



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Perner

und dem Institut für systemische Entzündungsforschung

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

***In vitro*-Generierung von Erythrozyten aus adulten Stammzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

Vorgelegt von

Dipl.-Biol. Pamela Lazar-Karsten

aus Teheran/Iran

Lübeck 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hauke Busch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.01.2020

–Promotionskommission der Sektion Medizin–

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	7
2. Einleitung	12
2.1 Hämatopoese.....	12
2.2 Die hämatopetische Nische.....	15
2.3 Erythropoese.....	16
2.4 In vitro Differenzierung CD34 ⁺ Zellen zur Erythropoese.....	19
2.5 Das Gen TAL1.....	20
2.6 Das Gen CLCN3.....	21
2.7 Mesenchymale Stammzellen.....	22
3. Zielsetzung	24
4. Material	25
4.1 Chemikalien Kulturmedien und Geräte.....	25
4.1.1 Verwendete Chemikalien.....	25
4.1.2 Antikörper.....	26
4.1.3 Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze.....	27
4.1.4 Verwendete Geräte.....	28
4.2 Laborbedarf.....	29
4.3 Primer, Sonden und Oligonukleotide.....	30
4.3.1 Verwendete Primer-Sondengemische für <i>real time</i> RT-PCR.....	30
4.3.2 Größenstandards.....	31
4.4 Lösungen, Kits und Reagenzien.....	31
4.4.1 Lösungen und Kits.....	31
4.4.2 Reagenzien für die Transfektion.....	31
4.5 Puffer.....	32
4.6 Kulturmedien.....	32
4.7 Färbelösungen.....	34

4.8 Zellkultur	34
4.8.1 Humane hämatopoetische Stammzellen	34
4.8.2 Humane MSCs	35
5. Methoden.....	36
5.1 Zellkulturtechniken.....	36
5.2 Isolierung von humanen CD34 ⁺ Zellen	36
5.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	36
5.2.2 Magnetische Zellaufreinigung CD 34 ⁺ Zellen	36
5.2.3 Reinheitsmessung und Zellzahlbestimmung am Durchflusszytometer	37
5.3 Kultur von humanen hämatopoetischen Stammzellen	37
5.4 Immunphänotypisierung der erythropoetischen Zellentwicklung.....	37
5.5 Morphologische Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung mittels Durchflusszytometrie	38
5.5.1 Färbung	38
5.5.1.1 Neutrale Benzidin-Färbung.....	39
5.5.5.2 Färbung nach Pappenheim.....	39
5.5.2 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl am Mikroskop	40
5.6 Kokultivierung mit MSCs	40
5.6.1 Charakterisierung der MSC.....	40
5.6.2 Erstellung der MSC-Matrices	41
5.6.3 Kokultivierung der CD34 ⁺ Zellen mit den MSCs.....	41
5.7 Nukleinsäure-Standardtechniken.....	41
5.7.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren	41
5.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
5.7.3 cDNA-Synthese von Gesamt-RNA.....	42
5.8 Microarray-Analysen.....	42
5.8.1 Auswertung der Arrays	43

5.8.2	Bioinformatische Datenanalyse der Microarrays.....	43
5.8.2.1	<i>Clustering</i> -Analyse.....	43
5.8.2.2	Diskriminatorische Genanalyse.....	43
5.9	<i>real-time</i> RT-PCR-Analyse.....	44
5.9.1	<i>real time</i> RT-PCR zur relativen Quantifizierung von Zielsequenzen.....	46
5.9.2	Vergleichende CT-Methode ($\Delta\Delta$ CT-Methode).....	48
5.9.3	Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	48
5.10	RNA-Interferenz.....	49
5.10.1	Einschleusung der siRNA mittels Nucleofektion.....	50
5.11	Proteinarray-Analysen.....	51
5.12	Durchföhrung von Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA).....	52
5.13	Statistik.....	52
6.	Ergebnisse	53
6.1	2-Phasen- und 3-Phasen-Kultur der Erythropoese.....	54
6.1.1	Proliferationsvergleich.....	54
6.1.2	Koexpression der spezifischen Oberflächenmarker.....	55
6.1.3	Untersuchung der Zellmorphologie und -differenzierung.....	59
6.2	Kokultivierung der Erythropoese mit MSCs.....	62
6.2.1	Untersuchung der Vitalität und der Proliferation in Kokultur-Modellen.....	63
6.2.2	Koexpression der spezifischen Oberflächenmarker in den Kokulturen.....	65
6.2.3	Untersuchung der Zellmorphologie und -differenzierung.....	68
6.2.4	Untersuchung der Zytokinsezernierung der Kokultur-Versuche.....	70
6.3	Microarray-Analysen in der 3-Phasen-Erythropoese-Kultur.....	72
6.3.1	Microarray-Analysen der erythropoetischen mRNA.....	73
6.3.1.1	<i>Cluster</i> analyse der gefilterten Datensätze.....	73
6.3.1.2	Diskriminatorische Genanalyse.....	84
6.4	siRNA-Transfektion und Hemmung von zwei Genen aus der Reihe der	

charakteristischen Genanalyse.....	89
6.4.1 Differenzierung und Reifung der mit siRNA behandelten Zellen in der Flüssigkultur.....	95
7. Diskussion	104
7.1 In vitro Erythropoese	105
7.2 Transkriptomanalyse	111
7.3 <i>Clustering</i> -Analyse.....	111
7.4 Diskriminatorische Genanalyse und SAM-Algorithmus	116
7.5 siRNA Transfektion primärer hämatopoetischer Stammzellen	117
8. Zusammenfassung	119
9. Literaturverzeichnis	120
10. Anhang.....	132
10.1 Publikationen.....	132
10.2 Ethikvotum.....	134
10.3 Danksagung.....	135
10.4 Lebenslauf.....	134
10.5 Erklärungen.....	136

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aq. dest.	aqua destillata
BCL-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BFU-E	<i>burst forming unit- erythroid</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of designation/differentiation</i>
cDNA	Komplementär-DNS (<i>complementary DNA</i>)
CFU-E	<i>colony forming unit- erythrocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit- granulocyte/macrophage</i>
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
Ct	Zyklus-Schwellenwert (cycle threshold)
CY5	Cytochrom 5
CY7	Cytochrom 7
d	Tag (<i>day</i>)
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbeco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxyuridintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetin-Rezeptor
et al.	„et alii“ (und andere)
FAM	6-Carboxy-Fluorescein; fluoreszenter Farbstoff
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLT3-L	Fms-like tyrosin kinase 3-ligand
× g	-fache Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GATA	Transkriptionsfaktor, benannt nach Bindemotiv WGATAR
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPA	Glycophorin A
HCl	Salzsäure
HLH	<i>Helix-Loop-Helix</i>
HSC	hämatopoetische Stammzelle (<i>haematopietic stem cell</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM-4	Interzelluläres Adhensionsmolekül-4
IFN	Interferon
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>Insulin-like growth factor</i>)
I κ B	Inhibierende κ B- Proteine
IKK	Inhibitorisches κ B-Kinasekomplex (<i>inhibitory κB kinase complex</i>)
IL	Interleukin
Lin	Stammzell-Linienmarker (<i>Lineage</i>)
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MNC	mononukläre Zelle (<i>mononuclear cell</i>)
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
MSC	mesenchymale Stammzelle (<i>mesenchymal cell</i>)
NaCl	Natriumchlorid

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphat-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PSA	Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B
RNA	Ribonukleinsäure (RNS) (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sog.	so genannt
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SCL	Stammzelleukämiegen (<i>stem cell leukemia</i>)
siRNA	Kleine eingreifende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
Tab.	Tabelle
TAL1	Akkutes T-Zell-Leukämieprotein (<i>T-cell acute leukemia protein 1</i>)
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris, Borat, EDTA
TCL-5	T-Zell-Leukämie/Lymphomprotein 5 (<i>T-cell leukemia/lymphoma protein 5</i>)
TEMED	Tetramethylethylenamidin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TNF	Tumor-Nekrose Faktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
TPO	Thrombopoetin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3, propandiol

(Tris(hydroxymethyl)aminomethan)

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
U	Einheit (<i>Unit</i>)
V	Volt
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (<i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>)
WNT	<i>Wingless-INT1</i>
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese beginnt beim Embryo vor allem in Leber und Milz, beim gesunden Erwachsenen hingegen findet sie im Knochenmark statt, wo die pluripotenten Stammzellen des blutbildenden Systems lokalisiert sind [13]. Diese gehören zu den wenigen Zellen des Körpers, die zur Selbsterneuerung befähigt und somit in der Lage sind, eine lebenslange Blutbildung sicher zu stellen [13]. Der Begriff Stammzelle geht ursprünglich auf die Untersuchungen von McCulloch und Till zurück. Sie identifizierten Zellen im Knochenmark, die zeitlebens für die Regeneration des hämatopoetischen Systems verantwortlich sind [1, 13]. Heute versteht man unter dem Begriff Stammzelle im Allgemeinen undifferenzierte Zellen, die sich selbst erneuern und in reife Zellen mit definierten morphologischen und funktionellen Eigenschaften differenzieren können [13]. Alle Blutzellen leiten sich von diesen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HSCs) ab, aus denen sich dann zunächst Stammzellen mit eingeschränkter Potenz und anschließend liniendeterminierte Vorläuferzellen entwickeln [2]. Hu und Akashi zeigten mit Hilfe von *Microarray*-Analysen, dass in den hämatopoetischen Progenitorzellen verschiedener Entwicklungsstufen die Gene aller Differenzierungsrichtungen transkribiert werden, die diesen Progenitoren noch offen stehen [145]. Erst bei der endgültigen Festlegung auf eine Differenzierungslinie wird die Transkription der zu den anderen Linien gehörenden Gene eingestellt [3, 4]. Für die Kontrolle der Differenzierung dieser Zellen sind unterschiedliche Signaltransduktionswege wichtig. So scheint der WNT (*wingless-INT1*)-Signalweg für die Proliferation der HSCs und die Selbsterneuerung des Stammzellpools verantwortlich zu sein [2, 145]. Außerdem spielen bei der Selbsterneuerung des Pools auch *HOX*-Gene wie *HOXB4* und *HoxA9* [5-8, 145] und die Notch-Rezeptorfamilie eine wichtige Rolle. [2, 145]. Die Differenzierung definiert zusammen mit der Fähigkeit der Selbsterneuerung die Kernfunktion der HSCs. Gesteuert wird die Differenzierung durch ein Netzwerk von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie z.B. Stammzell-Faktor (*stem cell factor*, SCF), Erythropoetin (EPO), Interleukin-(IL)3 und *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF) [9]. Sobald diese Zellen ausdifferenziert sind, verlieren sie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung [10]. Die HSCs werden über diese Fähigkeit sowie über die Expression spezifischer Antigene (s. Abbildung 2.1) definiert. So sind alle funktionellen HSCs im Knochenmark negativ für linienspezifische Oberflächenmarker (Lin) [10]. Diese Marker sind nur auf Zellen zu finden,

die sich bereits im Stadium der Spezialisierung zu einer bestimmten hämatopoetischen Zelllinie befinden (z.B. CD4/CD8 bei T-Zellen oder Ter-119 bei Erythrozyten) [10]. Die frühen HSCs exprimieren dafür ein hohes Maß des Stammzell-Antigens 1 (*stem cell antigen*, SCA1) und der Tyrosinkinase KIT. Daher wird diese Subpopulation der hämatopoetischen Stammzellen auch als LSK ($\text{Lin}^- \text{SCA1}^+ \text{KIT}^+$)-Untereinheit bezeichnet [10]. Weiterhin zeichnen sich diese Zellen durch das Vorhandensein von CD150 und das Fehlen von *CD34^{fms related tyrosinekinase 3}* (FLT3) ($\text{FLT3}^- \text{CD150}^+$) und durch die Fähigkeit der Langzeit-Repopulation aus [10]. Je weiter sich die Zellen spezialisieren, desto mehr verändert sich auch ihre Antigenzusammensetzung. So werden die Zellen CD34-positiv und FLT3-negativ und haben nur noch Kurzzeit-Repopulationsaktivität [10]. Ein Überblick über die Oberflächenantigene kann der Abbildung 2.1 entnommen werden.

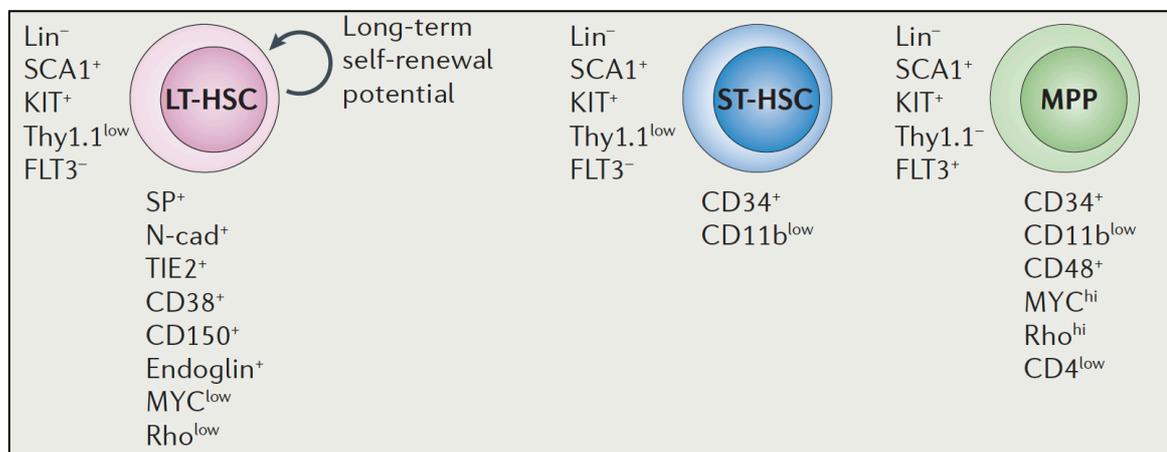


Abbildung 2.1: Charakterisierung der hämatopoetischen Stammzelle nach Wilson et al. [10]. Die Zellen werden anhand ihrer Fähigkeit der Langzeit-Repopulation definiert. Durch weitere Teilung entstehen aus LT-HSCs (long-term HSCs) die ST-HSCs (short-term HSCs) und MPPs (multipotent-progenitors).

Das CD34-Antigen ist ein Oberflächenprotein, welches von den meisten hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird [11, 145]. Es wird vermutet, dass es eine Rolle während der frühen Hämatopoese spielt, indem es die Adhäsion der Stammzellen an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks oder direkt an die Stromazellen vermittelt [12]. Bei den CD34^+ Zellen handelt es sich um keine klar definierte Zellpopulation, da viele nachfolgende, bereits weiter ausdifferenzierte Zellen ebenfalls dieses Antigen tragen. Diese Zellen sind bereits in ihrer Fähigkeit, in verschiedene Blutzelltypen zu differenzieren, eingeschränkt. Die Differenzierung der Blutzellen lässt sich in zwei Entwicklungslinien aufteilen: die lymphoide und die myeloide Linie. CD34^+ Zellen, die für die lymphoide Linie festgelegt

sind, differenzieren zu B- oder T-Lymphozyten. Die CD34⁺ Zellen der myeloiden Linie differenzieren zu Granulozyten, und Monozyten bzw. Megakaryozyten und Erythrozyten. Die Differenzierung myeloider Zellen ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

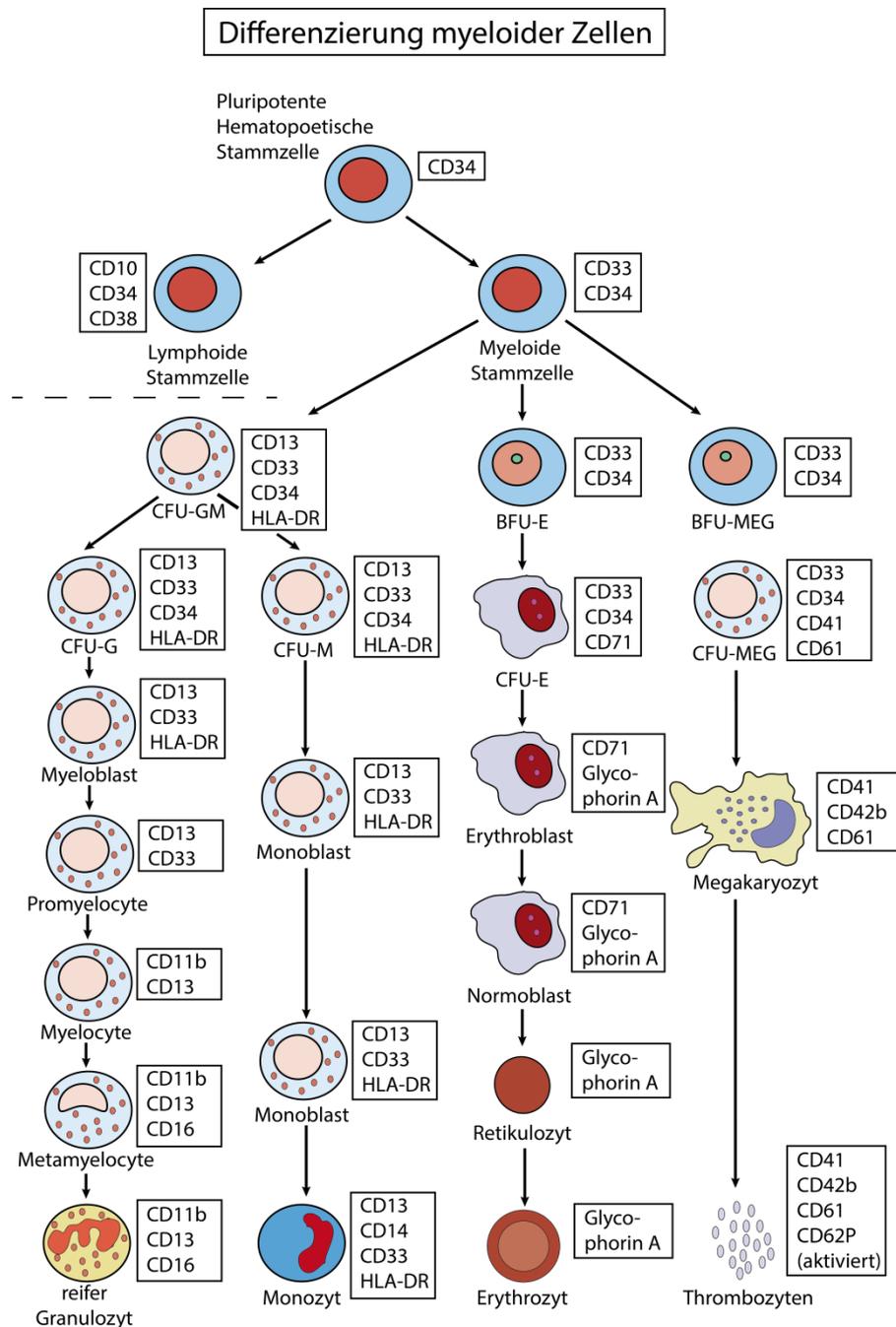


Abbildung 2.2.: Die Darstellung der myeloiden Differenzierung. Die myeloide Vorläuferzelle teilt sich in weitere Vorläuferzellen, die sich einerseits zu Granulozyten und Monozyten, andererseits zu Erythrozyten und Megakaryozyten weiterentwickeln (modifiziert nach: http://www.rrk-berlin.de/imarklab/my_gif.htm);[13].

Der Marker CD34 eignet sich außerdem als Merkmal für die frühen Differenzierungsstufen BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*) und CFU-GM (*colony-forming unit-granulocyte macrophage*). Diese Kolonien können im geeigneten semisoliden Nährmedium sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 2.3).

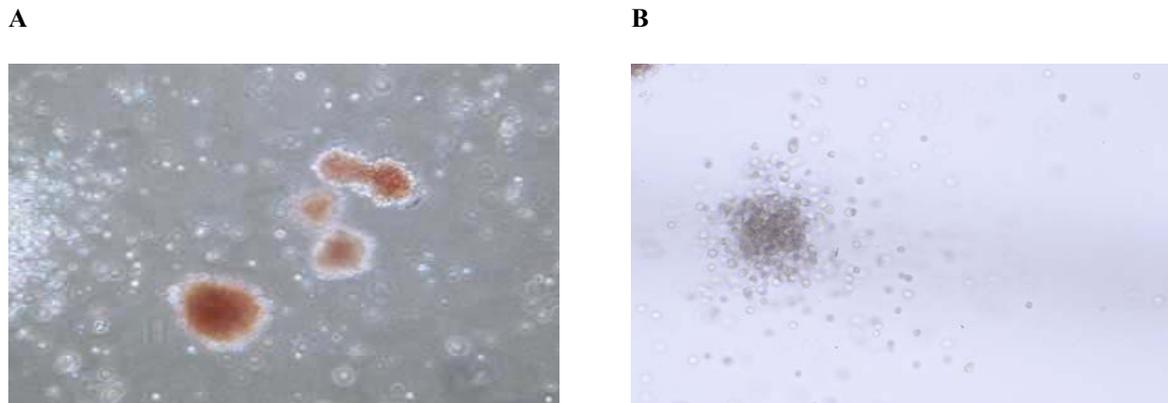


Abbildung 2.3: Kolonienbildung in einer semisoliden Kurzzeitkultur nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen. A zeigt die dicht gepackten, hämoglobinreichen Zellen einer BFU-E Kolonie. Am Bildrand sind heterogen verteilten Zellen sichtbar, die einer CFU-GM Kolonie zugeordnet werden. B zeigt eine CFU-GM Kolonie (40-fache Vergrößerung) [13].

