subberate
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cy5	Streptavidin–Cyanin 5
DKC	Dykeratosis congenita
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPM	Dolicholphosphatmannose
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FSC	<i>forward light scatter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAER	Fluoreszenzmarkierte Proaerolysinvariante (<i>fluorescently labeled proaerolysin variant</i>)
g	Gravitationskonstante oder Gramm
GluNAc	N-Acetylglucosamin
GP	Gesunder Proband
GPI	Glycosilphosphatidylinositol
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
h	Stunde
hTERT	katalytische Untereinheit der Telomerase (<i>human telomerase reverse transcriptase</i>)

Abkürzungsverzeichnis

hTR	RNA-Komponente der Telomerase (<i>human telomerase RNA</i>)
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MAC	Membranangriffskomplex (<i>membrane attack complex</i>)
mbp	Megabasenpaare
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minuten
m-RNA	Boten (<i>messenger</i>) RNA
mTR	RNA-Komponente der Telomerase der Maus
MW	Mittelwert
Q-FISH	Quantitative Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Phosphatidylinositol oder Propidium Iodid
PNA	Peptidnukleinsäuren (<i>Peptide nucleic acids</i>)
PNH	Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSC	Natriumcitrat (<i>sodium salt citrate</i>) oder <i>side scatter</i>
TFU	elomerfluoreszenzeinheit (<i>telomere fluorescence unit</i>)
TRF	Telomer-Restriktionsfragment
TRF1	Telomer-bindendes Protein 1 (<i>telomere repeat binding factor 1</i>)
TRF2	Telomer-bindendes Protein 2 (<i>telomere repeat binding factor 2</i>)
U	Umdrehungen oder Einheiten (<i>units</i>)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 4

Inhaltsverzeichnis 6

1 Einleitung..... 9

 1.1 Telomere..... 9

 1.1.1 Struktur und Funktion..... 9

 1.1.2 Telomere und das Endreplikationsproblem..... 11

 1.2 Telomerase 13

 1.2.1 Struktur 13

 1.2.2 Bedeutung der Telomerase 14

 1.3 Methoden der Telomerlängenbestimmung..... 16

 1.3.1 Southern Blot 16

 1.3.2 Q-FISH..... 17

 1.3.3 Konventioneller flow-FISH 17

 1.4 Klinik der PNH..... 19

 1.4.1 Geschichte der PNH 19

 1.4.2 Symptomatik und Klassifikation der PNH..... 19

 1.4.3 Natürlicher Krankheitsverlauf der PNH 21

 1.4.4 Therapie der PNH 21

 1.5 Pathogenese der PNH 23

 1.5.1 Normale Hämatopoese des Menschen..... 23

 1.5.2 Ursprung des PNH Klons..... 24

 1.5.3 Aufbau des pig-A Gens und seine Mutationen..... 25

 1.5.4 Struktur und Synthese des GPI-Ankers 26

 1.5.5 Funktion des GPI-Ankers und der daran verankerten Proteine .. 27

 1.5.6 Intravasale Hämolyse und das Komplementsystem 28

 1.5.7 Entstehung des Klons 30

 1.5.8 Telomerdynamik bei AA und PNH 33

 1.6 Diagnostik der PNH..... 34

 1.6.1 Tests der Komplementaktivierung..... 34

 1.6.2 Nachweis über GPI-verankerte Proteine..... 35

 1.6.3 Nachweis mittels Aerolysin 35

2	Fragestellung der Doktorarbeit	37
3	Material und Methoden	38
3.1	Material	38
3.1.1	Herstellerfirmen.....	38
3.1.2	Geräte und Materialien	39
3.1.3	Puffer, Medien, Chemikalien.....	40
3.1.4	Antikörper und Toxine.....	40
3.1.5	Patientenproben.....	41
3.2	Methode	41
3.2.1	Gewinnung der mononukleären Zellen	41
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsbestimmung.....	41
3.2.3	Auftauen und Auszählung der internen Kontrolle.....	42
3.2.4	Nachweis des GPI-Ankers und Proaerolysinfärbung	42
3.2.5	BS3 und kovalente Quervernetzung	44
3.2.6	Hybridisierung mit PNA.....	45
3.3	Grundlagen der Messung.....	48
3.4	Verwendete Statistik	52
3.5	Auswertung der Daten	52
3.6	Berechnung der Telomerlänge mit Hilfe der internen Kontrolle.....	57
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Validierung der Methode	58
4.2	Darstellung der Altersstruktur der PNH Patienten.....	63
4.3	Ergebnisse der Telomerlängenbestimmung.....	64
4.3.1	Bestimmung mit Proaerolysin	64
4.3.2	Bestimmung mit CD59	66
4.4	Korrelation des Alters mit der Telomerlängendifferenz zwischen GPI(+) und GPI(-) Granulozyten.....	67
5	Diskussion	70
5.1	Einfluss der Methodik auf die Telomerlängenmessung.....	70
5.2	Telomerdynamik bei AA.....	72
5.3	Telomerdynamik bei PNH	74
5.4	Replikationsunabhängige Erklärung der Telomerbiologie bei PNH....	76

5.5	Telomerbiologische Erklärungsansätze des natürlichen Verlaufs der PNH.....	78
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literatur.....	81
8	Eigene Veröffentlichungen	92
8.1	Publikationen	92
8.2	Vorträge	92
8.3	Posterpräsentationen	93
9	Danksagung.....	94
10	Lebenslauf	96

1 Einleitung

1.1 Telomere

1.1.1 Struktur und Funktion

Das Wort Telomere bildet sich aus den zwei griechischen Wörtern „Telo“, das Ende, und „meros“, ein Teil. Der Begriff wurde von dem Medizin-nobelpreisträger Hermann Joseph Müller im Jahre 1938 geprägt (Mueller, 1938). Es handelt sich hierbei um eine sich tausendfach wiederholende DNA Sequenz an den Enden eines jeden Chromosomenarms.

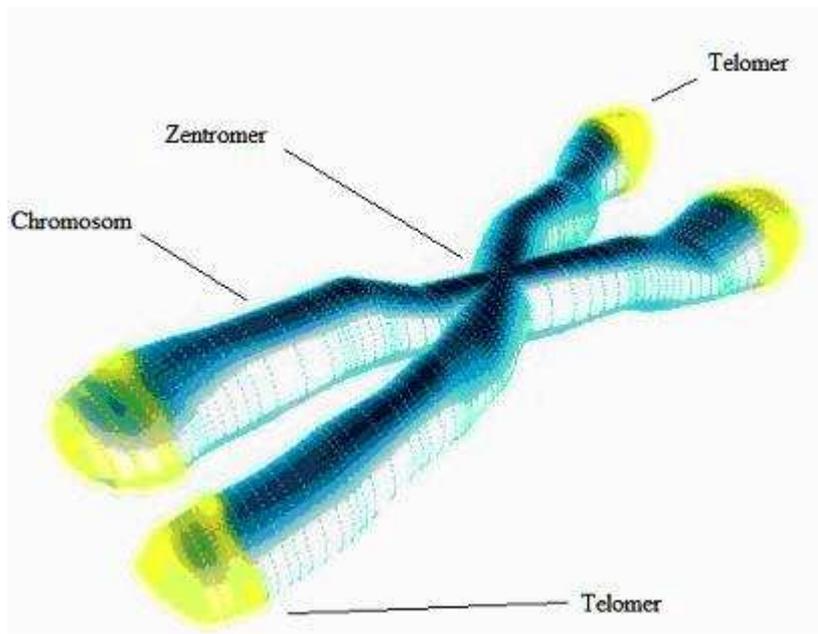


Abbildung 1: Darstellung eines X-Chromosoms, (modifiziert nach (Pieska Alfred, 2006))

Telomere bestehen in allen Wirbeltieren aus der sich wiederholenden Sequenz: TTAGGG (Moyzis et al., 1988). Die Länge der Telomere unterscheidet sich jedoch von Spezies zu Spezies (Kipling et al., 1990). So besitzen Katzen zum Beispiel zwei- bis dreimal längere Telomerlängen als der Mensch (Brummendorf et al., 2002). Es gibt aber auch Unterschiede in der

Telomerlänge zwischen Individuen, einzelnen Zellarten und sogar Unterschiede in der Telomerlänge zwischen den einzelnen Chromosomenarmen (Martens et al., 1998). Zusätzlich zu den Nukleotiden bestehen die Telomere auch noch aus einer Vielzahl von Proteinen, die für die Bindung der Telomere und ihre Interaktion innerhalb der Zelle unentbehrlich sind (Blackburn, 2001).

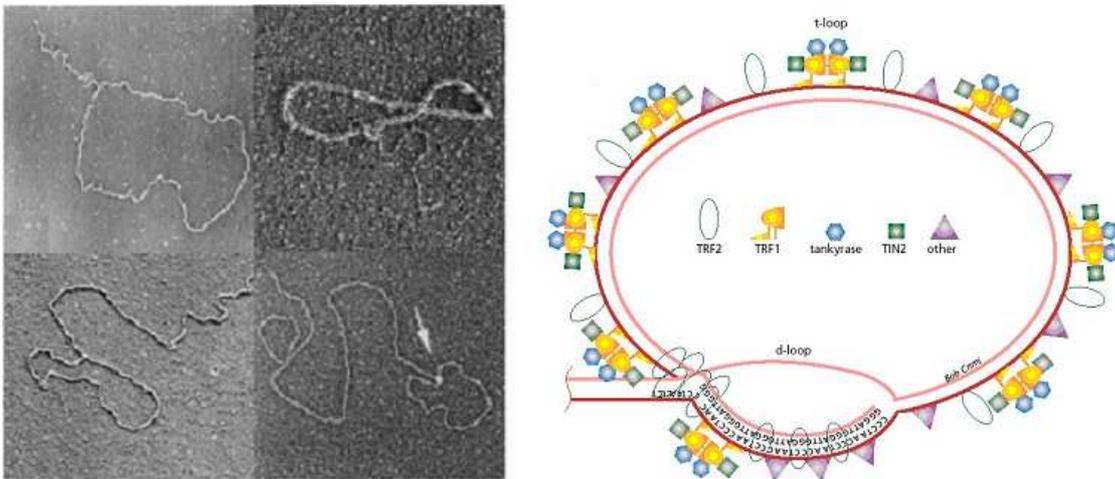


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung des Endes eines Telomeres (aus (Griffith et al., 1999)) und schematische Darstellung eines T-loops und dessen Proteine (aus (Shay, 1999))

Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die Telomere nicht stumpf, sondern in einer sogenannten *T-loop*-Struktur (T für *telomeric*) enden (Abbildung 2). Der *T-loop* entsteht durch Anlagerung des freien 3' Endes der Telomer DNA an den 5' Strang. Hierdurch entsteht zum einen der *T-loop* und ein kleiner *D-loop* (D für *displacement*) (Griffith et al., 1999). Für das Entstehen des *T-loops* und seiner Regulation werden verschiedene Proteine wie zum Beispiel TRF1 und TRF2 benötigt (Shay, 1999). Durch die Interaktion der unterschiedlichen Proteine mit der Telomer DNA und der Telomerase beeinflussen die Telomerproteine auch die Telomerlänge (Smogorzewska et al., 2000; Smogorzewska et al., 2004; Songyang et al., 2006).

Die Telomere besitzen mehrere Funktionen. Zum einen dient der Telomer-Nukleoproteinkomplex als Anheftungspunkt im Zellkern und damit der räumlichen Organisation der Chromosomen (Tommerup et al., 1994). Zum anderen sind sie für die korrekte Orientierung der Chromosomen während der Zellteilung wichtig. Zudem stellen die Telomere eine Art „Schutzkappe“ der Chromosomenenden dar und verhindern dadurch die Fusion mit anderen Chromosomen, Rekombinationen und enzymatischen Abbau (Zakian, 1995). Der Verlust der Schutzkappe führt zu strukturellen und numerischen Chromosomenveränderungen und zu Störungen im Genom (Bouffler et al., 1996).

1.1.2 Telomere und das Endreplikationsproblem

Die Replikation der DNA basiert auf einem komplizierten Wechselspiel verschiedenster Enzyme und Proteine (siehe Abbildung 3). Zu Beginn entwindet und öffnet das Enzym Helicase den Doppelstrang. An diesem kann nun das Enzym DNA-Polymerase α ansetzen und den DNA Einzelstrang von 5' nach 3' replizieren. Der Strang, an dem die DNA Polymerase α ansetzt, arbeitet von 5' nach 3' und heißt deswegen auch *leading strand*. Da die DNA aber nur in 5'-3' Richtung synthetisiert werden kann, erfolgt durch das Enzym DNA-Primase die Bildung von RNA-Primern. Die OH-Gruppe des 3' Endes der RNA Fragmente dient als Ansatzpunkt für die DNA Polymerase α . Sie kann nun den *lagging strand* wie beim *leading strand* weiter in 5'-3' Richtung synthetisieren, bis sie zum nächsten *Primer* kommt. Die DNA-Polymerase δ verfügt über die Eigenschaft, RNA Nukleotide zu entfernen und durch DNA-Nukleotide zu ersetzen. Diese kontrolliert den *lagging strand* und im abschliessenden Schritt verbindet die DNA-Ligase die bereits synthetisierte DNA mit den durch DNA ersetzten RNA-Primern.

Hieraus ergibt sich nun das Problem, dass das äußerste 5' Ende nicht mehr repliziert werden kann (Harley et al., 1990).

Replikation, da eine weitere Telomerlängenverkürzung mit möglichen chromosomalen Instabilitäten einhergeht und somit zu malignem Wachstum führen kann (Schmitt, 2003).

Im Jahre 1990 postulierte Calvin Harley auf Grundlage dieser Vorarbeiten sein Modell der „mitotischen Uhr“. In diesem lassen sich über die Länge der Telomere Rückschlüsse über die replikative Geschichte der jeweiligen Zelle ziehen (Harley et al., 1990).

Mit Hilfe der Telomere konnte man einige Phänomene wie zum Beispiel das *Hayflick limit* oder das Endreplikationsproblem erklären. Allerdings blieb es zunächst unklar, wie zum Einen die Keimbahnzellen ihre Funktion über Generationen aufrecht erhalten konnten noch warum Tumorzellen sich unbegrenzt teilen können. Zur Klärung dieses Problems trug die Entdeckung eines Enzyms bei, das Telomere verlängern kann, die Telomerase.

1.2 Telomerase

1.2.1 Struktur

Der humane Telomerasekomplex besteht aus zwei Untereinheiten: hTR, der „*human Telomerase RNA*“, einer 560 Basenpaare großen RNA Matrize und hTERT, der „*human Telomerase Reverse Transcriptase*“, dem eigentlichen Enzym (Counter et al., 1998; Feng et al., 1995). Die Telomerase hTERT ist ein mehr als 1000 kDa schweres Holoenzym, dessen 35 kb großes Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 (5p15.33), etwa 2 mbp von den Telomeren entfernt liegt (Cong et al., 1999; Wick et al., 1999). Es ist die einzige bislang beim Menschen bekannte reverse Transkriptase.

Die genaue molekulare Struktur des ganzen Telomerasekomplexes ist bis heute noch nicht im Detail aufgeklärt worden.

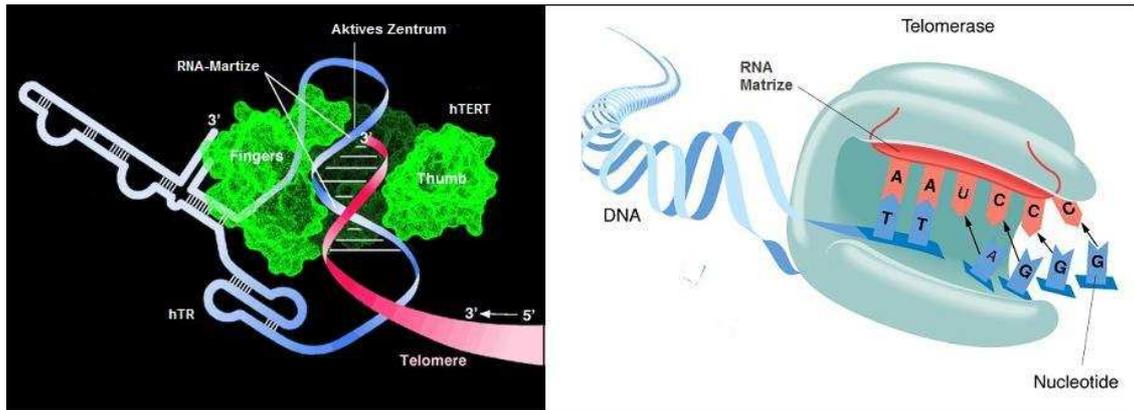


Abbildung 4: Darstellung des Zusammenspiels von hTR und hTERT (modifiziert nach (Greider et al., 1996; Lingner et al., 1997))

Während hTR vermutlich ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert wird, findet man eine starke Expression von hTERT vor allem in Keimbahnzellen und Tumoren (Ducrest et al., 2002; Feng et al., 1995). Eine schwache Expression (etwa 10% der Expression von Tumorzellen) von hTERT lässt sich ebenfalls in peripheren Blutleukozyten und in hämatopoetischen und anderen Stammzellen nachweisen (Broccoli et al., 1995; Hiyama et al., 1995) (siehe Abbildung 5).

1.2.2 Bedeutung der Telomerase

Durch die Entdeckung der Telomerase konnte man nun zwei noch offene Fragen erklären: Warum sich Tumorzellen endlos teilen können und warum über Generationen hinweg die Chromosomen nicht verschwinden.

Der erste Nachweis von Telomerase im humanen Gewebe erfolgte 1989 durch Morin et al. in einer humanen Tumorzelllinie (Morin, 1989). In den darauf folgenden Jahren konnte in einer Vielzahl von Tumoren das Enzym Telomerase nachgewiesen werden (Shay et al., 1997). Man nimmt an, dass, um das *Hayflick limit* und damit die Seneszenz zu umgehen (siehe Abbildung 5), die überwiegende Mehrheit der Tumore Telomerase exprimiert (Klingelutz, 1999). Ein weiterer Beweis für die Theorie von Harley (Harley et al., 1992) und die Bedeutung der Telomerase gelang durch den Transfer von Telomerase in retinale Epithelzellen und Fibroblasten (Bodnar et al., 1998). Diese zuvor

telomerasenegativen Zellen konnten sich nun weit über das *Hayflick limit* hinaus teilen und somit als immortalisiert angesehen werden. Durch den Nachweis einer starken Telomeraseexpression in den Keimbahnzellen ließ sich zudem erklärt werden, warum die Chromosomen über Generationen nicht verschwinden (Wright et al., 1996).

Im Gegensatz zu den oben genannten Versuchen, welche die Bedeutung einer funktionellen Telomerase verdeutlichten, zeigte Blasco et al. 1997, welche Konsequenzen das Fehlen von Telomerase nach sich zieht (Blasco et al., 1997). Bei Mäusen, denen die RNA Komponente homozygot depletiert wurde (mTR -/-), nahm die Telomerlänge kontinuierlich ab, bis man keine TTAGGG-Sequenzen mehr nachweisen konnte. Es wurden weiterhin vermehrt *End-to-End* Fusionen der Chromosomen festgestellt. Die Mäuse blieben bis in die sechste Generation zeugungsfähig, zeigten dann aber vermehrte Defekte der Spermatogenese bis hin zur Infertilität, eine zunehmende Häufung an Tumoren und eine Reduktion der Knochenmarksreserve.

Beim Menschen können ähnliche Symptome einer akzellerierten zellulären Alterung bei der Erbkrankheit Dykeratosis congenita (DKC) gefunden werden. Die klassische Trias aus Hautpigmentierung, dystrophischen Nägeln und einer Leukoplakie im Schleimhautbereich beginnt meist um das zehnte Lebensjahr. Weiterhin sind häufig gastrointestinale, urogenitale, neurologische und pulmonale Störungen assoziiert. Die Symptome sind progredient und der Tod tritt meist in der dritten Lebensdekade auf Grund eines Knochenmarksversagens oder von epithelialen Tumoren des Gastrointestinaltrakts oder der Haut ein (Marrone et al., 2003). Die Analyse des Familienstammbaums ergab zwei verschiedene Vererbungsvarianten: Einen X-chromosomal und einen autosomal dominanten Typ (Mason et al., 2005). Genauere Untersuchungen zeigten, dass die X-chromosomale Variante auf eine Mutation des Proteins Dyskerin zurückzuführen ist, einem wichtigem Interaktionspartner von hTERT (Mitchell et al., 1999). Die autosomale Variante beruht auf einer Mutation von hTR, der RNA Matritze der Telomerase (Vulliamy et al., 2001a). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass kürzere Telomere mit Chromosomentranslokationen und Aneuploidie assoziiert sind (Dokal, 2000;

Vulliamy et al., 2001b) . Die DKC kann somit als Modellkrankheit gesehen werden und erklären, wie klinische Symptome wie beispielsweise Knochenmarksversagen mit einer Störung der Aufrechterhaltung der Telomerlänge zusammenhängen.

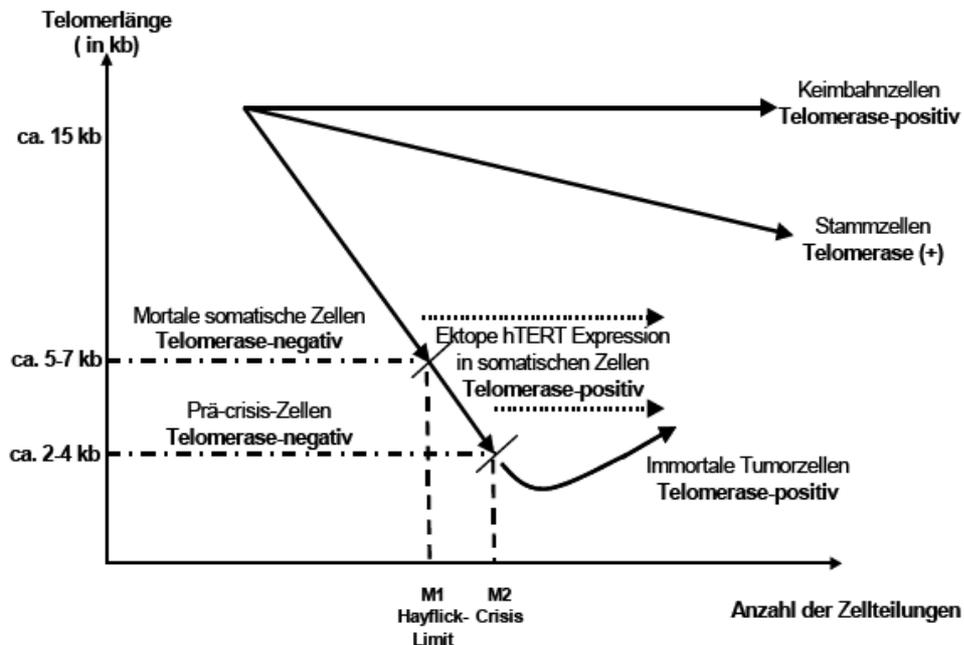


Abbildung 5: *Telomerhypothese der Zellulären Alterung und Immortalisierung (aus (Hartmann U. et al., 2003), modifiziert nach (Harley et al., 1992))*

1.3 Methoden der Telomerlängenbestimmung

1.3.1 Southern Blot

Es gibt heutzutage mehrere Möglichkeiten die Telomerlänge zu bestimmen. Mittels Southern Blots war es zum ersten Mal möglich die Länge der Telomere zu messen (Oexle, 1998). Mit Hilfe eines Restriktionsverdau können die entstandenen Telomer DNA-Fragmente elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt werden. Anschließend werden sie *geblottet* und dann mittels telomerspezifischer Sonden hybridisiert. Die sogenannten TRF

(Telomeric/terminal restriction fragments) zeigen sich wegen der inter- und intrazellulären Abweichung als „Schmier“ auf der Membran. Da gleichzeitig Kontrollen mit bekannter Telomerlänge auf die Membran aufgetragen werden, kann so die Telomerlänge der untersuchten Zellen berechnet werden.

