

Mobilization-based transplantation of young-donor hematopoietic stem cells extends lifespan in mice

Michael J. Guderyon et al., 2020

DOI:10.1111/accel.13110

Präsentiert von: Fatemeh Hefzolsehhe

Einführung

Material und Methoden

Ergebnisse

Diskussion

Einführung

Was sind Stammzellen?

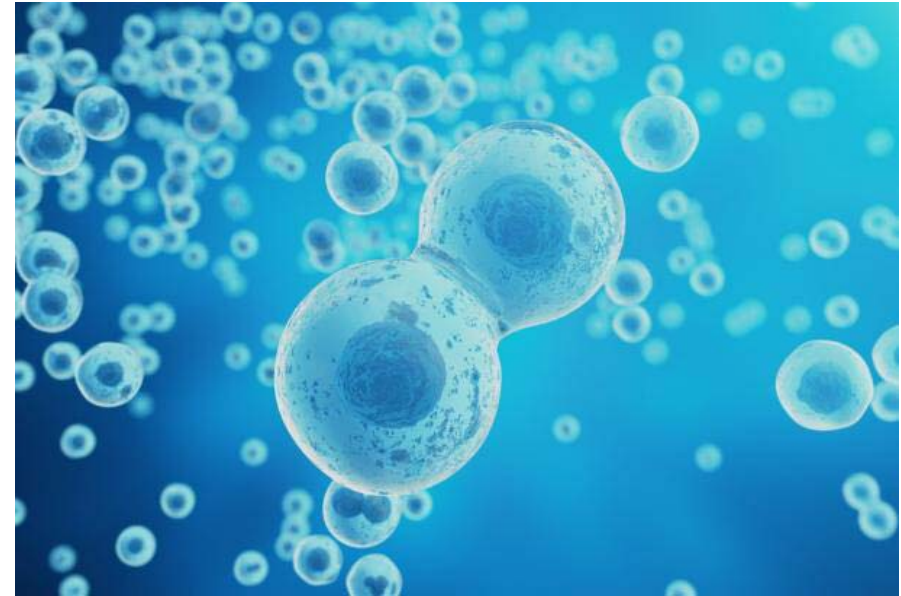
Alle Zellen im Körper—> Umwandlung in verschiedene Zelltypen oder Formen von Gewebe

Aufgaben

- Blutkörperchen Produktion
- Erneuerung verletzter Geweben

Arten von Stammzellen

- Embryonale Stammzellen
- Adulte Stammzellen

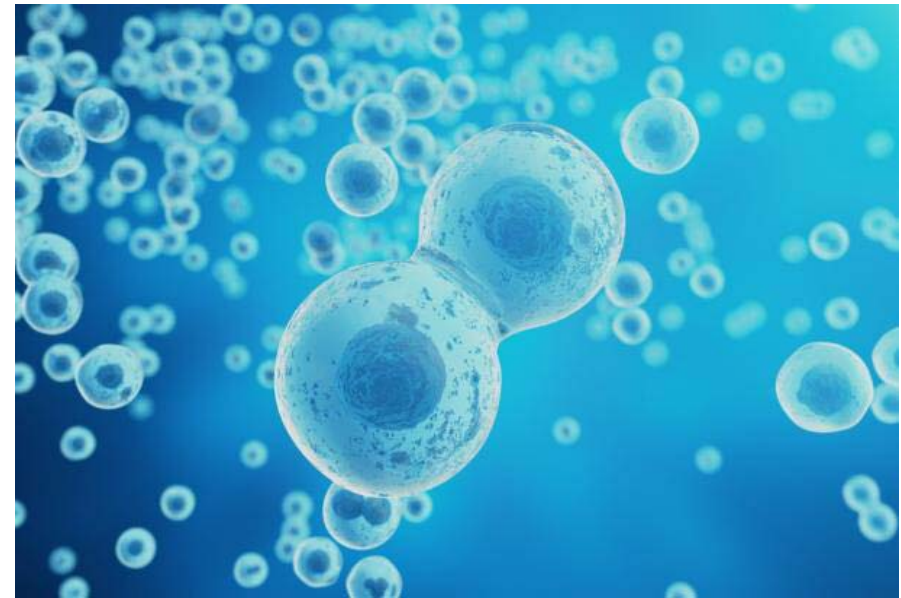


Stammzellen und Stammzelltherapie

- **Seit 1970**
 - Adulte Stammzellen zur Behandlung von Blutsystem betroffenen Krankheiten —> **Leukämie**
 - Behandlung anderer Krankheiten
 - > Lymphomen
 - > Multiplen Myeloma
- **Zurzeit Forschung in vielen Bereichen**