2.2 Die hämatopoetische Nische

Im adulten Organismus findet die humane Hämatopoese in einer spezifischen Mikroumgebung des Knochenmarkes, der sogenannten Knochenmarknische, statt [14]. In dieser Nische finden sich die optimalen Voraussetzungen (z.B. die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren) für die Differenzierung und Selbsterneuerung der HSCs [15, 144]. Diese exklusiv in der Knochenmarknische herrschenden Bedingungen werden hauptsächlich durch das sogenannte „Stroma“ hergestellt, das aus zellulären Komponenten der Matrix und löslichen Faktoren besteht, welche die hämatopoetischen Inseln umgeben. Eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und Wachstumsfaktoren, die in der Nische vorzufinden sind, werden entweder lokal sezerniert und im ECM-Netzwerk gespeichert oder von verschiedenen spezialisierten Zellen außerhalb des Knochenmarkes produziert und über die Blutbahn zur Nische transportiert [144]. Das Stroma-Kompartiment beinhaltet unterschiedliche Zelltypen wie Fibroblasten, Adipozyten, Makrophagen, Endothelzellen und unreife mesenchymale Stammzellen (MSCs), die ihrerseits zu verschiedenen Gewebetypen mesenchymalen Ursprungs differenzieren können, nachdem sie

adäquate Stimuli erhalten haben [16-19]. All diese zellulären Komponenten sind wichtige Teile der Mikroumgebung, welche sowohl den „*steady-state*“ als auch die Stress-induzierte Hämatopoese [16-19] fördern.

2.3 Erythropoese

Als Erythropoese bezeichnet man den komplexen Prozess, in dem HSCs über mehrere Entwicklungsstufen zu Erythrozyten ausreifen [13]. Zum Auslösen der Differenzierung bedarf es eines extrazellulären Signals. Im Falle der Differenzierung von Erythrozyten aus myeloiden Stammzellen ist dies hauptsächlich das Zytokin Erythropoetin (EPO) [20]. Hierbei handelt es sich um ein Hormon, welches von der Niere als Antwort auf Hypoxie ausgeschüttet wird [155]. Es erhöht den Anteil an Zellen, die in Richtung der Erythropoese ausdifferenzieren und die terminale Reifung und E nukleation erreichen. Weiterhin aktiviert EPO antiapoptotische Proteine wie BCL-x(L) in den erythrozytären Vorläuferzellen, schützt diese damit und ist ein notwendiger Faktor für die terminale Kernausschleusung [13, 21, 22, 146]. Die erythrozytären Vorläuferzellen werden mit dem Erreichen des BFU-E-Stadiums sensitiv für EPO [23]. Das initiale Signal für eine Entwicklung in Richtung Erythropoese erhalten die HSCs allerdings durch andere Faktoren. Zu nennen wären hier vor allem SCF (*stem cell factor*, KIT-Ligand) sowie IL-3 und IL-6. SCF wird von Fibroblasten, Hepatozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Stromazellen produziert und fördert die DNA-Synthese und somit die Proliferation von Stammzellen und erythrozytären Vorläuferzellen sowie deren Überleben [24, 25]. In Zusammenarbeit mit anderen Zytokinen (IL-3, -6, -11, GM-CSF, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) und EPO) kann die membrangebundene Form von SCF die Proliferation von Vorläuferzellen der myeloiden, lymphoiden, megakaryozytären und erythropoetischen Zelllinien regulieren [13, 26]. Auch andere Wachstumsfaktoren wie Insulin und IGF (*insulin like growth factor*)-1 spielen eine wichtige Rolle bei der terminalen Differenzierung [24, 27]. Die HSCs durchlaufen unterschiedliche Stadien bis zum reifen Erythrozyten. Nach geeigneter Stimulierung gehen aus den HSCs mit hoher mitotischen Aktivität zunächst die BFU-E und dann die CFU-E hervor. Diese erythropoetischen Vorläuferzellen sind durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber EPO gekennzeichnet. Die erste morphologisch identifizierbare erythropoetische Vorläuferzelle ist der **Proerythroblast**, eine große Zelle mit einem Durchmesser von 20 µm, einem großen Kern und einem basophilen Zytoplasma [13]. Die anschließenden Differenzierungsstufen umfassen den **basophilen**, den **polychromatischen** und den

orthochromatischen Erythroblast. Beim basophilen Erythroblast erfolgt eine Reduktion der Zell- und Kerngröße und eine Erhöhung der Kerndichte [28]. Zudem wird das Zytoplasma der Zelle aufgrund der beginnenden Proteinsynthese und dem steigenden Gehalt an Ribosomen basophil [13]. Im polychromatischen Erythroblasten nimmt die Größe des Zellkerns deutlich ab und die Zelle beginnt Hämoglobin zu synthetisieren [28]. Der orthochromatische Erythroblast ist die letzte teilungsfähige Zelle der erythropoetischen Reihe mit einem kondensierten Kern und graublauem Zytoplasma infolge der erhöhten Hämoglobinsynthese [13]. Das Zytoplasma dieser Zelle besitzt weniger Ribosomen und Mitochondrien und ist weniger basophil [29]. Ohne weitere Zellteilung reift der hämoglobinreiche **Normoblast** heran und es entsteht nach Ausstoßung des mittlerweile pyknotisch gewordenen Zellkerns – ein Prozess bekannt als E nukleation – der **Retikulozyt**, welcher aus dem Knochenmark ins periphere Blut wandert [13]. Sein Zytoplasma beinhaltet nur noch ribosomale RNA und netzförmig angeordnete Ribosomen, die zur Hämoglobinsynthese fähig sind [29]. Im Knochenmark reift der Retikulozyt nach Abbau der übriggebliebenen Zellorganellen zum **Erythrozyten** und nimmt seine typische diskoidale, also diskusartige Form an [13].

Innerhalb des Knochenmarks geschieht die Reifung der erythropoetischen Vorläuferzellen in Erythroblasteninseln (*erythroblastic islands*) [30, 150]. Diese bestehen aus reifenden Erythroblasten, die einen zentral gelegenen Makrophagen umlagern und sich im engen Kontakt zu diesem befinden. Das Erythroblasten-Makrophagen-Protein (EMP) wurde als das erste Molekül identifiziert, das sowohl von den Erythroblasten als auch von den Makrophagen sezerniert wird und durch homophile Bindungen den Kontakt zwischen diesen Zellen ermöglicht [30, 31]. Außerdem wurden weitere Moleküle wie die Adhäsionsmoleküle VCAM (*vascular cellular adhesion molecule*)-1, $\alpha_4\beta_1$ Integrin und ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-4 identifiziert, die ebenfalls die Zell-Zell-Kontakte zwischen Makrophagen und den Erythroblasten vermitteln [32, 33]. Die Arbeitsgruppe um Belay et al. [150] detektierte VCAM-1 aus dem konditionierten Medium der HS27-Zellen, welches die Expansion der erythropoetischen Zellen steigerte [150]. Makrophagen produzieren ein Spektrum von Faktoren, die das Wachstum und/oder die Differenzierung von Zellen fördern, wie IL-1, Interferon ($\text{IFN}\gamma$), Tumor Nekrose-Faktor (TNF), GM-CSF [34, 35]. Rich et al. konnten zeigen, dass Makrophagen aus murinem Knochenmark in der Lage sind, hämatopoetische Wachstumsfaktoren zu produzieren [36]. Neben der Freisetzung dieser für die Entwicklung der Erythrozyten wichtigen Faktoren phagozytieren die Makrophagen die

ausgestoßenen Nuklei der Retikulozyten [37] und beseitigen defekte Erythrozyten [38]. Der E nukleation des Normoblasten gehen eine Abnahme der Zellgröße, ein Abbau der Nukleoli, eine Kondensation des Kerns und eine Akkumulation des Hämoglobins voraus [145]. Auch eine extreme Verdichtung des Chromatins wird beobachtet. Dieser kompakte Kern wird dann an die Zellmembran transportiert und mit Hilfe von pseudopodienähnlichen Ausstülpungen abgeschnürt und ausgestoßen [39, 145]. Actin-Filamente spielen eine bedeutende Rolle bei der Abschnürung und dem Abtransport des Kerns [40, 145]. Tabelle 2.1 zeigt die verschiedenen Stadien der erythropoetischen Zelldifferenzierung und ihre Dauer nach Bonanou-Tzedaki [28, 145]. Durch die Stimulation mit EPO wird die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in den erythroiden Vorläuferzellen angetrieben, welche ihr Maximum in den basophilen Erythroblasten erreicht (siehe Tabelle 2.1) [145]. Die Hämoglobinsynthese wird initiiert, sobald die RNA transkribiert wurde. Sie zeigt ihr Maximum in den orthochromatischen Erythroblasten und bleibt für eine lange Zeit in den Retikulozyten erhalten. Am Ende des „Blastenstadiums“ beim Übergang des orthochromatischen Erythroblasten zum Retikulozyten, werden nur noch Hämoglobintranskripte translatiert. Mit dem Beginn der Reifung zum Retikulozyten wird die Lipoxygenasesynthese eingeschaltet. Dieses Enzym spielt eine bedeutende Rolle beim Abbau der Zellorganellen [41]. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die während der Reifung der erythropoetischen Zellen eine Rolle spielen, sind TAL1, LMO2 und GATA-2, später GATA-1, FOG, RB, EKLF und NF-E2 [42, 43, 145, 162]. Auf den Transkriptionsfaktor TAL1 wird später genauer eingegangen (siehe 2.5 Das Gen TAL1).

GATA-1 ist ein wichtiger Regulator der Erythropoese und wurde zuerst von Tsai et al. bei der Regulation der murinen Hämoglobinexpression beschrieben [43, 164]. GATA-1 reguliert die terminale Differenzierung der erythropoetischen Zellen [44, 148]. GATA-2 weist ein umgekehrt proportionales Expressionsmuster zu GATA-1 auf und reguliert die frühen Phasen der Hämatopoese und fördert die Proliferation der Zellen, wobei es die Differenzierung hemmt [45, 148, 163]. NF-E2 wird eine Rolle bei der Antwort auf den oxidativen Stress während der Erythropoese zugesprochen [46]. Erythrozyten aus *p45NF-E2^{-/-}* Mäusen mit einer Defizienz für diesen Faktor sind durch eine erhöhte Konzentration an reaktivem Sauerstoff charakterisiert. Sie zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress und haben eine verkürzte Lebensspanne [46].

Tabelle 2.1: Zeittafel der erythropoetischen Zelldifferenzierung aus der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle nach Bonanou-Tzedaki [28, 145].

	Stadium	Zeit (Tage)	Zelluläre Veränderung	Molekulare Veränderung	
<i>Liniendeterminierte erythropoetische Vorläuferzellen</i>	BFU-E	14	Liniendetermination, zunehmende Sensitivität für EPO	Expression des EPO-Rezeptors (EPOR)	
	CFU-E				
<i>Morphologisch definierbare Zellen</i>	Proerythroblast	2-3	Zellgrößenzunahme	Induktion der Hämoglobintranskription, Synthese von Spektrin, Transferrin-Rezeptor, Glycophorin	
	Basophiler Erythroblast		Zunahme des Hämoglobingehaltes	Hohe DNA-, RNA- und Protein-Synthese	
	Polychromatischer Erythroblast			Maximale Transkription der Hämoglobin-Gene, maximale Synthese von Häm, Transferrin-Rezeptor, Spektrin und Glycophorin	
	Orthochromatischer Erythroblast			Starke Zunahme des Hämoglobingehaltes, Chromatinkondensation und Kernextrusion	Maximale Synthese von Hämoglobin und Band-3, nachlassende DNA- und RNA-Synthese
	Retikulozyt			Verlust verschiedener Oberflächenrezeptoren, maximale Aktivität von Katalase, Superoxid-Dismutase, Karboanhydrase und Lipoxigenase, Abnahme der Proteinsynthese	
	Erythrozyt	Ca. 120		Maximaler Hämoglobingehalt	

2.4 In vitro Differenzierung CD34⁺ Zellen zur Erythropoese

Für die Untersuchung der humanen Erythropoese ist es essentiell, eine *in vitro*-Differenzierung durchführen zu können. Diese sollte alle Entwicklungsstadien der *in vivo*-Erythropoese durchlaufen und kernlose Retikulozyten hervorbringen [146]. Als Ausgangsmaterial können zu diesem Zweck z.B. pluripotente Stammzellen dienen, die entweder aus Nabelschnurblut oder Knochenmark aufgereinigt werden. Außerdem können

durch Verabreichung von G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert werden. Durch die anschließende Leukapherese – ein gängiges Verfahren für die Gewinnung der Stammzellen aus dem peripheren Blut, bei dem das Blut ähnlich wie bei Dialyse „ausgewaschen“ und die benötigte Zellfraktion getrennt wird - und immunomagnetische Sortierung können CD34⁺-Zellen isoliert und mit einer Reinheit von bis zu 95% angereichert werden. Die CD34⁺-Zellen können anschließend in der Zellkultur durch Zugabe von EPO und –je nach Kultivierungsmethode– verschiedenen anderen Zytokinen zur Differenzierung in die erythropoetische Linie stimuliert werden. Verschiedene Kulturmodelle wurden in den letzten Jahre auf dieser Grundlage entwickelt [47]. Es wurden sowohl Zellen aus dem Nabelschnurblut [48, 49, 146] als auch Zellen aus Leukapheresen für die Kultivierung und Reifung zu erythroiden Zellen verwendet [49]. Panzenböck et al. zeigten, dass unter der gleichzeitigen Verwendung von SCF und EPO in einer sogenannten 2-Phasen-Kultur aus CD34⁺ Zellen Zellpopulationen koloniebildende erythrozytäre Vorläuferzellen amplifiziert werden konnten, die Kolonien vom Typ BFU-E und CFU-E bildeten [49, 146]. Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeitsgruppe von Neildez-Nguyen eine 3-Phasen-Kultur etabliert, die ebenfalls als Ausgangsmaterial Nabelschnurblut verwendete und unter serumfreien Bedingungen verlief. Unter Verwendung von SCF, FLT-3 und Thrombopoetin (TPO) wurde in der ersten Phase, die in diesem Fall EPO-unabhängig war, eine hohe Zellexpansionen erreicht [50]. Allerdings war der Anteil der enukleierten Zellen in dieser Kultur gering. In einer weiteren Veröffentlichung kultivierte diese Arbeitsgruppe aufgereinigte Stammzellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut in einem serumfreien Medium. In der zweiten Phase der Kultur wurden diese Zellen zur weiteren Reifung auf einem adhärent wachsendem, murinem Stromalayer oder wahlweise auf einem Layer aus humanen MSCs kokultiviert. Somit erreichten sie nicht nur eine hohe Proliferation der Zellen, sondern auch eine nahezu vollständige terminale Differenzierung inklusive kernloser Retikulozyten [51]. EPO gilt als Schlüsselfaktor für die erythropoetischen Zellreifung. Kim et al. [160] beschreibt den AKT-Signalweg als einen EPO-unabhängigen Signalweg zu identifizieren, der durch Hochregulierung von *GATA1* und *FOXO3* zur Inhibierung von Apoptose, Modulation des Zellzyklus und Reifung der erythropoetischen Zellen führen..

2.5 Das Gen *TAL1*

Wie bereits erwähnt, spielen Transkriptionsfaktoren während der unterschiedlichen Stadien der Erythropoese eine wichtige Rolle. Einer dieser Faktoren ist TAL1. Dieser Transkriptionsfaktor ist auch unter dem Namen TCL-5 (*T-Cell Leukemia/Lymphoma Protein 5*) oder SCL (*stem cell leukemia*) bekannt und gehört zur Klasse 2 Helix-Loop-Helix (bHLH) der Transkriptionsfaktor-Familie [36]. Diese Klasse spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Differenzierung vieler Zelltypen [52]. Das Gen *TAL1* wurde bei der Analyse der Translokation zwischen dem Chromosom 1p32-33 und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) α/δ -Locus auf dem Chromosom 14q11 in der akuten humanen T-Zell-lymphatischen Leukämie (T-ALL) entdeckt [52]. *TAL1* wird im vaskulären und hämatopoetischen System, insbesondere in hämatopoetischen Vorläuferzellen und in erythroiden, megakaryozytischen und Mastzell-Vorläufern exprimiert [53, 54]. Der erste Hinweis auf die Funktion des TAL1-Proteins wurde durch *Antisense*-Experimente geliefert, welche zeigten, dass dieses Protein bei der Initiation der primitiven hämatopoetischen Entwicklung und Regulation der Proliferation und Selbsterneuerung der multipotenten hämatopoetischen Zelllinien eine Rolle spielt [55]. So sind TAL1 defiziente Mäusembryonen nicht in der Lage, hämatopoetische Zellen zu generieren [56, 57]. Die direkte Rolle in der erythropoetischen Differenzierung wurde durch die erzwungene Expression von *TAL1* in hämatopoetischen Zelllinien gezeigt, wonach diese eine erhöhte erythropoetische Differenzierung zeigten [58, 59]. Umgekehrt nahm das Expressionsniveau von *TAL1* mRNA und dem korrespondierenden Protein bei einer Differenzierung der Zellen in Richtung der Monozyten/Makrophagen Reihe stark ab [60, 61]. Die biologische Aktivität von TAL1 hängt von zwei wichtigen Domänen des Proteins ab. Die Helix-Loop-Helix-Domäne erlaubt ihnen zu homo- oder heterodimerisieren. Daher ist diese Domäne ausschlaggebend für die Heterodimerisierung von TAL1 mit den Mitgliedern der ubiquitär exprimierten E2A-Proteinen wie E47, E12 und HEB, welche die Hauptpartner von TAL1 sind [62]. Die Basisdomäne, welche auch in vielen HLH-Proteinen vorhanden ist, gewährleistet die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA im Bereich der E-Box Konsensussequenz CANNTG und dadurch die weitere Transaktivierung des Zielgens [149]. *In vitro*-Transkriptionsassays haben gezeigt, dass sich TAL1 an der Bildung von Proteinkomplexen beteiligen kann, die aus E12, dem LIM-Protein, LMO-2, Ldb1 und GATA-1 oder SP-1 in der erythropoetischen Differenzierung oder LMO-2 und E12/E47 oder GATA-3 in den T-

ALL-Zellen bestehen. Diese Komplexe binden an Promotorregionen, die eine E-Box-, eine SP-1- oder eine GATA-Bindungsstelle enthalten [63-65].

2.6 Das Gen *CLCN3*

Bei der Entkernung der Retikulozyten laufen Prozesse ab, die sowohl denen der Zellteilung [39, 40, 66, 67] als auch der Apoptose [68-71] ähneln. Die Tatsache, dass die E nukleation Parallelen zur Apoptose aufweist, macht eine Untersuchung apoptotischer Gene während der erythropoetischen E nukleation interessant. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben die morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose gut darstellen können [72]. Das Gen *CLCN3* codiert für einen Chloridkanal, welcher den Austausch zwischen Chlorid (Cl)-Ionen auf der einen und Protonen auf der anderen Seite vermittelt. Die mögliche Bedeutung von diesem Gen in der Apoptose wurde in der Studie von Myssina et al. [73] veranschaulicht: eine Zunahme der Kalziumionen durch osmotischen Schock oder oxidativen Stress führte zum Schrumpfen der Erythrozyten, zum Membranblebbing (also dem Ausstülpfen der Membran), zum Verlust der Membranstabilität und zur Phosphatidylserinasymmetrie. Erythrozyten, die Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche tragen, gehen eine Bindung mit den entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen ein, die zur Eliminierung dieser Erythrozyten führt. Eine erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle führte zur Stimulierung von Ca^{2+} -sensitiven Kaliumkanälen, so dass Kalium ausströmt. Dies führte zur Hyperpolarisierung der Zelle und zum Ausströmen von Cl-Ionen. Als Reaktion auf diese Vorgänge schrumpft der Erythrozyt und es kommt zu Ceramidbildung. Ceramid sensibilisiert die Zellen für die Phosphatidylserinbildung [73]. Daher wird eine Mitwirkung von Cl-Ionenkanälen in der Apoptose vermutet. Die Arbeitsgruppe um Myssina et al. [73] fand heraus, dass durch Hinzugabe eines Cl-Kanalblockers der proapoptotische Effekt des oxidativen Stresses auf reife Erythrozyten gemindert wird. Da die Entkernung der Erythrozyten einige Parallelen zu Apoptose aufweist, könnten Cl-Ionenkanäle wie *CLCN3* möglicherweise eine Rolle bei der E nukleation spielen.

2.7 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) gehören zu einer nicht-hämatopoetischen Population von adhären Zellen, die mittlerweile gut charakterisiert sind [74-76]. Sie besitzen ein hohes Proliférations- und Differenzierungspotenzial und exprimieren eine Reihe von

Oberflächenmoleküle wie CD73, CD90 und CD105 [144]. Die MSCs spielen eine zentrale Rolle in der hämatopoetischen Nische. Sie sind nicht nur ein Teil dieser Nische im Knochenmark, sondern auch der Ursprung der meisten anderen Knochenmarkzellen im Bereich der hämatopoetischen Nische [144]. *In vitro* und *in vivo* Experimente erbrachten den Beweis, dass MSCs im Knochenmark zu Chondrozyten, Adipozyten, Myofibroblasten, Osteozyten, Osteoblasten und Endothelzellen ausdifferenzieren können [77-79, 144]. Auch die Wirkung einiger dieser Zellen auf die Blutzellbildung ist erforscht worden. Es ist z.B. bekannt, dass Osteoblasten sowohl über Zelladhäsion als auch über Produktion von die Hämatopoese beeinflussenden Zytokinen in der Lage sind, hämatopoetische Vorläuferzellen in einem Ruhezustand zu bewahren und so ihr Überleben zu fördern [80-82, 144]. Wichtig für diese positive Wirkung ist die Bindung von hämatopoetischen Vorläuferzellen an die Osteoblasten sowie die von den Osteoblasten sezernierten Wachstumsfaktoren Angiopoetin [83, 84, 144] und Osteopontin [85, 86]. Den Endothelzellen hingegen wird eine Beteiligung an Migrationsprozessen und terminaler Differenzierung von Blutvorläuferzellen zugesprochen [87-89, 144]. Frühere Studien haben gezeigt, dass MSCs eine Vielfalt an Zytokinen produzieren, welche die Hämatopoese beeinflussen, wie z.B. SCF, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 und IL-15, Thrombopoetin, und G-CSF [90-93]. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung von MSCs als *Feeder layer*, also als eine Matrix, die den Boden der Kulturflasche bedeckt, die aus Nabelschnurblut gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) in einer *in vitro* Kokultur vor Apoptose schützen kann [91]. Die Arbeitsgruppe um Perucca et al. [151] konnte zeigen, dass MSCs die Expansion der CD34⁺-Zellen positiv beeinflussen und ihre Differenzierung in Richtung Erythropoese fördern. Daher spielen die MSCs außer bei der Zytokinproduktion auch eine Rolle bei der Reifung der HSCs zu Erythrozyten [51].