1.3.2 Q-FISH

Die Methode des Q-FISH beruht auf Arbeiten der Forschungsgruppe von Peter Lansdorp (Lansdorp et al., 1996). Q-FISH basiert auf der Hybridisierung der DNA mit Fluorochrom markierten PNA-Oligonukleotid (CCCTAA)₃ (*Peptide nucleic acids*) Molekülen. Ihre chemische Struktur ist analog der DNA, unterscheidet sich jedoch darin, dass die Basen, statt an einer Pentosephosphatkette, an das Peptidoligomer N-(2-aminoethyl)glycine gebunden sind (Nielsen et al., 1994). DNA-PNA Doppelstränge gehorchen genauso wie DNA-DNA Doppelstränge den Watson-Crick-Basenpaarregeln, bilden aber stärkere Bindungen aus als DNA-DNA Doppelstränge (Egholm et al., 1993). Diese Eigenschaft führt im Vergleich zu DNA-DNA Bindungen zu einer deutlich erhöhten Schmelztemperatur und ermöglicht eine Renaturierung unter für DNA zu niedrigen Ionenkonzentrationen. Unspezifische Bindung auf Grund von Autohybridisierungen können so weitestgehend ausgeschlossen werden. Der Austausch der Zuckerkette gegen eine Peptidkette macht die DNA-PNA Bindungen zudem resistent gegen Nukleasen und Proteasen aus Serum oder Zelle. Nach Aufbereitung und Hybridisierung werden etwa 25 Metaphasezellen auf einem Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (siehe Abbildung 6).

Über die Stärke des chromosomenarm-spezifischen Fluoreszenzsignals kann später mit einer dafür entwickelten Software die Telomerlänge individueller Chromosomenarme ausgerechnet werden, da sich das Fluoreszenzsignal proportional zur Telomerlänge verhält (Poon et al., 1999).

1.3.3 Konventioneller flow-FISH

Basierend auf der Idee des Q-FISH, die Telomerlänge mittels Fluorochrom markierten PNA-Nukleotiden zu bestimmen, entwickelte Natalie Rufer die flow-

FISH Methode. Nun war es möglich die Telomerlänge auch von Zellen in der Interphase zu bestimmen (Rufer et al., 1998). Die Zellen werden mittels PNA-Nukleotiden hybridisiert und die Stärke des Fluoreszenzsignals wird durchflusszytometrisch detektiert. Im Gegensatz zum Q-FISH war es beim flow-FISH nun zum ersten Mal möglich, die durchschnittliche Telomerlänge nicht nur von einzelnen Zellkernen in der Metaphase, sondern von vielen Zellen in der Interphase, schnell und gut reproduzierbar zu bestimmen. In einer Studie mit >300 gesunden Individuen konnten Rufer und Brümmendorf anschließend zeigen, dass mittels flow-FISH die Telomerlängendifferenz auch *in vivo* bestimmt werden kann (Rufer et al., 1999).

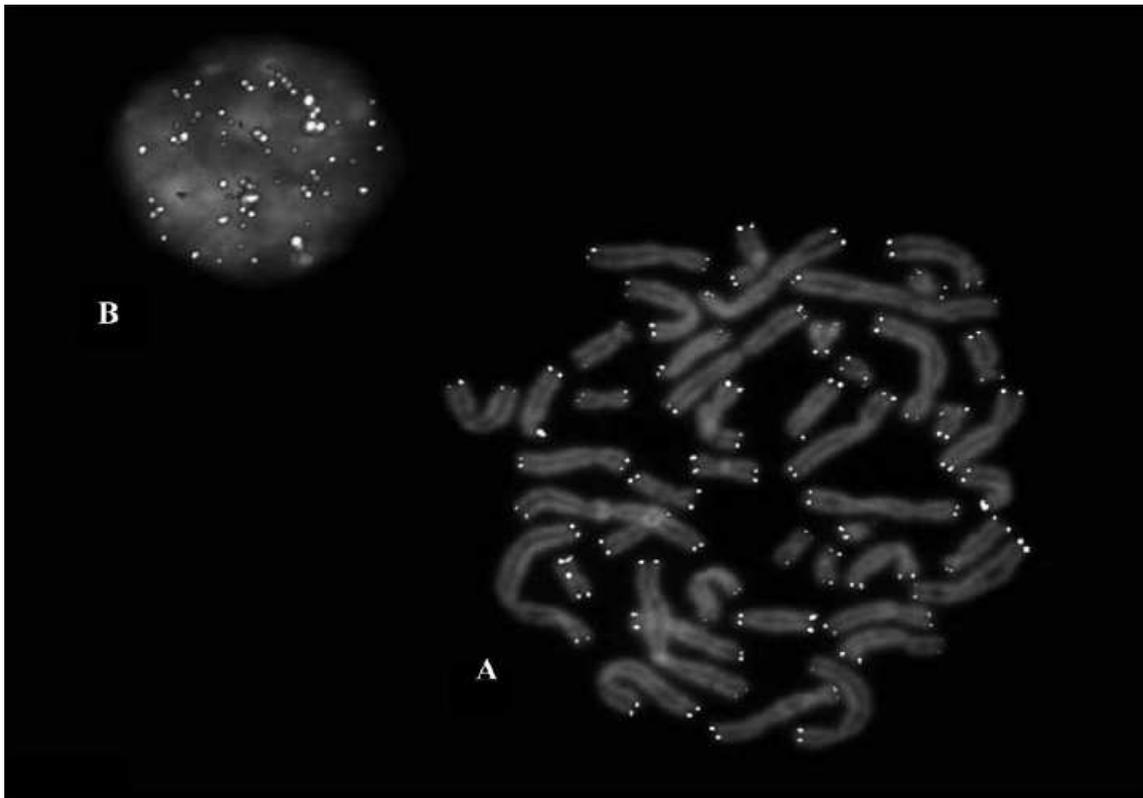


Abbildung 6: Darstellung der Telomere der 46 humanen Chromosomen mittels Q-FISH (aus (Hartmann U. et al., 2004))

1.4 Klinik der PNH

1.4.1 Geschichte der PNH

Eine der ersten Beschreibungen der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) erfolgte im Jahre 1882 durch Dr. Paul Strübing. Am Falle eines 29-jährigen Patienten beschrieb er die folgenden Symptome: Müdigkeit, abdominelle Schmerzen und schwere nächtliche paroxysmale Hämoglobinurie. Diese wurden nach seiner Beschreibung durch Alkoholexzesse, schwere körperliche Anstrengung und Eisensalze ausgelöst. Er schloss damals schon auf eine intravasale Hämolyse, da sich das Blutplasma nach einem „Anfall“ rot färbte (Struebing, 1882). Weitere Beschreibungen erfolgten durch Marchiafava und Micheli, was auch zu dem Namen Marchiafava-Micheli-Syndrom führte. Der Begriff der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie wurde dann endgültig durch J. Enneking im Jahre 1928 eingeführt.

1.4.2 Symptomatik und Klassifikation der PNH

Das Krankheitsbild der PNH zeigt eine Inzidenz von etwa 1:100.000 bis 1:500.000 bei einem Altersgipfel von 25- 45 Jahren. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen (Ostermann et al., 2003). Nach Parker et al. lässt sich die PNH in drei verschiedene Unterarten einteilen (Parker et al., 2005).

Die Klassische PNH:

Klinisch stehen bei der klassischen Form die paroxysmal auftretenden, hämolytischen Krisen und die erhöhte Thromboseneigung im Vordergrund. Während einer hämolytischen Krise kann es ausser zu einer Anämie und einer Hämoglobinurie zusätzlich zu akuten abdominellen Beschwerden, Ösophagusspasmen mit Dysphagie und sogar zu einem akutem Nierenversagen kommen. Ein weiteres und wichtiges klinisches Symptom ist das erhöhte Thromboserisiko. Es ist die Haupttodesursache bei PNH Patienten. Bevorzugter Bildungsort der Thromben sind die hepatischen Venen, was bis zu einem Budd-Chiari-Syndrom mit oft fulminantem tödlichen Verlauf führen kann. Weiterhin können auch die cerebralen Venen und Sinus befallen werden mit

dem Risiko einer fulminanten Sinusvenenthrombose oder auch dem Befall der restlichen abdominalen Venen.

Die Patienten mit klassischer PNH zeigen laborchemisch die Zeichen einer intravasalen Hämolyse. Diese Patienten haben ein erniedrigtes Haptoglobin, erhöhte Serum-LDH Werte, eine Retikulozytose und ein erhöhtes indirektes Bilirubin. Bei der Knochenmarksuntersuchung findet sich meist normo oder hyperzelluläres Knochenmark mit leichter erythrozytärer Hyperplasie. Eisen lässt sich wegen des Eisenverlustes durch die hämolytischen Krisen meist nur gering anfärben (Brodksy RA, 2004).

PNH im Rahmen von anderen Erkrankungen der Blutbildung:

Zusätzlich zu den Symptomen einer klassischen PNH zeigen diese Patienten noch die Symptome einer anderen hämatologischen Erkrankung. Am häufigsten ist PNH mit einer Aplastischen Anämie (AA) assoziiert. In diesem Falle können je nach Schweregrad der AA noch die Symptome einer Panzytopenie hinzukommen. Bei einer PNH im Rahmen eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) kann man ähnliche Symptome finden. Die Patienten in dieser Untergruppe zeigen zusätzlich zu den laborchemischen Zeichen einer intravasalen Hämolyse auch die Zeichen einer Blutbildungsstörung des Knochenmarks.

Bei der Klärung der Frage, ob die PNH mit einer weiteren Erkrankung wie z.B. der AA oder dem MDS assoziiert ist, kann eine Knochenmarksuntersuchung häufig diagnostisch wegweisend sein. Die Diagnosestellung der assoziierten Erkrankungen erfolgt auf der Grundlage der jeweils aktuellen internationalen Diagnosekriterien.

Subklinische PNH:

Hier bestimmen die Symptome der Grundkrankheit wie zum Beispiel der Aplastischen Anämie oder des MDS das klinische Bild. Die Patienten zeigen keine klinischen oder laborchemischen Zeichen einer intravasalen Hämolyse. Mittels Durchflusszytometrie können bei dieser Variante der PNH auch kleinste PNH-Klone nachgewiesen werden. Die subklinische PNH ist sehr häufig bei

anderen hämatologischen Erkrankungen wie beispielsweise dem MDS zu finden. Im Falle der Aplastischen Anämie kann z.B. bei über einem Drittel der Patienten ein PNH Klon nachgewiesen werden (Meletis et al., 2003).

1.4.3 Natürlicher Krankheitsverlauf der PNH

Generell kann die Ausprägung der PNH von leichten Symptomen bis hin zu dramatisch fulminanten Verläufen reichen. Die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt etwa 10 bis 15 Jahre nach Diagnosestellung (Brodsky RA, 2004). Haupttodesursachen sind Thrombosen und Infektionen. Verschiedene Verlaufsformen der PNH sind beschrieben worden. Eine häufige Form ist die Entwicklung einer PNH aus einer Aplastischen Anämie. Bei diesen Patienten wird am Anfang eine AA diagnostiziert und im späteren Verlauf, meist Jahre nach der immunsuppressiven Behandlung, entwickelt sich eine PNH. Etwas seltener kann sich umgekehrt auch aus einer PNH im Verlauf der Erkrankung eine AA entwickeln (Hillmen et al., 1995; Tichelli et al., 1988).

Weiter beobachtet man bei der PNH in etwa 1% der Fälle eine Entwicklung zur Leukämie. Die leukämischen Zellen entstehen hierbei meist aus dem GPI-negativen Stammzellklon (Devine et al., 1987; Nishimura et al., 1996). Etwas häufiger ist die Entwicklung der PNH zu einem MDS.

Schließlich ist in der früheren Literatur auch in 15% der Fälle ein Verschwinden der PNH beschrieben worden. Die früheren Messmethoden verwendeten allerdings das Komplementsystem zum Nachweis einer PNH. Da diese Ergebnisse mit den aktuellen, deutlich sensitiveren Nachweisverfahren nicht reproduzierbar sind, ist das Verschwinden der PNH als ein eher seltener Verlauf zu sehen (Hillmen et al., 1995).

1.4.4 Therapie der PNH

Klassische PNH:

Es bestehen zwei Therapieansätze der PNH. Eine symptomatische Therapie und eine kurative Therapie. Der symptomatische Therapieansatz besteht in der

Kontrolle der klinischen Symptome der PNH. Hier wird durch Gabe von Cumarinen (z.B. Marcumar) versucht, das Thromboserisiko zu reduzieren. Ferner muss eine Kontrolle der hämolytischen Anämie erfolgen. Hierzu besteht die Möglichkeit von wiederholten Bluttransfusionen oder als neuere Therapieoption der monoklonale Antikörper Eculizumab. Dieser gegen den Komplementfaktor C5 gerichtete Antikörper verhindert die Komplementaktivierung und dadurch die Hämolyse der Erythrozyten. Die aktuell durchgeführten Studien zeigen einen verminderten Transfusionsbedarf der PNH Patienten und eine Reduzierung der Anzahl der hämolytischen Krisen. Eine immunsuppressive Therapie zeigt bei der klassischen PNH keine Wirkung. Der kurative Ansatz besteht in einer allogenen Knochenmarkstransplantation. Die Entscheidung zur Knochenmarkstransplantation muss individuell gefällt werden und hängt von verschiedenen Faktoren wie z.B. dem Alter des Patienten, den Komplikationen und dem Verlauf der Erkrankung ab (Parker et al., 2005).

PNH im Rahmen anderer hämatologischer Erkrankungen:

Die symptomatische Therapie besteht in einer wie zuvor beschriebenen Kontrolle der Symptome der klassischen PNH (siehe oben). Zusätzlich profitieren diese Patienten von der Therapie ihrer mit der PNH assoziierten Erkrankung; im Falle der AA beispielsweise von einer immunsuppressiven Therapie. Eine weitere Option stellt die schon oben beschriebene kurative Therapie mittels Knochenmarkstransplantation dar. Dieser Therapieansatz ermöglicht zusätzlich die Therapie der assoziierten Erkrankungen (Parker et al., 2005).

Subklinische PNH:

Bei dieser Variante steht die Therapie der Grunderkrankung wie zum Beispiel der AA oder des MDS im Vordergrund. Da der PNH- Klon keine PNH typischen Symptome verursacht, wird keine PNH spezifische Therapie eingeleitet (Parker et al., 2005).

1.5 Pathogenese der PNH

1.5.1 Normale Hämatopoese des Menschen

Täglich werden in einem gesunden Knochenmark etwa 10^{11} Zellen gebildet (Lansdorp, 1997). Grundlage der Blutbildung sind sogenannte pluripotente hämatopoetische Stammzellen. Pluripotent bedeutet, dass diese Zellen noch die Fähigkeit haben, sich in verschiedene Zellarten zu teilen, im Gegensatz zu omnipotenten Stammzellen jedoch nicht in jede Zellart.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, differenzieren die Zellen nach mehreren Teilungsschritten immer mehr in die jeweiligen spezifischen Zellsubtypen aus. Hierbei ist auffällig, dass abhängig von der Differenzierungsstufe unterschiedliche Teilungsmuster existieren. Stammzellen teilen sich asymmetrisch, d. h. immer eine Stammzelle bleibt erhalten und nur die andere Zelle differenziert weiter aus. Mathematische Modelle haben auf der Grundlage von Telomerdaten ergeben, dass sich die hämatopoetischen Stammzellen, welche in der Ausdifferenzierungshierarchie ganz oben stehen, nur etwa alle 1-2 Jahre teilen (Rufer et al., 1999; Vickers et al., 2000). Im Gegensatz hierzu teilen sich die in der Hierarchie weiter unten liegenden Zellen häufiger und bleiben nicht auf ihrer Entwicklungsstufe stehen.

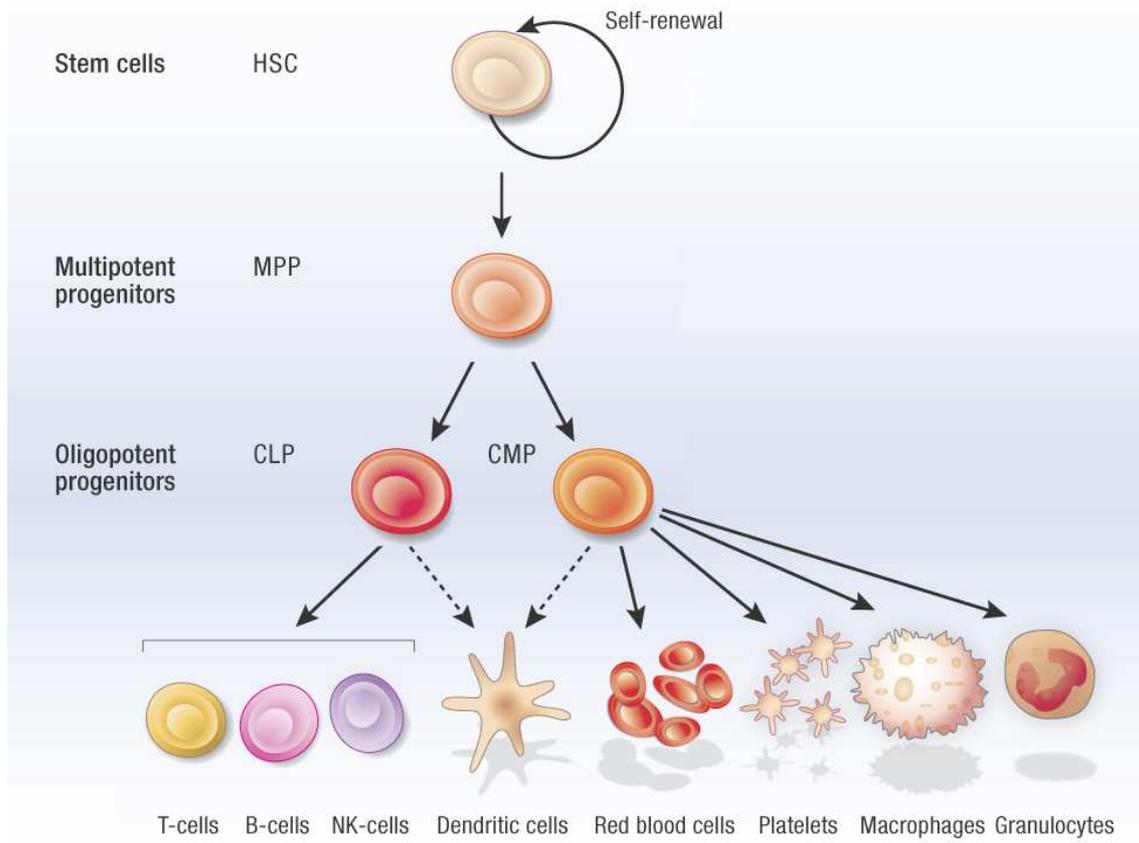


Abbildung 7: Überblick über die menschliche Hämatopoese (modifiziert nach (Tan et al., 2006))

1.5.2 Ursprung des PNH Klons

Voraussetzung für das Entstehen der Erkrankung ist eine Mutation des *pig-A* Gens. Eine solche Mutation in den ausdifferenzierten Zelllinien ist unwahrscheinlich, da bei Patienten mit PNH alle Zellarten betroffen sind. Das *pig-A* Gen muss also in multipotenten Stammzellen mutieren, um das Vorkommen der Mutation in allen Zellarten zu erklären. John Dacie postulierte 1963, dass ein mutierter Klon einer hämatopoetischen Stammzelle Teile der Hämatopoese übernimmt und sich in alle Zellarten ausdifferenziert (Dacie, 1963). Sieben Jahre später konnten Oni et al. diese Vermutung mit Hilfe einer elektrophoretischen Analyse der auf dem X-Chromosom gelegenen Glucose-6-

Phosphat Dehydrogenase bestätigen (Oni et al., 1970). 1991 haben Josten et al. diese Annahme auf DNA Ebene mittels X-chromosomaler Polymorphismusanalyse weiter erhärtet (Josten et al., 1991).

1.5.3 Aufbau des pig-A Gens und seine Mutationen

Wie oben schon erwähnt ist die Mutation des pig-A Gens Voraussetzung für die Entstehung der PNH. Das pig-A Gen codiert das Enzym, welches das N-Acetylglucosamin (GluNAc) an das Phosphatidylinositol (PI) kovalent verbindet (siehe Abschnitt 1.5.4). Der Name pig-A kommt von Mäuselymphozytenzelllinien, welche bei früheren Experimenten Großbuchstaben bekommen haben. Mit Hilfe der Zelllinie A konnte das Gen identifiziert werden. Es liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22.1) und kodiert ein Enzym, welches aus 484 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 54 kD hat (Armstrong et al., 1992; Miyata et al., 1993; Takahashi et al., 1993; Takeda et al., 1993).

Es sind eine Vielzahl von Mutationen beschrieben worden, wobei der größte Anteil aus Deletionen und Insertionen von DNA-Basenpaaren besteht (Rosse et al., 1995).

1.5.4 Struktur und Synthese des GPI-Ankers

Die Mutation des pig-A Gens führt zu einer Störung der Synthese des Glycosylphosphatidylinositolankers (GPI-Anker). Der GPI-Anker besteht aus drei Bestandteilen: Einem Phosphatidylinositolmolekül, einem Glycankern und einem Phosphoethanolaminmolekül, an welches die jeweiligen Proteine kovalent gebunden sind. Die Biosynthese des GPI-Ankers erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Der erste Syntheseschritt (A), der vom pig-A Gen kodiert wird, erfolgt über eine kovalente Verbindung des N-Acetylglucosamins (GluNAc) an das Phosphatidylinositol (PI). In einem weiteren Syntheseschritt (B) wird Mannose an Dolichylphosphat gebunden, so dass daraus das Molekül Dolicholphosphatmannose (DPM) entsteht. Das DPM stellt die drei Mannosemoleküle für die Mannosylierung bereit. An jedes Mannosemolekül wird anschließend noch ein Ethanolamin gebunden. Im letzten Schritt (D) wird nun das synthetisierte Protein über das Ethanolamin kovalent gebunden und weiter über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert (Rosse et al., 1995).

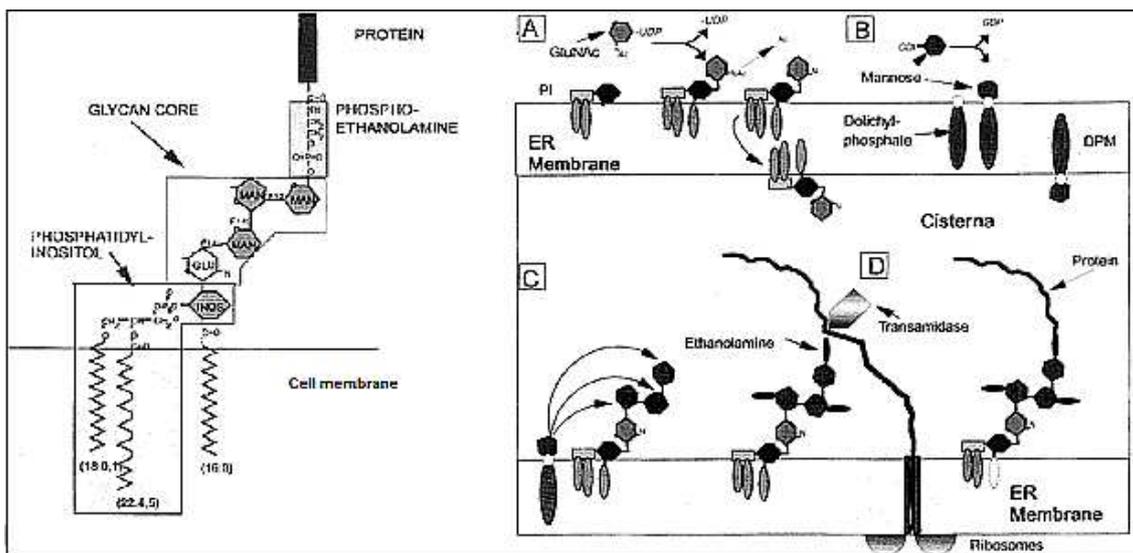


Abbildung 8: Aufbau und Biosynthese des GPI-Ankers (aus (Rosse et al., 1995))

1.5.5 Funktion des GPI-Ankers und der daran verankerten Proteine

Die Funktion des GPI-Moleküls besteht in der Verankerung einer Vielzahl von Proteinen in der Zellmembran. Aus diesem Grund hat das GPI-Molekül eine lipophile Seite mit langkettigen Fettsäuren, die sich in der Zellmembran einlagern und eine hydrophile Seite, an der die jeweiligen Proteine gebunden werden. Wegen seiner „Ankerfunktion“ spricht man auch häufig von einem GPI-Anker. In der Tabelle 1 sind die wichtigsten GPI verankerten Proteine in hämatopoetischen Zellen angegeben.