Fokuspunkt: Gehirn und Nerven

 - > Alzheimer
 - > Demenz
 - > Parkinson

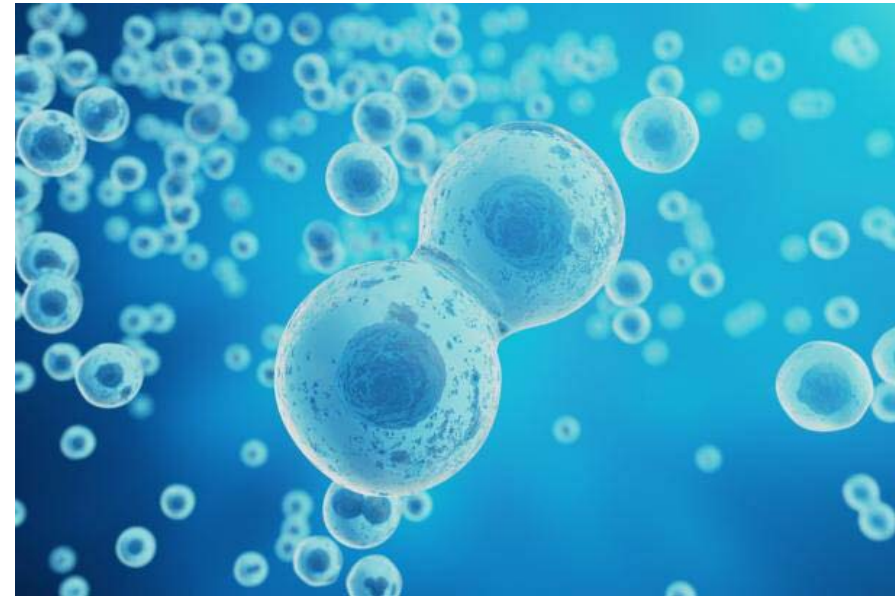


Stammzellen und Stammzelltherapie

- Zunehmendes Alter —> altersabhängige Mortalität
- Therapie —> Transplantation von jungen HZS

Konventionelle hämatopoetische Stammzelltherapie

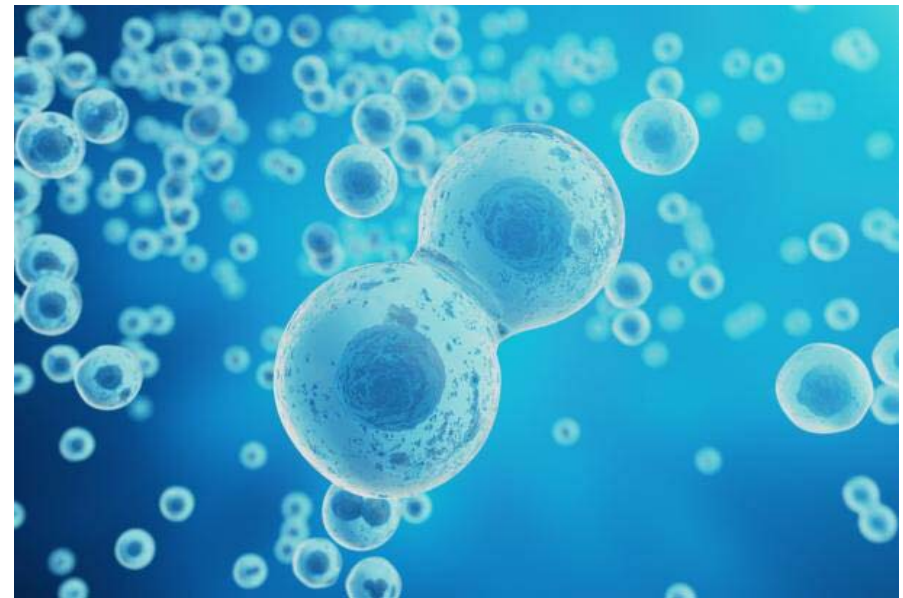
- starke zytotoxische Behandlungen
- Knochenmarksnische Veränderungen
- Schädigung der Knochenmark Struktur



Stammzellen und Stammzelltherapie

Neues HSZT Verfahren

- Meistens —> in spezifischen Nischen in Knochenmark
- 1 bis 5% —> tägliche Wanderung in die Blutbahn
- G-CSF (Granulozyten-Kolonie-Stimulierende Faktor) + Plerixafor (AMD3100)
—> Stimulierung HZ Mobilisierung
- Diese Studie neue Methode, G-CSF basierte Mobilisierung von Stammzellen statt konventioneller zytotoxischen Behandlungen