3. Zielsetzung

Die Erythropoese umfasst die Spezialisierung multipotenter hämatopoetischer Stammzellen mittels eines mehrstufigen Differenzierungsprozesses. Dies umschließt die Reifung der erythropetischen Vorläuferzelle, dem Proerythroblasten, zum terminal differenzierten Erythrozyten. Die komplexen molekularen Mechanismen der Regulation der Erythropoese sind nur unzureichend geklärt. Die Entwicklung der multipotenten hämatopoetischen Zellen in Richtungen Erythropoese wird durch interne Transkriptionsprogramme, epigenetische Muster und externe Signale (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Interaktionen) beeinflusst. Für das bessere Verständnis der molekularen Vorgänge ist ein *in vitro* Erythropoese-Modell essentiell, welches alle Stadien der erythropoetischen Entwicklung bis hin zur Enukleation durchläuft. Viele der bisher entwickelten Modelle konnten entweder keine hohe Zellproliferation oder keine terminale Differenzierung vorweisen.

Ausgehend von zwei Veröffentlichungen (Panzenböck et al. [49] und Neildez-Nguyen et al. [50]) war es Ziel dieser Arbeit, zunächst das Flüssig-Erythropoese-Modell zu optimieren. Das Modell sollte nicht nur gute Proliferationsraten vorweisen, sondern auch alle Stadien einer *in vivo* Erythropoese inklusive des kernlosen Retikulozyten darstellen, sodass es der physiologischen Situation im lebenden Organismus möglichst nahekommt. Das 14-Tage-Modell aus der Veröffentlichung von Panzenböck und das 21-Tage-Modell aus der Veröffentlichung von Neildez-Nguyen wurden etabliert und modifiziert. Die Proliferation und Differenzierung der Zellen wurde in beiden Kulturen an definierten Untersuchungstagen mithilfe von Mikroskopie (Zellzählung und Zytospins) und Durchflusszytometrie untersucht. Als nächstes sollten Gene identifiziert werden, die bei der terminalen Differenzierung von Bedeutung sind. Dafür sollte mRNA aus verschiedenen Reifungsstadien der erythropoetischen Zellen und an definierten Untersuchungstagen isoliert werden und für eine PIQOR™-Immunology (*Parallel Identification and Quantification of RNA's*)-Microarray-Analyse der Firma Miltenyi verwendet werden. Als Referenztag diente der Untersuchungstag 0, also der Tag der Zellisolierung der CD34⁺ Zellen. Diese so identifizierten Gene sollten dann mittels siRNA-Inteferenz-Technik inhibiert und die Auswirkung dieser Inhibierung auf die Entwicklung und Enukleation der erythropoetischen Zellen in Flüssigkultur durchflusszytometrisch und mit Hilfe von Pappenheim- und neutraler Benzidinfärbung an Zytospins untersucht werden.

4. Material

4.1 Chemikalien, Kulturmedien und Geräte

Tabelle 4.1.1: Verwendete Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Acrylamid/Bis Solution 29 +1, 30%	BioRad, München
Agarose NA	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Aqua ad injectabile	Braun, Melsungen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat	Merck, Darmstadt
dNTPs 10mM	Applied Biosystems
Ethylenediamintetraactic acid (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Appligene, Heidelberg
Ficoll Typ 400	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerin, 50%	Bandschiff Kit, Pharmacia Biotech
Hanks Buffered Salts	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Gibco BRL, Paisley, England
humanes Albumin	DRK Blutspendedienst, Springe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T.Baker Deventer, Holland
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromide	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-MLV Reverse Transkriptase, 200 J/µl	Promega, Mennheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat 4% (ACDA)	Baxter, München
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamide	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
RNasin 40 U/µl	Promega, Mannheim
Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris 100mM pH 6,8	Merck, Darmstadt
Tris Base	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 4.1.2: Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Label</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>
CD34	PE	IgG1	Becton Dickinson, Plymouth, UK
CD36	PE	IgG1	Immunotech/Beckman Coulter, Krefeld
CD45	FITC	IgG1	Becton Dickinson, Plymouth, UK
CD45	PC7	IgG1	Becton Dickinson, Plymouth, UK
CD71	FITC	IgG1	BD Biosciences, Bedford, USA
GlycophorinA	Cy5	IgG1	BD Biosciences, Bedford, USA
Mouse Anti Human	FITC	IgG1	BD Biosciences, Bedford, USA
Monoclonal Isotype Control			
Mouse Anti Human	PE	IgG1	BD Biosciences, Bedford, USA
Monoclonal Isotype Control			
Mouse Anti Human Isotype Control	PC5	IgG1	BD Biosciences, Bedford, USA

Table 4.1.3: Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA V)	Fluka Biochemika, Neu Ulm
Dexamethasone	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
Erythropoetin (EPO)	Ortho-Biotech, Neuss
Erythropoetin (EPO)	R&D Systems, Wiesbaden
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories Inc., Österreich
Fms-Like Tyosine Kinase 3 (FLT3)	Strathmann Biotech, Hannover
Insulin, human	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin-Like-Growth-Faktor (IGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin-Like-Growth-Faktor Long R3 (IGF-R3)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L- Glutamin	BioWhittacker, Heidelberg
MEM Alpha Medium	Invitrogen GIBCO, Carlsbad
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Pyruvat	BioWhittacker, Heidelberg
Östradiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin 10000 E/ml, Streptomycin 10000µg/ml	BioWhittacker, Heidelberg
RPMI 1640	BioWhittacker, Heidelberg
Stem Cell Factor (SCF)	Strathmann Biotech, Hannover
Stem Cell Factor (SCF)	Cell Systems, St. Katharinen
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thrombopoethin (TPO)	Strathmann Biotech, Hannover
Trypsin-EDTA 0,25% (200 mg/l EDTA; 500 mg/l Trypsin 1:250)	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien

Tabelle 4.1.4: verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage LC 6200S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Athos ELISA Reader	Biotest, Dreieich
Brutschrank	Labotect Labortechnik, Göttingen
Coulter Counter T-660	Beckman Coulter, Krefeld
Diaplan Lichtmikroskop	Leitz, Stuttgart
Digitalkamera Canon EOS 10D	Canon Inc., Tokyo, Japan
Digitalkamera Leica DC350F	Leica, Bensheim
Durchflusszytometer FC-500	Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammer GNA-100	Pharmacia LKB., Freiburg
Electrophoresis Power Supply	Micro Bio Tec Brand, Gießen
Filmentwicklungsgerät CLASSIC E.O.S	AGFA, Leverkusen
Fluoreszenzmikroskop DMLM DC350F IL350	Leica, Bensheim GEHealthcare, USA
Gefriertruhe, -80°C	Nuaire, Plymouth, USA
Kühlzentrifuge Centrikon T-324 mit Rotor A 6.9	Kontron, München
Laborwaage 12116 MP	Sartorius, Göttingen
Magnetic cell separator MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Nucleofactor™ II	Amaxa Biosystems, Walkersville, USA
Omnifuge 2.0 RS mit Rotor 2251	Heraeus Sepatech, Hamburg
pH- Meter 83 Autocal	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipette Combi-Pipette Typ 3180L	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Vario-Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim
Schüttler	Heidolph polymax 1040, Kehlheim
Software „Primer Express“	Applied Biosystems, Foster City,

	CA, USA
Spektralphotometer Hitachi U-3000	Hitachi, Bremen
Sterile Werkbank II AI B3	Nuaire Plymouth, USA
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	Sigma, Steinheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus Christ GmbH, Osterode
UV-Tisch N9	Benz, Wiesloch
Vollblut Zellzähler Coulter Ac.T8	Beckmann Coulter
Wasserbad	GFL Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge Minifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Christ GmbH, Osterode

4.2 Laborbedarf

Tabelle 4.2: Laborbedarf

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Einmalkanülen BD Microlance TM 3, steril	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einmalspritzen, steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
ExcelGel [®] SDS Homogenous 7,5% Gele	Biotest, Dreieich
Filterpapier, Munktell 1F Grade	Amersham Biosciences, Freiburg
Flachboden-Mikrotiterplatten Costar	Corning Incorp. New York, USA
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner, Nürtingen
Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluss, 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Latex- Einmalhandschuhe	Ansell, München
Microcon- 10, 30-, 100- Filter	Millipore GmbH, Schwalbach
MicroAmp Optical Tubes	Applied Biosystems, Foster City, USA
Nunc [®] Stericup Filtrationssysteme	Millipore GmbH, Schwalbach
Nylon-Zellsieb	BD Biosciences, Bedford, USA

Objekträger Super Frost	Menzel Gläser, Braunschweig
Optical Caps (8 caps/strip),	Applied Biosystems
Petrischalen	Becton Dickinson, Plymouth, UK
Pipettenspitzen, 1-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Sterilfiltertips, gestopft 10 µL, - 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1.5 ml, mit Schraubdeckel	Nunc™, Roskilde, Dänemark
Röhrchen für Surchflusszytometrie 600 µl	Greiner Nürnberg
Separationssäulen Größe LS	Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach
Stabpipetten, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tray für Multiply 0,2 ml (96 well)	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen, 175 ml	Nunc™, Roskilde, Dänemark
Zellkultur-Schalen 35 mm, Multidish 6 wells	Nunc™, Roskilde, Dänemark
Zellsieb 4 µm	BD Falcon, Heidelberg
Zellulosenitrat-Membran 0,2 µm	Schleicher und Schuell, Dassel

4.3 Primer, Sonden und Oligonukleotide

Tabelle 4.3.1: *Verwendete Primer-Sondengemische für real time RT-PCR*

Gen-Name	Assay	Ampliconlänge	Hersteller
HBZ	HS00923579-m1	66 bp	Applied Biosystems
RXRA	HS00172565-m1	74 bp	Applied Biosystems
FLT3	HS00975659-m1	137 bp	Applied Biosystems
CD38	HS00277045-m1	97 bp	Applied Biosystems
TAL1	HS01097987-m1	84 bp	Applied Biosystems
CLCN3	HS00923164-m1	116 bp	Applied Biosystems

GAPDH (*humane Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase*) human 20x, (*Pre-Developed TaqMan Assay Reagents; Applied Biosystems, Weiterstadt*)

Tabelle 4.3.2: *Größenstandards*

Bezeichnung	Hersteller
1KB Ladder 250 µg (1µg /µl)	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
123 Basenpaar DNA Leiter 1µg/µl	Gibco, Paisley, UK

4.4 Lösungen und Kits

Tabelle 4.4.1: Lösungen, Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Indirect CD34 MicroBead Kit (Human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Desoxynucleotide Triphosphat (dNTPs), (dTTP, dGTP, dCTP, dATP), 10 mM	Applied Biosystems, Weiterstadt
Diff-Quick® Fix	Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz
DNeasy DNA-Tissue-Isolations Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Gel-Ladepuffer (10 x 250 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2% Brom-Phenolblau; 40% Glycerin)	Pharmacia Biotech, Dübendorf
Human cytokine antibody array c series 2000 and 2000.1	RayBiotech, Nocrass, USA
MgCl ₂ 25 mM	Promega GmbH, Mannheim)
RNeasy RNA-Isolations Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems/Roche, New Jersey, USA

Tabelle 4.4.2: Reagenzien für die Transfektion

Bezeichnung	Hersteller
Hs_CLCN_3HP siRNA 20 nmol, Bestellnummer: SI00028882	Qiagen GmbH, Hilden
Hs_TAL1_6HP siRNA 20 nmol, Bestellnummer: SI03060687	Qiagen GmbH, Hilden
Human CD34 Cell Nucleofactor Kit V	Amaxa Biosystems, Walkersville, USA

4.5 Puffer

MACS-Puffer

500 ml PBS

0,5% bovines Serum Albumin

0,4% EDTA-Lösung aus einer 0,5M Stammlösung, sterilfiltrieren

Albumin 1%

Für die Herstellung der 1% Albuminlösung wurde 0,1g BSA V in 10 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

TBE-Puffer (10x)

Tris-Base 216 g

Borsäure 110 g

EDTA 14,88 g

Aqua dest. ad 2000 ml

pH 8,0; Lagerung bei 4°C

Gel-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,025 g

Xylene Cyanol 0,025 g

Ficoll Typ 400 0,5 g

Aqua dest. ad 10 g

Lagerung bei RT

4.6 Kulturmedien

Basismedium der Erythropoese-Kultur

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)

15% FCS

1% BSA

15% destilliertes Wasser,

1,9 mM Natriumbicarbonat,

10⁻⁴ mol/L β-Merkaptoethanol

128 µg/ml Eisen gesättigtes Transferrin

100 µg /ml Streptomycin

100 IU/ml Penicillin

Dieses Kulturmedium wurde in 500 ml Volumen hergestellt, in Falcon-Röhrchen portioniert und bis zum Zeitpunkt des Gebrauches eingefroren. Für beide Erythropoese-Kulturen wurde das gleiche Basismedium verwendet.

2-Phasen-Kultur der Erythropoese

Dem Basismedium wurden hinzugefügt:

Proliferationsmedium (in Phase 1, Tag, 1 bis Tag 8):

IU/ml rekombinanten humanen EPO (rhEPO)

100 ng/ml SCF

40 ng /ml long-R3 insulin-like growth factor-1, (IGF-1)

10^{-6} mol/L Dexamethason

10^{-6} mol/L β -Östradiol

Differenzierungsmedium (Phase 2, Tag 9 bis Tag 16):

IU/ml rhEPO

1 µg/ml h-Insulin

3-Phasen-Kultur der Erythropoese

Es wurde das Basismedium mit folgenden Zusätzen verwendet:

EPO-unabhängige Vorphase (Phase 1, Tag 1 bis Tag 7):

100 ng/ml SCF

50 ng/ml humaner FLT3-L

100 ng/ml TPO

100 µg/ml humanes Insulin

Proliferationsmedium (in Phase 2, Tag 8 bis Tag 14):

3 IU/ml rhEPO

50 ng/ml SCF

50 ng/ml IGF-1

100 µg/ml Insulin

Differenzierungsmedium (in Phase 3, Tag 15 bis Tag 21):

3 IU/ml rhEPO

50 ng/ml IGF-1

100 µg/ml Insulin

Kulturmedium für MSCs

α-MEM

20% FCS

1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B (PSA)

4.7 Färbelösungen

Neutrale Benzidin-Färbung

Methanol

1% 3,3-Dimethoxybenzidinlösung:

0,5 g 3,3-Dimethoxybenzidin in 50 ml Methanol lösen

1% Wasserstoffperoxidlösung:

1ml Wasserstoffperoxid mischen mit

25 ml Ethanol

25 ml Aqua dest.

Färbung nach Pappenheim

Die Pappenheim Färbung ist eine Färbemethode für Blutaussstriche und Gewebe, die nach dem deutschen Hämatologen Arthur P. Pappenheim benannt wurde. Nach dieser Methode wird das Präparat mit konzentrierter May-Grünwald-Lösung fixiert, mit verdünnter May-Grünwald-Lösung gefärbt und anschließend mit Gimsa-Lösung gegengefärbt. Die Zellkerne erscheinen im Präparat rötlich bis violett. Das Plasma der Granulozyten färben sich rosa und das der Monozyten und Lymphozyten erscheint bläulich. Die Pappenheim-Färbungen wurden vom Institut für Hämatologie der Uniklinik Lübeck angefertigt (siehe auch 5.5.1.2).

4.8 Zellkultur

4.8.1 Humane hämatopoetische Stammzellen

Das für die Flüssigkultur eingesetzte Zellmaterial stammt von Patienten, die nach Aufklärung über die Verwendung überschüssiger Stammzellen zu Forschungszwecken ihre schriftliche Einwilligung dazu gaben. Die *in vitro* Studie zu humaner Erythropoese wurde am 21.11.2007 durch die Ethikkommission des Uniklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck mit dem Aktenzeichen 07-167 genehmigt.

Die Patienten unterzogen sich im Rahmen einer geplanten Hochdosis-Chemotherapie am

Institut für Transfusionsmedizin, Campus Lübeck einer Leukapherese. Die CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen wurden vor der Apherese mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF (10 µg/Kg Körpergewicht/Tag) mobilisiert. Durch die Einwirkung von G-CSF werden hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark freigesetzt und gelangen durch transendotheliale Migration in die periphere Zirkulation. Nach mehrtägiger Gabe wird ein bis zu hundertfacher Anstieg an CD34⁺ Zellen im peripheren Blut beobachtet [92]. Die Stammzellapherese erfolgte mit dem Amicus Zellseparator der Firma Baxter (Geräteeinstellung laut Hersteller). Der Zellseparator trennte das Vollblut auf Grund unterschiedlicher Dichte in seine Bestandteile auf. Die hämatopoetischen Stammzellen befanden sich innerhalb der mononukleären Zellfraktion und wurden gesammelt. Ein kleiner, überschüssiger Anteil dieser Zellen wurde zu Forschungszwecken verwandt und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

4.8.2 *Humane MSCs*

Zur Gewinnung von MSCs wurden Knochenmarkaspirate im Rahmen von Hüftoperationen mit Protheseimplantation an der Klinik für Orthopädie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck aus dem Knochenmark des Oberschenkelknochens isoliert und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Dies geschah, nachdem der Patient aufgeklärt wurde und sein Einverständnis gab. Die mononukleären Zellen wurden dann durch eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll Hypaque isoliert. Die Studie wurde am 21.02.2005 durch die Ethikkommission des UK-SH, Campus Lübeck mit dem Aktenzeichen 04-183 genehmigt.

5. Methoden

5.1 Zellkulturtechniken

Die zellbiologischen Arbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung fand in geeigneten Schalen oder Flaschen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre statt.

5.2 Isolierung von humanen CD34⁺ Zellen

5.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Stammzellen für unsere Versuche entstammten aus Patientenmaterial nach einer Leuapherese durch G-CSF- (Neupogen) Stimulation. Die Probe wurde zunächst mit PBS 1:1 verdünnt, da sie in der Regel sehr zellreich war. Diese verdünnte Probe wurde in einem 1:1-Verhältnis in einem neuen Falconröhrchen auf Ficoll-Hypaque-Lösung (1,077 g/ml) überschichtet. Danach wurden die Zellen für 20 min. bei 600 g und 15°C ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukläeren Zellen (MNCs) sammelten sich auf dieser Weise im Übergang zwischen der verdünnten Probe und dem Ficoll-Hypaque und wurden als weißlicher Ring sichtbar. Dieser Ring wurde vorsichtig abgesaugt, in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt und anschließend zwei Mal mit 50 ml PBS gewaschen (10 min., 300 g, 20°C, mittlere Bremse). Nach dem Waschen wurde das Zellpellet in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

5.2.2 Magnetische Zellaufreinigung von CD34⁺ Zellen

Zur Aufreinigung der CD34⁺ Zellen wurde das *Indirect CD34 MicroBead Kit (Human)* von Miltenyi Biotec verwendet. Die magnetische Zellaufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und beinhaltete zwei Schritte: die Markierung der Zellen mit Antikörper und magnetischen *MicroBeads*, und die Isolierung der markierten Zellen über eine magnetische Säule. Vor der Markierung wurden die Zellen durch ein 40 µm Zellsieb gegeben. 1×10^8 MNCs wurden mit 100 µL FcR Blocking-Reagenz und 100 µL monoklonalen Hapten-konjugierten Antikörper 15 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit MACS-Puffer gewaschen, in 400 µL MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 100 µL Anti-Hapten *MicroBeads* zugegeben und die Zellen 15 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf eine vorher mit MACS-Puffer gespülte LS-Säule des MACS-Separators gegeben. Die Zellen wurden dann noch dreimal mit Puffer gespült. Dann

wurden 5ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, der Magnet entfernt und durch das Einführen und Durchdrücken des Stempels die CD34⁺ Zellen aus der Säule eluiert. Um die Reinheit der CD34⁺ Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen auf eine neue Säule gegeben die Prozedur wiederholt. Die Reinheitsbestimmung folgte danach am Durchflusszytometer.

5.2.3 Reinheitsmessung und Zellzahlbestimmung am Durchflusszytometer

Die Zellen wurden zur Reinheitsmessung und Zellzahlbestimmung wie folgt markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Dazu wurde 100 µl der Zellsuspension mit 10 µl monoklonalem PE-konjugiertem anti-CD34 Antikörper und 10 µl monoklonalem FITC-konjugiertem anti-CD45 Antikörper 15 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl *Counting-Beads* dazu gegeben und der Ansatz wurde am Durchflusszytometer FC-500 der Firma Beckmann Coulter unter Verwendung der CXP Software gemessen. Die Reinheit der CD34⁺ Zellen wurde mit entsprechender Kompensation ausgewertet. Nach dem Ausschluss toter Zellen betrug die Reinheit der Aufreinigung stets >93%.

5.3 Kultur von humanen hämatopoetischen Stammzellen

Die aufgereinigten CD34⁺ Zellen wurden durchflusszytometrisch, wie unter 5.2.3 erläutert, quantifiziert und die Vitalität der Zellen mit Hilfe einer Trypan-Blau-Färbung am Lichtmikroskop bestimmt (siehe 5.5.2 Bestimmung der Vitalität und Zellzahl am Mikroskop). Dann wurde die Zellzahl auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und in zwei unterschiedliche Flüssigkultursysteme für 16 Tage (2-Phasen-Kultur) oder für 21 Tage (3-Phasen-Kultur) bei 37°C unter 5% CO₂ in Sechs-Loch-Platten mit jeweils 2, bzw. 3 ml Medium gegeben und kultiviert (Zusammensetzung der Kulturmedien: Siehe 4.11.2.1-4.11.2.3). Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert und an definierten Untersuchungstagen (siehe Tabelle 5.1) durchflusszytometrisch quantifiziert und erneut auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt, indem ein partieller oder ein totaler Austausch (siehe Tabelle 5.1) des entsprechenden Mediums vorgenommen wurde.