Tabelle 1: GPI-verankerte Oberflächenproteine in Blutzellen (aus (Brodsky RA, 2004))

<i>Funktion</i>	<i>Vorkommen</i>	<i>Antigenname (Internationale Bezeichnung)</i>
Komplementregulator	Alle Blutzellen	CD55 (decay accelerating factor) CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis)
Adhäsionsmoleküle	Alle Blutzellen	CD58 (lymphocyte function-associated antigen)
	Granulozyten	CD48
	Alle Leukozyten	CD66b CD48
Enzyme	Erythrozyten	Acetylcholinesterase
	In einigen T und B-Lymphozyten	CD73
Rezeptoren	Granulozyten, NK-Zellen	CD16 (Fc-γ receptor III)
	Monozyten, Granulozyten	
	Zellen der myeloischen und erythropoetischen Reihe	Folatrezeptor
	Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	CD14 (monocyte differentiation antigen)
	B-Lymphozyten,	CD24
B-Zell Differenzierung	Granulozyten	
Blutgruppenantigen	Erythrozyten	Dombrock-Holley/Gregory-bearing protein
Unbekannt	Lymphozyten, Monozyten	CDw62 CAMPATH-1 antigen

1.5.6 Intravasale Hämolyse und das Komplementsystem

Auf Grund der Mutation des pig-A Gens werden verschiedene GPI verankerte Proteine nicht mehr auf der Oberfläche der Blutzellen exprimiert (siehe Tabelle 1). Das Fehlen der Proteine wirkt sich besonders drastisch auf die Erythrozyten aus. Dort fehlen auf Grund der pig-A Mutation die beiden Oberflächenproteine CD55 und CD59 bzw. werden nur zu gering exprimiert. CD59 ist ein Protein, welches durch Bindung von Komplementfaktor C9 die Anlagerung des MAC (*membrane attack complex*) durch die Komplementfaktoren C5b-8 verhindert. Im Gegensatz dazu wirkt CD55 inhibierend auf die Aktivierung der Komplementkaskade (siehe Abbildung 9). Diese beiden Oberflächenproteine sind Komplementinhibitoren, welche verhindern, dass die Erythrozyten durch das eigene Komplementsystem lysiert werden. Im Gegensatz zu anderen Zellen haben Erythrozyten aber nur CD55 und CD59 als Komplementinhibitor. Dieses Fehlen von weiteren Komplementinhibitoren erklärt nun die Hämolyse in PNH Patienten. Durch eine noch unbekannte Ursache werden somit die Erythrozyten während einer hämolytischen Krise durch das aktivierte Komplementsystem zerstört und dadurch die klassischen Symptome der PNH, nämlich intravasale Hämolyse und Hämoglobinurie, ausgelöst (Löffler et al., 2006; Rosse et al., 1995).

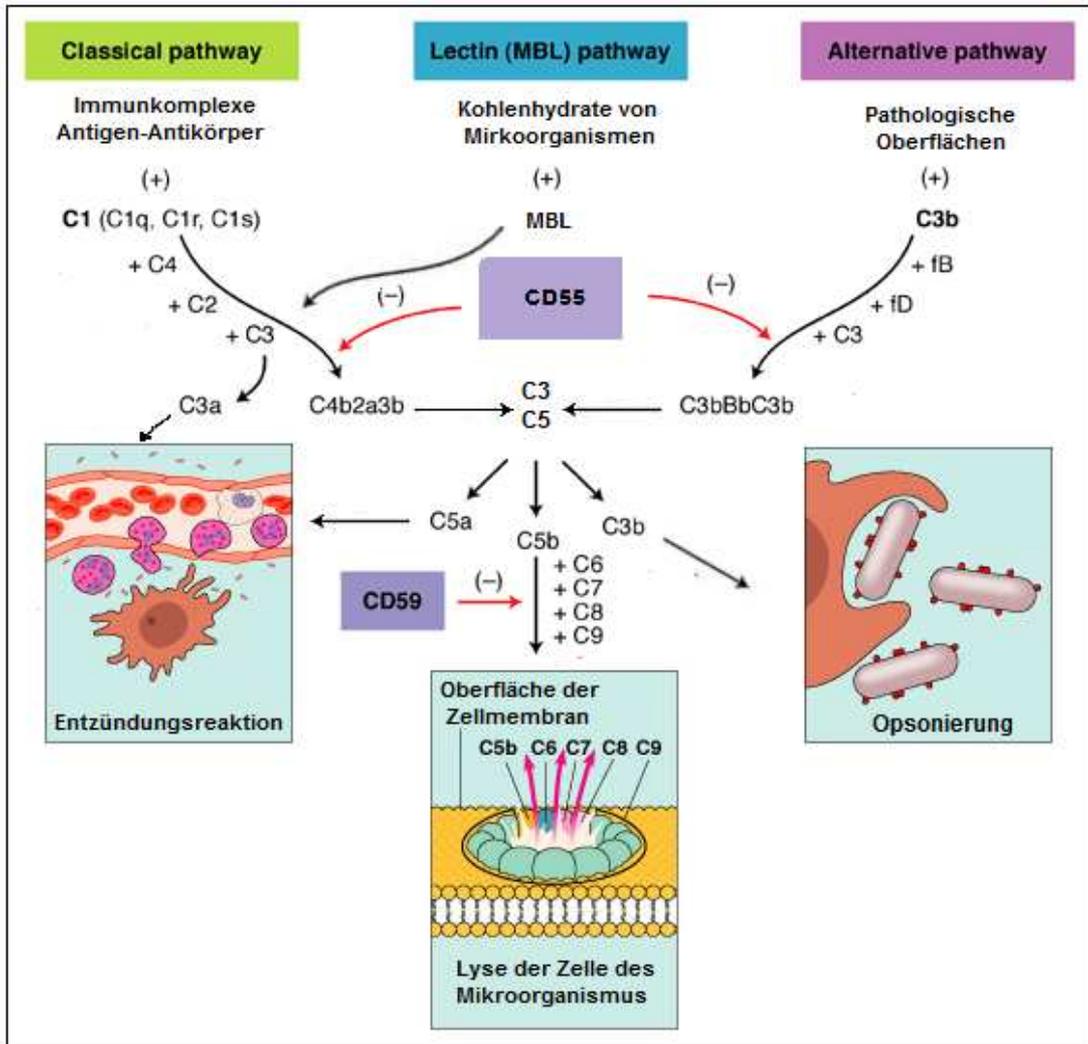


Abbildung 9: Aufbau und Funktion des Komplementsystems (modifiziert nach (Cummings, 2004; Francis et al., 2003))

1.5.7 Entstehung des Klons

Luzzatto und Young veröffentlichten 1989 und 1992 das sogenannte Modell der dualen Pathogenese. In diesem Modell kommt es nach der pig-A Genmutation in einem zweiten Schritt zu einem Wachstumsvorteil des PNH-Klons. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten der Pathogenese. Eine Variante ist die positive Selektion, die andere die negative Selektion. Positive Selektion bedeutet, dass der PNH-Klon einen intrinsischen Wachstumsvorteil besitzt und deshalb gegenüber der normalen Hämatopoese selektiv expandiert. Die Hypothese der negativen Selektion postuliert, dass das normale, nicht mutierte Knochenmark nicht regelrecht an der Hämatopoese teilnimmt bzw. supprimiert wird und der PNH-Klon zur Kompensation expandiert.

Basierend auf den Arbeiten von Luzzatto und Young (Rotoli et al., 1989; Young, 1992), veröffentlichte Ware et al. 2003 (Ware et al., 2003) ein 3-Stufen-Modell für die Entstehung der PNH, welches auch die enge Assoziation zwischen PNH und AA erklärt.

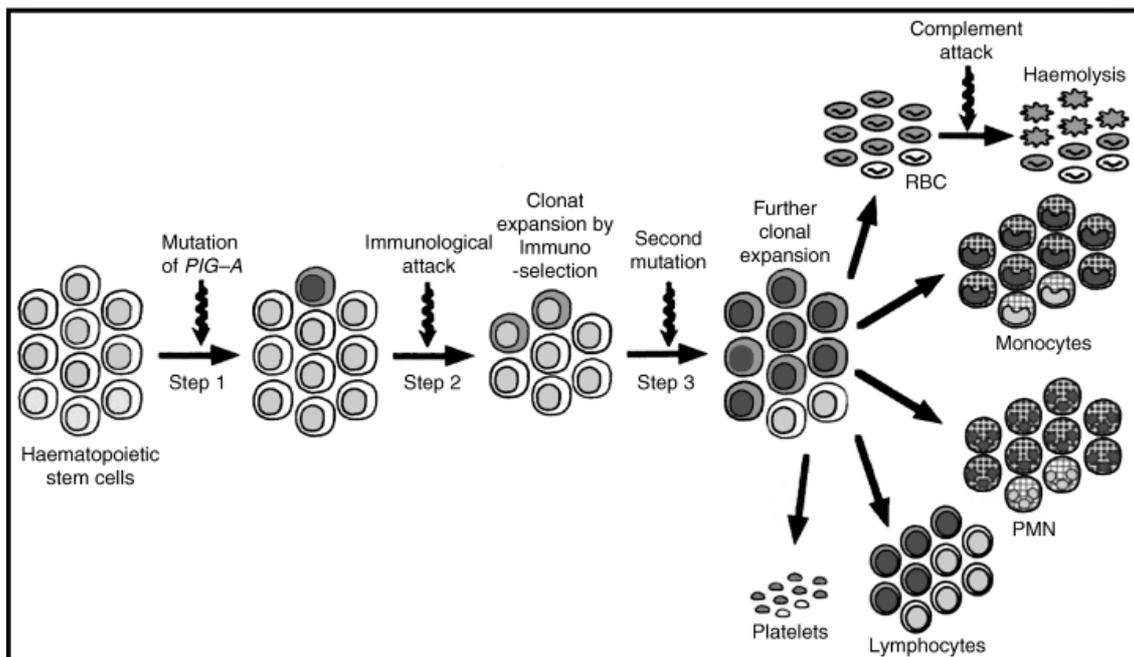


Abbildung 10: 3-Stufen-Modell zur Entstehung der PNH (nach (Inoue et al., 2003))

1999 konnten Araten et al. (Araten et al., 1999) bei gesunden Personen eine sehr kleine Anzahl von Granulozyten nachweisen, denen der GPI-Anker fehlte und welche eine pig-A Genmutation tragen. Der erste Schritt dieses Modells, eine Mutation des pig-A Gens in einer hämatopoetischen Stammzelle, ist also ein relativ häufiges Ereignis, welches auch in gesunden Personen vorkommt. Hu et al. (Hu et al., 2005) konnten zeigen, dass sich die Mutation im pig-A Gen bei etwa $14.7 \pm 4.0 \times 10^{-6}$ CD34+ Zellen im Knochenmark findet. Die Mutationsrate ist um zwei bis drei Zehnerpotenzen höher als die normale Mutationsrate des Menschen (1×10^{-8}) (Jackson et al., 1998). Die hohe Mutationsrate, die Tatsache, dass das pig-A Gen auf dem X-Chromosom liegt und die Vermutung, dass replikativer Stress zur weiteren Erhöhung der Mutationsrate führt (Hu et al., 2005), erklären auch das gelegentliche Vorkommen von mehr als einem PNH-Klon in einem PNH Patienten (Nishimura et al., 1997). Der oben erwähnte replikative Stress wird gut erklärt durch den im zweiten Schritt des Modells angenommenen Angriff zytotoxischer T-Zellen auf die GPI-positiven Stammzellen. Ob der vermutete Angriffspunkt der T-Zellen ein GPI verankertes Protein oder der GPI-Anker selber ist, bleibt bis heute unklar (Karadimitris et al., 2001), ist aber Gegenstand intensiver Forschung. Als Folge des T-Zellangriffs kommt es zu einer Reduzierung der Zahl der normalen Stammzellen. Der mutierte, GPI-negative Klon expandiert (negative Selektion) und gewinnt nun einen größeren Anteil an der Hämatopoese. Verschiedene Experimente lassen darauf schließen, dass der GPI negative Klon weniger einen intrinsischen Wachstumsvorteil besitzt, sondern eher zur Kompensation im Rahmen der selektiven Zerstörung der GPI-positiven Stammzellen expandiert (Araten et al., 2002; Chen et al., 2002; Chen et al., 2000; Kulkarni et al., 2002; Murakami et al., 1999; Rosti et al., 1997; Tremml et al., 1999).

In einem dritten Schritt nimmt man an, dass es zusätzlich zu der pig-A Mutation noch zu einer zweiten Mutation kommt. Diese führt nun zu einem Wachstumsvorteil des Klons (positive Selektion), so dass er große Teile der Hämatopoese (bis fast 100%) langfristig übernehmen kann, wie man es häufig bei der klassischen PNH finden kann. Allerdings muss man zu diesem letzten Schritt hinzufügen (nach (Parker, 2007)), dass

- die mutierten Klone nur begrenzt expandieren und die Klonegröße relativ stabil bleibt,
- die mutierten Klone normal auf die das Knochenmark regulierenden Signale reagieren, sie also nicht autonom agieren,
- der Übergang in eine Leukämie eher selten und nicht die Regel ist.

Die zweite Mutation führt also nicht zu einer onkogenen Transformation, wie man sie von Tumoren oder Leukämien her kennt. Die klassische PNH kann somit als eine gutartige, klonale Knochenmarkserkrankung angesehen werden. Mit Hilfe dieses Modells lassen sich nun einige Punkte der engen Beziehung zwischen AA und PNH erklären. Während bei der AA nur die beiden ersten Schritte eingetreten sind, braucht man für die klassische PNH alle drei Schritte. Kommt es bei einem Patienten mit AA zu einer Mutation im PNH Klon, kann man nun auch erklären, warum sich nach Jahren aus einer AA eine PNH entwickelt. Analog kann sich umgekehrt der PNH-Klon erschöpfen, so dass sich sekundär eine PNH zu einer AA entwickelt. Weiterhin erklärt dieses Modell das Vorkommen von kleineren PNH-Klonen bei Patienten mit AA, da der dritte Schritt zur Entwicklung einer klassischen PNH noch fehlt (Marsh et al., 2003).

Schließlich liefert dieses Modell eine Erklärung für die Wirkungslosigkeit einer immunsuppressiven Therapie bei Patienten mit klassischer PNH. Der autoimmune Prozess wird durch die Therapie gestoppt, allerdings übernimmt der Klon auf Grund seiner zweiten Mutation immer noch den überwiegenden Teil der Hämatopoese.

1.5.8 Telomerdynamik bei AA und PNH

Zwillingsstudien haben gezeigt, dass die Telomerlänge eines Menschen primär genetisch festgelegt ist (Rufer et al., 1999; Slagboom et al., 1994). Da die Telomeraseaktivität in menschlichen hämatopoetischen Stammzellen nur etwa 10% der Aktivität von menschlichen Keimbahnzellen aufweist, reicht diese Aktivität nicht aus um die Telomerverkürzung aufzuhalten (zusammengefasst in (Drummond et al., 2007)). Unter der Annahme, dass die Zahl der Zellteilungen von hämatopoetischen Stammzellen hin zu reiferen Vorgängerzellen bis hin zu terminal differenzierten Blutzellen über das Leben hinweg konstant bleibt, lässt sich bei einem gleichbleibenden Telomerverlust pro Zellteilung auf die replikative Geschichte der Stammzellen, die aktiv zur Hämatopoese beitragen, zurückschließen. Diese Hypothese macht man sich zunutze, um bei Erkrankungen mit Beteiligung des hämatopoetischen Stammzellkompartiments (HSZ) Rückschlüsse auf die Pathophysiologie ziehen zu können. Ein sehr gutes Beispiel für eine solche Untersuchung ist die AA und, auf Grund der engen Assoziation, die PNH (Brummendorf et al., 2001b; Drummond et al., 2007).

Ball et al. untersuchten 1998 die Telomerlänge aller Leukozyten mittels Southern Blot und fanden, dass Patienten mit aktiver AA und Patienten in Remission kürzere Telomere aufweisen als gesunde Spender (Ball et al., 1998). Weiterhin korrelierte der Telomerlängenverlust bei Patienten mit aktiver AA deutlich mit dem Krankheitsverlauf. Im Gegensatz dazu zeigten die Patienten in Remission keinen weiteren Telomerlängenverlust im Verlauf der Krankheit. Die Untersuchung von 13 Patienten mit PNH als Spätkomplikation der AA ergab ein ähnliches Verhalten wie bei den Patienten mit AA. Bei den drei untersuchten Patienten mit klassischer PNH fanden sich hingegen keine verkürzten Telomere.

Im Jahr 2001 konnte Brummendorf et al. mit konventionellem flow-FISH zeigen, dass die Granulozyten von Patienten mit AA kürzere Telomere besitzen als gesunde Spender (Brummendorf et al., 2001a). Eine genauere Analyse einzelner Subgruppen ergab, dass unbehandelte Patienten und Patienten, die auf die immunsuppressive Therapie nicht ansprachen, signifikant kürzere

Telomere hatten als Patienten in Remission. Weiterhin ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der (Pan)Zytopenie und der Größe des Telomerverlustes nachweisen. Die 6 untersuchten PNH Patienten zeigten bei allerdings hoher interindividueller Variabilität keine signifikante Telomerverkürzung im Vergleich zu gesunden Spendern.

Karadimitris et al. untersuchten 2003 die Telomerlänge von 10 PNH Patienten (Karadimitris et al., 2003). Mit Hilfe eines CD59 Antikörpers trennten sie die GPI positiven und negativen Granulozyten auf und untersuchten mittels Southern Blot die Telomerlänge. Anschließend verglichen sie die Ergebnisse mit den Telomerlängen von gesunden Probanden. Sie fanden, dass die GPI positiven Granulozyten kürzere Telomere aufweisen als die GPI negativen, aber beide sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Beide, GPI positive und negative Kompartimente, waren jedoch signifikant kürzer als die von gesunden Individuen.

1.6 Diagnostik der PNH

1.6.1 Tests der Komplementaktivierung

Die Komplementaktivierungstests sind zur Diagnose der PNH heute obsolet und werden nur wegen ihrer historischen Bedeutung erwähnt. Dies ist zum einen der Ham-Test und der Zuckerwassertest. Der Ham-Test funktioniert über eine leichte Ansäuerung des Blutes, was zu einer vermehrten Aktivierung des Komplementsystems führt. Da nur die PNH Zellen lysiert werden, ist dieser relativ spezifisch für die PNH, allerdings muss der Klon ausreichend groß sein, um eine positive Reaktion auszulösen. Der Sucrose- Hämolysetest (Zucker-Wasser-Test) funktioniert über den gleichen Mechanismus. Auch hier wird das Komplementsystem über an PNH-Erythrozyten gebundene Sucrose aktiviert. Obwohl dieser Test etwas sensibler als der Ham-Test ist, werden beide Tests heute nicht mehr routinemäßig angewendet (Brodksy RA, 2004).

1.6.2 Nachweis über GPI-verankerte Proteine

Die Grundlage dieser Tests besteht darin, dass man die Proteine, welche am GPI-Anker gebunden sind mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachweist. Hierzu wird mittels Durchflusszytometrie der jeweilige Anteil der Proteine bestimmt. Durch die Kombination von mehreren Antikörpern (siehe Tabelle 1) und der Analyse von mehreren Zellarten wie zum Beispiel Erythrozyten, Granulozyten und Lymphozyten kann die Sensibilität erhöht und die Beteiligung der einzelnen hämatopoetischen Differenzierungslinien beurteilt werden. Transfusionen oder ein möglicher seltener angeborener Proteinmangel zum Beispiel von CD55 könnten bei Verwendung eines einzelnen Antikörpers zu einer Fehldiagnose führen (Sutherland et al., 2007).

1.6.3 Nachweis mittels Aerolysin

Während der Antikörpertest indirekt über die gebundenen Proteine das Fehlen des GPI-Ankers misst, lässt sich mit Hilfe des Aerolysintests der GPI-Anker direkt bestimmen. Proaerolysin ist eine 52 kDa schwere Vorstufe des Toxins Aerolysin, welches als sekretorisches Toxin im Bakterium *Aeromonas hydrophilia* vorkommt (Fivaz et al., 2001). Beide, Proaerolysin und Aerolysin, binden spezifisch am Glycosylphosphatidylinositolanker (GPI-Anker). Aerolysin besitzt die Eigenschaft sich an den GPI-Anker anzulagern und dort Kanäle zu bilden, welche dann über einen Verlust der Stabilität der Zellmembran zur Lyse führt. Hierzu bilden sieben Aerolysinmoleküle einen Heptamerkomplex, der einen Kanal in die Zellmembran formt und damit die Zelle lysiert (Buckley, 1992). Proaerolysin muss erst enzymatisch zu Aerolysin gespalten werden. Verschiedene Varianten des Proaerolysins verhindern entweder die enzymatische Abspaltung oder die Fähigkeit lytische Kanäle zu bilden (Tsitrin et al., 2002). Dadurch, dass sich diese Varianten in die Zellmembran einlagern, die Zelle aber nicht zerstören, sind sie sehr gut zum Nachweis der PNH Zellen geeignet. Zur Routinebestimmung wird in den hämatologischen Speziallabors aktuell meist FLAER (*fluorescently labeled proaerolysin variant*) verwendet (Sutherland et al., 2007).

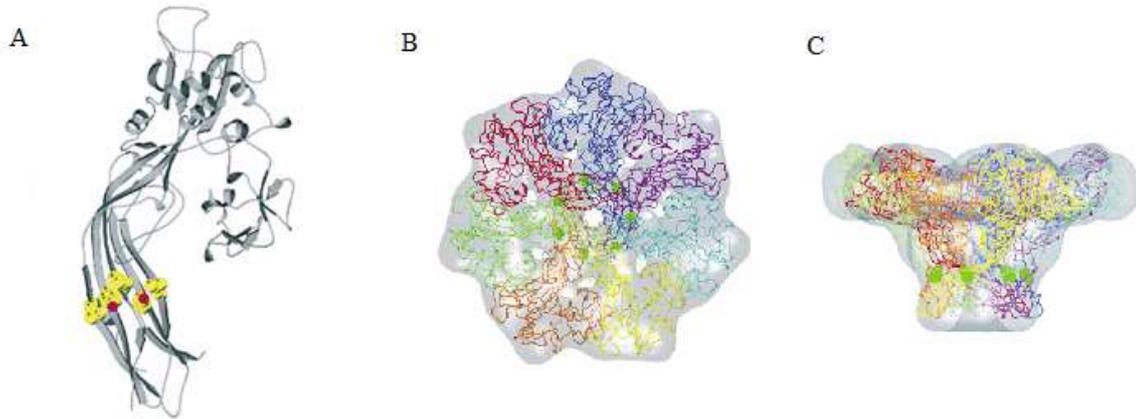


Abbildung 11: Darstellung von Proaerolysinmonomeren und einem Aerolysin-heptamer (Abbildungen aus (Tsitrin et al., 2002))

2 Fragestellung der Doktorarbeit

In dem von Ware postulierten Modell werden zum einen die GPI positiven Stammzellen von PNH Patienten durch eine Autoimmunreaktion angegriffen (negative Selektion), zum anderen expandiert der PNH Klon (positive Selektion).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass auf Grundlage des von Harley postulierten Modells der mitotischen Uhr mit Hilfe der Telomere die replikative Geschichte der HSZ dargestellt werden kann. Die Analyse der Telomerlänge in GPI positiven und GPI negativen Zellen ermöglicht es, Rückschlüsse über das bisherige Teilungsverhalten (die „replikative Geschichte“) der GPI positiven Stammzellen im Vergleich zu den dem PNH Klon zu Grunde liegenden Stammzellen zu ziehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe einer eigens dafür entwickelten Methode, dem Proaerolysin *multi-color flow-FISH*, die vorbestehenden Ergebnisse von Karadimitris et al. mit optimierter Methodik zu überprüfen und weitere Anhaltspunkte zur Klärung der noch offenstehenden Fragen bezüglich der Pathogenese der PNH zu finden (Karadimitris et al., 2003).