Stammzellen und Stammzelltherapie

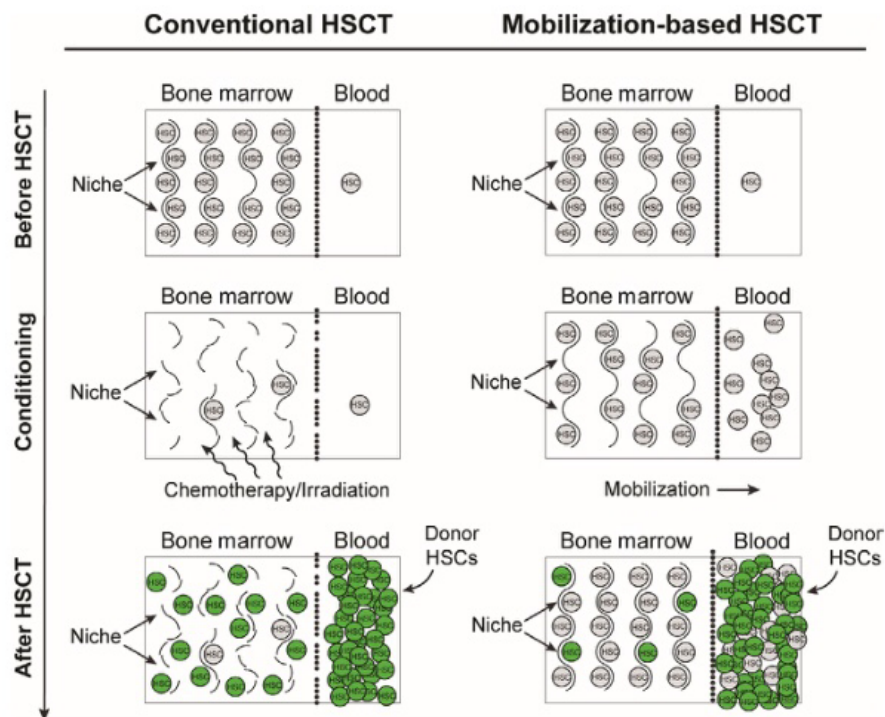


FIGURE 5 Schematic illustration comparing mechanisms between conventional and mobilization-based hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). First column depicts conventional HSCT following irradiation or chemotherapeutic conditioning, allowing noncompetitive engraftment of donor hematopoietic stem cells (HSCs), but significant damage to the stroma. Second column depicts HSCT following mobilization-based conditioning, allowing infusion of superior donor HSC populations to out-compete endogenous cells for limited niche spaces, while preserving the stroma

Material und Methoden

Mäusen

- C57BL/6J, GFP⁻
- C57BL/6J, GFP⁺

Standarder Haltungsbedingungen

12 St. Licht/ 12 St. Dunkelheit

20-22 °C

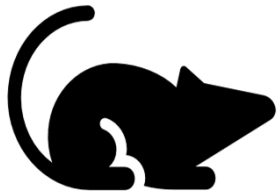
Fütterung ad libitum

Frisches Wasser

Käfigreinigung

Spender zu Empfänger Ratio → 2:1

HSZ Mobilisierung-basierte Konditionierung



Weibliche → 2 oder 19 Monate alt



G-CSF intraperitoneal Verabreichung (125 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
AMD3100 subkutane Injektion (5 mg/kg)

G-CSF Verabreichung jede 12 St. → 4 nacheinanderfolgende Tage vor der Transplantation
AMD3100 Verabreichung 14 St. nach letzter G-CSF Injektion und 1 St. vor der T.

HSZ Mobilisierung-basierte Konditionierung

Wiederholung einmal jede 2 Woche

—> Langlebigkeit Untersuchungen: 8 Transplantationszyklus

—> Peripheres Blut und Knochenmark Analyse : einmalige Transplantation



HSZT Effizienz

Anteil von Spender SZ (GFP⁺) gegen gesamte WBZ
Durchflusszytometrie

Bestrahlung-basierte Konditionierung



Bestrahlungsstärke
1,050 cGy
(~80 cGY/Min)



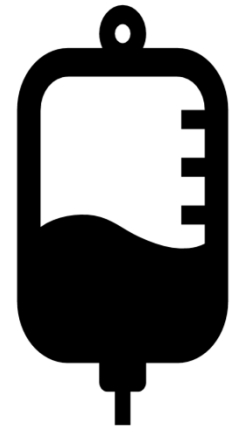
1,0 mg/ml Gentamicin in Trinkwasser: eine Woche
vor der Bestrahlung bis 4 Wochen nach T.



Spender: 8 Wochen alt (weiblich)
(GFP⁺) lineage-negative Zellen (Stammzellen): $(5,0 \times 10^6)$

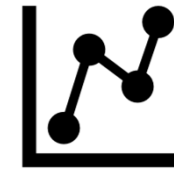
Stammzellentnahme

- Am Tag der Transplantation wurden Spendermäusen durch Genikbruch eingeschläfert
- Knochenmarkzellen Entnahme von **Schienbeine, Oberschenkel, Oberarmen und Hüftknochen**
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) + 0,5% Heparin
- Auflösung rote Blutkörperchen durch Lysine
- Zentrifugierung
- Isolierung lineage-negative Zellen (SZ) durch **Cell Depletion Kit**