Tabelle 5.1: Ablauf der Zellkultur im 2- und 3-Phasen-Kultur der Erythropoese

3-PHASEN-KULTUR			2-PHASEN-KULTUR		
Unter- suchungstag	Mediumwechsel	Phase	Unter- suchungstag	Mediumwechsel	Phase
0	Kulturansatz	Beginn Phase 1	0	Kulturansatz	Beginn Phase 1
3	Partieller Austausch		4	Partieller Austausch	
7	Totaler Austausch	Beginn Phase 2	8	Totaler Austausch	Beginn Phase 2
10	Partieller Austausch		12	Partieller Austausch	
14	Totaler Austausch	Beginn Phase 3	16	Kultur beendet	
17	Partieller Austausch				
21	Kultur beendet				

5.4 Immunphänotypisierung der erythropoetischen Zellentwicklung mittels Durchflusszytometrie

Um die unterschiedlichen Stadien der erythropoetischen Zellentwicklung in den Flüssigkulturen beurteilen zu können, wurde der Verlauf der Expression von spezifischen Oberflächenantigenen während der Kultivierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden die von den Zellen exprimierte Antigene mit Antikörper markiert. Dazu wurden 1×10^5 Zellen in 100 μ l Zellsuspension mit 2,5 μ l anti Glycophorin A (GPA) PE-Cy5, 5 μ l anti-CD36 FITC, 5 μ l anti CD45 PE-Cy7 und 5 μ l anti CD71 PE 15 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml PBS gewaschen und das Pellet in 0,5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz am Durchflusszytometer Coulter FC-500 der Firma Beckman Coulter unter Verwendung eines 4-Farbenprotokolls mit entsprechender Kompensation gemessen und ausgewertet. Hier wurden die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Es wurden 1×10^5 Zellen für die Analyse eingesetzt.

5.5 Morphologische Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung

5.5.1 Färbung

An definierten Untersuchungstagen (siehe Tabelle 5.1) wurden Aliquots der kultivierten humanen Stammzellen entnommen. Zur Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung wurde dann folgendermaßen verfahren:

Zu einer Suspension von 50.000 Zellen wurde 50 μ L 1%-Albumin-Lösung gegeben. Anschließend wurde die Suspension mit PBS auf 250 μ l aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde in einer Zytocentrifuge 10 min. bei 400 rpm auf einen Glasobjektträger zentrifugiert.

Anschließend die Zellen mit Pappenheim bzw. Neural-Benzidin mit einer anschließenden Diff-Quik® Fix-Färbung gefärbt.

5.5.1.1 Neutrale Benzidin-Färbung

Objektträger 5 min. in Methanol fixieren, abtropfen lassen
1,5 min. in der 1%igen 3,3-Dimethoxybenzidinlösung inkubieren, abtropfen lassen
1,5 min. in der 1%igen Wasserstoffperoxidlösung inkubieren, abtropfen lassen
30 sec. mit Aqua dest. spülen
anschließend jeweils 5mal 1sec. in Diff-Quik-Fixierlösung, Diff-Quik-Färbelösung 1 und Diff-Quick-Färbelösung 2 eintauchen und abtropfen lassen
Objektträger mit Aqua dest. spülen
Objektträger an der Luft trocknen lassen

5.5.1.2 Färbung nach Pappenheim

Die Pappenheim-Färbungen wurden vom Institut für Hämatologie der Uniklinik Lübeck nach folgendem Protokoll angefertigt:

Luftgetrocknete Objektträger mit May-Grünwald-Lösung bedecken
3 min. einwirken lassen
Objektträger mit Aqua dest. abspülen und anschließend mit Aqua dest. bedecken
3 min. einwirken lassen
Zellen erneut mit Aqua dest. spülen
Aqua dest. abkippen
15 min. mit Giemsa-Färbelösung färben
gut mit Aqua dest. abspülen
Objektträger an der Luft trocknen lassen
eventuelle Farbreste an der Unterseite des Objektträgers mit Ethanol entfernen

Die Quantifizierung und morphologische Beurteilung der erythropoetischen Reifestufen erfolgte an einem Lichtmikroskop (Leica) mit 1000facher Vergrößerung. Auf jedem Objektträger wurden mindestens 250 Zellen morphologisch beurteilt und den unterschiedlichen Reifestadien der Hämatopoese (Stammzelle, Proerythroblast, basophiler und polychromatischer Erythroblast, Normoblast, Retikulozyt und nicht-erythroide Zelle) zugeordnet.

5.5.2 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl am Mikroskop

Zur Beurteilung der Vitalität der kultivierten humanen Stammzellen wurde folgendermaßen verfahren:

10 µl Aliquots der Zellsuspension entnommen

mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt

10 µl der Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer anschließend sofort analysiert und die weißen und blauen Zellen gezählt.

Die Anzahl der blauen Zellen stellte dabei den Anteil der toten Zellen dar. Das Verhältnis der weißen Zellen zu der Gesamtzellzahl zeigte den Anteil an vitalen Zellen in der Kultur.

5.6 Kokultivierung mit MSCs

Aus Knochenmarkaspirate wurde die Fraktion der mononukleären Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll Hypaque isoliert. Die Zellen wurden nach einer Zellzahl-Bestimmung am Vollblutzellzähler (Coulter Counter) mit Kulturmedium bestehend aus α -Mem, 20% FCS, 1% L-Glutamin, Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B (PSA) versetzt und in Kulturflaschen mit einer Dichte von 1×10^7 MNCs pro Flasche in 40 ml Medium im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich ausgetauscht und die Zellen passagiert. Dabei wurden die adhären Zellen mit einem Trypsin-EDTA-Gemisch 3 min. bei 37°C inkubiert, die Trypsin-Mischung wurde mit PBS+20% FCS neutralisiert und die Zellen vom Boden der Flasche losgelöst. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm 10 min. gewaschen und erneut ausgesät. Innerhalb von 14 Tagen kam es so zu einer selektiven Anreicherung und Proliferation von plastikadhären MSCs in den Kulturflaschen. Die Zellen der zweiten Passage wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen charakterisiert und für die Erstellung von Matrizes verwendet.

5.6.1 Charakterisierung der MSCs

Für die Charakterisierung wurden Antikörper gegen folgende Antigene eingesetzt: CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166 und HLA-A, B und C [144]. Diese Antigene werden alle auf MSCs exprimiert [17, 18, 76, 94, 144]. Um eine signifikante Kontamination mit hämatopoetischen Stammzellen auszuschließen, wurden die Messungen mit gegen CD34 (PE) und CD45 (FITC) gerichteten monoklonalen Antikörpern mitgeführt [144].

5.6.2 Erstellung der MSC-Matrizes

Für die Erstellung der MSC-Matrix wurden die MSCs aus der zweiten Passage verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst und anschließend in 2 ml Kulturmedium in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Vertiefung in eine 6-Loch-Platte überführt, sodass es zu einem den Boden der Vertiefungen bedeckenden Wachstum der Zellen kam. Bei einer Konfluenz von mindestens 95% wurden die Platten mit 30 Gray bestrahlt. Dies verhinderte ein weiteres Wachstum. Die so behandelten Matrizes wurden nach einem weiteren Mediumwechsel bis maximal 14 Tage nach der Bestrahlung für Kokultivierungsversuche verwendet.

5.6.3 Kokultivierung der $CD34^+$ Zellen mit MSCs

Bei diesem Versuch wurden drei parallele Ansätze vorbereitet. Für den ersten Ansatz wurden 5×10^5 $CD34^+$ Zellen in 2 ml Zellsuspension direkt auf die MSC-Matrix gegeben. Für den zweiten Ansatz wurde 1,5 ml Suspension von 5×10^5 $CD34^+$ auf ein Transwell, welches die Erythropoese- und MSC-Kultur voneinander trennte, gegeben. Im dritten Ansatz wurden 5×10^5 $CD34^+$ Zellen in 2 ml Suspension auf einer unbeschichteten Platte als Negativkontrolle kultiviert (Erythropoese in der 2-Phasen-Kultur). Für alle Ansätze wurde das 2-Phasen-Medium der Erythropoese als Kulturmedium verwendet.

5.7 Nukleinsäure-Standardtechniken

5.7.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits. Die Herstellung der Lösungen und Puffer sowie die Durchführung erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

5.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen wurde photometrisch am Spektralphotometer Hitachi U-3000 in Quarzküvetten durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Für eine OD₂₆₀ von 1 wurden die Referenzkonzentrationen von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 40 µg/ml für RNA zugrunde gelegt (82). Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

RNA-Konzentration (µg/ml) = OD (260nm) × 40 µg/ml × Verdünnungsfaktor

5.7.3 *cDNA-Synthese von Gesamt-RNA*

Zu 1-5µg der Gesamt-RNA wurde 1µL Oligo dT15-Primer geben, auf 10 µL mit Aqua bidest. aufgefüllt und für 5 min. bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der Gesamt-RNA zu denaturieren. Hinzu kamen:

- 4µl M-MLV RT 5x-Puffer
- 2µl dNTPs (10mM)
- 2,3µl DTT (0,1%)
- 0,7µl RNasin (40U/µL)
- 1µl M-MLV Reverse Transkriptase

Anschließend 5 min. bei 90°C inkubieren

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Als Kontrolle wurde in jeweils einem Ansatz die Reverse Transkriptase weggelassen (minus-RT-Kontrolle). In diesem Ansatz sollte es zu keiner cDNA-Bildung und somit zu keinem Signal bei der *real-time* RT-PCR kommen.

5.8 *Microarray-Analysen*

Das *Microarray*-Verfahren wird bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression verwendet, indem die RNA-Expression bestimmter Gene untersucht wird. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse der *Microarray*-Analyse beruhen auf der Versuchsdurchführung des Unternehmens Miltenyi-Biotec™, im Auftrag des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck. Die anschließenden Beschreibungen der Auswertung unter 5.8.1 und 5.8.2 sind aus dem Servicereport, der im Auftrag unserer Arbeitsgruppe von der Firma Miltenyi angefertigt wurde und sich in meinem Besitz befindet, entnommen [152]. Ziel war die Untersuchung der Spenderproben an verschiedenen Tagen der 3-Phasen-Erythropoese-Flüssigkultur zum Referenztag 0. Hierfür wurde die gewonnene Gesamt-RNA der einzelnen Erntetage an Miltenyi-Biotec versandt und weiterbehandelt. Als Plattform für die *Microarray*-Analysen diente das *PIQORT^M Stem Cell Microarray (human)* mit 936 Sonden. Auf diesem Array wurde T7-amplifizierte RNA hybridisiert, die an verschiedenen Kulturtagen der Erythropoesekultur isoliert wurde. Insgesamt wurden 6 Experimente durchgeführt. Anschließend wurde die RNAs der Untersuchungstage 7, 10, 14, 17 auf die Membran hybridisiert.

5.8.1 Auswertung der Arrays

Die Auswertung des *Microarray* beruhte auf dem Normalisierungsverfahren und definierten Grenzwerten der Firma Miltenyi-Biotec. Um die Daten zu normalisieren, wurden die relativen Expressionen durch die Intensitäten des Fluoreszenzfarbstoff-Verhältnisses Cy5/Cy3 dargestellt. Zu dieser Ratio war ebenfalls der entsprechende Variationskoeffizient (cv) in % gegeben, der sich auf das durchschnittliche Expressionsverhältnis der 4-fach-Bestimmung (4 Spots pro Gen) bezog. Nur die Spots wurden für die Cy5/Cy3 –Kalkulation berücksichtigt, die mindestens in einem Kanal eine Signalintensität aufwies, die 2fach höher war als die mittlere Signalintensität des Hintergrundes. Gene mit sehr geringen Signalintensitäten (<2-fach über den durchschnittlichen Hintergrundintensitäten in beiden Farbkanälen) waren farblich nicht hinterlegt. Eine grüne Hinterlegung implizierte eine <0,58-fache Runterregulierung eines bestimmten Gens im Verhältnis zu Tag 0. Eine rote Hinterlegung stellte eine mehr als 1,7-fache Hochregulierung zu Tag 0 dar. Gene, die in mehr als 12 der 24 Proben keine Expression zeigten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Außerdem wurden Gene aus der Analyse entfernt, die im Vergleich zum Tag 0, also zu der Referenz-mRNA weniger als 0,58-fach differenziell reguliert waren. Nach diesen Selektionsschritten blieben 496 Gene übrig. Von den Signalstärken dieser Gene wurde der Logarithmus zur Basis zwei gebildet. Zusätzlich wurde zu jeder Ratio die korrespondierende, x-fache Veränderung errechnet, um einen besseren, intuitiven Eindruck für die Expressionsveränderungen zu bekommen.

5.8.2 Bioinformatische Datenanalyse der Microarrays

5.8.2.1 Clustering-Analyse (unsupervised)

Die *Clusteranalyse* gruppiert alle relevanten Gene in Anbetracht ihres ähnlichen Expressionsprofils. Alle Gene werden in einer hierarchischen Baumstruktur gruppiert, wobei Gene, die eine ähnliche Expression zeigen (coexprimierte Gene) dicht nebeneinander und Gene, deren Expression sich voneinander unterscheidet, weit voneinander entfernt platziert sind. In der *Clusteranalyse* wurden coexprimierte Gene identifiziert und miteinander in einer *clustered heat map* zusammengefasst. Die Farben in den *heat maps* repräsentieren die Genexpressionslevel. Rot zeigte eine höhere Expression des Gens im Vergleich zur Referenz, während grün eine relativ niedrige Expression des betreffenden Gens bedeutet. Schwarz bedeutete keine differenzielle Genregulation, und grau zeigte eine fehlende Expression.

Für das *Clustering* wurde die *SOTA*-Methode (*self-organizing tree algorithm*) verwendet. Dieser Algorithmus gliedert die Gesamtheit aller Gene in kleinere Gruppen von koregulierten Genen– *Cluster* – auf und stellt ihre Beziehung zu einander in Form einer Baumstruktur (Dendogramm) dar. Im Prozess des *Clustering*s wird jedes Gen zu derjenigen Gruppe zugeordnet, deren Expressionsschwerpunkt – im Weiteren Centroid genannt – dem Expressionsverhalten des Gens am ähnlichsten ist. Größere Gruppen definieren neue Knoten, von denen zwei neue Tochtergruppen (Arme) abstammen. Die *SOTA*-Analyse wurde in 10 Zyklen mit „nicht-zentriertem Pearsonschem Korrelationskoeffizient“ als Ähnlichkeitsmaß durchgeführt. Als Abstandmaß und Vereinigungsregeln zum *Clustering* der resultierenden Gene wurden der „euklidische Abstand“ und *average linkage clustering* verwendet.

5.8.2.2 Diskriminatorische Genanalyse

Bei dieser Methode wurden Algorithmen verwendet, um Gene zu identifizieren, die ihre Expression signifikant während der Kulturzeit verändern. Sie „verhalten“ sich in jedem Kulturansatz gleich. Als statistische Methode wurde in dieser Arbeit *SAM* (*significance analysis of Microarrays*) verwendet. Diese Methode wurde 2001 von Tusher, Tibshirani und Chu [95] etabliert, um herauszufinden, ob Veränderungen der Genexpression statistisch signifikant sind. Diese Auswertungsmethode erlaubt, dass auch diejenigen Gene erfasst werden, die nicht so stark reguliert wurden und daher vielleicht aus der Analyse und Auswertung ausgeschlossen worden wären. Außerdem wird in dieser Analyse das „Hintergrundrauschen“, also alle unspezifischen Einflussgrößen z.B. das Alter der Patienten, das Geschlecht usw. ausgeblendet und auf die eigentliche Fragestellung des Experiments fokussiert.

SAM identifiziert signifikante Gene durch das Ausführen von spezifischen t-Tests, basierend auf Permutationsanalysen der Expressionsdaten und kalkuliert die falsch-positiven Daten heraus.

5.9 real-time RT-PCR-Analyse

Die Expression von ausgesuchten Genen aus der *Microarray*-Analyse (siehe 5.10) (FLT3, HBZ, RXRA, CD38, TAL1 und CLCN3) wurde mit Hilfe der *real time* RT-PCR am iCycler von BioRad durchgeführt. Zunächst wurde die RNA als Matrize benutzt und in eine komplementäre cDNA umgeschrieben. Dem Reaktionsgemisch mit der cDNA wurde dann ein am 5'-Ende mit Reporterfluorogen markierter Sonden- ein Fluoreszin-Derivat- und

die AmpliTaq DNA-Polymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität beigemischt. Die Sonde, sie besteht aus 15-30 Nukleotiden, trägt am 3'-Ende zusätzlich einen 3'-OH-blockierenden Quencher-Farbstoff, ein Rhodaminderivat. Der Quencher-Farbstoff ist über ein Linkermolekül (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit Primern zunächst sequenzspezifisch an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde zerschnitten wird. Kommt es zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe- und damit auch der FET - zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Freie, nicht-hybridisierte Sonden werden hingegen nicht hydrolysiert. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs mit jedem PCR-Zyklus an. Das gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da die nicht 100%ig bindenden Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Die Veränderungen werden mit Hilfe des iCycler im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst [13, 153].

Die PCR-Zyklusnummer, bei der die Fluoreszenzemission einen Schwellenwert erreicht, der dem 10-fachen der Standardabweichung der Basislinienemission entspricht, dient für quantitative Messungen. Diese Zyklusnummer bezeichnet man als Schwellenwertzyklus (engl. *cycle threshold*) oder Ct-Wert. Dieser ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge der verwendeten cDNA-Proben. Von jeder Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Zu jedem Versuch wurde eine NTC („*non template control*“) mitgeführt, bei der die RNA durch Aqua dest. ersetzt wurde, um Kontaminationen auszuschließen [153]. Die Reaktion wurde in einem *real-time*-Cycler (iCycler, Bio-Rad) durchgeführt.

Tabelle 5.2: PCR-Mastermix

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5µl
Aqua dest. (RNasefrei)	9,5µl
GAPDH	1µl
Sonde-Primer-Gemisch	1µl
cDNA	1µl

Tabelle 5.3: PCR-Program

<i>PCR Schritte</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholung</i>
Hold	50°C	02:00 min.	1
Aktivierung der Taq Polymerase	95°C	10:00 min.	1
Denaturierung der cDNA	95°C	00:15 min.	45
Annealing und cDNA Neusynthese	60°C	01:00 min.	45
Hold	4°C	∞	1

5.9.1 real time RT-PCR zur relativen Quantifizierung von Zielsequenzen

Bei dieser Form der Quantifizierung sollte die Zielsequenz in ihrer Expression relativ zu einer nicht spezifischen Sequenz bestimmt werden. Dabei wurde die unbekannte Menge der Zielsequenz semiquantitativ bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz untersucht. Als Standard diente das sogenannte *housekeeping*-Gen GAPDH (*humane Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase*, ein Enzym der Glykolyse, das in allen stoffwechselnden Zellen näherungsweise gleich stark exprimiert wird). Das bedeutet, in derselben Probe wird die Expression des Ziel-Gens und des Referenz-Gens parallel erfasst und die ermittelten Werte des Ziel-Gens relativ zu der endogenen GAPDH-Kontrolle angegeben. Die Sonden für die Detektion des Zielgens tragen den Reporterstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM). Für die Detektion der GAPDH wurde der Reporter VICTM verwendet [13, 153]. Das Signal einer iCycler PCR repräsentiert die Veränderung in der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenz-spezifischen Sonde. Dieser

normalisierende Effekt geht in die Berechnung über den Rn-Wert ein. Der Rn-Wert (normalisiertes Reportersignal) entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffs. Unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Volumina-Schwankungen (Pipettierfehler) können somit ausgeglichen werden. Dabei repräsentieren positive Rn-Werte die relative Fluoreszenz von Ansätzen mit Probenmaterial, während negative Rn-Werte die Fluoreszenz von NTCs darstellten. Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basieren, werden ausgeglichen, indem das binnen der ersten PCR-Zyklen erstellte Hintergrundsignal vom jeweiligen Rn-Wert abgezogen wird. Dieser Wert wird als ΔRn -Wert bezeichnet [13, 153].

Wie bereits erwähnt, drückt der Ct-Wert die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Es gilt: Je mehr Ziel-Gen in der Ausgangsprobe vorhanden ist, desto kleiner ist der Ct-Wert. Zudem ist der Ct-Wert abhängig von der Effektivität der PCR-Reaktion, welche hauptsächlich von der Primereffektivität beeinflusst wird. Für die Quantifizierung erstellt das System eine Standardkurve Ct über (LogN) der Startkopienzahl und ermittelt davon über Interpolation die Startkopienzahl der zu untersuchenden Proben. In einem PCR-System mit 100 % Effizienz nimmt der Ct-Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab. Zur Bestimmung der Expressionsaktivität der Proben wurde die vergleichende Ct-Methode, auch $\Delta\Delta Ct$ -Methode genannt angewendet. Dazu wurde zunächst die Differenz aus dem Ct-Wert des *housekeeping*-Gens und dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens gebildet (ΔCt). Da in der Amplifikationskurve der ΔRn logarithmisch aufgetragen wurde, musste der Semiquantifizierungswert als $2^{\Delta Ct}$ ausgedrückt werden. Zur Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_x - \Delta Ct_{kb}$$

x: Thresholdwert für die endogene Amplifikationskontrolle

kb: Threshold für den normalisierten Wert der Zielsequenz des Kalibrators

Kalibrator: Probe, die als Grundlage für die Erstellung vergleichender Ergebnisse dient (Probematerial vom Tag 0 des Erythropoesemodells)

Die Expressionsrate des untersuchten Gens wurde als prozentualer Anteil der Expression des Kalibrators angegeben. Der Kalibrator wird dadurch gleich 100% gesetzt und die unbekanntes Proben werden als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator bestimmt.

War die Expressionsrate des untersuchten Gens höher als die des Kalibrators, war das untersuchte Gen hoch reguliert. War sie niedriger, war das Gen herunter reguliert [153].

5.9.2 Vergleichende CT-Methode ($\Delta\Delta$ CT-Methode)

Sind die Effizienten für Zielsequenz und Referenzsequenz ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden 0. Mit Hilfe dieser Vorexperimente kann bei Anwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode gezeigt werden, dass die Effizienten beider Reaktionen von Zielsequenz und Referenz ungefähr gleich sind. Dabei sollte der absolute Wert der Steigung des Graphen $<0,1$ sein. Kann dies gezeigt werden, so kann die $\Delta\Delta$ CT-Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden, ohne dass eine Standardkurve generiert werden muss. Im Folgenden sind die absoluten Werte der Steigung des Graphen für die verschiedenen PCR-Ansätze aufgelistet:

HBZ [0,055]

RXRA [0,040]

FLT3 [0,015]

CD38 [0,016]

TAL-1 [0,038]

CLCN3 [0,025]

Alle Werte sind $<0,1$, somit war die Generierung einer Standardkurve nicht notwendig.