Für die hier vorliegende Arbeit ergibt sich daraus folgende Fragestellung:

- 1.) In welchem Ausmaß wirkt sich die bei PNH Patienten angenommene autoimmune Zerstörung der normalen hämatopoetischen Stammzellen und die beobachtete Expansion des PNH Klons auf die Telomerlänge aus ?
- 2.) In wie weit stimmen die ermittelten Ergebnisse mit dem angenommenen Pathogenesemodell überein ?
- 3.) Ergeben sich Hinweise darauf, dass fortschreitende Telomerverkürzung mit der Transformation einer PNH zu einer AA, MDS oder AML korreliert sein könnte ?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herstellerfirmen

Tabelle 2: *Übersicht der Herstellerfirmen*

Allegiance Healthcare Corporation	Mc Gaw Park/USA
B. Braun Biotech International	Melsungen
Bangs Laboratories Inc	Fishers/USA
BD Pharmingen	San Diego/USA
Becton Dickson	Heidelberg
Bio Whittaker	Walkersville/USA
Biochrom AG	Berlin
Calbiochem®- Novabiochem Corporation	La Jolla/USA
Caltag Laboratories	Burlingame/USA
CC Pro GmbH	Neustadt/Weinstrasse
Cell Systems Biotechnologie Vertrieb GmbH	St. Katharinen
CLF Analytische Laborgeräte GmbH	Emersacker
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Hamburg
Gibco BRL life technologies	Karlsruhe
Gilson	Villiers-le-Bel/France
Greiner	Frickenhausen
H. Hund GmbH	Wetzlar
Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Hirschmann Laborgeräte	Rottenburg
John Poulten LTD	Essex/GB
Karl Hecht KG	Sondheim
Liebherr Holding GmbH	Biberach an der Riß
Merck KG	Darmstadt
Mettler GmbH	Giessen
Nunc GmbH & CO KG	Wiesbaden
PE Applied Biosystems GmbH	Weiterstadt
Pierce Biotechnology	Rockford/USA
Protox Biotech	Victoria/Canada
Roth GmbH & CO KG	Karlsruhe
Schott Duran	Mainz
Scotsman® TEPA Service & Vertriebs GmbH	Hamburg
Sigma-Aldrich Chemicals	Deisenhofen
Universitätszentrallager	Tübingen

3.1.2 Geräte und Materialien

Tabelle 3: *Übersicht der verwendeten Geräte und Materialien*

Aluminiumfolie	Universitätszentrallager
Becherglas 100, 250 ml	Schott Duran
Biofuge 15	Heraeus
CryoTube 1,8 ml	Nunc
Eismaschine AT 20	Scotsman®
Eppendorf Hütchen 1,5 ml	Eppendorf
FACS Calibur™	Becton Dickson
Falcon® Conical Centrifuge Tubes 15, 50 ml	Becton Dickson
Falcon® Polysterene Round-Bottom-Tube	Becton Dickson
Gefrierschrank –20°C	Liebherr
Gefrierschrank –80°C	Heraeus
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Megafuge 3.0 R	Heraeus
Mikroskop Wilovert S	H. Hund
Multipette Plus	Eppendorf
Neubauer Zählkammer 0,025 mm ²	Hecht
96-Mikrowellplatten	Greiner
Pasteurpipetten	John Poulten
Pipetman 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Roth
Pipettus akku	Hirschmann
Präzisionswaage AT 261	Mettler
Sterilbank Herasafe	Heraeus
Thermoshaker Schutron	CLF
Vakuumbehälter Medi Vac Flex Advantage	Allegiance Healthcare
Varifuge 3.ORS	Heraeus
Vortexer Certomat® MV	B. Braun Biotech
Wasserbad Thermomix®	B. Braun Biotech

3.1.3 Puffer, Medien, Chemikalien

Tabelle 4: *Übersicht der verwendeten Puffer, Medien und Chemikalien*

Bis(sulfosuccinimidyl)suberate	Pierce
Bovines Serum Albumin	Calbiochem®
FACSflow	Becton Dickson
Fetales Kälberserum FCS	CC Pro
Formamid	Sigma
Glucose	Merck
H2O dest.	Hausanlage
NaCl	Merck
NaCl 0,9%	B. Braun
Ammoniumchloridlösung	Cell Systems
PBS	BioWhittaker™
PNA Oligonucleotide (FITC)	PE Applied Biosystems
Propidium Iodide	Sigma
Quantum™ 24 FITC Premix Microbeads	Bangs Laboratories
SSC 20% Buffer	Sigma
Streptavidin-Cy5 labeled	Caltag
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma
Trypan Blue Stain	Biochrom AG
Tween 20	Sigma
Ultrapure Formamide redistilled	Gibco

3.1.4 Antikörper und Toxine

Tabelle 5: *Übersicht der verwendeten Antikörper und Toxine*

Biotin Mouse IgG1 κ	BD Pharmingen
Biotin Anti-Human CD45	BD Pharmingen
Biotin Anti-human CD59	BD Pharmingen
Proaerolysin Alexa 647	Protox Biotech

3.1.5 Patientenproben

Von der Studiengruppe AA/PNH unter der Leitung von Prof. Schretzenmeier aus Ulm wurden uns anonymisierte Proben von Patienten mit PNH zugeschickt, wobei die Diagnose PNH zuvor durch das Routinelabor der Blutspendezentrale des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) gesichert wurde. Das Projekt erhielt die Zustimmung der Ethikkommissionen der Universität Tübingen sowie der Universität Ulm.

3.2 Methode

3.2.1 Gewinnung der mononukleären Zellen

Die untersuchten PNH Proben waren maximal zwei Tage alt und bestanden aus 3-7 ml mit EDTA versetztem Vollblut. Ammoniumchlorid wurde zur osmotischen Lyse der Erythrozyten benutzt, um die mononukleären Zellen zu gewinnen. Im Einzelnen ging man wie folgt vor: Blut und Ammoniumchloridlösung werden in einem Verhältnis von 1:4 zusammengegeben. Unter vorsichtigem Bewegen vermischt man die Lösungen und inkubiert anschließend 5 min bei Raumtemperatur (RT). Danach wird die Probe bei 1200 U 10 min bei RT zentrifugiert und anschließend dekantiert. Nach Hinzufügen von 1 ml Ammoniumchlorid wird resuspendiert, erneut 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 20 s an der Tischzentrifuge (Biofuge 15) bei 15000 U abzentrifugiert. Nach nochmaliger Lyse wird das Zellpallet in 1 ml PBS mit 5% FCS aufgenommen.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen wurde die Trypanblaumethode angewendet. Trypanblau kann tote Zellen anfärben, da deren Membran für den Farbstoff permeabel wird. Unter dem Mikroskop werden die toten Zellen dann als tiefblaue Zellen sichtbar. Im Vergleich dazu erscheinen die vitalen Zellen weiß und durchsichtig. Für den Versuch sollte das Verhältnis der lebenden zu

den toten Zellen nicht unter 70 % liegen. Ansonsten wurde die Probe verworfen. Zur Zellzahlbestimmung wurden 40 µl Trypanblau in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte. Im Anschluss gab man 10 µl der Probe hinzu und resuspendierte. Daraufhin wurden 10 µl in eine Neubauerzählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop die Zellen ausgezählt. Die Zellkonzentration ergibt sich aus Verdünnungsfaktor, Kammergröße und ausgezählten Zellen.

3.2.3 Auftauen und Auszählung der internen Kontrolle

Im nächsten Schritt taute man mit Formaldehyd 3,7% fixierte Rinderthymuszellen auf. Diese waren bei -80 °C gelagert und dienten als interne Kontrolle für die spätere Messung. Die Probe mit dem Rinderthymus wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, anschließend gab man 500 µl FCS hinzu, resuspendierte und überführte die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nach dem Zentrifugieren bei 15000 U für 30 sec an der Tischzentrifuge (*Varifuge*), saugte man den Überstand vollständig ab und resuspendierte die Zellen in 1 ml PBS mit 5% FCS. Die darauf folgende Zellkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der oben beschriebenen Trypanblaumethode. Auf Grund der Fixierung mit Formaldehyd erfolgte keine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen.

3.2.4 Nachweis des GPI-Ankers und Proaerolysinfärbung

Prinzip:

In diesem Versuch wurde eine Antikörperkombination aus Anti-IgG1, Anti-CD45 und Anti-CD59 verwendet. Anti-IgG1 ist ein aus Mäusen gewonnener Antikörper, welcher unspezifisch an humane Zellen bindet. Diese Isotypenkontrolle besteht wie die anderen Antikörper aus IgG und wird verwendet, um das beim Messen immer vorhandene Hintergrundrauschen darzustellen. Sie dient somit als Negativkontrolle. Im Gegensatz dazu wurde Anti-CD45 als Positivkontrolle benutzt. CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, welche auf der Oberfläche der meisten Leukozyten, aber nicht

auf Erythrozyten, Thrombozyten oder anderen nicht hämatopoetischen Zellen vorkommt (Altin et al., 1997). CD59 ist ein GPI verankertes Protein, das die Bildung des MAC Komplexes verhindert (Sugita et al., 1995).

Alle verwendeten Antikörper waren chemisch mit Biotin markiert. Es interagiert mit Streptavidin und bildet eine starke nichtkovalente, über weite Temperatur- und pH-Bereiche stabile Bindung (10^{-15} M) aus (Löffler et al., 2006). Diese Eigenschaften machte man sich zunutze, um die biotinylierten Antikörper nachzuweisen. Über die Markierung des Streptavidin mit einem Fluorochrom, in diesem Fall mit hitzestabilem Cy5, konnte man den gebundenen Antikörper nachweisen.

Der Nachweis der extrazellulär liegenden Proteine, die über GPI-Anker in der Zellmembran eingelagert sind, erfolgt mittels Antikörper. Fehlt der GPI-Anker, so können die Antikörper wegen der nun wiederum auch fehlenden Proteine nicht binden. Der Anker wird deshalb indirekt über die daran gebundenen Proteine nachgewiesen. Aerolysin bzw. seine Vorstufe Proaerolysin binden dagegen direkt den GPI-Anker in der Zellmembran (Fivaz et al., 2001). Für die Experimente wurde ein chemisch mit dem Fluorochrom Alexa 647 (siehe Abschnitt 3.3) markiertes Proaerolysin verwendet (T. Buckley, Victoria, B.C., Canada).

Durchführung:

Für diesen Versuch verwendete man Mouse-IgG1, Anti-CD45, Anti-CD59 und Proaerolysin. Es wurden nun 1×10^5 Rinderthymuszellen und 2×10^5 Zellen der Blutprobe in die Reaktionsgefäße überführt und mit PBS mit 5% FCS auf 100 μ l aufgefüllt. In die acht Reaktionsgefäße (1-8) gab man den jeweiligen Antikörper hinzu (siehe Tabelle 6) und inkubierte 15 min bei RT im Dunkeln. Die Proaerolysinproben (9-12) wurden als direktes Markierungsverfahren erst bei Zugabe von Streptavidin zu den Antikörperproben mit Proaerolysin inkubiert. Zum Entfernen der ungebundenen Antikörper wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 ml PBS hinzu gegeben, die Probe 10 min bei 1800 U zentrifugiert und der Überstand dann auf 100 μ l abgenommen. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurden

die Zellen durch starkes Mischen erneut gelöst. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und der Überstand am Schluss auf etwa 50 µl dekantiert. Im nächsten Schritt gab man 5 µl Streptavidin Cy5 zu den Antikörperproben und 5 µl Proaerolysin zu den verbleibenden vier Proben hinzu. Die Zellen wurden resuspendiert und dann erneut für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Um das überschüssige Streptavidin zu entfernen, wurden die Proben dreimal nach den oben beschriebenen Schritten gewaschen und der Überstand beim letzten Durchgang auf 80 µl abgenommen.

Tabelle 6: *Pipettierschema für in diesem Versuch verwendete Antikörper und Toxine*

Antikörperübersicht				
	Mouse-IgG1	Anti-CD45	Anti-CD59	Proaerolysin
Gefäßnummer	1+2	3+4	5-8	9-12

3.2.5 BS3 und kovalente Quervernetzung

Prinzip:

Durch die Behandlung der Proben mit 75% Formamid bei 87°C entstehen zwei Probleme. Das erste Problem besteht darin, dass Antikörper und Antigen miteinander nur über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren. Durch die hohen Temperaturen, die für die spätere Hybridisierung der Telomer DNA nötig sind, würde sich der Antikörper vom Antigen lösen. Das zweite, schwerwiegendere Problem ist, dass Formamid Proteine denaturiert und die Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen das gewünschte Epitop nach dem Hybridisierungsschritt meistens unmöglich macht.

Zur Umgehung dieser Probleme verwendete man einen sogenannten *Cross-Linker*, in diesem Versuch BIS-(Sulfo-succinimidyl)-Subberate (BS3). Es handelt

sich um ein symmetrisches Molekül mit einem mittleren Molekulargewicht von 572 u. Es enthält zwei Succinimidylgruppen, die durch eine Kette, bestehend aus acht Kohlenstoffatomen, voneinander getrennt sind. Die beiden Succinimidylgruppen können im sauren pH-Bereich mit primären und sekundären Aminogruppen, in diesem Fall von Antigen und Antikörper, reagieren. Diese sind dann kovalent miteinander verbunden und ermöglichen so eine spätere Behandlung der Probe mit Formamid und Hitze (Batliwalla et al., 2001).

Durchführung:

Für den weiteren Versuch benötigte man 2 mM BS3. Hierzu stellte man zuerst einen 5 mM Citratpuffer aus SSC 20% und NaCl 0,9% in einem Verhältnis von 1:60 her. Mittels einer Präzisionswaage wurden dann 1,14 mg BS3 pro 1 ml Citratpuffer abgewogen. Der Bedarf an BS3-Lösung hing von der Zahl der benötigten Proben ab. Anschließend wurden 80 µl der BS3-Lösung in jede Probe gegeben, maschinell geschüttelt und diese dann für 30 min im Dunklen auf Eis inkubiert. Nach 30 min gab man 1 ml des TRIS Puffers und NaCl 0,9% im Verhältnis 1:10 hinzu. Man inkubierte für weitere 20 min im Dunkeln auf Eis. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben bei 1800 U 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand auf 50 µl abgenommen.

3.2.6 Hybridisierung mit PNA

Prinzip:

Die Telomerlänge von Zellen wurde mittels *flow-FISH* bestimmt. Hierzu verwendete man mit dem Fluorochrom FITC markiertes PNA (*Peptide nucleic acids*). Sie unterscheiden sich chemisch von der DNA, dass die vier Basen statt an einer Pentosephosphatkette an das Peptidoligomer N-(2-aminoethyl)glycine gebunden sind (Nielsen et al., 1994).

DNA-PNA Doppelstränge gehorchen genauso wie DNA-DNA Doppelstränge den Watson-Crick-Basenpaarregeln, bilden aber stärkere Bindungen als DNA-DNA Doppelstränge aus. Dies führt im Vergleich zur DNA zu einer deutlich erhöhten Schmelztemperatur und ermöglicht eine Renaturierung unter für DNA

zu niedrigen Ionenkonzentrationen. Zudem macht der Austausch des Zuckergerüsts gegen ein Peptidgerüst die PNA resistent gegen Nukleasen und Proteasen aus Serum oder Zelle (Egholm et al., 1993). Die Telomerdoppelstränge am Ende der Chromosomen sollen aufgetrennt (geschmolzen) und mit FITC markierte PNA-Oligonucleotide (CCCTAA)₃ hybridisiert werden. Da die Stärke des FITC-Signals proportional zur Anzahl der Basenpaare ist, kann man später mittels FACS über die Stärke des FITC-Signals Rückschlüsse auf die Länge der Telomere ziehen. Da die Zellen bei der FACS-Auswertung immer eine gewisse Eigenfluoreszenz besitzen, muss man eine Hybridisierungslösung ohne PNA als Leerwert hinzugeben (Baerlocher et al., 2002; Baerlocher et al., 2004; Rufer et al., 1998).

Durchführung:

Nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Pipettierschema gab man 100 µl / 1x10⁵ Zellen der in Tabelle 8 aufgeführten Hybridisierungslösung zu den Proben.

Tabelle 7: *Pipettierschema für Hybridisierungs-Mix*

Reaktionsgefäßnummer				
UNST (<i>Unstained</i>)	1	3	5+7	9+11
TEL (PNA-FITC)	2	4	6+8	10+12

Tabelle 8: *Hybridisierungs-Mix für Multi-Color-Flow-FISH, UNST = ungefärbte Probe (ohne PNA-FITC); TEL = Telomer-Probe (mit PNA-FITC)*

UNST	TEL
20mM Tris pH 7.1	20mM Tris pH 7.1
20mM NaCl	20mM NaCl
1% BSA	1% BSA
75% Formamide	75% Formamide
-----	0.3 µg/ml PNA-FITC
11% ddH ₂ O	10% ddH ₂ O

Die Proben wurden anschließend resuspendiert und 15 min bei 87 °C in das Wasserbad gestellt. Im Anschluss daran ließ man die Proben eine Stunde bei RT im Dunkeln hybridisieren. Nach Ende der einstündigen Hybridisierungsphase wurden die Proben zum Entfernen des überschüssigen PNA gewaschen. Der hierzu verwendete Puffer bestand aus 75% Formamide, 10 mM Tris Puffer pH 7.1, 1% BSA, 1% Tween20 und 4% ddH₂O. In jede Probe wurden je 1 ml Waschpuffer gegeben, diese maschinell geschüttelt und die Probe bei 2000 g 5 min lang bei RT zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde auf ca. 100 µl dekantiert und die Waschschriffe dreimal wiederholt. Im letzten Schritt wurde der Überstand auf ca. 80 µl abgenommen.

Zur Entfernung des Formamids wurde ein weiterer Waschpuffer verwendet. Dieser bestand aus 1% BSA, 1% Tween20, 10 mM HEPES Puffer und 3.95% Glucose. Erneut gab man 1 ml in jede Probe, resuspendierte das Pellet und zentrifugierte die Proben bei 900 g 10 min bei RT. Der Überstand wurde auf 50 µl dekantiert. Als letzter Schritt wurde zum Färben der DNA 100 µl / 100000 Zellen einer PI-Lösung hinzugegeben. Dazu gab man 0.06 µg/ml PI und 0.1% BSA in die entsprechende Menge PBS-Puffer. Die Proben wurden anschließend resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Innerhalb der darauffolgenden 24 h erfolgte die Messung der Proben.

3.3 Grundlagen der Messung

In diesem Versuch werden vier verschiedene Fluorochrome verwendet. Dies sind Cy5, Alexa 647, PI und FITC. Das in diesem Versuch verwendete Gerät FACScalibur enthält zwei Laser und vier Kanäle (FL1-4), welche emittiertes Licht in verschiedenen Wellenlängen detektieren. FITC wird zur Färbung der Telomer DNA verwendet, Cy5 für die Färbung der Antikörper, Proaerolysin für die GPI- Ankerfärbung und PI zur DNA Färbung. Wegen der hohen Hybridisierungstemperatur ist es wichtig, dass FITC, Cy5 und Alexa 647 hitzestabil sind. Zudem müssen die einzelnen Fluorochrome so gewählt sein, dass die Emissionsspektren des einen möglichst wenig in den Messkanal des anderen hineinreichen. Wie man in Abbildung 12 sieht, sind diese Vorgaben für FITC erreicht, aber nur zum Teil für Cy5 und PI. In Tabelle 6 sind die einzelnen Fluorochrome und ihre jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren mit ihrem jeweiligen Messkanal aufgelistet. Die Messkanäle sind für FITC 530/30, für Cy5 661/16 und für PI 670/LP.

Tabelle 9: *Verwendete Fluorochrome bei Multi-Color-Flow-FISH*

Fluorochrom	Absorption	Emission	Detektion
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	488 nm	519 nm	FL1
Propidium Iodid (PI)	488 nm	617 nm	FL3
Alexa 647	633 nm	668 nm	FL4
Cy5	633 nm	670 nm	FL4

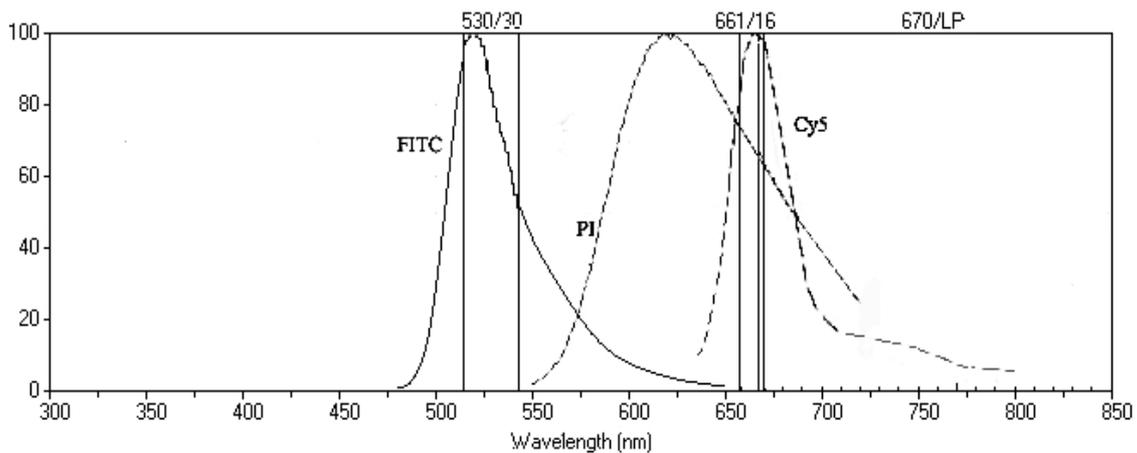


Abbildung 12: Emissionsspektren und Detektionsbereiche der in Tabelle 9 aufgelisteten Fluorochrome (Aus www.bdbioscience.com/spectra, 20.10.2004).

Um diese Überlagerung auszugleichen, gleicht man zum einen die beiden Fluorochrome am FACS Gerät miteinander ab. Zum anderen verwendet man geringere PI Konzentrationen, so dass die Interferenz nicht so ausgeprägt ist. Die genauen Einstellungen der Abgleichung sind in Tabelle 10 gezeigt. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, besitzen Alexa 647 und Cy5 ein fast identisches Emissionsspektrum und werden im gleichen Messkanal FL-4 gemessen. Dies ist wichtig, da man aus diesem Grund für die einzelnen Messungen von Proaerolysin oder Cy5 markierten Antikörpern die Messparameter nicht ändern muss und sie dadurch miteinander vergleichbar werden. In Tabelle 11 sind die Einstellungen der einzelnen Kanäle gezeigt. Sie geben an, mit welcher Spannungsstärke, Amplitude und in welchem Modus die Zellen detektiert werden sollen. Diese Einstellungen können je nach Bedarf während der Messung verändert werden, jedoch nicht der FL1 Kanal, da hier die Telomerfluoreszenz quantifiziert wird und die Ergebnisse vergleichbar sein sollen. Eine Erhöhung der Voltage im FL3- Kanal hat zum Beispiel die Folge, dass die Zellen im PI/FSC Plot (Siehe Auswertung Abbildung 14) weiter im oberen Teil des Messfensters angezeigt werden. Durch leichte Veränderung der jeweiligen Parameter können die einzelnen Messungen so aufeinander abgestimmt werden, dass sie später gut auswertbar und vergleichbar sind.