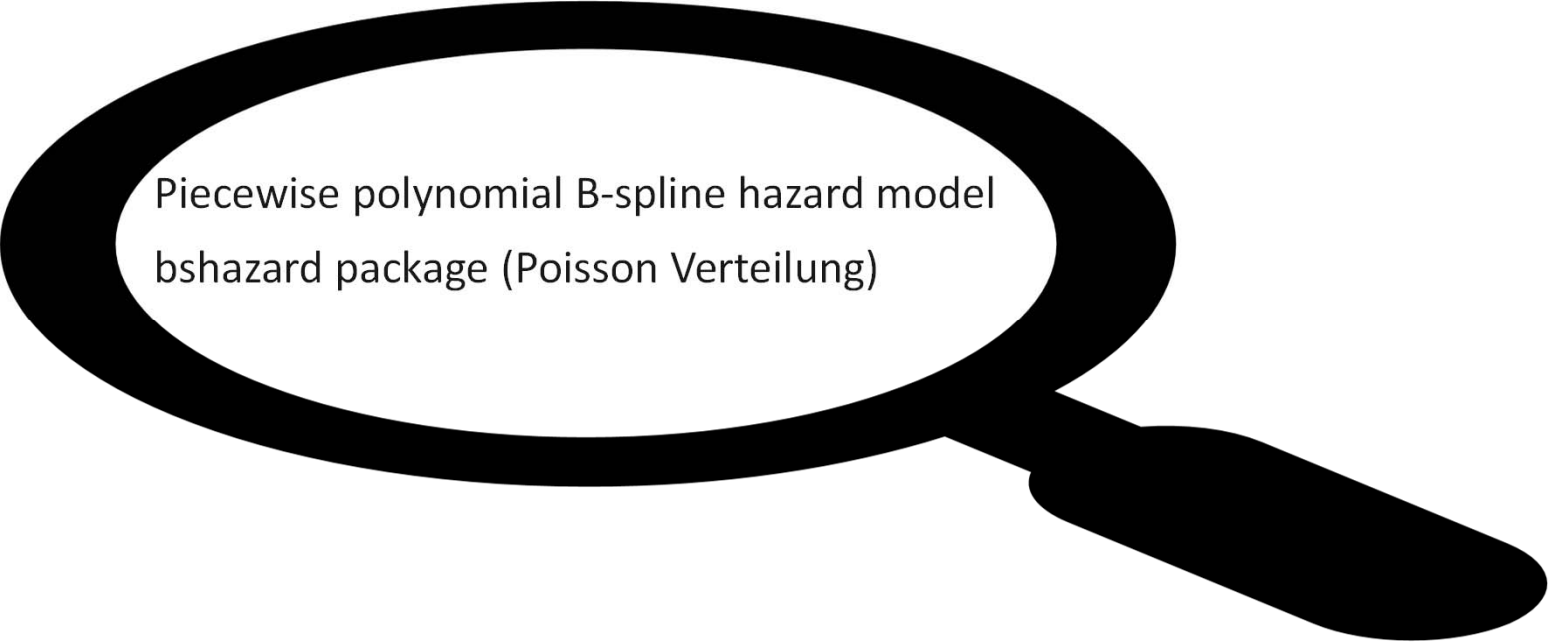
Langlebigkeit Bestimmung

- Langlebigkeit Bewertung —> 2 Wochen nach Ankommen der Mäuse ans Institut
- Kontrolle: 2 Mal täglich zur Bestimmung Todesart und Todeszeitpunkt
- 6 klinische Symptome als akut Moribund
 1. Starke Trägheit
 2. Starke Gleichgewichtsstörungen
 3. Starke Gangstörung
 4. Schnelle Gewichtsverlust innerhalb einer Woche oder mehr
 5. Geeiterte Tumor
 6. Blutige Tumor
- **Natürliche Lebensdauer** —> Das Alter, an das eine moribunde Maus eingeschlüpfert wird



- **Kaplan-Meier** Analyse zur Überlebenskurven Darstellung
- Überlebenskurven Vergleich durch **log-Rank Test**

Altersspezifische Mortalität




Piecewise polynomial B-spline hazard model
bshazard package (Poisson Verteilung)

Poisson Verteilung:

Eine Wahrscheinlichkeitsverteilung, mit der die Anzahl von Ergebnissen, die unabhängig voneinander in einem festen Zeitintervall oder räumlichen Gebiet eintreten, modelliert werden kann

altersabhängige gesundheitliche Defizite

- 26 Monate alt (weiblich) 

- 31 potenzielle Defizite

- Defizitakkumulationsindex (DAI)

Note 0: keine Symptome
Note 0,5: milde Symptome
Note 1: starke Defizit

(DAI) Bestimmung für jede einzelne Maus: Diese (DAI) Noten wurden addiert und dividiert durch die Anzahl von gesamten Defiziten

Futteraufnahme Assessment


19 Monate alt (weiblich)



Durchschnittliche Futteraufnahme—> monatlich
Differenz zwischen Futtermasse am Anfang des Tages und Restfutter
nach 24 St. dividiert durch die Anzahl von Mäusen pro Käfig

Messung des Futters durch [CS200 Compact Scale \(Ohaus\)](#)

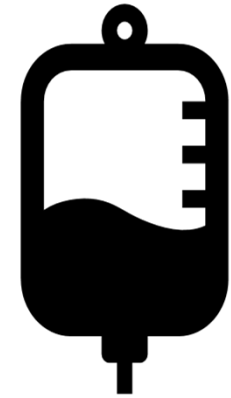
Körpergewicht Assessment

19 Monate alt (weiblich) 

Assessment: Monatlich (gleicher Zeitpunkt) für jede Gruppe
Individuelle Messung von jedem Mess mit [CS200 Compact Scale \(Ohaus\)](#)