5.9.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Reaktionsansätze wurden nach der PCR zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Zu diesem Zweck wurden 10 μ L der PCR-Produkte mit 2 μ L Gel-Lade-Puffer (einfach) gemischt und auf das Gel aufgetragen.

Herstellung des Agarosegels

1,5g Agarose zu 75 ml 1xTBE-Puffer dazugeben

in der Mikrowelle aufkochen

2 Gele mit je 30 ml gießen

30 min. bei 4°C inkubieren

Die Gele wurden bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die Laufzeit des Gels betrug 45 min. bei einer Spannung von 90 Volt. Die mRNA-Banden sind nach 20-minütigem Ethidiumbromidbad unter UV-Licht sichtbar gemacht worden.

5.10 RNA-Interferenz

Der Mechanismus der RNA-Interferenz wurde von Mello und Fire das erste Mal im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben [96-99]. Es handelt sich um einen endogenen, zellulären, regulatorischen Mechanismus, wobei eine doppelsträngige RNA (dsRNA) spezifisch eine komplementäre RNA-Sequenz in der Zelle erkennt und diese posttranskriptionell abbaut [13]. Die Injektion von dsRNA führt zu einer spezifischen Herunterregulierung der Genaktivität. Die RNA-Interferenz wird in der Forschung verwendet, um z.B. gezielt die Translation von Proteinen zu unterdrücken und somit ihre Funktion zu erforschen. Erste Hinweise für die Wirkungsweise der dsRNA gab es durch die Entdeckung von kleinen, etwa 21 Basenpaare (bp) langen, doppelsträngigen Fragmenten, die von der ursprünglich eingebrachten dsRNA abstammten. Das Enzym, das diese Fragmentierung vornimmt, wurde identifiziert und aufgrund seiner Funktion als DICER bezeichnet [13]. Es handelt sich um eine RNase mit Homologie zur bakteriellen RNaseIII. Die Produkte dieses Enzyms, die 21 bp langen Fragmente, wurden siRNAs (*small interfering RNAs*, *kleine interferierende RNAs*) genannt. Die doppelsträngigen siRNAs werden unter ATP-Verbrauch vermutlich mit Hilfe einer Helicase entwunden und ein Einzelstrang in den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) überführt. Mit dem Einbau der kleinen RNAs erhält der RISC die Spezifität für eine mRNA mit einer Sequenz, die komplementär zu der eingebauten siRNA ist. Der Ribonukleoproteinkomplex bindet über die siRNA an die Zielsequenz und zerschneidet diese in der Mitte des Hybrids. Die siRNA bleibt dabei erhalten [13]. Abbildung 5.2 stellt die Schritte dieses Mechanismus schematisch dar.

In seiner Arbeit konnte Elashir et al. zeigen, dass synthetische dsRNA von 21 bp Länge, direkt in Säugerzellen eingebracht, zu einer sequenzspezifischen Hemmung der Genexpression führt ohne eine unspezifische Aktivierung der Protein-Kinase R [100]. In höheren Eukaryontenzellen führt lange dsRNA, ein Intermediat bei der Replikation vieler Viren, zu einer sequenzunabhängigen Aktivierung des antiviralen Interferonsystems und damit verbunden zu einer Phosphorylierung der Protein-Kinase R und im weiteren Verlauf zur unspezifischen Hemmung der Proteinbiosynthese [13].

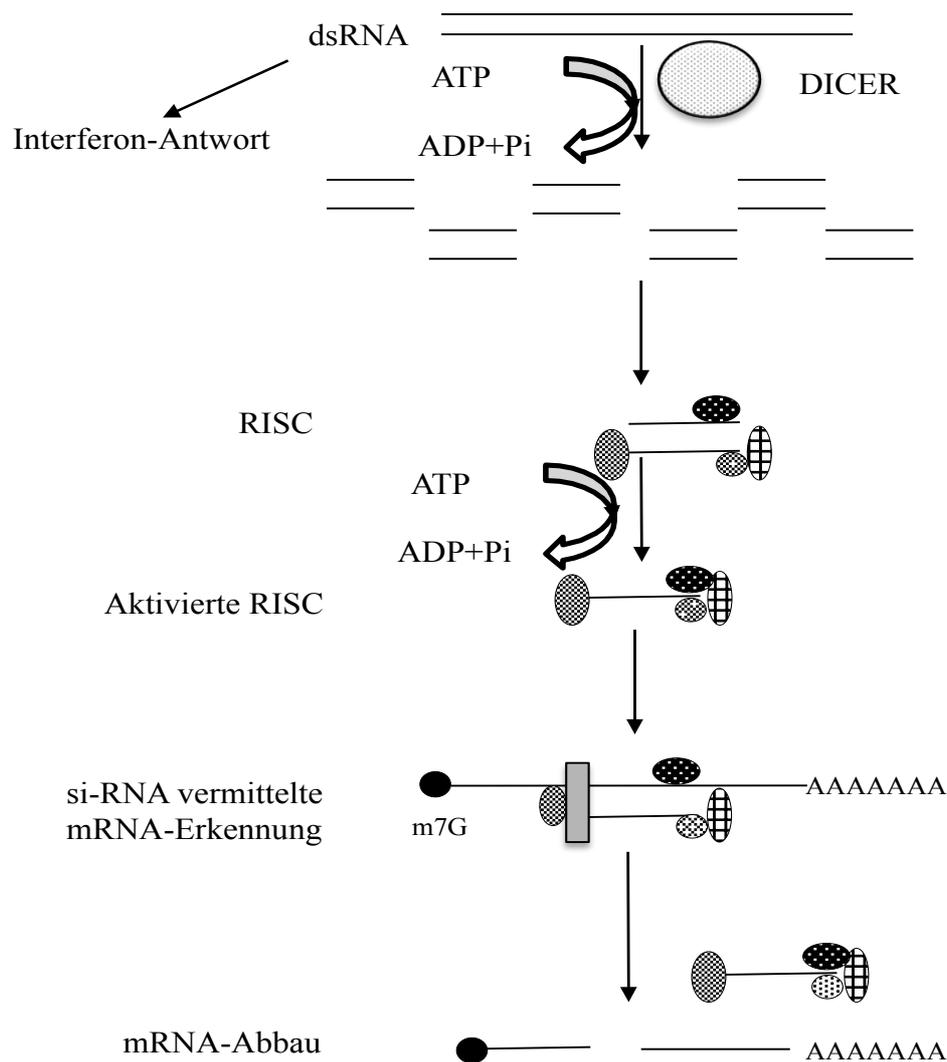


Abbildung 5.2: Der Mechanismus der RNA-Interferenz. Das Enzym Dicer, schneidet lange, doppelsträngige RNA in 21 bp lange siRNA, die vom RNA-Induced Silencing Complex (RISC) aufgenommen werden. Dieser wird aktiviert und spaltet die Ziel-RNA, nachdem diese mit Hilfe von siRNA erkannt wurde. (modifiziert nach *BIOforum* 4/2004, Seite 46-47, GIT-Verlag)

5.10.1 Einschleusung der siRNA mittels Nukleofektion

In den CD34⁺ Zellen wurden mit Hilfe des Nukleofektor-Elektroporationsgerätes durch Einschleusung von siRNAs die Gene TAL1 und CLCN3 nach Herstellerangaben gehemmt. Als Kontrolle diente ein Teil der Zellen, die genauso behandelt wurden wie die transfizierten Zellen, ohne dass siRNA zugegeben wurde (*Mock-Kontrolle*, aus dem englischen Wort *mocking* = imitieren).

Für die Transfektion wurden 3×10^6 CD34⁺ Zellen mit 100 µl *Human-CD34-Cell Nucleofector-reagent*, bestehend aus 0,5 ml Supplement und 2,25 ml Nucleofector-Lösung gemischt. Dann wurden 2 µl 100 µM siRNA hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Amaxa-Gerät transfiziert. Bei der *Mock*-Kontrolle wurde die siRNA durch Aqua dest. ersetzt. Anschließend wurden die Zellen, wie bereits unter 5.3.2 erläutert, kultiviert. Die Zellen wurden außerdem mit pmaxGFP transfiziert. Das Plasmid pmaxGFP enthält ein grünes Fluoreszenz-Markerprotein, welches bei erfolgreicher Transfektion in der Zelle angeschaltet wird und so am Fluoreszenzmikroskop oder FACS zur Ermittlung der Transfektionseffizienz verwendet werden kann.

5.11 Proteinarray-Analysen

Zur semiquantitativen Detektion der von den MSCs und hämatopoetischen Zellen der Kultur möglicherweise sezernierten Wachstumsfaktoren wurde mit Kulturüberständen der direkten bzw. indirekten Kokultivierung der erythroiden Zellen mit MSCs ein Proteinarray mit 174 Zielzytokinen durchgeführt. Die Analyse wurde mit einem gebrauchsfertigen Array-Kit der Firma RayBiotech basierend auf Nylonmembranen, an die Antikörper gebunden waren, durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um zellfreie Kulturüberständen, die am Kulturtag 12, also nach 96 Stunden Inkubation (zuletzt umgesetzt an Tag 8), gewonnen wurden (n=2). Diese wurden nach Gewinnung in sterilen Gefäßen bei -80 °C tiefgefroren und am Tag der Verarbeitung wieder aufgetaut [144]. Die Überstände der Erythropoese-Kultur und der Kultur von „puren“ MSCs wurden als Kontrolle verwendet. Diese wurden auf die Membranen gegeben und inkubiert, damit die sezernierten Zytokine auf den jeweiligen Antikörper auf der Membran binden. Die Detektion erfolgte mittels eines biotinmarkierten Sekundärantikörpers, der auf humane Proteine bindet, auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran mit HRP (*horseradish-peroxidase*)-konjugiertes Streptavidin inkubiert. Danach wurde ein Substrat auf die Membran gegeben, welches von HRP umgesetzt wurde und eine Chemilumineszenz verursachte. Die Membran wurde dann zwischen zwei Folien eingespannt und direkt im Anschluss im Auslesegerät IL350 von GE Healthcare mit Hilfe der Imagequant TL-Software analysiert. Alle gemessenen Werte wurden auf eine interne Kontrolle bezogen.

5.12 Durchführung von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Zur Quantifizierung vom Zytokin Interleukin (IL)-6, das bereits im Proteinarray detektiert wurde, wurde ELISA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Kulturüberstände der reinen MSC-Kultur, der direkten Kokultur und der indirekten Kokultur mittels des *IL-6 Quantikine ELISA Kit, human* der Firma R&D entsprechend der Herstellerangaben gemessen. Sechs unabhängige Versuche wurden so in Triplikate untersucht.

5.13 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism für Windows durchgeführt. Zur Beurteilung einer Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest angewendet. Wenn die Werte normal verteilt waren, wurde die Signifikanz mittels ANOVA bestimmt, wenn zwei Gruppen verglichen wurden. Waren die Proben nicht normalverteilt waren, wurde die Signifikanz mit Hilfe des Wilcoxon-Tests beim Vergleich von zwei Gruppen bzw. der Kruskal-Wallis zum Vergleich von drei Gruppen verwendet. Werte $<0,05$ gelten als signifikant.

Die Auswertung des Microarrays beruht auf den Normalisierungsverfahren und definierten Grenzwerten der Firma Miltenyi-Biotec.. Die relativen Expressionen sind hierbei durch die Intensitäten des Fluoreszenzfarbstoff-Verhältnisses Cy5/Cy3 dargestellt. Zu dieser Ratio ist ebenfalls der entsprechende Variationskoeffizient (cv) in % gegeben, der sich auf das durchschnittliche Expressionsverhältnis der 4-fach Bestimmung (4 Spots pro Gen) bezieht. Gene mit sehr geringen Signalintensitäten (<2 -fach über den durchschnittlichen Hintergrundintensitäten in beiden Farbkanälen) sind farblich nicht hinterlegt. Eine grüne Hinterlegung impliziert eine $<0,58$ -fache Runterregulierung eines bestimmten Gens im Verhältnis zu Tag 0. Eine rote Hinterlegung stellt eine mehr als 1,7fache Hochregulierung zu Tag 0 dar.

6. Ergebnisse

Zur Etablierung einer möglichst realistischen *in vitro* Kultur der Erythropoese wurden in dieser Arbeit zunächst zwei unterschiedliche Systeme der Erythrozytengenerierung miteinander verglichen. Hierfür wurden die Erythropoese-Kulturen basierend auf den Veröffentlichungen von Panzenböck et al. [49] (2-Phasen-Kultur) und Neildez-Nguyen et al. [50] (3-Phasen-Kultur) mit einigen Modifikationen (siehe Tabelle 6.1) als die „Lübecker-Erythropoese-Kultur“ verwendet. Die Ergebnisse dieser Etablierung wurden durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlicht [146]. Das Ziel hierbei war, eine Flüssigkultur mit der bestmöglichen Proliferation und Differenzierung zu generieren. Tabelle 6.1 verdeutlicht die unterschiedliche Zusammensetzung der Basismedien.

Tabelle 6.1: Zusammensetzung des Basismediums der Lübecker Erythropoese-Kultur (2- und 3-Phasen-Kultur) im Vergleich zu Neildez-Nguyen et. al. und Panzenböck et. al.

Lübeck	Neildez-Nguyen et. al.	Panzenböck et. al
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	serumfreies Medium	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)
15% FCS	2% BSA	15% FCS
1% BSA	50 µg/ml eisengesättigtes humanes Transferrin	1% BSA
15% destilliertes Wasser	900 µg/ml Eisensulfat	15% destilliertes Wasser
1,9 mM Natriumbicarbonat,	90 µg/ml Eisennitrat	1,9 mM Natriumbicarbonat,
10 ⁻⁴ mol/L β-Merkaptoethanol	100 µg/ml Insulin	10 ⁻⁴ mol/L β-Merkaptoethanol
128 µg/ml eisengesättigtes humanes Transferrin	30 µg/ml Soyabohnen-Lecithin	128 µg/ml eisengesättigtes humanes Transferrin
100 µg /ml Streptomycin	7,5 µg/ml Cholesterol	100 µg/ml Streptomycin
100 IU/ml Penicillin	10 ⁻⁶ M Hydrocortison	100 IU/ml Penicillin

Die Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren, die dem Basismedium unseres 2-Phasen-Modells hinzugefügt wurden, entsprach den Angaben der Veröffentlichung von Panzenböck et al. [50] (siehe 4.6). Das Lübecker 3-Phasen-Modell unterschied sich lediglich durch die Zugabe von 100 µg/ml Insulin zu jeder Kultivierungsphase vom 3-Phasen-Modell aus der Veröffentlichung von Neildez-Nguyen et. al. Als Ausgangsmaterial für diese Versuche dienten humane adulte CD34⁺ Stammzellen, welche mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Positivselektion mit Hilfe von

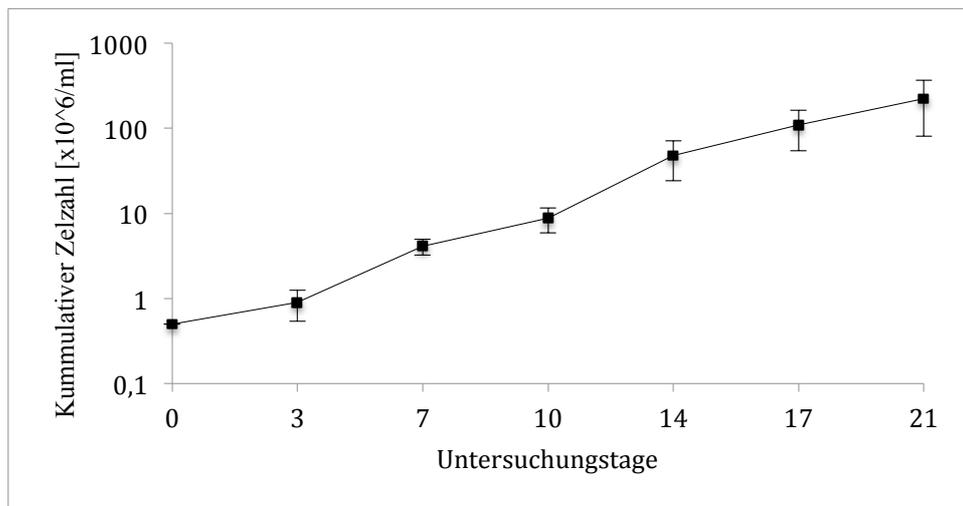
CD34⁺ MACS-Beads (Miltenyi Biotech) isoliert und in Flüssigkulturen überführt (5×10^5 Zellen / ml) wurden. Die Reinheit der Zellen nach der Isolation betrug stets $\geq 93\%$.

6.1 2-Phasen- und 3-Phasen-Kultur der Erythropoese

6.1.1 Proliferationsvergleich

Am Ende der 2-Phasen-Kultur der Erythropoese wurde im Mittel eine Zellkonzentration von $26,1 \pm 11,9 \times 10^6$ Zellen pro ml und somit eine 53-fache Expansion ermittelt. In der 3-Phasen-Kultur mit einer einwöchigen Initiationsphase konnte eine kumulative Zellzahl von $223 \pm 141 \times 10^6$ Zellen pro ml erreicht werden. Für dieses Modell wurde eine 447-fache Expansionsrate ermittelt. Bereits ab Tag 3 der 3-Phasen-Kultur konnte der Proliferationsvorteil dieser Kultur beobachtet werden. Die Zellzahl der 2-Phasen-Kultur betrug am Tag 4 der Untersuchung $0,9 \times 10^6$ Zellen pro ml. Der Untersuchungstag 4 der 2-Phasen-Kultur war bezüglich der Glycophorin A(GPA)-Produktion, also der erythropoetischen Differenzierung mit dem Tag 7 der 3-Phasen-Kultur vergleichbar. Am Tag 7 der 3-Phasen-Kultur betrug die Zellzahl bereits $4,1 \times 10^6$ Zellen pro ml und wies somit einen deutlichen Vorsprung im Vergleich zu 2-Phasen-Kultur auf (Zusammensetzung der Kulturmedien: siehe Kapitel 4.6: Kulturmedien). Abbildung 6.1 zeigt die kumulative Zellzahl der beiden Erythropoese-Kulturen im Vergleich.

A



B

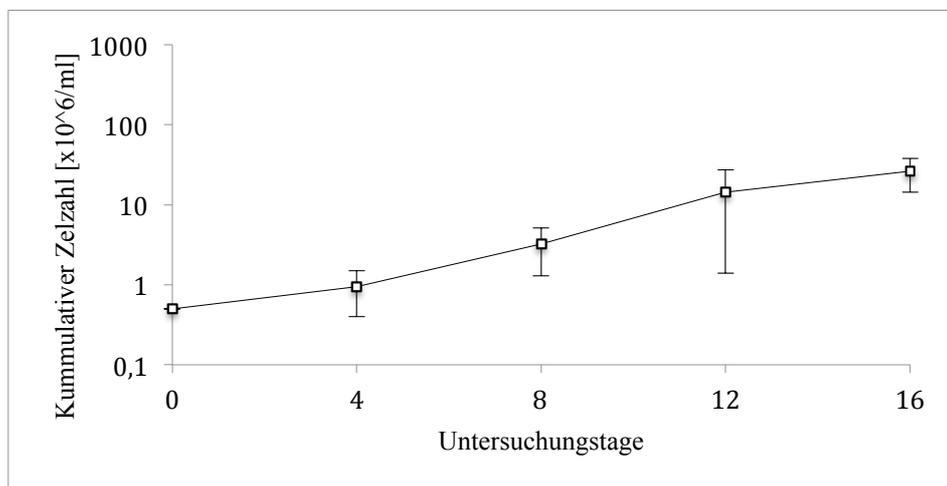


Abbildung 6.1 Vergleich der kumulativen Zellzahl in der 2-Phasen- und 3-Phasen-Kultur der Erythropoese. Die initiale Zellzahl betrug jeweils $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ ($n=8$). Die Balken zeigen die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA.

6.1.2.1 Koexpression der spezifischen Oberflächenmarker

Je nach Reifegrad exprimieren erythropoetische Zellen spezifische Oberflächenmarker, deren durchflusszytometrische Untersuchung die Beurteilung der unterschiedlichen Stadien im Verlauf der Erythropoese zulässt und eine Aussage darüber zulässt, ob die Kultur eine erythropoetische Reifung durchläuft. In beiden Erythropoese-Kulturen konnte man die bereits bekannten typischen Antigenexpressionsmuster beobachten. Die Herunterregulierung der prototypischen Antigene für humane Stammzellen (CD34) und Zellen der myeloischen Reihe (CD45) einerseits und die zunehmende Expression der Oberflächenmarker CD36, CD71 und Glycophorin A (GPA) andererseits, zeigten die

reguläre Entwicklung der *in vitro* generierten Zellen entlang einer normalen, erythropoetischen Ausreifung.

Der Vergleich der Punktwolken (scatter plots) der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigt die genaue Veränderung der Oberflächenexpression während der Reifung der Stammzellen zu erythropoetischen Zellen; hier exemplarisch gezeigt für die 3-Phasen-Kultur (Abbildung 6.2). Während die initial ausgesäten hämatopoetischen Stammzellen am Tag 0 der Kultur CD45 und CD34 (nicht dargestellt) positiv waren, jedoch keine Oberflächenexpression der erythrozytären Marker CD36- und GPA aufwiesen, konnte zunächst eine alleinige schwache CD36 Expression (Tag 7) und später eine doppelt-positive Zellpopulation ($CD36^+GPA^+$) am Tag 14 der Kultur, also 7 Tage nach EPO-Zugabe beobachtet werden. Diese Zellen verloren mit zunehmender Ausreifung, bis zum Ende der Kultur das CD36-Antigen und wurden stark GPA-positiv. Korrespondierend hierzu konnte in der 2-Phasen-Kultur die $CD36^+GPA^+$ doppelt positive Zellpopulation bereits am Tag 8 der Kultur beobachtet werden. Auch hier verloren die reiferen Stadien der erythropoetischen Zellen allmählich den frühen erythrozytären Marker CD36 und exprimierten den erythrozytenspezifischen Marker, das Glycophorin A mit hoher Dichte auf ihrer Oberfläche (Daten nicht gezeigt).