Tabelle 10: *Kompensation der einzelnen Fluorochrome*

FL1	-	1.0 % FL2
FL2	-	17.5 % FL1
FL2	-	0.0 % FL3
FL3	-	11.6 % FL2
FL3	-	0.4 % FL4
FL4	-	7.0 % FL3

Tabelle 11: *Einstellungen der einzelnen Messkanäle am FACScalibur*

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.50	Lin
P2	SSC	375	6.85	Lin
P3	FL1	775	2.00	Lin
P4	FL2	650	1.00	Lin
P5	FL3	571	6.39	Lin
P6	FL1-A		1.00	Lin
P7	FL4	805		Log

Threshold:

Primary Parameter

FL3

Value:

0

Secondary Parameter:

None

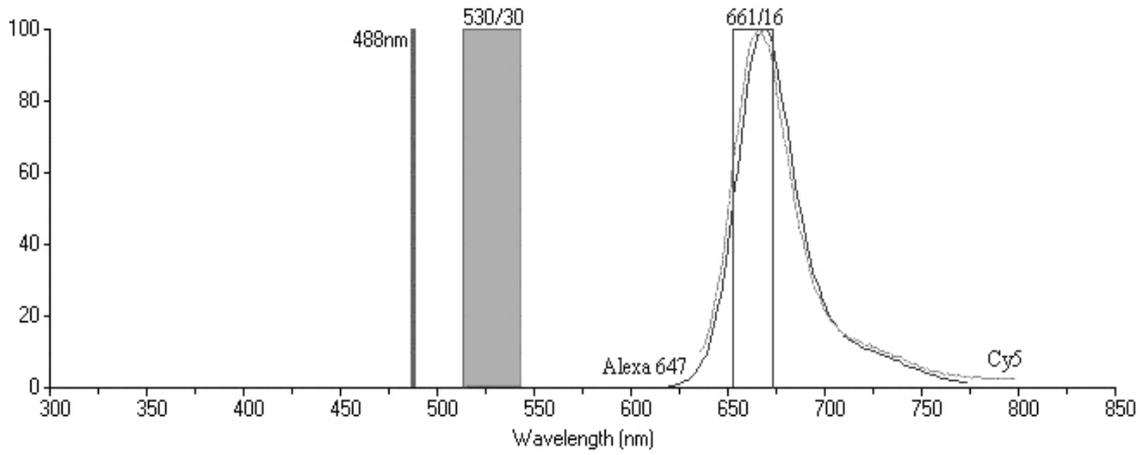


Abbildung 13: Emissionsspektren und Detektionsbereiche der in Tabelle 9 aufgelisteten Fluorochrome Alexa 647 und Cy5. (Aus www.bdbioscience.com/spectra, 20.10.2004)

3.4 Verwendete Statistik

Die Ergebnisse der *flow-FISH* Messungen wurden in *telomere fluorescence units* (TFU) angegeben und die Standardabweichungen hinzugefügt. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. Klaus Dietz mittels *des 2-sample t -test, paired t test* und *Pearson correlation coefficient*. Das Signifikanzniveau wurde für p-Werte kleiner als 0.05 festgelegt. Alle Telomerlängen wurden als Doppelwerte gemessen; die Klongröße mittels CD59 und Proaerolysin als Vierfachwerte und die Werte des Referenzzentrums als Einfachwerte. Zur statistischen Analyse wurde *JMP Software version 5.1* (SAS Institute, Cary, NJ) verwendet.

3.5 Auswertung der Daten

Im folgenden Abschnitt soll die Auswertung der FACS Analyse beispielhaft erklärt werden.

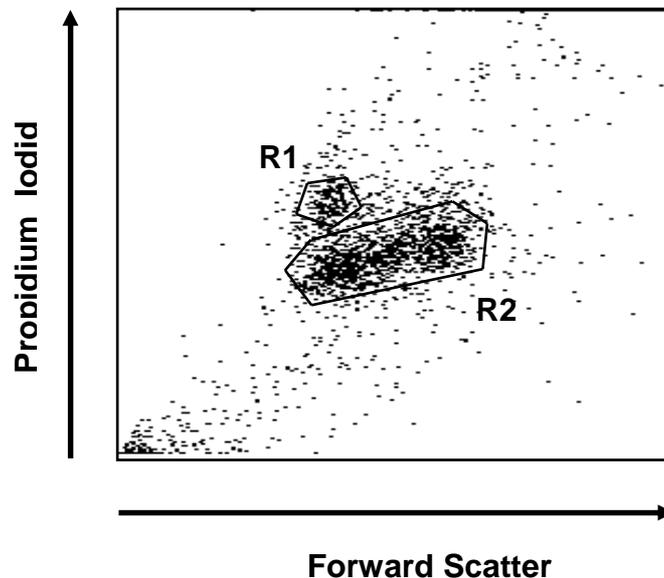


Abbildung 14: 1. Schritt der Analyse der gemessenen Zellen

Zum Auswerten der gemessenen Daten werden die Zellen im ersten Schritt nach Größe (*Forward Scatter*) und nach DNA Anfärbung mittels PI gegeneinander aufgetragen. Wie oben in Abbildung 14 zu sehen ist, kann man sehr gut die Rinderthymuszellen (R1) von den humanen Blutzellen (R2) abtrennen. Um die humanen Blutzellen in Granulozyten und Lymphozyten aufzutrennen, werden die Zellen, die in R2 eingrenzt wurden, nun nach Größe (*Forward Scatter*) und nach Granularität (*Sideward Scatter*) aufgetrennt.

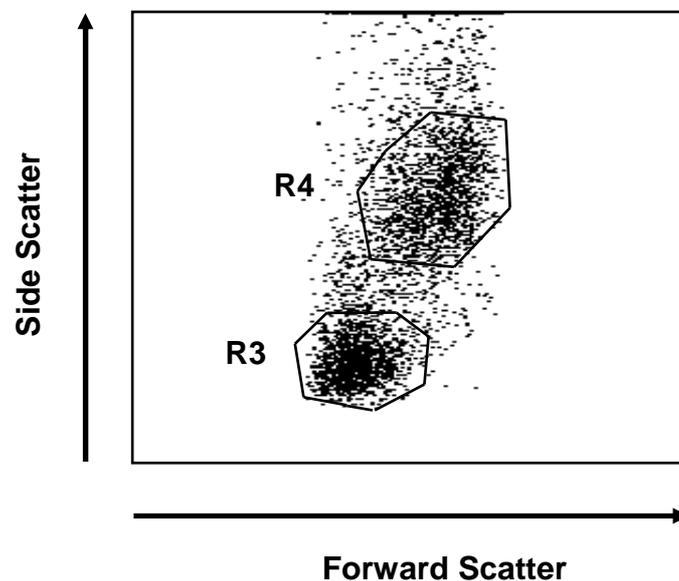


Abbildung 15: 2. Schritt der Analyse der gemessenen Zellen

In Abbildung 15 ist der Unterschied zwischen den kleineren und weniger granularen Lymphozyten (R3) und den größeren Granulozyten zu erkennen. Da im Rahmen dieser Studie die Telomerlänge der Granulozyten von Interesse war, werden nun die Granulozyten (R4) weiter aufgetrennt. Die Auftrennung der Granulozyten erfolgte nun nach Größe (*Forward Scatter*) und nach Intensität der Cy5/Alexa 647 Färbung, wie man in Abbildung 16 sehen kann.

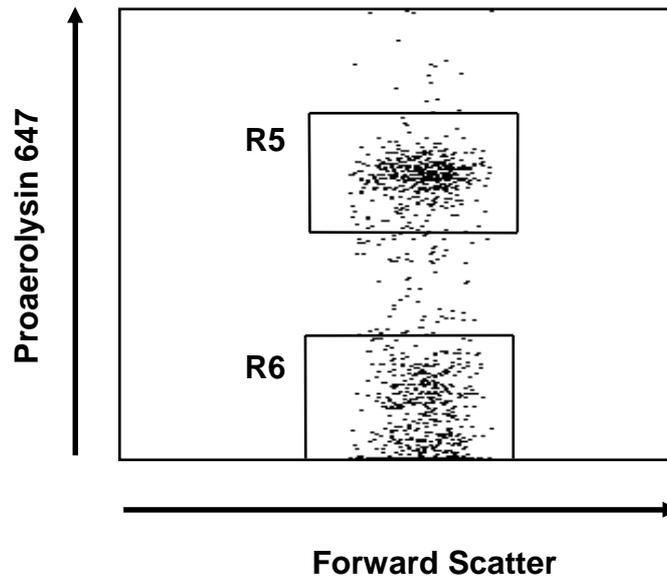


Abbildung 16: 3. Schritt der Analyse der gemessenen Zellen

In R5 kann man jetzt sehr gut die GPI positiven Granulozyten und in R6 die GPI negativen Granulozyten erkennen. In der FACS Darstellung kann man zudem auch noch das Verhältnis der GPI positiven zu den GPI negativen Granulozyten in Prozent ablesen. Diese werden später zur Bestimmung der Spezifität der Methode mit den Antikörperkombinationen der Routinediagnostik aus Ulm verglichen.

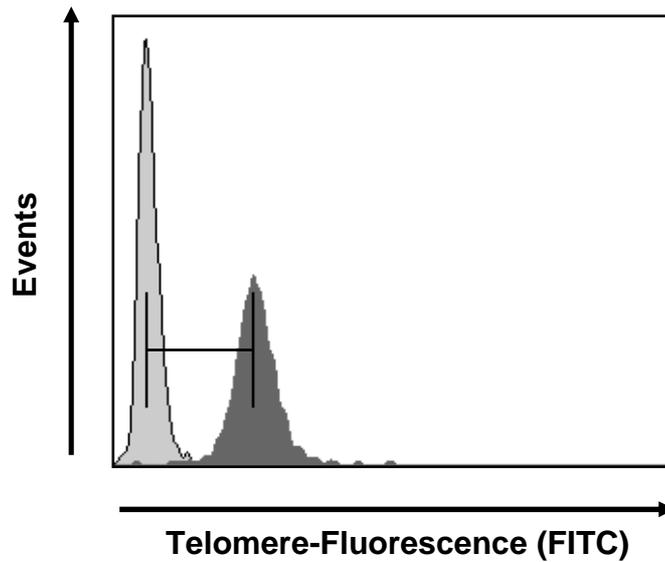


Abbildung 17: 4. Schritt der Analyse der gemessenen Zellen

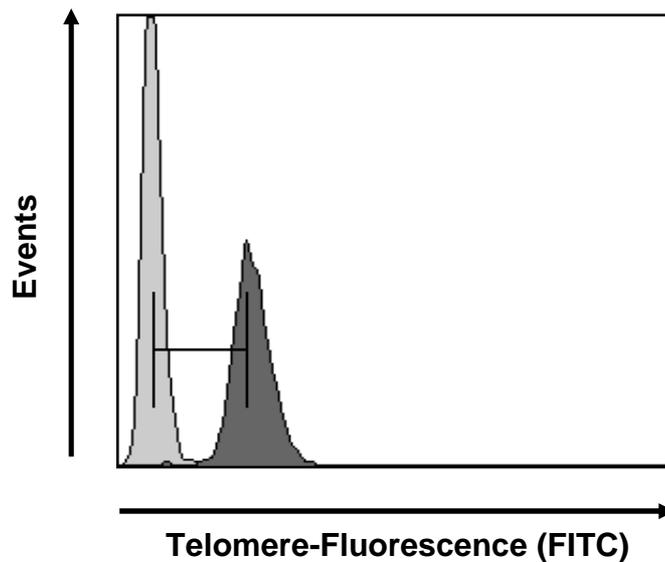


Abbildung 18: 5. Schritt der Analyse der gemessenen Zelle

Als nächster Schritt wird nun die Intensität der FITC Färbung der DNA/PNA-Hybride gemessen. In Abbildung 17 wird die Intensität der GPI positiven Granulozyten (R5) und in Abbildung 18 die Intensität der GPI negativen Granulozyten (R6) gegenüber der gemessenen Zellzahl gezeigt. In der Horizontalen ist die Intensität der FITC Färbung zu sehen, in der Vertikalen die gemessene Ereigniszahl.

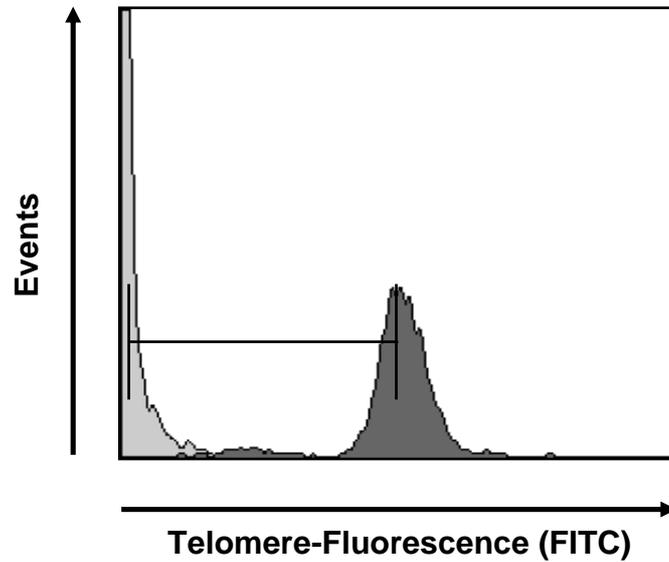


Abbildung 19: 6. Schritt der Analyse der gemessenen Zellen

Schließlich bestimmt man noch die Intensität des Telomersignals der Rinderthymuszellen. Die Zellen, welche in Abbildung 14 in R1 abgegrenzt wurden, werden nun wie oben bei Schritt 4 beziehungsweise 5 dargestellt und das Telomersignal gegen die Eigenfluoreszenz aufgetragen.

3.6 Berechnung der Telomerlänge mit Hilfe der internen Kontrolle

Zur Bestimmung der Telomerlänge misst man die Emissionsintensität des Fluorochroms FITC. Je länger die Telomere, desto mehr PNA kann mit der Telomer DNA hybridisieren und desto stärker wird das Signal. Die Intensität kann aber auch von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß und von Versuch zu Versuch unterschiedlich stark um den wirklichen Wert streuen. Um die relativen Werte der einzelnen Messungen miteinander vergleichen zu können, verwendet man eine interne Kontrolle. Rinderthymozyten erfüllen hierfür mehrere Bedingungen: Zum einen unterliegt die Telomerlänge nur sehr geringen Schwankungen und zum anderen sind die Telomere im Vergleich zu humanen Zellen mehr als doppelt so lang. Schließlich lassen sich die in jede Probe hinzu gegebenen Rinderthymuszellen, wie in Abbildung 14 zu sehen ist, sehr gut von den humanen Zellen unterscheiden und sind somit als interne Kontrolle ideal geeignet. Da die Telomerlänge der Rinderthymuszellen schon früher mit Hilfe eines Southern Blots bestimmt wurde (die Telomerlänge ist 19,515 kb), ergibt sich jetzt die Möglichkeit, aus den relativen Telomerlängenwerten der FACS-Auswertung auf absolute Telomerlängen (in TFU, 1 TFU entspricht 1 kb) zu schließen. Hierfür geht man am Beispiel von Granulozyten wie folgt vor:

$$\frac{(\text{Intensität des Signals der mit FITC angefärbten Granulozyten}) - (\text{Intensität des Signals ohne FITC [Leerwert]})}{$$

$$(\text{Intensität des Signals des mit FITC angefärbten Thymus}) - (\text{Intensität des Signals ohne FITC (Leerwert)})$$

Der Quotient dieses Bruchs multipliziert mit 19,515 kb ergibt die absolute Telomerlänge in kb.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der Methode

Um die Messgenauigkeit des neu entwickelten Protokolls zu validieren, wurden zwei verschiedene Parameter untersucht: Die Abweichungen der Doppelwerte zueinander (intraexperimentelle Variation) und die Abweichung der einzelnen Mittelwerte der internen Kontrolle (Thymusproben) von Experiment zu Experiment (interexperimentelle Variation). In der folgenden Abbildung sind die Einzelwerte der Thymusproben gegen die Zeit aufgetragen.

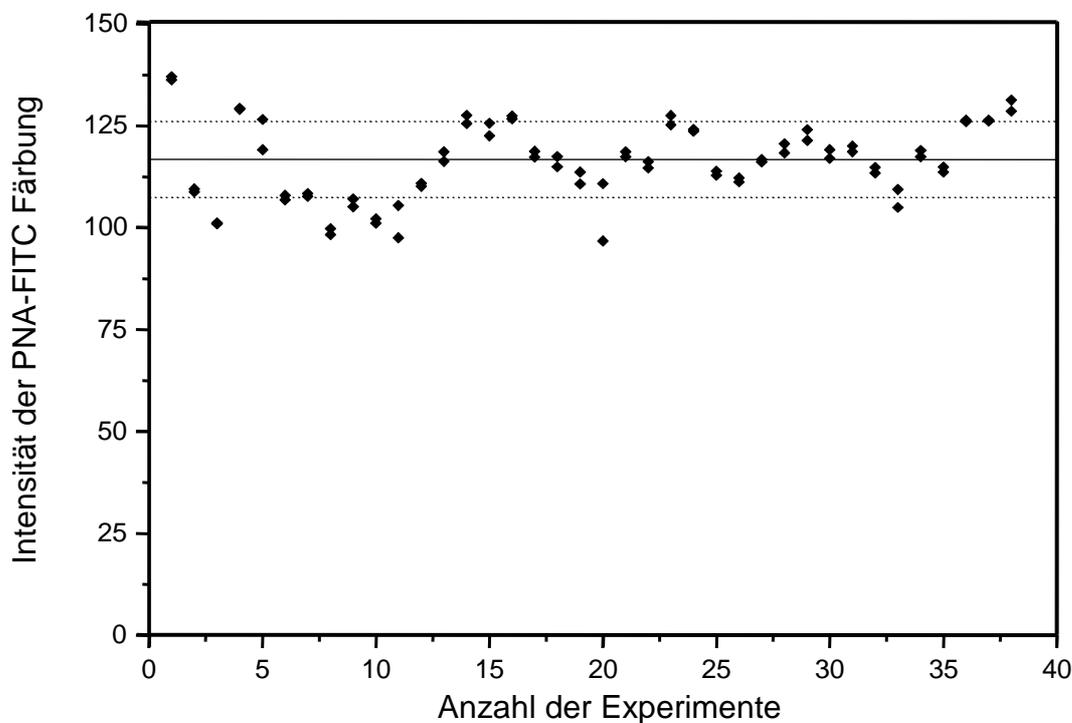


Abbildung 20: Darstellung der Validierung des Proaerolysin multi-color flow-FISH. Die gestrichelte Linie stellt die Standardabweichung dar, die durchgezogene den Mittelwert.

Das Ausmaß der Variation der Doppelwerte von Experiment zu Experiment lässt sich nun wie folgt bestimmen: Aus den Mittelwerten der einzelnen Doppelwerte wird ein Mittelwert gebildet. Hier ist der Mittelwert der

Fluorochromintensität des Thymus 116,3. Weiter wird die Standardabweichung aus den Mittelwerten der einzelnen Doppelwerte gebildet. Dies geschieht wie folgt: Die Standardabweichung s ist die Wurzel aus der Summe der Abweichungsquadrate geteilt durch die Anzahl der Messwerte -1 . Hierbei ist \bar{x} der Mittelwert aller Messungen, x_i ist der jeweilige Einzelwert der Messungen und n die Gesamtzahl aller Messungen.

$$s = \sqrt{\left(\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \right)}$$

Aus diesen zwei Werten kann nun der so genannte Variationskoeffizient gebildet werden.

$$\text{Variationskoeffizient} = \left(s / \bar{x} \right) \times 100 \%$$

Der Vorteil des Variationskoeffizienten besteht darin, dass er unabhängig von einer Einheit ist und man damit unterschiedliche Methoden miteinander vergleichen kann .

Hier in diesem Versuch liegt der Variationskoeffizient für die Thymuszellen von Experiment zu Experiment bei 8.0 % (interexperimentelle Variation). Wenn man nun das gleiche mathematische Verfahren auf die Doppelwerte der Thymusmessung anwendet, erhält man einen Variationskoeffizient von 1.4 % für die Doppelwerte (intraexperimentelle Variation).

Ein weiterer Punkt der Validierung der neuen Methode ist die Spezifität der Messung. Hierbei geht es darum, wie genau die neue Methode positive Zellen als positive Zellen erkennt; in diesem Fall, wie genau GPI (-) Zellen als solche erkannt werden. Hierzu wurden aus den Daten der FACS Messung das Verhältnis GPI (+) zu GPI (-) Zellen bestimmt und mit den Daten des Ulmer Referenzlabors korreliert. Diese verwenden in der Routinediagnostik die Antikörper CD24, CD66b und CD16. Alle drei sind genauso wie CD59 GPI-verankerte Proteine auf der Außenseite der Zellmembran. FLAER ist Proaerolysin, welches mit einem anderem Fluorochrom markiert ist. In Tabelle

Ergebnisse

12 ist eine Auflistung des Anteils GPI (-) Granulozyten in % aus den Telomerlängenmessungen dieser Studie und des Ulmer Referenzlabors gezeigt.

Tabelle 12: *Alter der Patienten und Größe des Klonen der 16 PNH Patienten*

Patientennummer	Alter	GPI(-) Granulozyten (in %)			
		Klinische Routinebestimmung		Multi-Color-Flow-FISH	
		CD24/CD66b	FLAER/CD16	CD59	Proaerolysin
1	13	31.6	31.4	4.2	42.0
2	31	98.5	93.2	98.8	97.8
3	33	<i>n.g.</i>	<i>n.g.</i>	90.9	95.8
4	42	26.7	54.2	<i>n.g.</i>	55.8
5	26	61.2	59.7	53.2	52.7
6	74	13.5	6.5	19.4	18.8
7	65	74.2	78.8	76.7	79.9
8	48	76.3	75.7	<i>n.g.</i>	68.4
9	18	65.7	83.6	69.8	76.4
10	16	12.2	14.4	13.5	14.9
11	16	74.3	76.5	46.3	37.6
12	46	98.1	99.5	90.0	92.8
13	40	99.5	99.4	99.2	97.9
14	34	99.9	98.6	99.1	99.3
15	36	61.0	65.4	71.0	76.6
16	19	98.7	97.2	96.6	97.6

n.g. = nicht gemessen

Aus der Tabelle kann man entnehmen, dass mit Proaerolysin bestimmte Klongrößen überwiegend sehr gut miteinander korrelieren. In Abbildung 21 sind die entsprechenden Korrelationen aufgetragen.