Peripheres Blut Analyse

- 40 µl Blutprobe von Schwanzvene von Mäusen
- Mikrozentrifugengefäß—> 40 µl Durchflusspuffer (PBS+ 2,0% FBS: Fötalen Rinderserum) und Heparin —> 3:1
- Auflösung von roten Blutkörperchen durch Lysine
- Inkubation (Färbung) von Blutproben mit Fc-Rezeptor Blockern spezifisch für Mäusen CD16/32 und geeigneten Antikörpern (1:1000 Verdünnungsrate) auf das Eis für 20 Min.
- Zentrifugiert
- Resuspendiert
- Sofortige Filtrationen
- Durchflusszytometrie Analyse



Hämatopoetische Vorläuferzellen Analyse

- Knochenmark Sammlung von **Schienbeine, Oberschenkel, Oberarmen und Hüftknochen**
- Auflösung von roten Blutkörperchen durch Lysine
- Isolation lineage-negative Zellen (SZ) durch **Cell Depletion Kit**
- Bestimmung des Anteils von Vorläuferzellen: Inkubation (Färbung) von lineage-negative Zellen (SZ) mit Fc-Rezeptor Blockern spezifisch für Mäusen CD16/32 (BD Pharmingen TM) und geeigneten Antikörpern auf das Eis für 20 Min.
- Zentrifugiert
- Resuspendiert in Durchfluspuffer (PBS+ 2,0% FBS: Fötalen Rinderserum)
- Sofortige Filtrationen durch 40 µm Maschengröße Filter
- Durchflusszytometrie Analyse

Ergebnisse

Zunehmender Anteil von HSZ von Spender nach Mobilisierung-basierte Transplantation

TABLE 1 Mobilization-based hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)

Transplantation cycles (n)	Replacement result (%)	
	1 month post-HSCT	4 months post-HSCT
1	26.9 ± 4.9	25.9 ± 7.9
2	36.8 ± 5.3	36.6 ± 4.1
3	48.9 ± 4.0	42.2 ± 4.0
4	61.9 ± 5.5	50.0 ± 1.9
5	69.1 ± 4.6	56.8 ± 7.1
6	80.2 ± 2.6	68.1 ± 9.3
7	90.4 ± 2.9	76.6 ± 7.0

Note: N = 3/group. Variance = standard deviation of the mean. No animals were excluded from study.

Ergebnisse

Positiver Einfluss von Mobilisierung-basierte HSZT von jungen Spendern auf Langlebigkeit und Mortalität von alten Empfängern

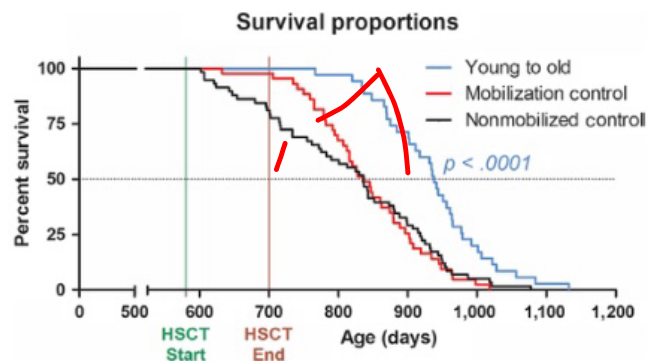
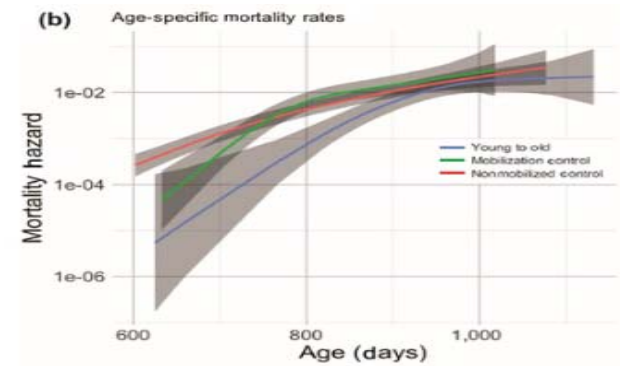
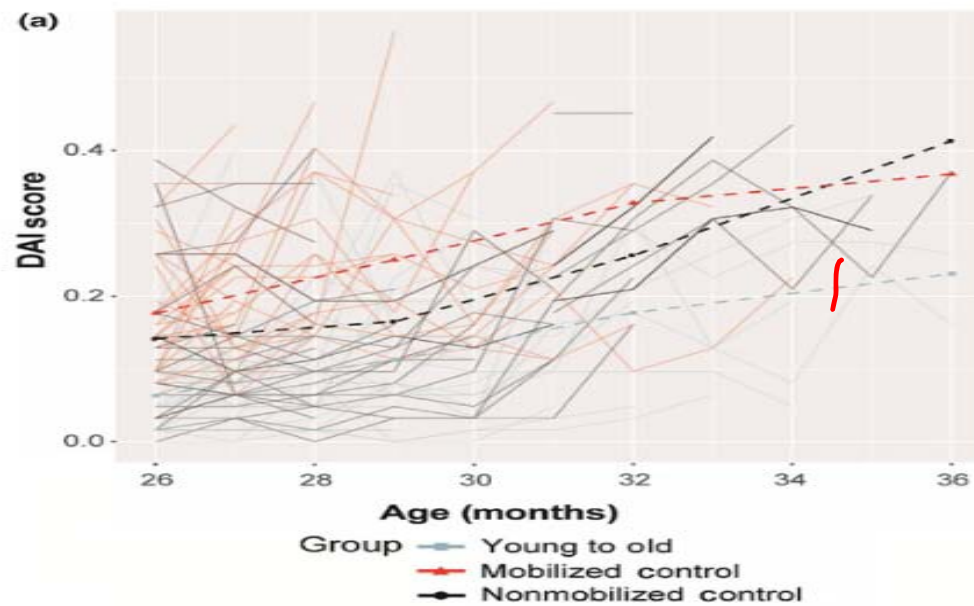