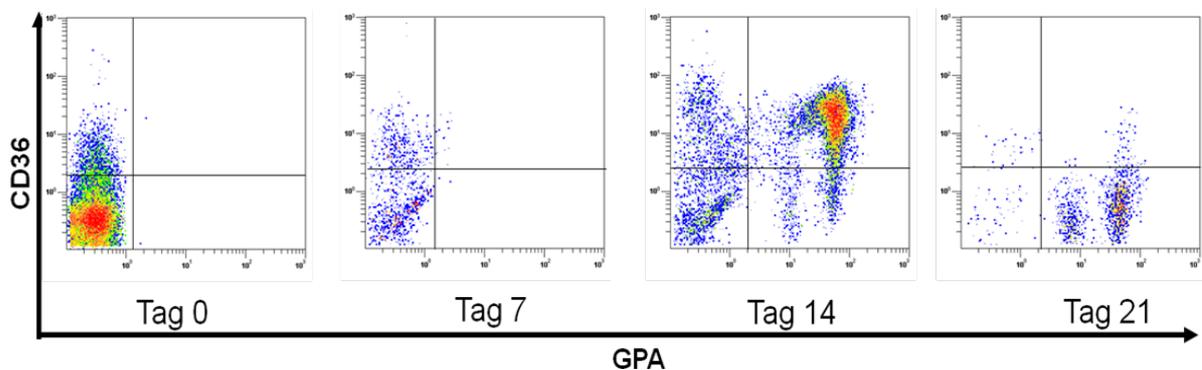


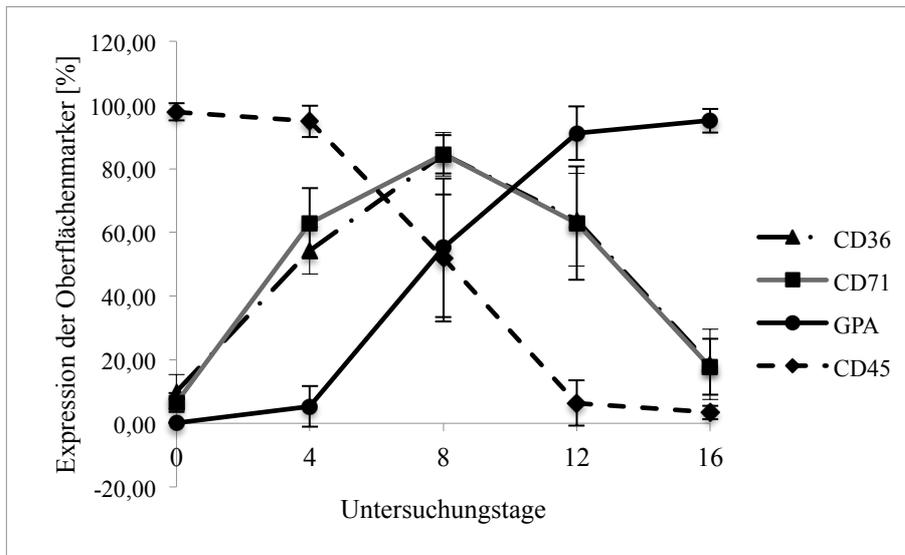
Abbildung 6.2: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von hämatopoetischen Stamm- und erythropoetischen Vorläuferzellen an den Untersuchungstagen 0, 7, 14 und 21 der 3-Phasen-Kultur. Am Tag 0 der Kultur waren fast alle Zellen CD36 und GPA negativ. Am Tag 14 konnten doppeltpositive erythroide Vorläuferzellen in der Kultur beobachtet werden. Am Tag 21 der Kultur waren über 90% der Zellen einfach positiv für GPA.

Mit beginnender Reifung der Zellen nahm die CD36-Expression zu, welche typischerweise auf frühen erythropoetischen Vorläuferzellen zu finden ist. Aus diesen Zellen können noch koloniebildende Einheiten wie z.B. CFU-E entstehen. Die CD36-Expression erreichte ihr

Maximum am Tag 8 der 2-Phasen-Kultur mit $84,6 \pm 6,9\%$. Im Vergleich dazu wurde bei der 3-Phasen-Kultur das Maximum von $67,7 \pm 14\%$ erst am Tag 14 erreicht.

Glycophorin A (GPA, CD235a) ist der wichtigste spezifische Marker für die erythroetischen Reihe, der ab dem Stadium des basophilen Erythroblasten exprimiert wird. GPA konnte in der 2-Phasen-Kultur am Tag 8 mit $55,0 \pm 16,7\%$ nachgewiesen werden. Die Expression dieses Antigens nahm während der Kultur kontinuierlich zu und erreichte am Ende der Kultur (Tag 16) einen Wert von $95,0 \pm 3,7\%$. Die GPA-Expression in der 3-Phasen-Kultur mit einer EPO-unabhängigen Vorphase konnte erst ab Tag 10 beobachtet werden. Am Tag 14 der Kultur stieg die GPA-Expression auf $53,0 \pm 12,1\%$ und erreichte am letzten Kulturtag vergleichbar hohe Werte ($94,5 \pm 5,5\%$ am Tag 21). Parallel zur Zunahme der GPA-Expression konnte eine Abnahme der CD45-Expression -ein pan-Leukozytenmarker, der allerdings auch auf frühen multipotenten Stammzellen exprimiert wird- beobachtet werden. Durch die Induktion der Erythropoese mittels Wachstumsfaktorenzugabe ist der verbleibende CD45-Gehalt ein Maß für die „Kontamination“ der Kultur mit Zellen der weißen Reihe. Am Ende der Kulturzeit betrug der Anteil an CD45 positiven Zellen, also an nicht-erythrozytären Zellen nur $5,4 \pm 1,6\%$ in der 3-Phasen- und $3,4 \pm 2,1\%$ in der 2-Phasen-Kultur. Abbildung 6.3 zeigt den Vergleich der Expressionsmuster beider Kulturen.

A



B

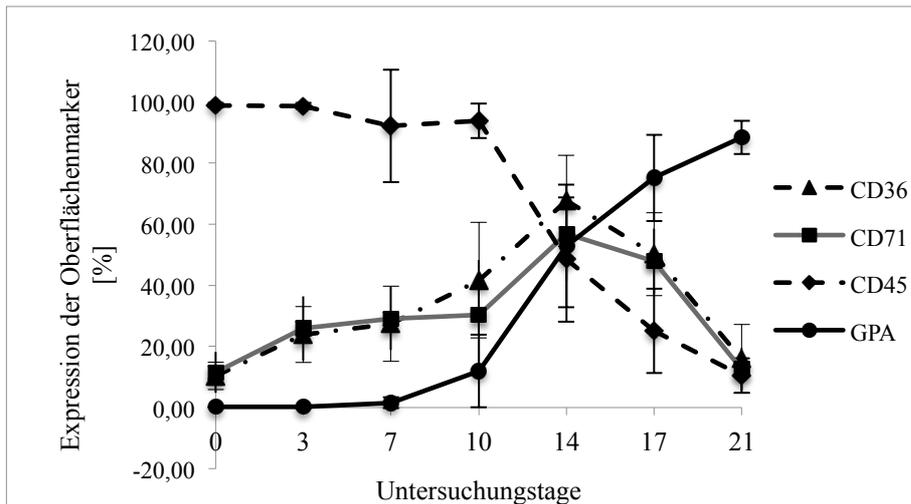


Abbildung 6.3: Vergleich der Expression der Oberflächenmarker der unterschiedlichen Erythropoese-Kulturen. Die Expression wurde nach Markierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer gemessen und der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation ermittelt ($n=8$). Eine Isotyp-Kontrolle wurde stets mitgeführt. Die Balken stellen die Standardabweichungen dar. A: Oberflächenexpression in der 2-Phasen-Kultur, B: Oberflächenexpression in der 3-Phasen-Kultur ($n=7$). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA.

6.1.3 Untersuchung der Zellmorphologie und -differenzierung

Um die unterschiedlichen Stadien der humanen Erythropoese beurteilen zu können, wurden an den Untersuchungstagen 0, 8, 12 und 16 der 2-Phasen-Kultur bzw. an den Untersuchungstagen 0, 3, 7, 10, 14, 17 und 21 der 3-Phasen-Kultur Proben entnommen, die Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert und mittels Pappenheim bzw. Neutral-Benzidin gefärbt. Die Zellen wurden aufgrund ihres Reifestadiums und ihrer Morphologie wie folgt eingeteilt (siehe auch 2.3 für genauere Beschreibung der jeweiligen Zelltypen):

Hämatopoetische Stammzelle/Proerythroblast

Basophiler Erythroblast

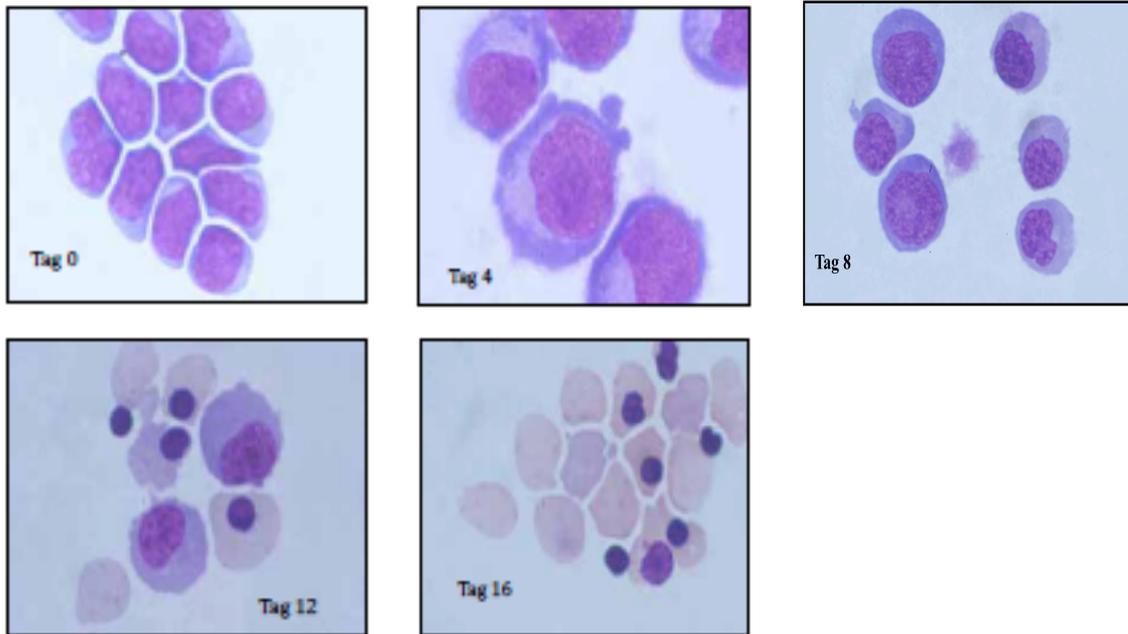
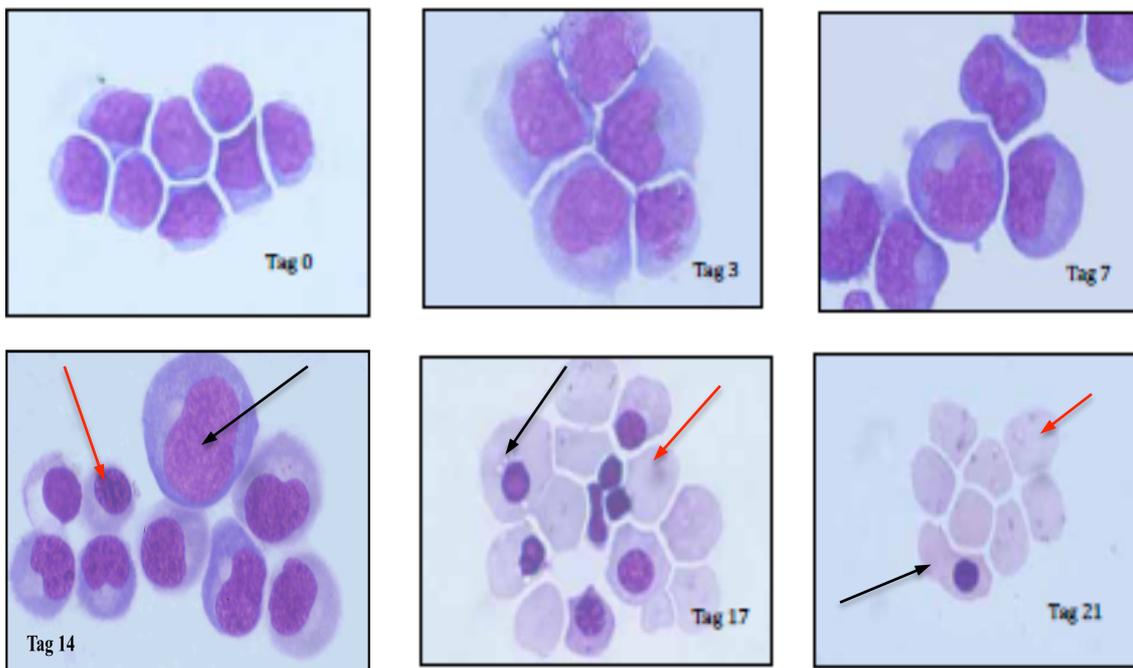
Polychromatischer Erythroblast

Normoblast

Retikulozyt

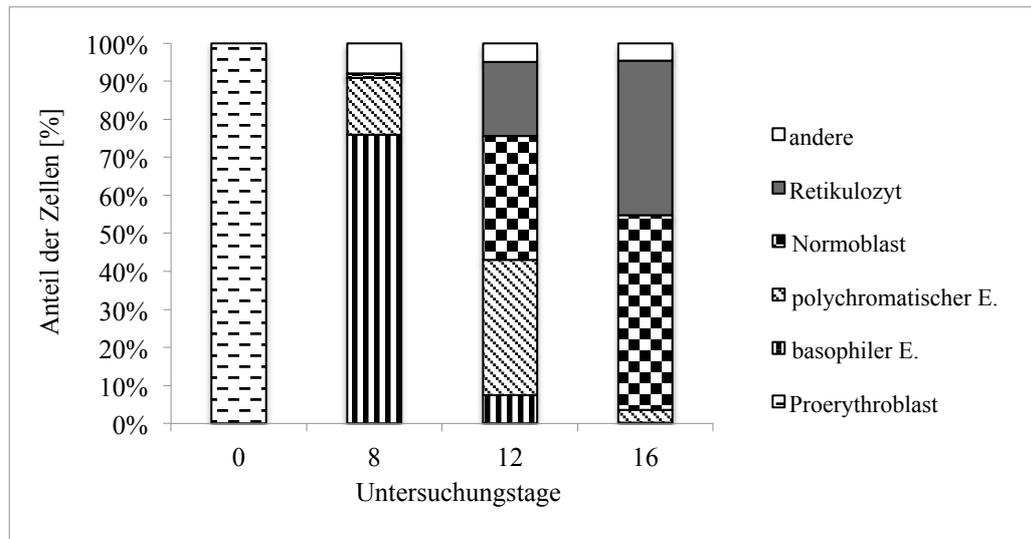
Nicht-erythrozytäre Zellen (in der Grafik als „andere“ aufgeführt)

Abbildung 6.5 zeigt das typische Muster der erythropoetischen Ausreifung in Abhängigkeit zum gewählten Kulturmodell. In Abbildung 6.6 sind die prozentualen Anteile an unterschiedlich reifen erythropoetischen Zellen in 2-Phasen- und 3-Phasen-Kultur dargestellt.

2-Phasen-Kultur**3-Phasen-Kultur**

werden die unterschiedlichen Stadien der Erythropoese nach einer Pappenheim-Färbung (Vergrößerung: 1000x). In der 3-Phasen-Kultur sind typische erythropoetische Zellen mit Pfeilen gekennzeichnet (Tag 14: schwarzer Pfeil: basophiler Normoblast mit dem basophilen Zytoplasma, roter Pfeil: polychromatischer Erythroblast mit dem kondensierten Zellkern, Tag 17 und 21: schwarzer Pfeil: der hämoglobinreiche Normoblast mit dem pyknotischen Zellkern, roter Pfeil: kernloser Retikulozyt, der den Knochenmark verlässt und in das periphere Blut wandert).

A



B

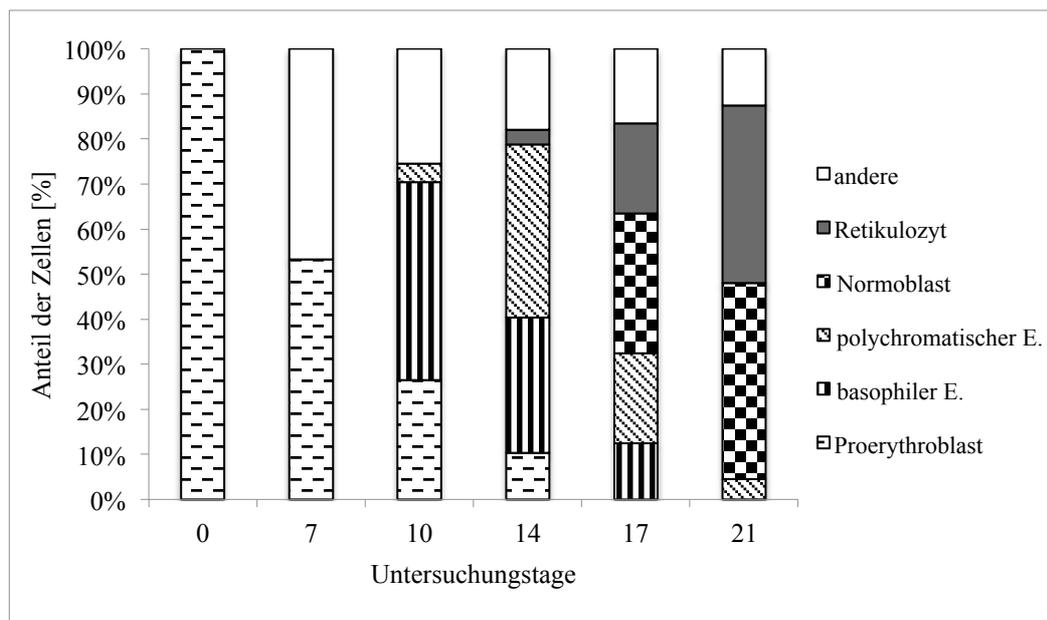


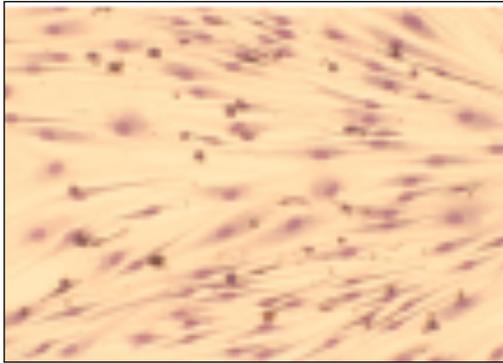
Abbildung 6.6: Vergleich der prozentualen Anteile an erythropoetischen Zellen in unterschiedlichen Reifestadien in 2-Phasen-Kultur (A) und 3-Phasen-Kultur (B). Die Zellen aus der Flüssigkultur wurden auf einen Objektträger zentrifugiert und nach Pappenheim sowie Neutral-Benzidin gefärbt. Bei der Neutral-Benzidin Färbung wird das Hämoglobin gelb gefärbt. Somit werden hämoglobinproduzierende Zellen deutlich hervorgehoben. Mindestens 250 Zellen wurden mikroskopisch gezählt und je nach Reifestadium unterschiedlichen Zelltypen zugeordnet. (andere = Zellen der weißen Reihe; Basophile E. = Basophile Erythroblasten; Polychromatische E. = Polychromatische Erythroblasten, n=8). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA.

Beide Kulturen zeigten, zeitlich versetzt nach der Stimulierung mit EPO, die einzelnen Stadien der erythropoetischen Ausreifung. Aufgrund der frühen Zugabe von EPO konnten in der 2-Phasen-Kultur bereits am Tag 8 der Kultur die ersten Zellen der erythropoetischen Reihe beobachtet werden (basophile Erythroblasten: $75,9 \pm 14,1\%$; polychromatische Erythroblasten: $15,0 \pm 6,4\%$; jedoch so gut wie keine Normoblasten ($1,1 \pm 0,1\%$)). Am Ende der 2-Phasen-Kultur gehörten über 95% der Zellen der erythropoetischen Reihe und nur 4,7% der weißen Reihe an. In der 3-Phasen-Kultur konnten noch bis zum 14. Tag der Zellkultur Zellen mit Stammzellcharakteristika oder sehr frühe Proerythroblasten beobachtet werden. Der Anteil der Hämoglobinproduzierenden Zellen erhöhte sich am letzten Kulturtag auf insgesamt $87,5\% \pm 36,5$. Der Anteil der nicht erythropoetischen Zellen war in der 3-Phasen-Kultur höher als in der 2-Phasen-Kultur.