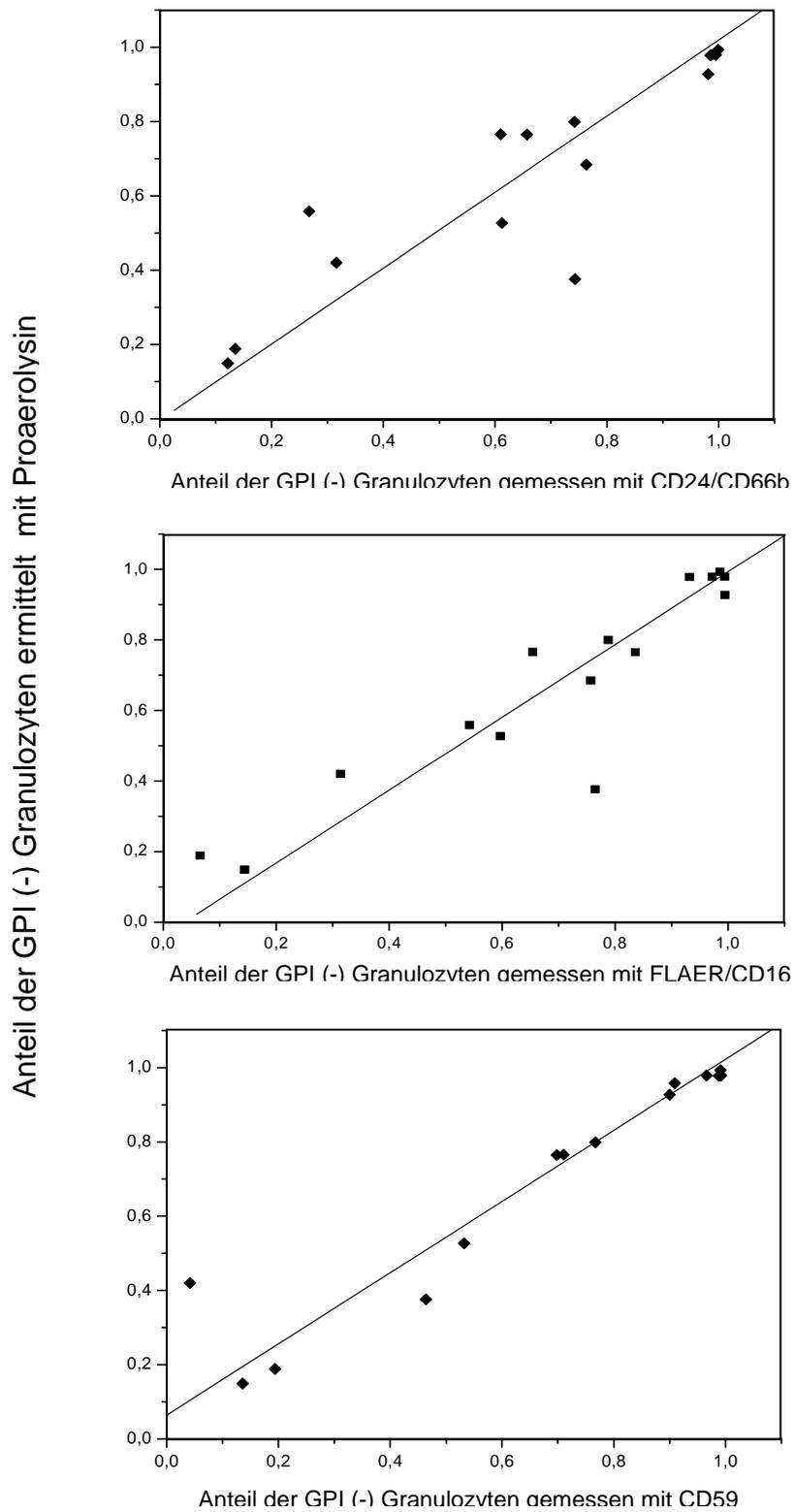


Abbildung 21: Korrelation der Klongröße bestimmt mit dem Proaerolysin multi-color flow-FISH in Bezug zu den Werten des Referenzzentrums in Ulm

Die Korrelation der Antikörperkonstellation CD24/CD66b mit Proaerolysin ergibt einen Korrelationskoeffizienten $R = 0.89$ und ein $p < 0.0001$. Für die Kombination FLAER/CD16 findet sich ein $R = 0.92$ und $p < 0.0001$ und für CD59 korreliert mit Proaerolysin ein $R = 0.95$ und $p < 0.0001$. Die Geraden in Abbildung 21 geben die jeweiligen Ausgleichsgeraden an. Die Bestimmung der Telomerlänge ergibt immer einen Wert, der nur im Zusammenhang mit dem Alter der einzelnen Person gesehen werden kann. Um nun die Telomerlänge von Patienten mit denen von gesunden Probanden vergleichen zu können, sollen beide Gruppen eine vergleichbare Altersstruktur aufweisen.

4.2 Darstellung der Altersstruktur der PNH Patienten

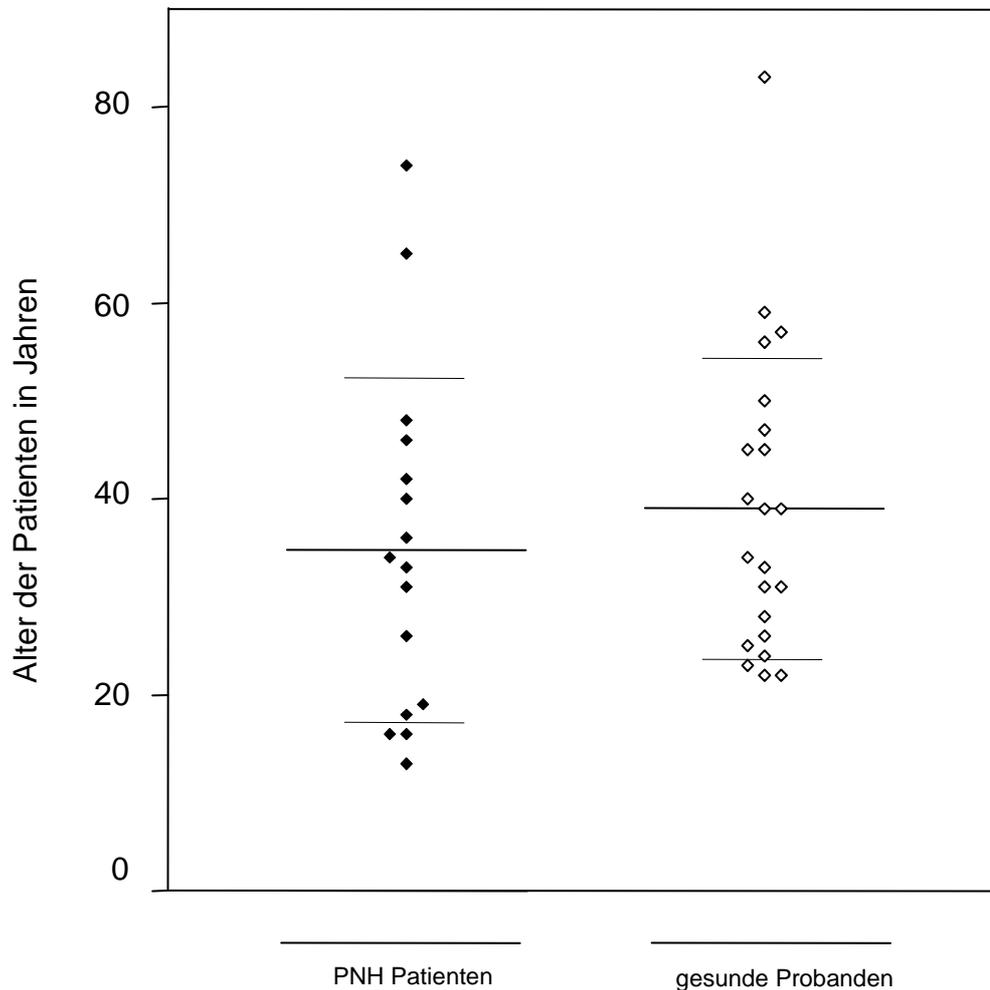


Abbildung 22: Darstellung der Altersstruktur der PNH Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern. Der Mittelwert ist als lange Linie, die Standardabweichung als kurze Linie eingezeichnet

Abbildung 22 sind die Altersstrukturen graphisch dargestellt. Die breiten Balken in der Mitte sind die Mittelwerte (MW), die kleineren geben den $MW \pm$ eine Standardabweichung an. Die PNH Patienten sind im Durchschnitt 34.8 Jahre alt und die Standardabweichung beträgt 17.5 Jahre. Im Falle der gesunden Probanden ist das Durchschnittsalter 39.1 Jahre und die Standardabweichung 15.3 Jahre. Es ist also eine gute Vergleichbarkeit beider Gruppen gegeben.

4.3 Ergebnisse der Telomerlängenbestimmung

4.3.1 Bestimmung mit Proaerolysin

In den vorherigen Abschnitten wurden die Ergebnisse der Validierung der Methode und die Vergleichbarkeit der Untergruppen dargestellt. Im folgenden Teil werden nun die Ergebnisse der Telomerlängenbestimmung gezeigt. Hierzu erfolgte ein Vergleich der Telomerlängen der GPI (+) Granulozyten der gesunden Probanden (GP) mit den GPI (+) und GPI (-) Granulozyten der PNH Patienten. Weiterhin wurden die GPI (+) und GPI (-) Granulozyten der PNH Patienten miteinander verglichen. Die Ergebnisse für Proaerolysin sind in Abbildung 23 und die Ergebnisse für CD59 Abbildung 24 zu sehen.

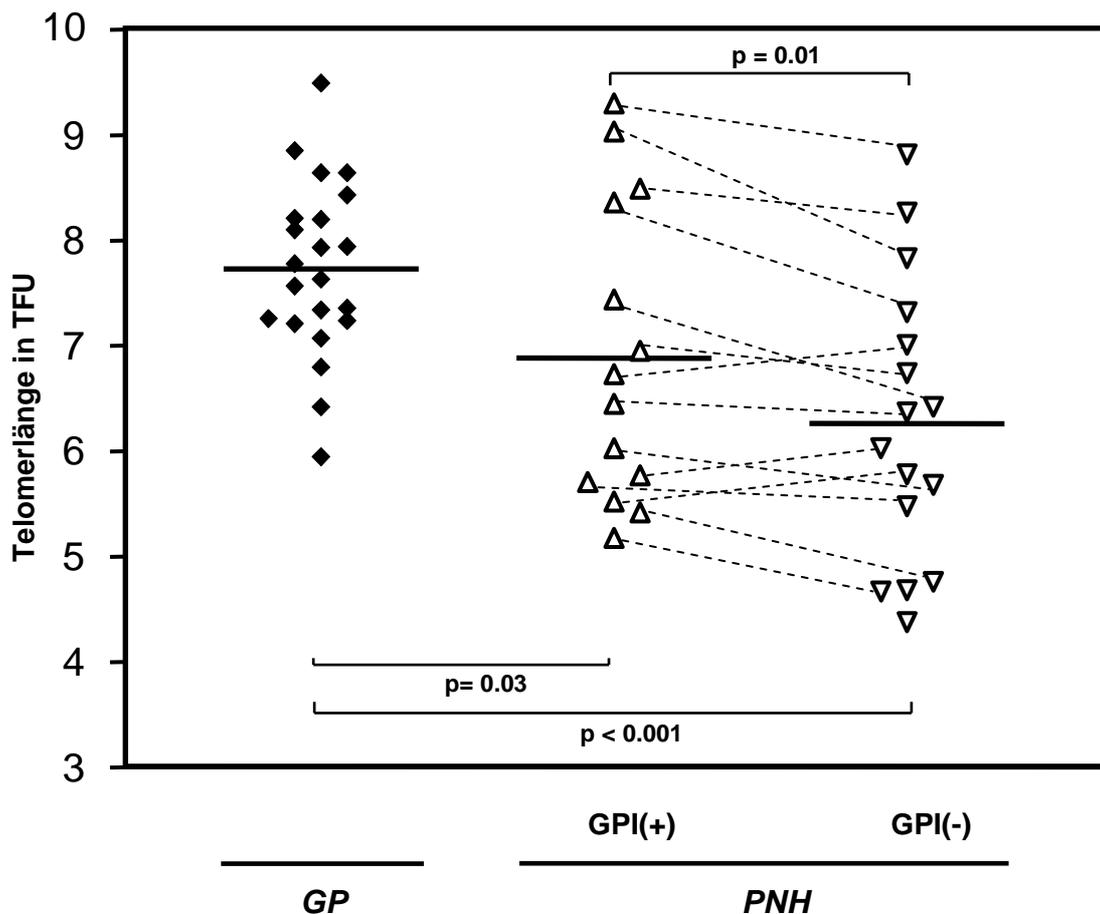


Abbildung 23: *Telomerlängen der gesunden Probanden (GP) und der PNH Patienten gemessen mit Proaerolysin*

Die Telomerlänge der GPI (+) Granulozyten der gesunden Probanden gemessen mit Proaerolysin beträgt im Durchschnitt 7.73 TFU mit einem Standardfehler von ± 0.2 TFU. Sie sind signifikant länger als die GPI (+) Granulozyten der PNH Patienten, deren Telomerlänge im Durchschnitt 6.88 ± 0.4 TFU beträgt. Der p- Wert beträgt in diesem Fall 0.03. Vergleicht man die GPI (-) Granulozyten der PNH Patienten, deren Durchschnittslänge 6.26 ± 0.3 TFU beträgt, mit den GPI (+) Granulozyten der gesunden Probanden, so ist der Unterschied ebenfalls signifikant mit einem p- Wert von < 0.001 . Betrachtet man den Unterschied in der Telomerlänge zwischen GPI (+) und GPI (-) Granulozyten innerhalb der PNH Patienten, so findet man erneut einen statistisch signifikanten Unterschied von 0.62 TFU bei einem p- Wert von 0.01. Die einzelnen Paare wurden miteinander verbunden, um deutlich zu machen, dass es intraindividuelle Unterschiede in der Telomerlänge zwischen den GPI (+) und GPI (-) Granulozyten bei PNH Patienten gibt. Hier zeigt sich schon deutlich, dass die GPI (-) Granulozyten kürzere Telomere haben als die GPI (+). In 3 Patienten waren die Telomere in GPI (+) Zellen kürzer als in GPI (-); bei 11 Patienten fand sich ein umgekehrtes Verhältnis.

4.3.2 Bestimmung mit CD59

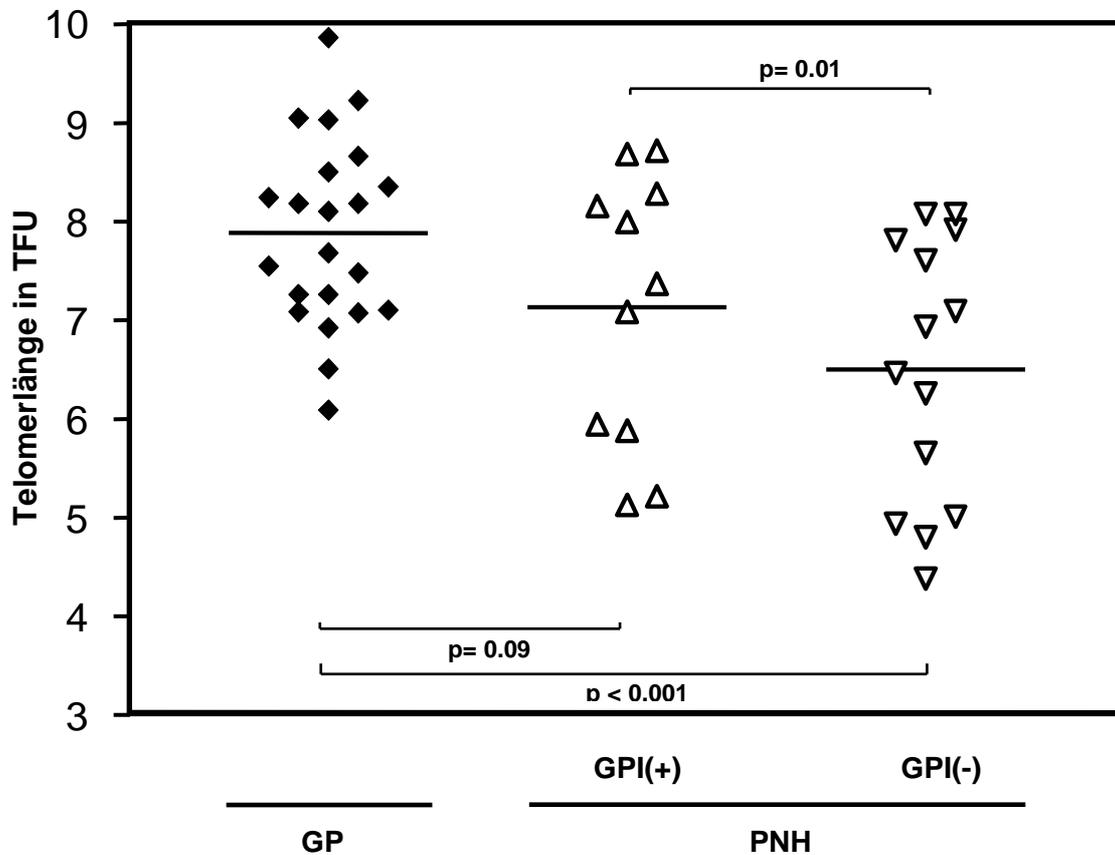


Abbildung 24: Telomerlängen der gesunden Spender und der PNH Patienten gemessen mit CD59

Für die Telomerlängen basierend auf CD59 Expression ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Ergebnissen für Proaerolysin. Die durchschnittliche Telomerlänge für die GPI (+) Granulozyten der gesunden Probanden beträgt 7.90 ± 0.2 TFU. Die GPI (+) Granulozyten der PNH Patienten sind mit einer Telomerlänge von 7.14 ± 0.4 TFU verglichen mit den GPI (+) der gesunden Probanden nicht signifikant kürzer bei einem p-Wert von 0.09. Vergleicht man allerdings die GPI (-) Granulozyten der PNH Patienten, die eine Telomerlänge von 6.50 ± 0.4 TFU aufweisen, mit den GPI (+) der gesunden Probanden, so ergibt sich eine deutliche Signifikanz bei einem p-Wert < 0.001 . bei einem p-Wert von 0.01.

4.4 Korrelation des Alters mit der Telomerlängendifferenz zwischen GPI(+) und GPI(-) Granulozyten

Im letzten Abschnitt werden mögliche Zusammenhänge zwischen Alter, Größe des GPI (-) Klon und Telomerlängendifferenz zwischen den GPI(+) und GPI(-) mit Proaerolysin gemessenen Granulozyten der einzelnen Patienten untersucht. Wie man in Abbildung 23 und

Abbildung 25 sehen kann, sind nur bei drei Patienten die Telomerlängen der GPI negativen Zellen länger als die der GPI positiven Zellen. Die Telomere der restlichen 11 Paare sind bei den GPI negativen kürzer als bei den positiven. Dieser Unterschied wurde weiter geprüft und mit dem Alter der Patienten korreliert.

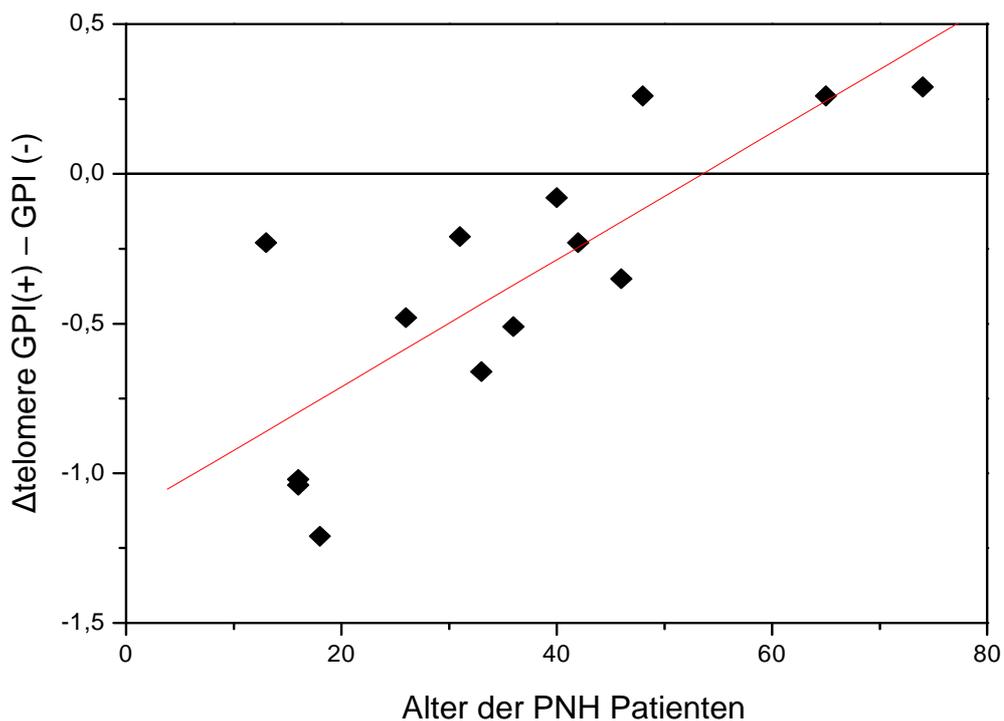


Abbildung 25: Korrelation zwischen dem Alter der PNH Patienten und der Telomerlängendifferenz zwischen den GPI(+) und GPI(-)Granulozyten.

Hier zeigt sich, dass die Differenz der Telomerlänge zwischen den GPI (+) und GPI(-) Granulozyten (Δ telomere GPI(+)-GPI(-)) gemessen mit Proaerolysin signifikant mit dem Alter korreliert ($R= 0.80, p< 0.005$). Weiter wurde analysiert, ob es einen Zusammenhang zwischen der Klongröße und Δ telomere GPI(+)-GPI(-) gibt.

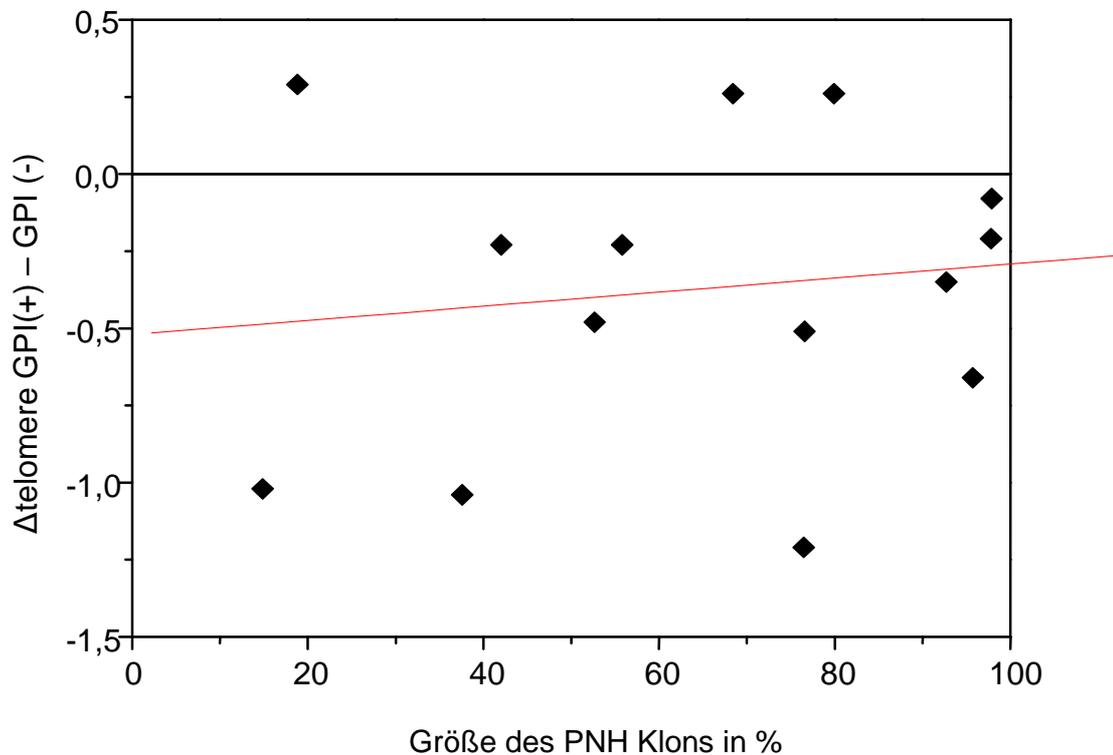


Abbildung 26: Korrelation zwischen der Größe des PNH Klons bestimmt an Granulozyten und der Telomerlängendifferenz zwischen den GPI(+) und GPI(-) Granulozyten

Wie man in Abbildung 26 gut sehen kann, ergibt sich in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv keine signifikante Korrelation zwischen der Klongröße und Δ telomere GPI(+)-GPI(-) ($R= 0.13, p=0.65$). Zum Schluss wurde noch untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Alter und Größe des PNH Klons gibt.