FIGURE 1 Young-donor hematopoietic stem cells (HSCs) extend the lifespan of aged female recipients. Survival of wild-type, female mice (19-month-old) receiving mobilization-based conditioning followed by infusion of either young-donor (2-month-old) HSCs (young to old, blue) or PBS (mobilized control, red) were compared with aged, wild-type, female nonmobilized control (black). young to old, $N = 42$; mobilized control, $N = 44$; nonmobilized control, $N = 58$



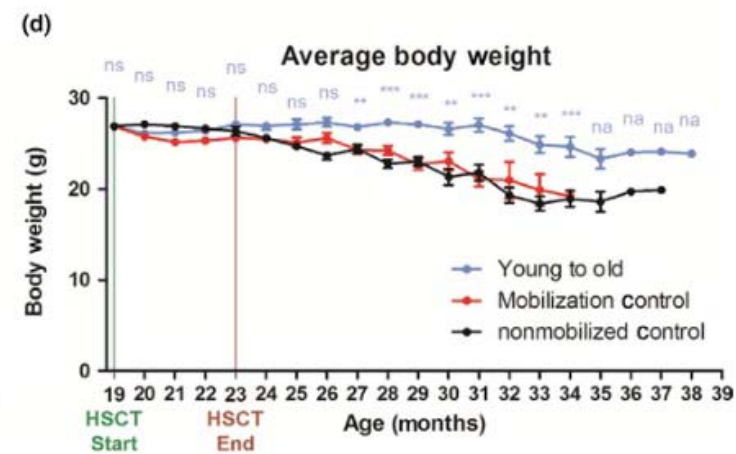
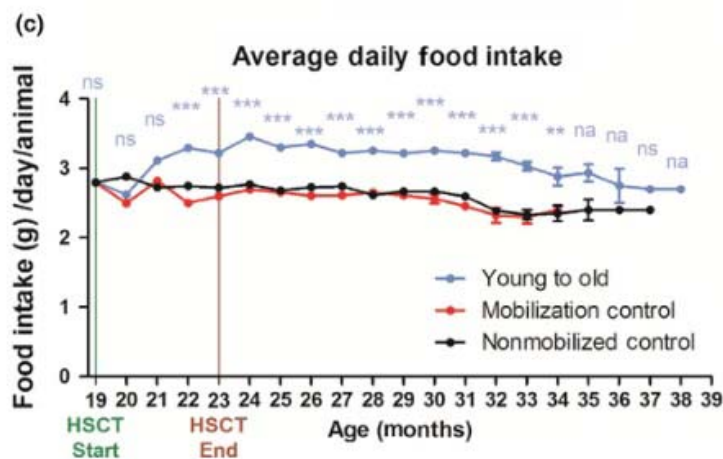
Ergebnisse

Positiver Einfluss von HSZT von jungen Spendern auf Gesundheitszustand von alten Empfängern



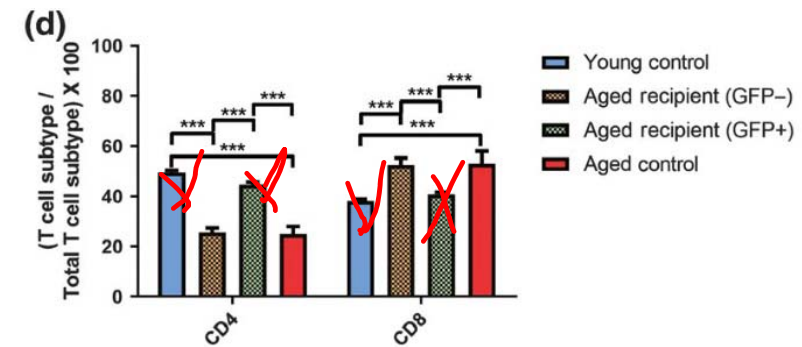
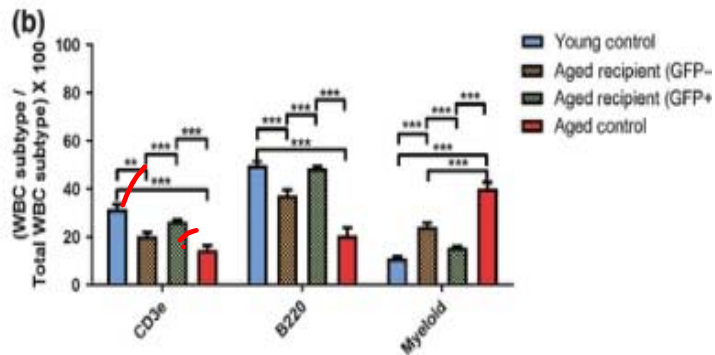
Ergebnisse