6.2 Kokultivierung der Erythropoese mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs)

Studien verschiedener Arbeitsgruppen haben den fördernden Effekt der MSCs als Teil der Stammzellnische im Knochenmark auf die *in vitro* Hämatopoese gezeigt und deren Rolle für die Blutbildung auch zum Teil bereits *in vivo* verifiziert [17, 18, 74, 94]. Um der *in vivo* Situation möglichst gut zu entsprechen und um näher zu untersuchen, inwiefern diese MSCs nicht nur die Hämatopoese allgemein, sondern speziell auch die Erythropoese positiv beeinflussen, wurden 2 unterschiedliche Kokulturen (direkt und indirekt) etabliert und mit der 2-Phasen-Kultur der Erythropoese– im weiteren Verlauf Standard-Kultur genannt– verglichen. Zu diesem Zweck wurden 6-Loch-Platten mit einer Matrix aus MSCs humanen Ursprungs beschichtet. $CD34^+$ Stammzellen wurden direkt bzw. indirekt getrennt durch eine semipermeable Membran mit MSCs kokultiviert kultiviert. An den Untersuchungstagen wurden Proben genommen, indem die Platte vorsichtig gespült wurde, um die erythropoetischen Zellen aus der Vertiefung der Platte zu lösen und die Matrix auf die Platte zu belassen. Als Kontrolle wurden einige Platten Neutral-Benzidin gefärbt und fotografiert, um die intakte MSC-Layer nachzuweisen (Abbildung 6.7)

A



B



Abbildung 6.7: Mikroskopische Aufnahme der gefärbten MSC-Layer. Am Tag 12 der Erythropoesekultur nach fast vollständigem Abspülen aller bis dahin kultivierten erythropoetischen Zellen. Die Platte wurden Neutral-Benzidin gefärbt und bei 100-facher (A), bzw. 400-facher (B) Vergrößerung fotografiert. Das Layer aus MSC und sezernierten Matrixproteinen bleibt nach dem Abspülen intakt und an der Plastikoberfläche haften, während die erythropoetischen Vorläuferzellen erfolgreich –bis auf wenige Ausnahmen– entfernt werden. Schwarzer Pfeil markiert die MSC, roter Pfeil die erythropoetische Zelle. Quelle: Dissertation Gisa A. Meyer; Institut für Transfusionsmedizin, Universität zu Lübeck, 2008 [144])

6.2.1 Untersuchung der Vitalität und der Proliferation in den Kokulturen

Die Vitalität der Zellen wurde gemessen, in dem 10 µl der Kultur mit 10 µl Trypan-Blau versetzt. Die Zellzahl wurde mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dabei wurden weiße Zellen (vitale Zellen) und blaue Zellen (tote Zellen) gezählt (siehe auch 5.5.2 Bestimmung der Vitalität und Zellzahl am Mikroskop). Während der ersten Kultivierungsphase fiel in der Standard-2-Phasen-Kultur die Zellvitalität von über $99,0 \pm 0,1\%$ am Tag 0 auf $89,0 \pm 0,1\%$ am Tag 4 der Kultur und erholte sich geringfügig ($91,0 \pm 0,1\%$) am Tag 12. Im Vergleich zur Standard-Kultur zeigten beide Kokultivierungen auf MSC-Layer eine verbesserte Vitalität. Dieser Vitalitätsvorteil konnte besonders in der indirekten Kokultivierung beobachtet werden. Bei der indirekten Kultur lag die Zellvitalität am Tag 0 bei $99,0 \pm 0,1\%$. Die niedrigste Vitalität wurde bei der direkten Kokultur an den Tagen 12 und 16 gemessen werden ($97 \pm 3,29\%$). Die direkte Kokultivierung auf MSC-Layer zeigte nach anfänglicher Abnahme der Zellvitalität von $99,0 \pm 0,1\%$ am Tag 0 auf $89 \pm 5,9$ am Tag 4 eine Plateauphase an Tagen 12 bzw 16 ($93 \pm 4,3\%$ bzw. $89 \pm 5,1\%$ Vitalität). Im Allgemeinen war die Vitalität der Zellen im gesamten

Um zu überprüfen, ob die Kokultivierung auf MSC-Layer einen vorteilhaften Effekt auf die Zellvermehrung der erythropoetischen Vorläuferzellen hat, wurde die jeweilige Zellzahl mikroskopisch bestimmt und mit der Standard-2-Phasen-Kultur verglichen (siehe Abbildung 6.9).

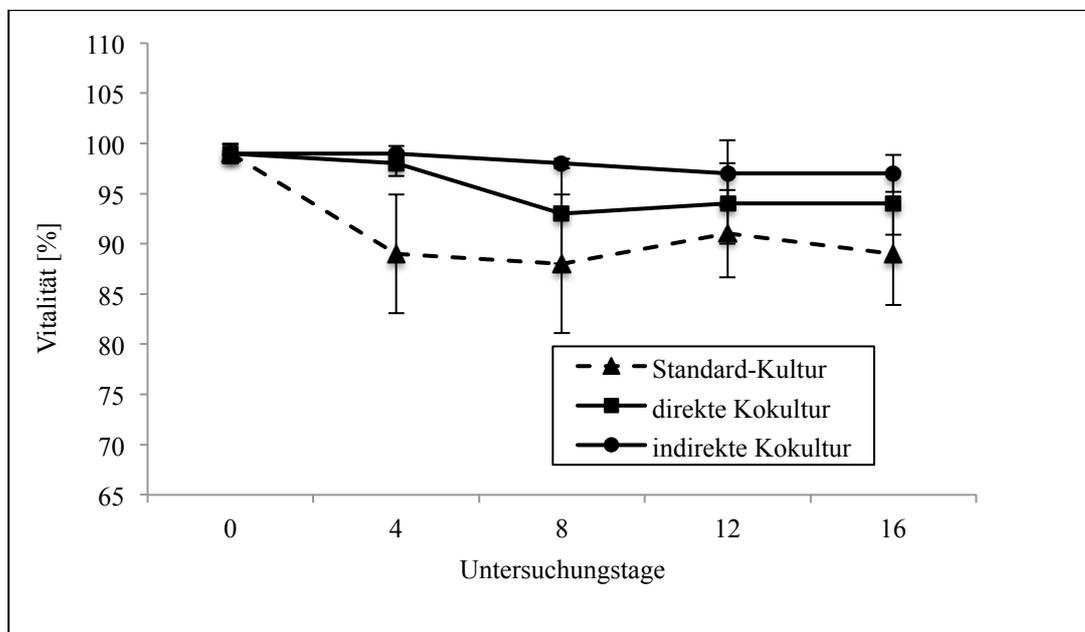


Abbildung 6.8: Vergleich der Vitalität in den MSC-Kokultur-Experimenten. Durch die Kokultivierung der hämatopoetischen Zellen mit MSCs konnten höhere Zellvitalitäten erreicht werden. Dieser Vorteil war besonders in der indirekten Kokultur zu beobachten (Standard-Kultur vs. direkte Kokultur am Tag 4 $p < 0,01$; Standard-Kultur vs. Indirekte Kokultur: am Tag 4 $p < 0,001$; am Tag 8 $p < 0,001$, am Tag 12 $p < 0,05$; am Tag 16 $p < 0,01$; $n = 6$). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA.

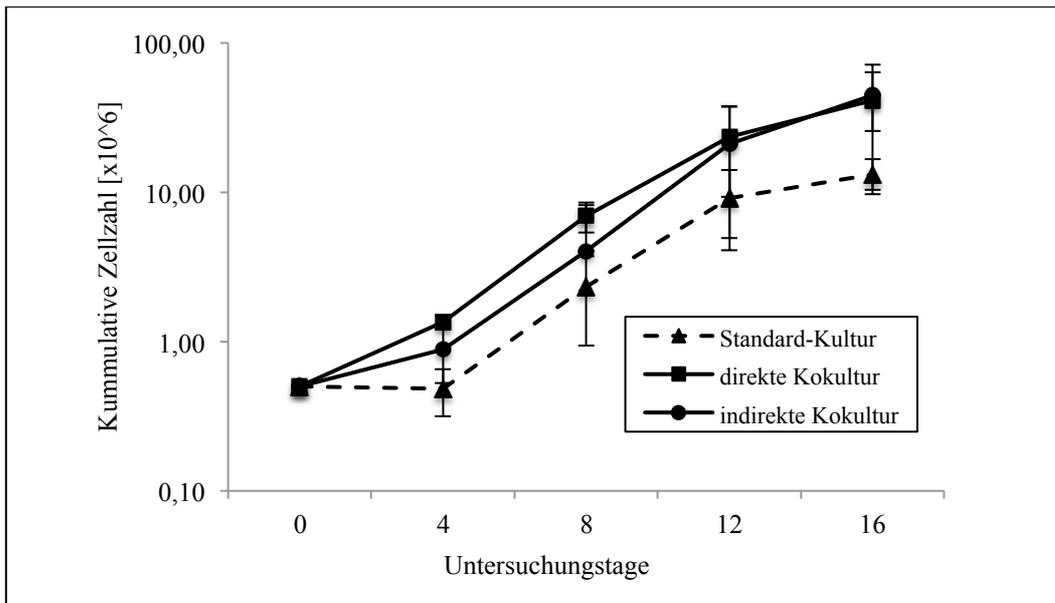


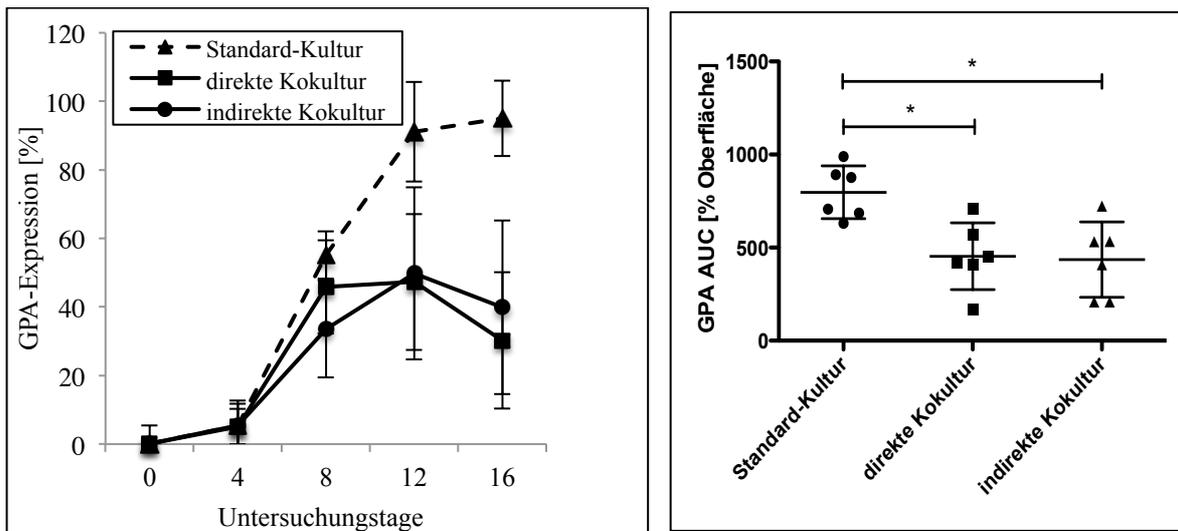
Abbildung 6.9: Zellproliferationsrate in den Kokulturen im Vergleich zur Standard-Erythropoesekultur: Beide Kokulturen zeigen eine höhere Zellzahlzunahme gegenüber der Standard-Kultur. Die initiale Zellzahl betrug 5×10^5 Zellen pro ml (Standard-Kultur vs. direkte Kokultur: $p < 0,05$; $n = 6$). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOV und Wilcoxon-Test. Standard-Kultur vs. Direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,001$; Standard-Kultur vs. Indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,00$.

Bereits am Tag 4 wurde in den Kokulturen eine Zunahme der Zellzahl beobachtet. Dies blieb in der Standard-Kultur aus (Zellzahl am Tag 4: Standard-Kultur: $0,5 \times 10^6$ /ml, direkte Kokultur: 1×10^6 /ml, indirekte Kokultur: $0,9 \times 10^6$ /ml). Die Zellzahl in den Kokulturen hatte sich bereits nach 3 Tagen annähernd verdoppelt. Am Ende der Kulturzeit konnte eine Proliferationsrate vom Faktor 82 und 89 bei der direkten bzw. indirekten Kokultur beobachtet werden. Im Vergleich dazu betrug die kumulative Zellzahl bei der Standardkultur nur das 22fache der initial eingesetzten Zellmenge.

6.2.2 Koexpression der spezifischen Oberflächenmarker in den Kokulturen

Zur Überprüfung der erythropoetischen Ausreifung wurden Proben aus den Kokulturen entnommen und mit spezifischen Antikörpern für CD36, CD71, Glycophorin A und CD45 gefärbt und nachfolgend durchflusszytometrisch gemessen. Die Messungen wurden mit denen der Standard-2-Phasen-Kultur verglichen. Abbildungen 6.10 und 6.11 zeigen die Expressionsmuster die obengenannten Oberflächenantigene.

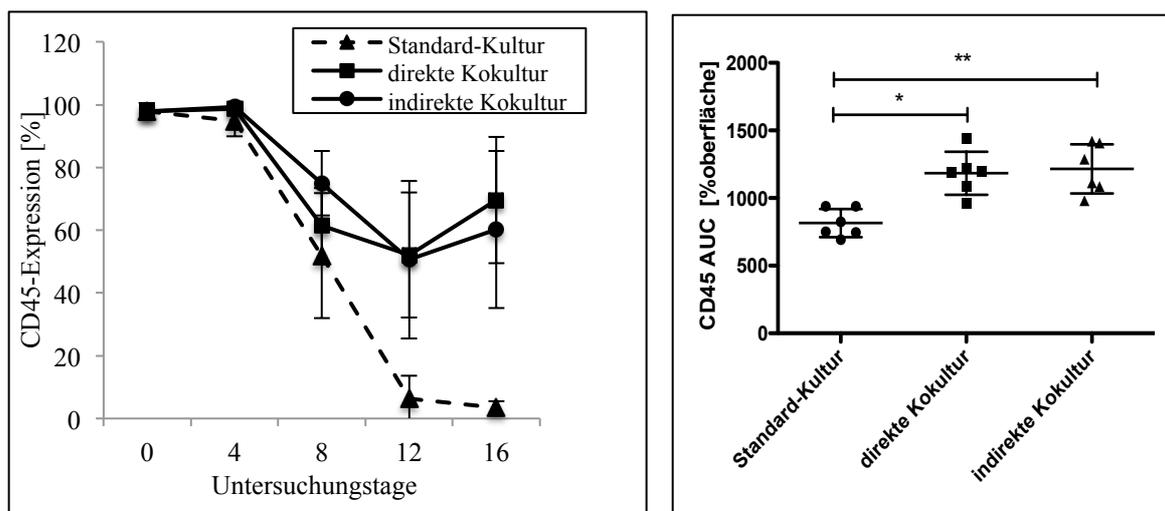
A



Standard-Kultur vs. direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$

Standard-Kultur vs. indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,05$

B

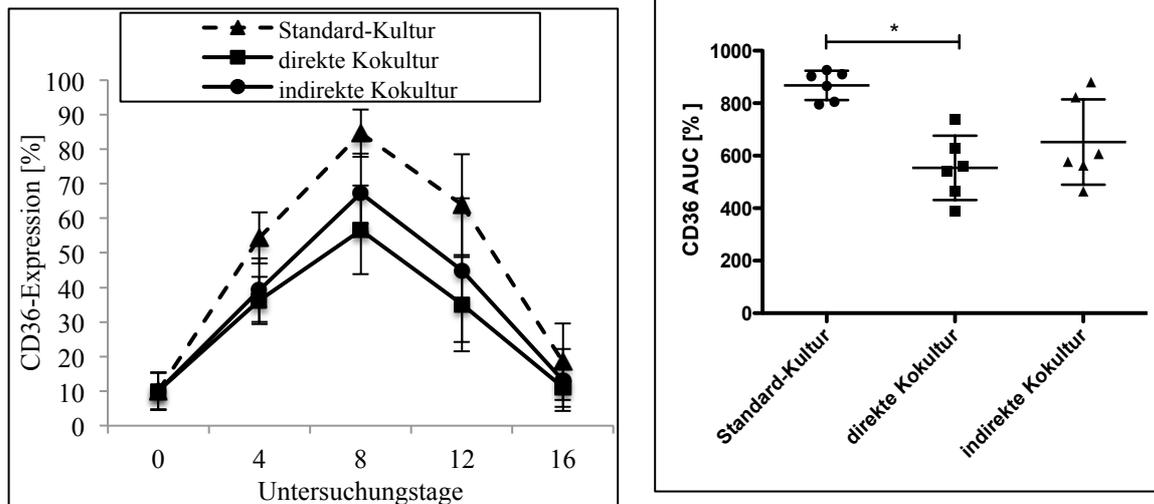


Standard-Kultur vs. direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$

Standard-Kultur vs. Indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,05$

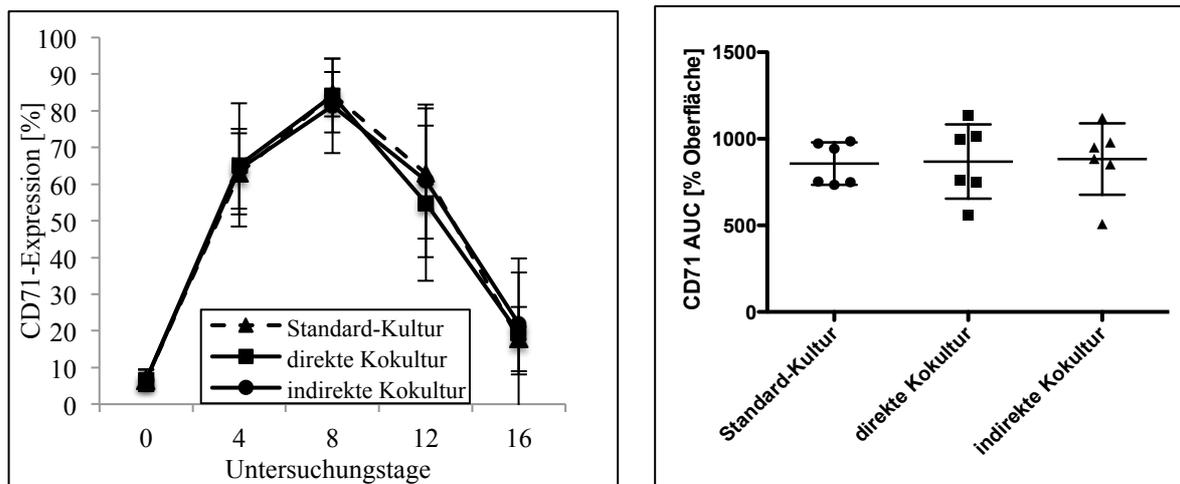
Abbildung 6.10: Oberflächen-Expression von CD45 und dem erythropoetischen Markern GPA auf Zellen der Kokulturen im Vergleich zur Standard-Kultur. Während die Standard-Kultur ein für die Erythropoese typisches Antigenprofil zeigte war die Frequenz an GPA-positiven Zellen in den beiden Kokulturen signifikant niedriger und korrespondierend hierzu der Anteil an CD45 positiven, nicht-erythrozytären Zellen signifikant höher ($n=6$). A: GPA-Expression, B: CD45-Expression. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test und für die AUC-Werte mittels Kruskal-Wallis-Test..

A



Standard vs. direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$
 Standard vs. indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,05$

B



Standard vs. direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$
 Standard vs. indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,0$

Abbildung 6.11: Oberflächen-Expression von erythropoetischen Markern CD36 und CD71 auf Zellen der Kokulturen im Vergleich zur Standard-Kultur. Der Unterschied im Expressionsmuster der drei Kulturen Standard-Kultur, direkte Kokultur und indirekte Kokultur ist besonders in Bezug auf CD36-Expression zu sehen ($n=6$). Die Standard-Kultur zeigt die höchste CD36-Expression während der gesamten Kulturzeit. A: CD36-Expression, B: CD71-Expression ($n=6$). Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test und für die AUC-Werte mittels Kruskal-Wallis-Test..

Die Standard-Erythropoesekultur zeigte eine hohe GPA-Expression bis zum Ende der Kultur. Am Tag 16 produzierten $95,1 \pm 3,7\%$ der Zellen GPA. Diese hohe Reinheit an

erythropoetischen Zellen konnte in den beiden Kokulturen nicht beobachtet werden. Nach einer anfänglich noch der Standard-Kultur ähnlichen GPA-Expression am Tag 8 stieg diese nur noch leicht an, sodass lediglich $30,3 \pm 19,8\%$ in der direkten bzw. $39,9 \pm 25,5\%$ in der indirekten Kokultur GPA exprimierten. Die höchste GPA-Expression in den Kokulturexperimenten konnte am Tag 12 beobachtet werden (direkte Kokultur: $47,3 \pm 19,8\%$; indirekte Kokultur: $49,9 \pm 25,0\%$). Die statistische Analyse zeigt, dass die Standard-Erythropoesekultur eine höhere Reinheit und signifikant höhere GPA-Expression mit sich bringt. Die GPA-Expression unterscheidet sich zwischen den beiden Kokulturen nicht.

Komplementär zur niedrigen Frequenz GPA-positiver Zellereignisse war der Anteil CD45-exprimierender Zellen in den Kokulturen hoch. Am Tag 16 exprimierten noch $69,5 \pm 20,0\%$ der Zellen in der direkten Kokultur CD45 und $60,2 \pm 20,9\%$ in der indirekten Kokultur. Im Vergleich dazu wies die Standard-Erythropoese-Kultur eine CD45-Expression von nur $3,4 \pm 2,1\%$ auf. Die CD36- und 71-Expression unterschieden sich in den drei Kulturen nicht signifikant voneinander. Zwar war die CD36-Expression am Tag 12 der Standard-Kultur signifikant höher als die der direkten Kokultur (Standard-Kultur: $63,9 \pm 14,6\%$; direkte Kokultur: $35,2 \pm 13,4\%$; $p < 0,05$), allerdings unterschieden sich die weiteren Expressionstage nicht voneinander. Die Expression des CD71-Antigens erreichte in den drei Kulturen den höchsten Wert am Tag 8 der Kultivierung (Standardkultur: $84,6 \pm 6,1\%$; direkte Kokultur: $84,2 \pm 10,7\%$; indirekte Kokultur: $81,3 \pm 13,0\%$). Die Expression nahm dann am Ende der Kultur ab. Bei der CD-721-Expression sind die Unterschiede in der Expression zwischen den drei Kulturen nicht signifikant.

6.2.3 Untersuchung der Zellmorphologie und –differenzierung in den Kokulturen

Die bereits durch die Oberflächenexpressionsanalysen gezeigten Ergebnisse wurden durch die Auswertung der Zytospins bestätigt. Am Tag 16 bestand die Standard-Kultur zu über 5% aus erythropoetischen Zellen, wobei $51,1 \pm 9,0\%$ Normoblasten und $40,6 \pm 9,4\%$ Retikulozyten ausmachten. Die blutlinienspezifische Entwicklung der Zellen in den beiden Kokulturen verlief bereits vom Beginn der Kultur an in Richtung der Myelopoese, sodass gemäß der morphologischen Auswertung am Tag 16 die Mehrheit aller kultivierten Zellen, nämlich $76,0 \pm 19,8\%$ in der direkten Kokultur und $57,0 \pm 18,6\%$ der Zellen in der indirekten Kokultur der weißen Zellreihe angehörten. Abbildung 6.12 zeigt die

prozentualen Anteile an unterschiedlich reifen erythropoetischen Zellen in den Kokulturen im Vergleich zur Standard-Kultur.