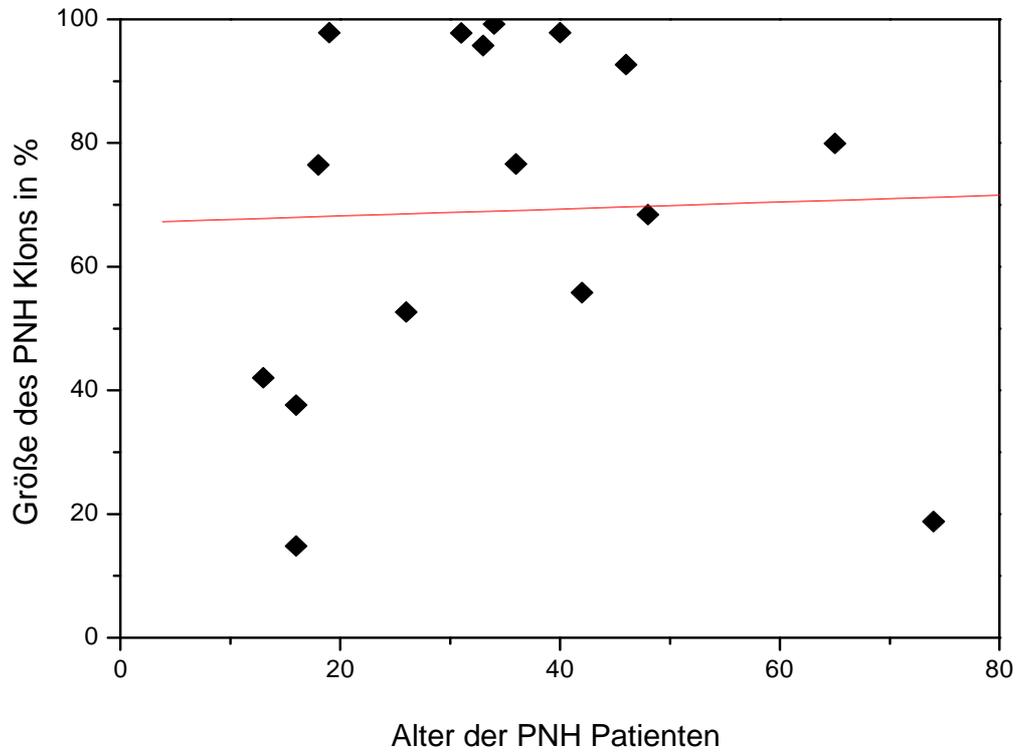


Abbildung 27: *Korrelation zwischen der Größe des PNH Klons in Prozent und dem Alter der untersuchten PNH Patienten.*

Wie man in Abbildung 27 sehen kann, zeigt sich hier keine signifikante Korrelation zwischen der Größe des PNH Klons und dem Alter der Patienten ($R=0.03$, $p=0.90$).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden selektiv die Telomerlängen der Granulozyten von PNH Patienten mit Hilfe des neu entwickelten Proaerolysin *multi-color flow-FISHs* untersucht. Ziel der Studie war die Überprüfung des von Ware et al. postulierten Modells zur Pathogenese der PNH {Ware, 2003 144 /id}. Da im zweiten und dritten Schritt des Modells die zwei Kompartimente des Knochenmarks von PNH Patienten zum einen durch eine Autoimmunreaktion, wie man sie bei der AA findet, angegriffen werden, zum anderen aus unbekanntem Grund expandieren, lag es nahe, diese Veränderungen des Knochenmarks mit Hilfe der Telomere zu überprüfen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Telomerlänge gut geeignet ist, Rückschlüsse über die stattgefundenen Zellteilungen im Stammzellkompartiment zu ziehen (Brummendorf et al., 2006; Drummond et al., 2007) . Das bedeutet, dass man bei PNH Patienten mittels Analyse der zwei Subpopulationen, den GPI positiven und negativen Zellen, Rückschlüsse über das bisherige Teilungsverhalten der GPI positiven Stammzellen und des PNH Klons ziehen kann.

5.1 Einfluss der Methodik auf die Telomerlängenmessung

Die auf dem konventionellen *flow-FISH* basierende Methode des Proaerolysin *multi-color flow-FISHs* zeigt gegenüber dem Southern Blot und dem Q-FISH verschiedene Vorteile:

Schwächen des häufig verwendeten *Southern Blots* sind der Bedarf einer sehr großen Anzahl von Zellen (mind. 1×10^6 Zellen), der große Zeitaufwand pro Versuch und das Unvermögen, die Telomerlänge einer Subpopulation innerhalb einer Probe zu bestimmen. Problematisch ist auch, dass durch die subtelomerisch gelegene Schnittstelle der Restriktionsenzyme etwa 2.5 bis 4 kbp DNA hinzu gerechnet werden müssen. Somit können die genauen Telomerlängen nicht gemessen werden, sondern sind nur annäherungsweise bestimmbar (Murnane et al., 1994).

Die Vorteile von *Q-FISH* bestehen darin, dass man nur wenige Zellen (ca. 10^2 bis 10^3) benötigt und man die Telomerlänge einzelner Zellen und sogar einzelner Chromosomenarme untersuchen kann. Von Nachteil ist, dass nur in Zellteilung befindliche Zellen für eine Untersuchung in Frage kommen und die Methode sehr aufwendig ist .

Im Gegensatz zum *Southern Blot* braucht man beim konventionellen *flow-FISH* nur eine kleinere Anzahl an Zellen (Minimum 1×10^5) und die Versuche sind im Gegensatz zu *Q-FISH* und *Southern Blot* nicht zu arbeitsintensiv. Ein weiterer Vorteil des *flow-FISH* ist die Möglichkeit der Unterscheidung der Telomerlänge zwischen verschiedenen Subpopulationen wie z.B. Granulozyten und Lymphozyten innerhalb einer Messung.

Der Proaerolysin *multi-color flow-FISH* hat auf Grund verschiedener Weiterentwicklungen zusätzliche Vorteile gegenüber dem konventionellen *flow-FISH*. Durch Einführung von Rinderthymozyten als interne Kontrolle konnte die Messgenauigkeit verbessert werden. Zudem erlaubt die Verwendung von Antikörpern bzw. Toxinen die Bestimmung der Telomerlänge einzelner phänotypisch definierter spezieller Subpopulationen in einer Messung.

Da die Studie mit einer neu entwickelten Methode, dem Proaerolysin multi-color flow-FISH durchgeführt wurde, muss die Spezifität und die Sensitivität der Methode im Vergleich zu anderen bisher etablierten Methoden bestimmt werden. Der Vergleich mit den Daten des Ulmer Referenzzentrums bezüglich der Klongröße, ermittelt an Granulozyten, ergab eine hervorragende Korrelation der Ergebnisse dieser Studie mit den im Rahmen der klinischen Routine erhobenen Werten (alle $r > 0.89$).

Bezüglich der Messgenauigkeit der Telomerlängenbestimmung wurden die Ergebnisse mit den Werten für den *Southern Blot* verglichen.

Da es sich um zwei verschiedene Methoden handelt, verwendet man den sogenannten Variationskoeffizienten als Parameter der Messgenauigkeit. Der konventionelle *flow-FISH* hat einen Variationskoeffizienten von 5-10% innerhalb einer Messung und von 20-30% von Experiment zu Experiment (Rufer et al., 1998). Law et al. verglichen 2001 den konventionellen *flow-FISH* mit der

Southern Blot Methode (Law et al., 2001). Sie fanden bezüglich der Messgenauigkeit keinen Unterschied zwischen *Southern Blot* und konventionellem *flow-FISH*. Durch Einführung einer internen Kontrolle aus Rinderthymozyten konnten Baerlocher et al. 2004 den Variationskoeffizienten innerhalb einer Messung auf 2-5% und von Experiment zu Experiment auf 5-10% reduzieren. Der kleinste detektierbare Unterschied wurde mit 0.5 kb angegeben (Baerlocher et al., 2004).

Die hier eingesetzte *multi-color flow-FISH* Methode unter Verwendung von Proaerolysin stellt eine Weiterentwicklung der von Baerlocher entwickelten Methode dar. Sie ist durch einen intraexperimentellen Variationskoeffizienten von 1.4% und einen interexperimentellen Variationskoeffizienten von 8% charakterisiert. Diese Ergebnisse entsprechen also den vorher beschriebenen Werten. Da in der Literatur momentan noch kein direkter Vergleich des *multi-color flow-FISH* mit der *Southern Blot* Methode beschrieben wird, ist es schwierig, eine Aussage bezüglich einer Überlegenheit der einen Methode über die andere zu treffen. Die Ergebnisse von Baerlocher und Lau lassen allerdings den Schluß zu, dass die Messgenauigkeit beim konventionellen *flow-FISH* mit einer internen Kontrolle eindeutig über der Messgenauigkeit des *Southern Blots* liegt.

5.2 Telomerdynamik bei AA

Das aktuelle Modell der Pathogenese der PNH zeigt als Gemeinsamkeit mit dem angenommenen Entstehungsmodell der AA einen T-Zell vermittelten Autoimmunprozess gegen die HSZ (Young, 2006). Auf Grund des vermuteten ähnlichen Pathomechanismus können die Erkenntnisse über die Telomerdynamik der AA auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen werden.

Frühere Studien über die Telomerbiologie der AA zeigten unterschiedliche Telomerlängen in den verschiedenen untersuchten Subgruppen der Erkrankung. Ball et al. fanden kürzere Telomere im Vergleich zu gesunden Spendern bei Patienten mit aktiver AA und bei Patienten in Remission und eine Korrelation zwischen Krankheitsdauer und Telomerlängenverkürzung (Ball et al.,

1998). Diese Ergebnisse stimmen gut mit dem zweiten Schritt des von Ware et al. postulierten Modells überein (Ware et al., 2003). Die Dauer des autoimmun vermittelten Angriffs auf die HSZ spiegelt sich in einer Verkürzung der Telomere wider, auf Grund einer kompensativen, vermehrten Proliferation der HSZ. In diesen Kontext passen auch die Ergebnisse der Untersuchung der 13 AA Patienten mit sekundärer PNH. Diese zeigen ein ähnliches Verhaltensmuster wie die Patienten mit AA und bestätigen die enge Assoziation zwischen AA und PNH wie sie auch von Ware et al. postuliert wurde (Ware et al., 2003).

Auf Grund der kleinen Anzahl von drei Patienten mit klassischer PNH in der Studie von Ball et al. ist die Aussagekraft über eine mögliche Telomerlängenverkürzung sehr begrenzt (Ball et al., 1998).

Eine weitere Schwäche der oben genannten Arbeit von Ball et al. ist zum einen die Ungenauigkeit des verwendeten *Southern Blots* und die Bestimmung der Telomerlänge aus unfraktionierten mononukleären Zellen. Lymphozyten haben eine andere Telomerkinetik als Granulozyten und exprimieren zudem schwach Telomerase (Hiyama et al., 1995; Rufer et al., 1999). Diese Einflussfaktoren erschweren die Möglichkeit, aus Telormessungen aus unfraktionierten mononukleären Zellen genaue Rückschlüsse auf die replikative Geschichte der HSZ zu ziehen.

Um den Einfluss methodischer Faktoren zu verringern, untersuchte Brümmendorf et al. 2001 die Telomerlängen von Granulozyten von AA und PNH Patienten mittels konventionellem *flow-FISH* (Brümmendorf et al., 2001a). Seine Arbeit zeigte, dass unbehandelte AA Patienten und therapierefraktäre Patienten signifikant kürzere Telomere aufweisen als gesunde Spender. Im Gegensatz zu Ball et al. fanden sich keine Unterschiede in der Telomerlänge von gesunden Spendern und Patienten in Remission (Ball et al., 1998). Während diese Ergebnisse die Theorie des replikativen Stresses und der daraus resultierenden Telomerverkürzung auf Grund des autoimmunen Prozesses untermauern, stehen die normalen Telomerlängen von Patienten in Remission im Gegensatz zur vorher veröffentlichten Studie. Als mögliche Erklärung interpretierten Brümmendorf et al., dass die Dauer des autoimmunen Prozesses zu kurz ist, um eine signifikante und messbare Veränderung der

Telomerlänge zu verursachen. Diese Aussage wird durch die Tatsache untermauert, dass Patienten mit einer moderaten Zytopenie (und deswegen ohne immunsuppressive Therapie) und einer langen Krankheitsdauer kürzere Telomere in den gemessenen Granulozyten zeigen (Brummendorf et al., 2001a). Als weitere Erklärung kommt in Frage, dass Ball et al. in mononukleären Zellen durch „Kontamination“ mit Lymphozyten die Messung der normalen Telomerlängen in den Granulozyten überdeckt haben (Ball et al., 1998). Bezüglich der 6 PNH Patienten fanden sich keine signifikant kürzeren Telomere. Auch hier ist, wie bei der früheren Studie von Ball et al., die Fallzahl zu klein, um eine abschließende Aussage zu treffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die GPI positiven Granulozyten in PNH Patienten, also die normalen, nicht mutierten HSZ, signifikant kürzer sind als die von gesunden Spendern. Die Ergebnisse der früheren Arbeiten über die AA konnten bestätigt werden. Demgegenüber unterscheiden sich die Ergebnisse der untersuchten PNH Patienten von denen der vorliegenden Arbeit. Dies kann zum einen Folge der kleinen untersuchten Fallzahl sein, zum anderen können methodische Einflüsse die abweichenden Resultate erklären.

5.3 Telomerdynamik bei PNH

Karadimitris et al. zeigten 2003 in ihrer Studie, dass GPI positive Granulozyten von PNH Patienten kürzere Telomere haben als GPI negative, beide Zellpopulationen aber kürzere Telomere aufweisen als gesunde Personen (Karadimitris et al., 2003). Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass in Analogie zur AA die normale, GPI positive Hämatopoese zerstört wird und der PNH Klon zur Kompensation expandiert. Diese Hypothese würde auch erklären, warum Karadimitris et al. ein sehr unterschiedliches Muster in der Telomerlänge zwischen GPI positiven und negativen Zellen fanden. Vier Patienten hatten kürzere Telomere bei GPI negativen Zellen als in GPI positiven und sechs Patienten hatten umgekehrt kürzere Telomere bei den GPI positiven als bei den negativen Zellen. Sie interpretierten die Unterschiede als abhängig von der Dauer des Autoimmunprozesses und des daraus resultierenden Schadens an der normalen GPI positiven Hämatopoese.

In der hier vorliegenden Studie konnten wir Teile der Ergebnisse von Karadimitris et al. bestätigen. Wir fanden ebenfalls, dass die GPI positiven und negativen Zellen signifikant kürzere Telomere haben als von gesunden Spendern. Im Gegensatz zu Karadimitris et al. zeigten unsere untersuchten Patienten jedoch signifikant kürzere Telomere bei den GPI negativen Granulozyten im Vergleich zu den GPI positiven. Von den 14 Patienten, bei denen man die Telomerlänge der GPI positiven und negativen Granulozyten bestimmen konnte, zeigten 11 kürzere Telomere in der GPI negativen Zellpopulation und nur 3 in den GPI positiven.

Ein Grund für diesen Unterschied kann in der höheren Spezifität und Sensitivität des neu entwickelten Proaerolysin *multi-color flow-FISHs* liegen, der eine genauere Bestimmung der Telomerlängen erlaubt.

Alternativ wäre denkbar, dass der mutierte Klon durch die postulierte 2. Mutation den größten Teil der Hämatopoese übernimmt. Die Werte des Referenzlabors ergeben eine durchschnittliche Klongröße von etwa 70%. Da der Klon den größten Teil der etwa 10^{11} Zellen pro Tag bilden müsste, wäre dies gut vereinbar damit, dass die GPI negativen Zellen kürzere Telomere haben. Die GPI positiven Zellen rekrutieren sich trotz des autoimmunen Angriffs, der zu einer signifikanten Telomerverkürzung führt, immer noch aus einem größeren Stammzellpool, was zu dem gemessenen Unterschied von 0.62 kbp. führen könnte. Gut vereinbar mit dieser Hypothese sind die Ergebnisse der Arbeit von Nishimura. Diese zeigten, dass ein dominanter Klon über Jahre hinweg den größten Teil der Hämatopoese übernimmt (Nishimura et al., 2002).

Weiter wäre denkbar, dass die drei Patienten mit kürzeren Telomeren in den GPI positiven Zellen mehr als einen Klon besitzen. Obwohl man in den meisten Fällen nur einen dominanten Klon findet, berichteten Nishimura et al. 1997 über einen Patienten mit vier verschiedenen GPI (-) Klonen (Nishimura et al., 1997). Diese leisteten alle einen unterschiedlichen Beitrag zur Hämatopoese, wobei ein Klon dominierte (zwischen 11 und 75%).

Die von Karadimitris et al. erwähnte Möglichkeit eines Einflusses von Krankheitsdauer und Therapie auf die Telomerlängen der beiden Populationen

lässt sich bedingt durch das Fehlen von klinischen Daten in dieser Studie nicht ausschließen. Da die Krankheitsdauer als Einflussfaktor auf die Telomerlängen schon in früheren Studien bei AA Patienten beschrieben wurde, ist es durch die enge Assoziation zwischen AA und PNH vorstellbar, ähnliche Ergebnisse bei PNH Patienten zu finden.

Baerlocher et al. konnten 2007, zwei Jahre nach Beendigung dieser hier vorliegenden Studie, weite Teile der Ergebnisse dieser Studie bestätigen (Baerlocher et al., 2007). Sie fanden in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit, dass CD59 negative Leukozyten von PNH Patienten kürzere Telomere aufweisen als CD59 positive. Beide Populationen sind signifikant kürzer als von gesunden Referenzpersonen. In ihrer Studie fanden sie bei 9 PNH Patienten eine signifikante Korrelation zwischen der Klongröße und Δ telomere GPI(+)-GPI(-) der Leukozyten ($r=0.9$, $p<0.05$). Der Unterschied zu der in dieser Studie gefundenen Korrelation ($r= 0.13$, $p=0.65$) könnte darin liegen, dass zum einen CD59 positive und negative Leukozyten verwendet wurden. Dies macht eine Vergleichbarkeit der Daten schwieriger, da die Daten dieser Arbeit auf Proaerolysin positiven und negativen Granulozyten basieren. Zum anderen untersuchten Baerlocher et al. nur Klongrößen von 20 - 80%. 5 Patienten in dieser Studie haben einen Klon größer als 90%. Es wäre möglich, dass bei einem so großen Anteil des Klons an der Hämatopoese die beschriebene Korrelation nicht mehr auftritt. In Abbildung 26 kann man sehen, dass die größten Klone relativ gleichmässig verteilt sind. Weiterhin wurden bei der Berechnung der Korrelation nur die Patienten berücksichtigt, bei denen die GPI (-) Zellen kürzere Telomere als die GPI(+) aufwiesen.

Zur endgültigen Klärung dieser Frage würde man allerdings weiterführende Studien mit einer größeren Patientenzahl und klinischen Daten benötigen.

5.4 Replikationsunabhängige Erklärung der Telomerbiologie bei PNH

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Telomere durch andere Mechanismen, die unabhängig von der Replikation der Zellen sind, verkürzt werden. Die kurzen Telomere wären damit nicht die Folge einer häufigen

Zellteilung, sondern Folge einer Störung in der Aufrechterhaltung der Telomere. Möglich wäre eine erhöhte Sensitivität für oxidativen Stress (Tchirkov et al., 2003), eine Veränderung von hTERT/hTR oder eine Störung der Interaktion der für die Aufrechterhaltung der Telomere benötigten Proteine (siehe Abbildung 2) (Mason et al., 2005).

Ähnlich wie bei der DKC wurde in einer kleinen Zahl von AA Patienten eine Mutation von hTR gefunden (2 von 150 AA, 0 von 13 untersuchten PNH Patienten) (Fogarty et al., 2003). Obwohl diese Mutationen selten sind, wurden kürzere Telomere auf Grund einer Mutation (von zwei Allelen), eine sogenannte *Haploinsufficiency* bei AA Patienten beschrieben (Marrone et al., 2004). Ein Merkmal der DKC sind kürzere Telomere, die, wie oben beschrieben, zu chromosomalen Veränderungen führen können. Ein Progress der PNH zu einer Leukämie oder einem MDS auf Grund der kurzen Telomere ließe erwarten, dass Auffälligkeiten im Karyotyp bevorzugt in GPI negativen Zellen zu finden sein müssten. Sloand et al. untersuchten 5 Patienten mit AA/PNH auf chromosomale Veränderungen (Sloand et al., 2003). Alle 5 Patienten hatten chromosomale Auffälligkeiten, wie zum Beispiel Trisomie 8 oder Monosomie 7, in den untersuchten GPI positiven Zellen, aber nur 3 Patienten zeigten diese Auffälligkeiten in den GPI negativen Zellen. Allerdings hatte ein Patient mehr Mutationen in den GPI negativen Zellen als in den GPI positiven. Diese Ergebnisse widersprechen auf den ersten Blick der Hypothese, dass kurze Telomere eine der Hauptursachen für chromosomale Störungen bei PNH Patienten sind. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde wäre ein Versagen der Hochregulation der Telomerase in den betroffenen Zellen. Diese Störung könnte zu einer Erschöpfung der replikativen Reserve führen und dadurch würde es eher zu einem Verlust des genetisch instabilen Klons als zu einem Weiterwachsen des Klons kommen. Über eine solche in Frage kommende Störung berichteten Keith et al., die eine Mutation an der Sp1 Bindungsstelle des hTR Promotors bei einem PNH Patienten fanden (Keith et al., 2004). Mit dieser Hypothese stimmen zudem die Ergebnisse der Arbeit von Araten et al. überein (Araten et al., 2001; Keith et al., 2004). In ihrer Studie untersuchten sie PNH Patienten über einen längeren Zeitraum und konnten zeigen, dass der

Anteil der Zellen mit einem auffälligen Karyotyp in 7 von 11 Patienten signifikant abnahm. Zudem entwickelte keiner der Patienten eine Leukämie oder eine Blastenausschwemmung ins periphere Blut.

5.5 Telomerbiologische Erklärungsansätze des natürlichen Verlaufs der PNH

Die Ergebnisse dieser Arbeit können verschiedene Aspekte der PNH und des dazugehörigen Modells der drei Schritte gut erklären. Im oben beschriebenen Abschnitt „Natürlicher Krankheitsverlauf der PNH“ wurden verschiedene Varianten des Krankheitsverlaufes dargestellt. Wie im oberen Abschnitt schon gezeigt, führen kurze Telomere entweder zur zellulären Seneszenz oder zur chromosomalen Instabilität (Bouffler et al., 1996). Die Instabilität der Chromosomen kann durch Chromosomenfusion oder Vergrößerung der Chromosomenzahl zur Aktivierung von verschiedensten Genen führen, die eine Transformation von einer gutartigen, benignen Zelle zu einer bösartigen, malignen Zelle, wie sie bei einer Leukämie zu finden ist, ermöglichen. Da die GPI negativen Zellen kürzere Telomere besitzen als die GPI positiven Zellen, würde dies erklären, wie sich in etwa 1% aller PNH Patienten aus einem PNH Klon eine akute myeloische Leukämie (AML) entwickeln kann (Devine et al., 1987; Harris et al., 1999; Nishimura et al., 1996). Die GPI negativen Zellen erreichen früher als die GPI positiven Zellen den Bereich telomervermittelter genetischer Instabilität und können dadurch potentiell eher zu einer Leukämie führen. Es sind aber nur 1% aller PNH Patienten davon betroffen, so dass man annehmen kann, dass die PNH Klone entweder eine unterschiedliche Telomerreserve besitzen oder als stark verkürzte Subklone mit kurzen Telomeren eher in die Seneszenz gehen als chromosomale Instabilitäten aufzuweisen. Diese Annahme stimmt auch mit den im vorangehenden Kapitel beschriebenen Ergebnissen zu Karyotypauffälligkeiten überein. Weiterhin lässt sich über diesen Punkt die in dieser Studie gefundene gute Korrelation des Alters und der Klondifferenz erklären. Um so älter die Patienten sind, um so kleiner ist die Differenz zwischen GPI positiven und negativen Zellen. Da ältere

Patienten kürzere Telomere haben und somit näher am *Hayflick limit* sind, kann die Differenz nicht mehr so groß werden wie bei jungen Patienten, da die Zellen durch das schnellere Erreichen des Hayflick limits früher in Seneszenz gehen. Die Entwicklung einer PNH nach mehreren Jahren zu einer AA kann durch die oben genannten Punkte gut erklärt werden (Hillmen et al., 1995). Hier könnte man sich vorstellen, dass der PNH Klon mit der zweiten Mutation in zelluläre Seneszenz geht und dadurch den dritten Schritt im Modell von Ware rückgängig macht. Da es sich aber ebenfalls um ein eher seltenes Ereignis handelt, kann man dies durch die große Teilungsreserve des Klons erklären. Nishimura et al. haben 2002 den Verlauf des Klons bei verschiedenen Patienten beschrieben. 6-10 Jahre nach der pig-A Mutationsanalyse des damals dominanten Klons konnte nachgewiesen werden, dass der damalig dominante Klon immer noch den größten Teil zur Hämatopoese beitrug (Nishimura et al., 2002). Zwei Patienten, bei denen der früher vorherrschende Klon verschwunden war oder kleiner wurde, entwickelten später eine AA.