Positiver Einfluss von HSZT von jungen Spendern auf Gesundheitszustand von alten Empfängern



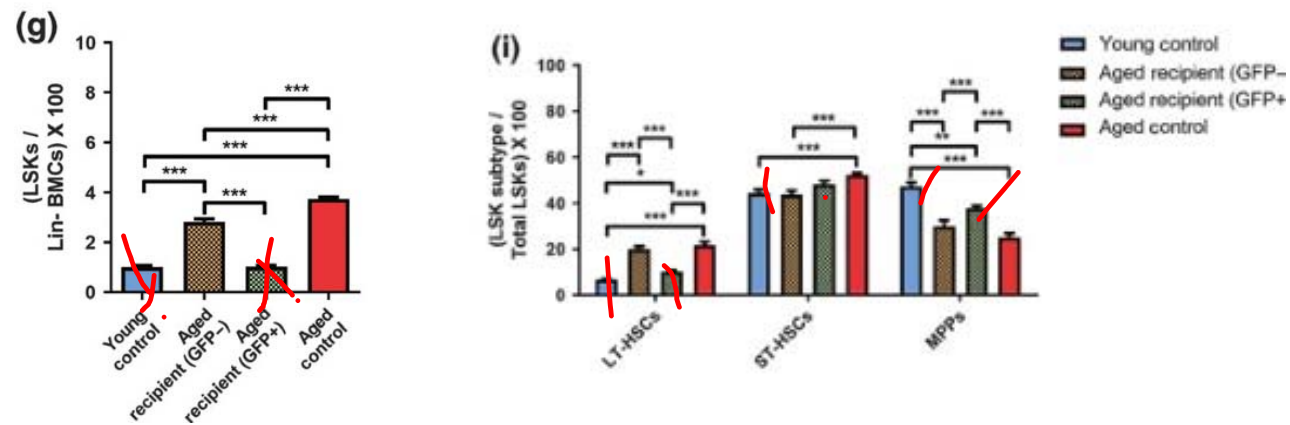
Ergebnisse

Verbesserung altersabhängige myeloische Abstammungsverzerrung durch HSZT von Jungen Spendern



Ergebnisse

Positiver Einfluss von HSZT von jungen Spendern auf LKS-Zellen (Stammzellen) Verteilung von alten Empfängern



Ergebnisse

Die Bemerkenswerte Ergebnisse von dieser Studie war:

- Zunehmende Langlebigkeit
- Verringerung der Körperschwäche
- Verbesserte Futterraufnahme und gleichbleibendes Körpergewicht

Diskussion

- Erste erfolgreiche HSZ Transplantation durch Mobilisierung- basierte Verfahren bei geringeren Nebenwirkungen; keine rasante Gewichtsabnahme und bessere Überlebensrate
 - Keine besondere Behandlungen erforderlich (Antibiotika, regelmäßiger Käfigwechsel) für die Empfängern bei Mobilisierung-basierte Transplantation
 - Geringere Toxizität durch Elimination von Bestrahlungen und Chemotherapie
 - Erste Studie bei höherer Lebensdauer und höherem gesundheitlichen Zustand
- > geringere altersabhängige Krankheitssymptome
- > Zunehmende Futteraufnahme und gleichbleibendes Körpergewicht

Diskussion

- Es wurde vermutet, dass dieser gute gesundheitliche Zustand durch den Gleichgewicht bei Zellproduktion nach Mobilisierung-basierter Transplantation
—> geringere myeloische Zellen Produktion und geringere deren Beitrag in weißen Blutkörperchen Population —> Minderung die Immunoseneszenz Symptome
- Zellabstammung Analyse zeigte, dass junge HSZ von jungen Spendern ihre Jugendliche phänotypische Verteilung und Funktion auch im Knochenmark von alten Empfängern bewahren
- Ein Kritiker an dieser Studie —> Anwendung nur weiblicher Mäusen
- ✓ Weil bei Männlichen einige Interventionen auswirken, daher wurde nur weibliche Mäusen genutzt, da könnte bei weiblichen eine Auswirkung auf Lebensdauer aussagekräftiger definiert werden

Zusammenfassung

Zusammengefasst

Zusammengefasst —> Mobilisierung-basierte HSZT. —> bietet eine gute Möglichkeit für weitere Untersuchungen auf HSZ-Nische Interaktionen an