Durch den gleichen Mechanismus könnte man auch erklären, warum es in seltenen Fällen auch zu einem Verschwinden der PNH kommen kann (Hillmen et al., 1995). Hier kommt es zusätzlich zur Seneszenz des Klons noch zum Erlöschen der Autoimmunreaktion gegen die restlichen Stammzellen.

Die Frage, ob die Telomere eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PNH bzw. AA spielen oder ein Marker für die replikative Geschichte sind, bedarf also weiterer Studien zur Klärung.

6 Zusammenfassung

Telomere bestehen beim Menschen und allen anderen Wirbeltieren aus der Sequenz TTAGGG und bilden zusammen mit anderen Telomer-bindenden Proteinen eine Art „Schutzkappe“ am Ende eines jeden Chromosomenarmes. Diese Schutzkappe schützt die Chromosomen vor Rekombinationen, Fusionen und Degeneration durch Enzyme. Auf Grund des sogenannten Endreplikationsproblems kommt es bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomerlänge. Unterschreiten die Telomere eine gewisse Länge, so kann dies zu chromosomalen Instabilitäten und zur Seneszenz führen. Diese Beobachtungen erlauben indirekt durch Telomerlängenbestimmung eine Aussage über die bisherige replikative Geschichte der Zelle.

Die PNH ist eine erworbene Störung der Hämatopoese, die auf einer Mutation des *pig-A* Gens in einer HSZ basiert. Dieses Gen codiert das für den ersten Syntheseschritt des GPI-Ankers verantwortliche Protein. Dieser Anker ist für die Befestigung verschiedenster Proteine an der Oberfläche der Zellmembran verantwortlich. Unter der Annahme eines autoimmunen Angriffs auf die nicht mutierten HSZ und einer beobachteten Expansion der *pig-A* mutierten Stammzelle, wurde mit Hilfe des neu entwickelten *multi-color flow-FISH* untersucht, inwieweit sich der entstehende replikative Stress auf die Telomerlänge der jeweiligen HSZ auswirkt. In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die normalen HSZ und die GPI negativen HSZ kürzere Telomere haben als gesunde Probanden. Weiterhin zeigte sich, dass die GPI negativen Zellen signifikant kürzere Telomere haben als die GPI positiven. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher veröffentlichten Daten und mit dem angenommenen Modell eines Autoimmunangriffs auf die GPI positiven HSZ. Alternativ können die Ergebnisse auch durch eine Störung in der Aufrechterhaltung der Telomerlänge erklärt werden, wobei weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage notwendig sind.

7 Literatur

- (1) Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997 October;75(5):430-45.
- (2) Araten DJ, Bessler M, McKenzie S, Castro-Malaspina H, Childs BH, Boulad F, Karadimitris A, Notaro R, Luzzatto L. Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia* 2002 November;16(11):2243-8.
- (3) Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 April 27;96(9):5209-14.
- (4) Araten DJ, Swirsky D, Karadimitris A, Notaro R, Nafa K, Bessler M, Thaler HT, Castro-Malaspina H, Childs BH, Boulad F, Weiss M, Anagnostopoulos N, Kutlar A, Savage DG, Maziarz RT, Jhanwar S, Luzzatto L. Cytogenetic and morphological abnormalities in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2001 November;115(2):360-8.
- (5) Armstrong C, Schubert J, Ueda E, Knez JJ, Gelperin D, Hirose S, Silber R, Hollan S, Schmidt RE, Medof ME. Affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria T lymphocytes harbor a common defect in assembly of N-acetyl-D-glucosamine inositol phospholipid corresponding to that in class A Thy-1- murine lymphoma mutants. *J Biol Chem* 1992 December 15;267(35):25347-51.
- (6) Baerlocher GM, Lansdorp PM. Telomere length measurements using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Methods Cell Biol* 2004;75:719-50.
- (7) Baerlocher GM, Mak J, Tien T, Lansdorp PM. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* 2002 February 1;47(2):89-99.
- (8) Baerlocher GM, Sloand EM, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria correlates with clone size. *Exp Hematol* 2007 August 11.
- (9) Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 1998 May 15;91(10):3582-92.
- (10) Batliwalla FM, Damle RN, Metz C, Chiorazzi N, Gregersen PK. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsillar B cells. *J Immunol Methods* 2001 January 1;247(1-2):103-9.

- (11) Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001 September 21;106(6):661-73.
- (12) Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997 October 3;91(1):25-34.
- (13) Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998 January 16;279(5349):349-52.
- (14) Bouffler SD, Morgan WF, Pandita TK, Slijepcevic P. The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1996 November;366(2):129-35.
- (15) Broccoli D, Young JW, de LT. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 September 26;92(20):9082-6.
- (16) Brodsky RA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology* 4th Edition Chapter 26, 419-428. 2004.
- (17) Brummendorf TH, Balabanov S. Telomere length dynamics in normal hematopoiesis and in disease states characterized by increased stem cell turnover. *Leukemia* 2006 October;20(10):1706-16.
- (18) Brummendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 2001 February 15a;97(4):895-900.
- (19) Brummendorf TH, Mak J, Sabo KM, Baerlocher GM, Dietz K, Abkowitz JL, Lansdorp PM. Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover in vivo. *Exp Hematol* 2002 October;30(10):1147-52.
- (20) Brummendorf TH, Rufer N, Holyoake TL, Maciejewski J, Barnett MJ, Eaves CJ, Eaves AC, Young N, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in normal individuals and in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Juneb;938:293-303.
- (21) Buckley JT. Crossing three membranes. Channel formation by aerolysin. *FEBS Lett* 1992 July 27;307(1):30-3.
- (22) Chen G, Kirby M, Zeng W, Young NS, Maciejewski JP. Superior growth of glycoposphatidylinositol-anchored protein-deficient progenitor cells in vitro is due to the higher apoptotic rate of progenitors with normal phenotype in vivo. *Exp Hematol* 2002 July;30(7):774-82.

- (23) Chen R, Nagarajan S, Prince GM, Maheshwari U, Terstappen LW, Kaplan DR, Gerson SL, Albert JM, Dunn DE, Lazarus HM, Medof ME. Impaired growth and elevated fas receptor expression in PIGA(+) stem cells in primary paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 2000 September;106(5):689-96.
- (24) Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999 January;8(1):137-42.
- (25) Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 1998 March 5;16(9):1217-22.
- (26) Cummings B. Complement system. Pearson Education . 2004. London.
- (27) Dacie JV. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Proc R Soc Med* 1963 July;56:587-96.
- (28) Devine DV, Gluck WL, Rosse WF, Weinberg JB. Acute myeloblastic leukemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of evolution from the abnormal paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *J Clin Invest* 1987 January;79(1):314-7.
- (29) Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000 September;110(4):768-79.
- (30) Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL, Brummendorf TH. Concise review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2007 August;25(8):1853-61.
- (31) Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 2002 January 21;21(4):541-52.
- (32) Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 1993 October 7;365(6446):566-8.
- (33) Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, . The RNA component of human telomerase. *Science* 1995 September 1;269(5228):1236-41.
- (34) Fivaz M, Abrami L, Tsitritin Y, van der Goot FG. Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* and related toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;257:35-52.

- (35) Fogarty PF, Yamaguchi H, Wiestner A, Baerlocher GM, Sloand E, Zeng WS, Read EJ, Lansdorp PM, Young NS. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet* 2003 November 15;362(9396):1628-30.
- (36) Francis K, van BJ, Canova C, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med* 2003 May;5(15):1-19.
- (37) Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 1996 February;274(2):92-7.
- (38) Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de LT. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999 May 14;97(4):503-14.
- (39) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990 May 31;345(6274):458-60.
- (40) Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992 July;27(4):375-82.
- (41) Harris JW, Kosciak R, Lazarus HM, Eshleman JR, Medof ME. Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma* 1999 February;32(5-6):401-26.
- (42) Hartmann U., Beier F, Brummendorf TH. Telomere length analysis by fluorescence in situ hybridization and flow-cytometry (flow-FISH). *J Lab Med* 28, 307-316. 2004.
- (43) Hartmann U., Brummendorf TH. Telomerase-Hemmstoffe: Ein neuer Ansatz für die Behandlung maligner Tumoren. *Arzneimitteltherapie* 21, 176-185. 2003.
- (44) Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 1965 March;37:614-36.
- (45) Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995 November 9;333(19):1253-8.
- (46) Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995 October 15;155(8):3711-5.
- (47) Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005 May 15;105(10):3848-54.

- (48) Inoue N, Kinoshita T. 3-step model of the pathogenesis of PNH. 2003. Tokyo, Springer.
- (49) Jackson AL, Loeb LA. The mutation rate and cancer. *Genetics* 1998 April;148(4):1483-90.
- (50) Josten KM, Tooze JA, Borthwick-Clarke C, Gordon-Smith EC, Rutherford TR. Acquired aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: studies on clonality. *Blood* 1991 December 15;78(12):3162-7.
- (51) Karadimitris A, Araten DJ, Luzzatto L, Notaro R. Severe telomere shortening in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria affects both GPI- and GPI+ hematopoiesis. *Blood* 2003 July 15;102(2):514-6.
- (52) Karadimitris A, Luzzatto L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia* 2001 August;15(8):1148-52.
- (53) Keith WN, Vulliamy T, Zhao J, Ar C, Erzik C, Bilsland A, Ulku B, Marrone A, Mason PJ, Bessler M, Serakinci N, Dokal I. A mutation in a functional Sp1 binding site of the telomerase RNA gene (hTERC) promoter in a patient with Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *BMC Blood Disord* 2004 June 22;4(1):3.
- (54) Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 1990 September 27;347(6291):400-2.
- (55) Klingelhutz AJ. The roles of telomeres and telomerase in cellular immortalization and the development of cancer. *Anticancer Res* 1999 November;19(6A):4823-30.
- (56) Kulkarni S, Bessler M. The effect of GPI-anchor deficiency on apoptosis in mice carrying a Piga gene mutation in hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 2002 December;72(6):1228-33.
- (57) Lansdorp PM. Self-renewal of stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997 October;3(4):171-8.
- (58) Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996 May;5(5):685-91.
- (59) Law H, Lau Y. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence in situ hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry* 2001 February 1;43(2):150-3.
- (60) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992 June 20;225(4):951-60.

- (61) Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997 April 25;276(5312):561-7.
- (62) Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie* 8th Edition. Springer Verlag 8. 2006.
- (63) Marrone A, Mason PJ. Dyskeratosis congenita. *Cell Mol Life Sci* 2003 March;60(3):507-17.
- (64) Marrone A, Stevens D, Vulliamy T, Dokal I, Mason PJ. Heterozygous telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency. *Blood* 2004 December 15;104(13):3936-42.
- (65) Marsh JC, Elebute MO. Stem cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anaemia: increasing evidence for overlap of haemopoietic defect. *Transfus Med* 2003 December;13(6):377-86.
- (66) Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 1998 January;18(1):76-80.
- (67) Mason PJ, Wilson DB, Bessler M. Dyskeratosis congenita -- a disease of dysfunctional telomere maintenance. *Curr Mol Med* 2005 March;5(2):159-70.
- (68) Meletis J, Terpos E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit* 2003 July;9(7):RA161-RA172.
- (69) Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999 December 2;402(6761):551-5.
- (70) Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 1993 February 26;259(5099):1318-20.
- (71) Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989 November 3;59(3):521-9.
- (72) Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 September;85(18):6622-6.

- (73) Mueller H. The remaking of chromosomes. The Collecting Net-Woods Hole 13, 181-198. 1938.
- (74) Murakami Y, Kinoshita T, Maeda Y, Nakano T, Kosaka H, Takeda J. Different roles of glycosylphosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by a mouse model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1999 November 1;94(9):2963-70.
- (75) Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J* 1994 October 17;13(20):4953-62.
- (76) Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O. Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjug Chem* 1994 January;5(1):3-7.
- (77) Nishimura J, Inoue N, Wada H, Ueda E, Pramoonjago P, Hirota T, Machii T, Kageyama T, Kanamaru A, Takeda J, Kinoshita T, Kitani T. A patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria bearing four independent PIG-A mutant clones. *Blood* 1997 May 1;89(9):3470-6.
- (78) Nishimura JI, Inoue N, Azenishi Y, Hirota T, Akaogi T, Shibano M, Kawagoe K, Ueda E, Machii T, Takeda J. Analysis of PIG-A gene in a patient who developed reciprocal translocation of chromosome 12 and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during follow-up of aplastic anemia. *Am J Hematol* 1996 March;51(3):229-33.
- (79) Nishimura JJ, Hirota T, Kanakura Y, Machii T, Kageyama T, Doi S, Wada H, Masaoka T, Kanayama Y, Fujii H, Inoue N, Kuwayama M, Inoue N, Ohishi K, Kinoshita T. Long-term support of hematopoiesis by a single stem cell clone in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002 April 15;99(8):2748-51.
- (80) Oexle K. Telomere length distribution and Southern blot analysis. *J Theor Biol* 1998 February 21;190(4):369-77.
- (81) Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973 September 14;41(1):181-90.
- (82) Oni SB, Osunkoya BO, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood* 1970 August;36(2):145-52.
- (83) Ostermann H, Dietzfelbinger H, Mittermüller JPPE. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. *MANUAL Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*, 153-159. 2003.
- (84) Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socie G.

- Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005 December 1;106(12):3699-709.
- (85) Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007 April;35(4):523-33.
- (86) Pieska Alfred. X-chromosom. *Science Photo Library* , 327-329. 2006.
- (87) Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 1999 August 1;36(4):267-78.
- (88) Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995 November 1;86(9):3277-86.
- (89) Rosti V, Tremml G, Soares V, Pandolfi PP, Luzzatto L, Bessler M. Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion. *J Clin Invest* 1997 September 1;100(5):1028-36.
- (90) Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol* 1989 July;26(3):201-7.
- (91) Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorp PM. 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* 1999 July 19;190(2):157-67.
- (92) Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 1998 August;16(8):743-7.
- (93) Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003 April;3(4):286-95.
- (94) Shay JW. At the end of the millennium, a view of the end. *Nat Genet* 1999 December;23(4):382-3.
- (95) Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997 April;33(5):787-91.
- (96) Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994 November;55(5):876-82.
- (97) Sloand EM, Fuhrer M, Keyvanfar K, Mainwaring L, Maciejewski J, Wang Y, Johnson S, Barrett AJ, Young NS. Cytogenetic abnormalities in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria usually occur in haematopoietic

- cells that are glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (GPI-AP) positive. *Br J Haematol* 2003 October;123(1):173-6.
- (98) Smogorzewska A, de LT. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 2004;73:177-208.
- (99) Smogorzewska A, van SB, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de LT. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000 March;20(5):1659-68.
- (100) Songyang Z, Liu D. Inside the mammalian telomere interactome: regulation and regulatory activities of telomeres. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16(2):103-18.
- (101) Struebing P. Paroxysmale Haemoglobinurie. *Dtsch Med Wochenschr* 8, 1-16. 1882.
- (102) Sugita Y, Masuho Y. CD59: its role in complement regulation and potential for therapeutic use. *Immunotechnology* 1995 December;1(3-4):157-68.
- (103) Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, Bamford S, Chin-Yee I, Keeney M. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007 May;72(3):167-77.
- (104) Takahashi M, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T, Ueda E, Kitani T, Medof ME, Kinoshita T. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1993 February 1;177(2):517-21.
- (105) Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993 May 21;73(4):703-11.
- (106) Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* 2006 December;86(12):1203-7.
- (107) Tchirkov A, Lansdorp PM. Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* 2003 February 1;12(3):227-32.
- (108) Tichelli A, Gratwohl A, Wursch A, Nissen C, Speck B. Late haematological complications in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1988 July;69(3):413-8.

- (109) Tommerup H, Dousmanis A, de LT. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* 1994 September;14(9):5777-85.
- (110) Tremml G, Dominguez C, Rosti V, Zhang Z, Pandolfi PP, Keller P, Bessler M. Increased sensitivity to complement and a decreased red blood cell life span in mice mosaic for a nonfunctional Piga gene. *Blood* 1999 November 1;94(9):2945-54.
- (111) Tsitrin Y, Morton CJ, el-Bez C, Paumard P, Velluz MC, Adrian M, Dubochet J, Parker MW, Lanzavecchia S, van der Goot FG. Conversion of a transmembrane to a water-soluble protein complex by a single point mutation. *Nat Struct Biol* 2002 October;9(10):729-33.
- (112) Vickers M, Brown GC, Cologne JB, Kyoizumi S. Modelling haemopoietic stem cell division by analysis of mutant red cells. *Br J Haematol* 2000 July;110(1):54-62.
- (113) Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 2001 September 27a;413(6854):432-5.
- (114) Vulliamy TJ, Knight SW, Mason PJ, Dokal I. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis* 2001 Marchb;27(2):353-7.
- (115) Ware R, Heeney M, Pickens C, DeCastro C, Howard T. A multi-step model for the pathogenesis and evolution of PNH. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders Molecular Aspects of Pathogenesis* (eds Omine, M & Kinoshita, T) , 41-53. 2003. Tokyo, Springer-Verlag.
- (116) Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972 October 18;239(94):197-201.
- (117) Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999 May 17;232(1):97-106.
- (118) Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996;18(2):173-9.
- (119) Young NS. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. *Blood* 1992 March 15;79(6):1385-92.
- (120) Young NS. Pathophysiologic mechanisms in acquired aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;72-7.

- (121) Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. Science 1995 December 8;270(5242):1601-7.

8 Eigene Veröffentlichungen

8.1 Publikationen

“Telomere length analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry (Flow-FISH)”

U. Hartmann, **F. Beier**, T. H. Brümmendorf
J Lab Med, 2004;28(4):307-316

“Accelerated telomere shortening in GPI- negative as compared to GPI positive granulocytes from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria (PNH) detected by proaerolysin flow-FISH”

F. Beier, S. Balabanov, T. Buckley, K. Dietz, U. Hartmann, M. Rojewski, L. Kanz, H. Schrezenmeier, T.H. Brümmendorf
Blood, Jul 2005; 106(2): 531-3

„Units of analysis in accelerated telomere shortening in glycosylphosphatidylinositol (GPI)-negative compared with GPI-positive granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) detected by proaerolysin flow-FISH“

A. Stark, D. Schultz, K. Dietz, **F. Beier**, S. Balabanov, H. Schrezenmeier, T.H. Brümmendorf
Blood, Nov 2006; 108: 3620 (response letter)

“Telomere length analysis in monocytes and lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) using multi-color flow-FISH”

F. Beier, S. Balabanov, C.C. Amberger, U. Hartmann, K. Manger, K. Dietz, I. Kötter, T. H. Brümmendorf
Lupus 2007 16: 955- 62

8.2 Vorträge

Proaerolysin Multi Color Flow-FISH reveals shortened telomere length in GPI- as compared to GPI+ granulocytes from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria”

Gehalten auf dem „3rd European Telomerase Meeting“ in Ladenburg, 23. November 2004

„Proaerolysin Multi Color Flow-FISH reveals shortened telomere length in GPI- as compared to GPI+ granulocytes from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria”

Gehalten auf dem Jahreskongress der „American Society of Hematology (ASH)“ in San Diego, 5. Dezember 2004

8.3 Posterpräsentationen

“Proaerolysin Multi Color Flow-FISH reveals shortened telomere length in GPI- as compared to GPI+ granulocytes from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria”

Präsentiert auf dem Jahreskongress der “Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie“ (DGHO) in Innsbruck am 2. Oktober 2004

“Accelerated telomere shortening in GPI-negative as compared to GPI-positive Granulocytes from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria (PNH) detected by proaerlysin flow-FISH”

Präsentiert auf dem Jahreskongress der “International Society of Experimental Hematology” (ISEH) in Glasgow am 2. August 2005

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof Dr. Tim Brümmendorf für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas, sowie für die wissenschaftliche Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit. Weiter möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof Dr. Tim Brümmendorf für seine außergewöhnlich engagierte Betreuung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und das Vertrauen, das er in mich in all der Zeit gesetzt hat, bedanken. Ohne seine jederzeit gewährte Unterstützung wäre so vieles nicht für mich möglich gewesen.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe in Tübingen und Hamburg für die sehr gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Patrick Ziegler, Herrn Dr. Dr. Stefan Balabanov und Frau Dr. Ulrike Hartmann bedanken, die mir immer bei allen Problem hilfreich zur Seite standen. Bei Frau Alexandra Wahl möchte ich mich für die ausgezeichnete Vorarbeit zur Etablierung der für diese Arbeit neu entwickelten Methode bedanken. Frau Bettina Kirchner und Frau Iris Schäfer möchte ich sehr herzlich für die ständige Hilfsbereitschaft und das exzellente Einarbeiten danken.

Herrn Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier und Herrn Dr. Markus Rojewski danke ich für die Überlassung der PNH Proben und ihre konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Buckley danke ich für die freundliche Überlassung des Proaerolysins und seine konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Dietz danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den statistischen Berechnungen für diese Arbeit und für die immer aufgebrachte Geduld.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Bruder Dr. med. Christoph Beier. Er war immer ein Vorbild für mich und stand mir mein ganzes Leben lang immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken. Einfach nur Danke für alles.

Ich danke Frau Beatriz Talaván Paniaqua. Was ich schreiben sollte, würde den Rahmen sprengen, aber ich glaube Du weißt es.

Allen Hardtern danke ich herzlich für alles, was sie in den letzten 26 Jahren für mich getan haben. Es gibt nirgendwo auf der Welt solche Freunde. Weiter möchte ich allen meinen Komilitonen, ehemaligen Mitbewohnern und allen, die ich nicht erwähnt habe, für das angenehme Umfeld und die Unterstützung in den letzten Jahren danken.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Fabian Johannes Alfred Beier
Geburtsdatum 03.10.1979
Geburtsort Filderstadt

Schullaufbahn

1986 - 1990 Friedrich-Glück-Grundschule Nürtingen
1990 -1999 Max-Planck-Gymnasium Nürtingen

Zivildienst

08/1999 – 07/2000 Institut für Klinische Chemie, Universität Ulm

Medizinische Ausbildung

10/2000 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-
Universtät Tübingen
08/2002 Physikum (Note: gut / 2.0)
09/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut / 2.0)
09/2004 – 02/2005 Auslandssemester an der Universität Besançon,
Frankreich
04/2006 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut /1.6)
04/ 2006 – 03/2007 Praktisches Jahr in Tübingen und der Universität von
Alcalá de Henares, Spanien
05.06.2007 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr
gut/1.0) und Abschluss des Medizinstudiums mit sehr
gut (Note: 1.49)
Seit 10/2008 Assistenzarzt in der Hämatologie/Onkologie der
Universität Regensburg

Studienbegleitende Tätigkeiten

10/2000 – 04/2006 25% Stelle als studentischer Pflegehelfer in der
Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen

Sprachen

Englisch, Spanisch, Französisch: gute Kenntnisse in Schrift und Sprache