Dieser Beweis, dass der Gesundheitszustand und die Lebensdauer von Säugetieren durch Stammzelltherapie positiv beeinflusst wird, könnte als ein neues und erfolgreiches Denken für die Anti-Aging Studien im Vordergrund stehen

Literaturverzeichnis

- Austad,S.N.,&Bartke,A.(2015).Sexdifferencesinlongevityandin responsestoanti-aginginterventions:Amini-review.Gerontology,62, 40–46.<https://doi.org/10.1159/000381472>
- Benz,C.,Copley,M.R.,Kent,D.G.,Wohrer,S.,Cortes,A.,Aghaeepour, N.,...Eaves,C.J.(2012).Hematopoieticstemcellsubtypesexpand differentiallyduringdevelopmentanddisplaydistinctlymphopoietic programs. *Cell Stem Cell*,10,273–283.<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.007>
- Bhattacharya,D.,Czechowicz,A.,Ooi,A.G.,Rossi,D.J.,Bryder,D.,& Weissman,I.L.(2009).Nicherecyclingthroughdivision-independent egressofhematopoieticstemcells.*Journal of Experimental Medicine*, 206,2837–2850. Brown,K.,Xie,S.,Qiu,X.,Mohrin,M.,Shin,J.,Liu,Y.,...Chen,D.(2013). SIRT3reversesaging-associateddegeneration.*Cell Reports*,3,319327. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.005>
- Chang,J.,Wang,Y.,Shao,L.,Laberge,R.M.,Demaria,M.,Campisi,J.,... Zhou,D.(2016).ClearanceofsenescentcellsbyABT263rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*,22,78–83.
- Chen,C.,Liu,Y.,Liu,Y.,&Zheng,P.(2009).mTORregulationandtherapeuticrejuvenationofaginghematopoieticstemcells.*Science Signalling*,2,ra75.<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000559>
- Cheng,C.W.,Adams,G.B.,Perin,L.,Wei,M.,Zhou,X.,Lam,B.S.,... Longo,V.D.(2014).ProlongedfastingreducesIGF-1/PKAtopromote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression. *Cell Stem Cell*,14,810–823.<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.014>
- Chhabra,A.,Ring,A.M.,Weiskopf,K.,Schnorr,P.J.,Gordon,S.,Le,A. C.,...Shizuru,J.A.(2016)Hematopoieticstemcelltransplantationin immunocompetent hosts without radiation or chemotherapy. *Science Translational Medicine*,8(351),351ra105. Clegg,A.,Young,J.,Iliffe,S.,Rikkert,M.O.,&Rockwood,K.(2013).Frailty in elderly people. *Lancet*,381,752–762.[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62167-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62167-9)
- Daley,G.Q.,&Scadden,D.T.(2008).Prospectsforstemcell-basedtherapy. *Cell*,132,544–548.<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.009>
- Das,M.M.,Godoy,M.,Chen,S.,Moser,V.A.,Avalos,P.,Roxas,K.M., ...Goodridge,H.S.(2019).Youngbonemarrowtransplantationpreserves learning and memory in old mice. *Communications Biology*,2, 73.
- deHaan,G.,&VanZant,G.(1997).Intrinsicandextrinsiccontrolofhemopoieticstemcellnumbers:Mappingofastemcellgene.*Journal of Experimental Medicine*,186,529–536. Dorshkind,K.,Montecino-Rodriguez,E.,&Signer,R.A.(2009).Theageingimmunesystem:Isitevertoooldtobecomeyoungagain?*Nature Reviews Immunology*,9,57–62.<https://doi.org/10.1038/nri2471>
- Duran-Struuck,R.,&Dysko,R.C.(2009).Principlesofbonemarrow transplantation(BMT):Providingoptimalveterinaryandhusbandry caretoirradiatedmiceinBMTstudies.*Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*,48,11–22. Dykstra,B.,Kent,D.,Bowie,M.,McCaffrey,L.,Hamilton,M.,Lyons,K., ...Eaves,C.(2007).Long-termpropagationofdistincthematopoietic differentiationprogramsinvivo.*Cell Stem Cell*,1,218–229.<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015>
- Florian,M.C.,Dorr,K.,Nebel,A.,Daria,D.,Schrezenmeier,H.,Rojewski, M.,...Geiger,H.(2012).Cdc42activityregulateshematopoieticstem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*,10,520–530.<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.007>
- Florian,M.C.,Nattamai,K.J.,Dorr,K.,Marka,G.,Uberle,B.,Vas,V.,... Geiger,H.(2013).Acanonicaltonon-canonicalWntsignallingswitch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature*,503,392–396.<https://doi.org/10.1038/nature12631>
- Fontana,L.,Kennedy,B.K.,Longo,V.D.,Seals,D.,&Melov,S.(2014). Medicalresearch:Treatageing.*Nature*,511,405–407.<https://doi.org/10.1038/511405a>

.....
.....
.....

Vielen Dank!