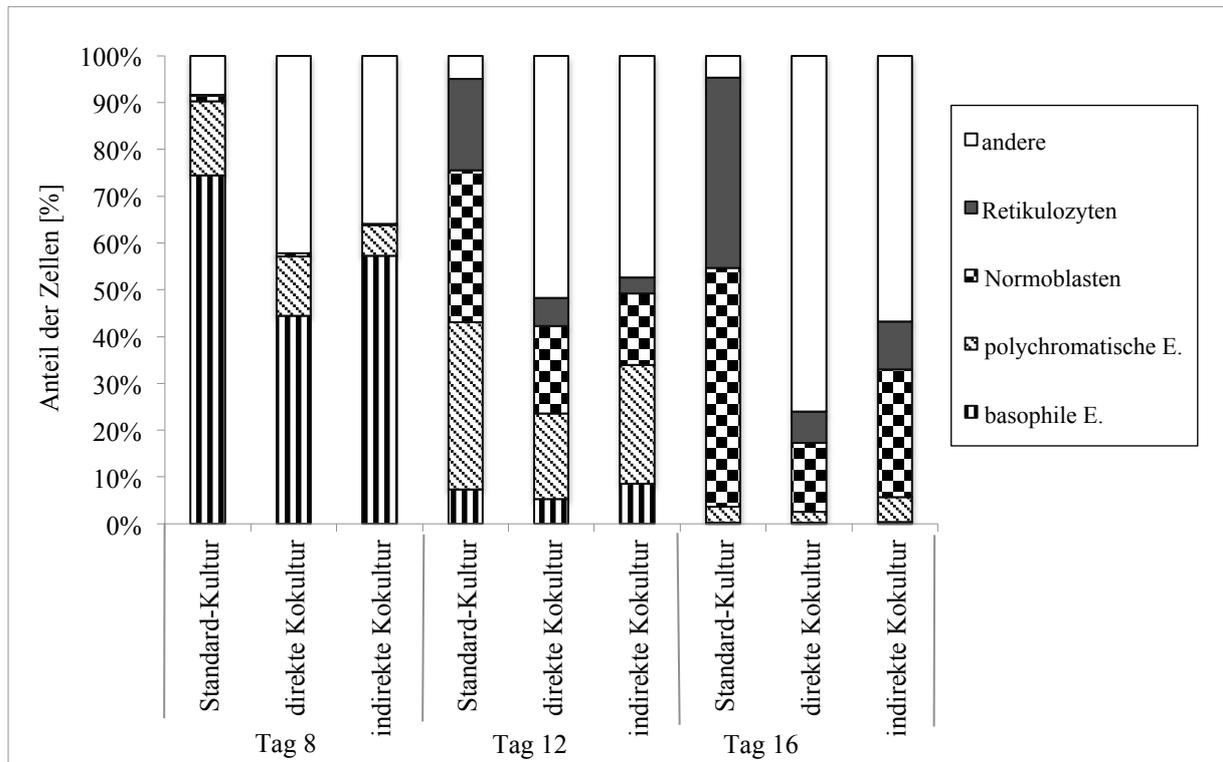


Abbildung 6.12: Zytospinauswertung der Standard-Erythropoesekultur, direkte Kokultur und indirekte Kokultur mittels Pappenheim- und Neutral-Benzidinfärbung. Bereits ab dem 8. Tag zeigte sich bei den Kokultivierungen eine deutliche Tendenz der Zelldifferenzierung entlang der Myelopoese, welche sich bis zum Ende der Kultur verstärkte. Auch die Reifung der verbleibenden erythrozytären Vorläuferzellen war leicht verzögert, weshalb am Ende der Kultur noch kernhaltige Zellstadien beobachtet werden konnten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Test. (andere = Zellen der weißen Reihe; Basophile E. = Basophile Erythroblasten; Polychromatische E. = Polychromatische Erythroblasten). Polychromatische E.: Standard-Kultur vs. direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$. Standard-Kultur vs. indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$ Retikulozyten. Standard-Kultur vs. direkte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$; Standard-Kultur vs. indirekte Kokultur am Tag 16: $p < 0,01$. ($n=6$)

Ein Vergleich des Anteils an entkernten Zellen in den Kokulturen zeigte, dass die Entwicklung der Vorläuferzellen zu Retikulozyten im Vergleich zur Standard-Kultur zumindest verzögert war. Am Tag 16 der Kokultur konnte im Vergleich zur Standard-Erythropoese noch ein höherer Anteil kernhaltiger Vorläuferstadien der Erythrozyten, wie polychromatische Erythroblasten und Normoblasten, besonders in der indirekten Kokultur nachgewiesen werden. Der Retikulozyten-Anteil betrug in der direkten Kokultur nur $7,9 \pm$

4,0% und in der indirekten Kokultur $8,0 \pm 2,8\%$. Währenddessen konnten in der Standard-Kultur $41,0 \pm 9,1\%$ Retikulozyten generiert werden.

6.2.4 Untersuchung der Zytokinsezernierung in den Kokulturen

Um herauszufinden, ob die von den MSCs sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokinen eine Wirkung auf die Entwicklung der erythropoetischen Zellen haben, wurde zunächst ein Proteinarray durchgeführt. Ein Proteinarray bietet die Möglichkeit, den Kulturüberstand auf das Vorhandensein einer Vielzahl an Zytokinen zu überprüfen. Mehr als 170 Zytokine konnten per Proteinarray untersucht werden. Die gemessenen Konzentrationen wurden zu einer internen Standardkontrolle ins Verhältnis gesetzt und zeigten eine x-fache Sezernierung des Zytokins in der jeweiligen Kultur im Vergleich zu der internen Kontrolle. Eine Zusammenstellung der wichtigsten nachgewiesenen Zytokine kann der Tabelle 6.1 entnommen werden.

In den Proteinarrays zeigten die Faktoren Interleukin (IL)-5, IL-6, IL-8, LIGHT, Fas-Ligand, FGF-4 eine sehr hohe Konzentration im Kulturüberstand der reinen MSC-Kultur. Auch in den Kokulturen konnten diese Zytokine nachgewiesen werden. Das Zytokin Gro wurde von den MSC in der direkten Kokultur in hohem Maße produziert ($106,8 \pm 5$ fach). Das Zytokin IL-6 zeigte die höchste Produktionsrate. Die höchste IL-6 Produktion wurde in den MSC-Kulturen gemessen werden. Die indirekte Kokultur zeigte ihrerseits eine etwas höhere IL-6 Sezernierung ($488,8 \pm 136,7$ fach) als die direkte Kokultur ($324,9 \pm 98,6$ fach), wobei der Unterschied nur gering ausfiel. Aufgrund der hohen IL-6 Produktion wurden die Kulturüberstände zur Bestätigung in einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)* einer absoluten quantitativen Analyse unterzogen. In der Tabelle 6.2 ist das Ergebnis der Proteinarray zusammengefasst. Abbildung 6.13 zeigt die Konzentration von IL-6 gemessen in der ELISA.

Tabelle 6.2: Proteinarray der Kokulturen im Vergleich zur Standard-Kultur und zum MSC-Kultur. Unter anderem konnte eine starke Produktion von IL-6 in den Kokulturen und der MSC-Kultur festgestellt werden ($n=3$). Anhand der Ergebnisse wurden die prominentesten Zytokine folgendermaßen markiert: # = Zytokine, die hauptsächlich von den MSC sezerniert werden; § = Zytokine, die primär während der Erythropoese sezerniert werden; * = Zytokine, die in der Kokultur sezerniert werden; Rest: Zytokine, die von allen Kulturen gleichermaßen sezerniert werden. Alle Werte wurden im Verhältnis zur internen Standardkontrolle des Assays (Standardkontrolle =1) gesetzt und zeigten x-fach erhöhte bzw. niedrigere Sezernierung des jeweiligen Zytokins im Vergleich zur Kontrolle.

Zytokine	Standard-Kultur (x-fach)	STD	Direkte Kokultur (x-fach)	STD	Indirekte Kokultur (x-fach)	STD	Kultur der MSCs (x-fach)	STD
B7-1 (CD80)	3,80	0,15	3,84	0,76	2,98	0,52	4,40	0,37
bFGF	5,57	0,5	6,93	3,73	4,57	1,16	6,11	0,62
BMP-4	4,05	1,96	2,65	0,71	2,58	1,07	3,91	0,12
EGF	6,59	0,4	2,17	1,47	3,82	2,57	4,64	0,08
Fas ligand [#]	0,95	0,4	0,93	0,17	1,12	0,53	31,64	0,8
FGF-4 [#]	7,49	0,43	7,41	2,35	6,00	1,40	28,80	0,16
G-CSF	0,69	0,24	1,04	0,88	0,88	0,61	7,16	0,06
Gro [#]	20,11	5,92	253,98	15,68	116,27	52,28	186,44	10,11
IGF I	5,17	0,26	4,60	0,84	6,59	0,57	5,02	0,24
IGF-II	7,36	1,13	4,98	2,40	5,56	3,15	8,0	0,46
IL-4	4,53	0,95	3,41	0,24	5,27	2,68	7,96	0,77
IL-5 [#]	0,89	0,48	27,82	23,46	48,10	32,05	115,34	3,55
IL-6 [#]	1,14	0,15	324,88	98,57	488,84	136,69	731,41	48,66
IL-6 R	2,58	0,27	6,17	5,57	3,91	2,42	7,37	0,11
IL-8 [#]	45,75	3,57	85,13	80,47	55,32	47,66	146,52	11,33
IL -3 R alpha 2	2,68	0,76	3,29	0,16	2,31	0,32	3,34	0,12
IL -8 R beta	3,47	0,6	3,87	0,91	2,63	0,51	4,5	0,13
LIGHT [#]	1,54	0,44	2,53	2,45	5,17	3,69	106,78	4,95
MCP-1 [*]	3,23	0,29	57,85	24,04	86,89	32,16	3,2	0,2
MIP-1 α	1,86	0,12	2,77	1,01	3,76	1,46	5,71	0,54
MIP-1 β	3,93	0,82	9,51	6,16	8,19	2,73	1,67	0,05
MIP-3 α	2,78	0,26	3,61	1,47	2,18	0,96	5,56	1,41
MMP-1	6,07	0,44	7,13	0,59	6,90	1,53	10,10	0,32
MMP-3	1,81	0,28	5,66	2,19	5,16	0,54	15,93	1,06
MMP-9 [§]	15,98	0,78	11,15	6,91	8,89	2,21	7,20	1,10
NT-3	3,48	1,15	2,90	1,04	3,21	1,20	5,44	2,60
TIMP-1 [*]	5,84	0,88	19,57	12,26	13,94	4,52	28,80	5,08
TIMP-2	0,79	0,19	6,18	5,58	3,31	0,96	8,18	1,42
TNF- α	3,02	0,6	2,62	2,20	1,77	1,28	3,10	0,59
Osteoprotegerin	1,84	0,53	5,73	4,87	2,83	1,25	13,85	0,35

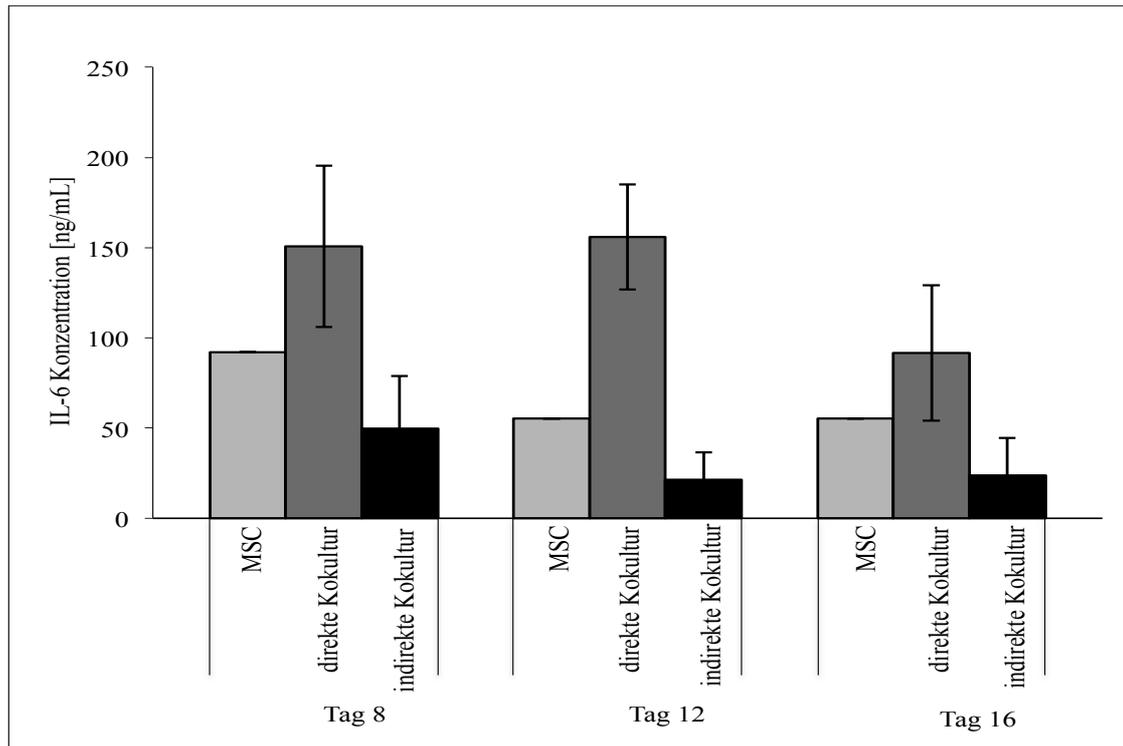


Abbildung 6.13: ELISA-Untersuchung von IL-6 Produktion in den Kulturüberständen der Kokulturen. Die MSC- 'Layer' zeigen in der direkten Kokultur mit erythropoetischen Zellen die höchste IL-6 Produktion. Jede Kultur wurde 6mal gemessen. Jede Messung erfolgte in drei parallelen Ansätzen (Direkte Kokultur vs. Indirekte Kokultur am Tag 8 $p < 0,01$; am Tag 12 $p < 0,01$; am Tag 16 $p < 0,05$; $n = 6$). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA.

Die quantitative IL-6 Bestimmung mittels ELISA zeigte eine hohe IL-6 Produktion in der direkten Kokultur während der gesamten Kulturzeit, wobei die Sezernierung zum Ende der Kultur geringfügig abnahm. Mit $150,7 \pm 44,6$ ng/ml konnte die höchste Konzentration dieses Zytokins am Tag 8 der direkten Kokultur gemessen werden. Die indirekte Kokultur zeigte die niedrigste IL-6 Konzentration im Überstand.

6.3 Microarray in der 3-Phasen-Kultur der Erythropoese

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, das Genexpressionsmuster der erythropoetischen Vorläuferzellen zu untersuchen und interessante Kandidatengene zu identifizieren, die besonders während der terminalen Differenzierung und hier insbesondere für den einmaligen Vorgang der Eukleation aktiviert werden. In diesen Versuchen wurde aufgrund der durch die längere Initiationsphase bedingten verbesserten Proliferation (siehe Kapitel 6.1.1) die 3-Phasen-Kultur verwendet. Dafür wurde die mRNA der kultivierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der 3-Phasen-Kultur isoliert und einer *Microarray*-Analyse (*PIQORT^M Stem Cell Microarray human*, Firma Miltenyi-Biotech) unterzogen.

Dabei wurden Gene identifiziert, die innerhalb der Kulturzeit im Vergleich zu Tag 0 signifikant hoch- bzw. herunterreguliert worden waren. In den folgenden Abschnitten werden diese Gene, die teilweise sehr wichtig für die Erythropoese sind, beschrieben.

Anschließend wurden die Daten aus den *Microarray*-Analysen mit Hilfe einer *qPCR* bestätigt und 2 Gene aus den differenziell hoch exprimierten Genen ausgesucht, diese durch siRNA-Transfektion herunterreguliert und die Auswirkung auf die erythropoetische Differenzierung untersucht.

6.3.1 *Microarray*-Analysen der erythropoetischen mRNA

Nach den anfänglichen Filtrationsschritten (siehe Kapitel 5.9.1) blieben aus insgesamt über 900 Genen 492 Gene übrig. Basierend auf 2 unterschiedlichen Analysemethoden wurden diese Gene der *Cluster*-Analyse und der diskriminatorischen Genanalyse unterworfen.

6.3.1.1 Clusteranalyse der gefilterten Datensätze

Die *Clusteranalyse* gruppiert alle relevanten Gene in Anbetracht ihres ähnlichen Expressionsprofils über einen gewissen Zeitraum. Alle Gene werden in einer hierarchischen Baumstruktur gruppiert, wobei Gene, die eine ähnliche Expression zeigen (Koexprimierte Gene) dicht nebeneinander und Gene, deren Expressionprofile sich unterscheiden, weit voneinander entfernt platziert werden. So wurden die Gene in unterschiedlichen Gruppen eingeteilt. Abbildung 6.14 bis 6.20 zeigen den Mittelwert aus 6 Versuchen mit einigen repräsentativen Genen. Die rote Linie repräsentiert den „Schwerpunkt“ des *Clusters*, im Weiteren Centroid genannt. Einige interessante Gene konnten in diesen Gruppen identifiziert werden, die den Vorgang der Erythropoese regulieren. Im Folgenden werden einige dieser Gene herausgearbeitet und beschrieben.

Gruppe 1: Cluster der Gene mit stetiger Expressionsabnahme über die Kulturdauer

Die Gene in dieser Gruppe wurden bereits zu Beginn der Kultur aktiviert und erreichten z.B. bei *IGFB2* die 2,6-fache \pm 0,45 Expression des Tages 0 -also frisch isolierte CD34⁺ Zellen- der Kultur. Bereits am Tag 10 der Kultur kann eine deutliche Abnahme der Expression beobachtet werden. Bei *ITGB2*, *ITGA7* und *CD33* steigt die Expression ab Tag 14 leicht an und erreicht am Tag 17 fast das Niveau vom Tag 10 (siehe Abbildung 6.14). Tabelle 6.3 fasst die Gene zusammen, die in der Gruppe 1 vertreten sind.

Tabelle 6.3: **Gruppe der Gene mit leichtem Anstieg bis Tag 10.** In dieser Gruppe sind unter anderem Integrine wie *ITGA* und *ITGB* vertreten.

Rezeptorproteine	<i>CD33</i> , <i>ITGA2B</i> , <i>ITGB2</i> , <i>ITGA7</i>
Integrine	<i>ITGA2B</i> , <i>ITGB2</i> , <i>ITGA7</i>
Transportproteine, Kanäle	<i>CLCN7</i>
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	<i>IGFBP2</i>

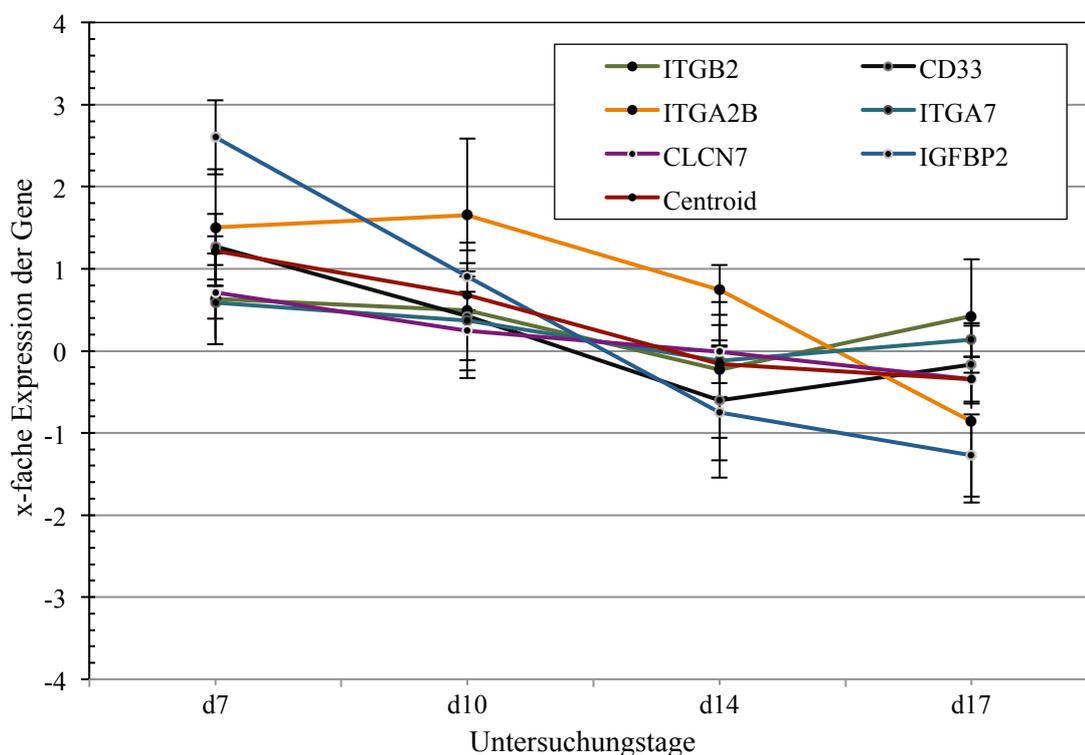


Abbildung 6.14: **Expressionsmuster der Gene mit leichtem Anstieg bis Tag 10.** In dieser Gruppe sind viele Rezeptoren wie *ITGA2B* (Integrin Alpha II B; CD41), *ITGB2* (Integrin Beta II Precursor; CD18) aus der Familie der Integrine und der myeloischer Marker *CD33* vertreten ($n=6$) ($d=$ Tag).

Das Gen *IGFBP2* (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 Precursor) zeigt die auffälligste Expression in diesem Cluster. Die Expression ist am Tag 7 bereits um das 2fache höher als am Tag 0 ($2,60 \pm 0,45$ -fache Expression), nimmt mit der Kulturzeit ab und sinkt auf das -1,2fache im Vergleich zu Tag 0 ($\log-1,28 \pm 0,50$). Weiterhin sind Integrine wie *ITGA2B*, *ITGB2*, *ITGA7*, in dieser Gruppe vertreten.

Gruppe 2: Cluster der Gene mit Expressionsabnahme ab Tag 10

Die Gene dieses Clusters wurden am Tag 7 gleich stark exprimiert wie am Tag 0 der Kultur (*ITGB3*: $0,97 \pm 0,57$). Ihre Expression erreichte am Tag 10 ihr Maximum und nahm an den folgenden Untersuchungstagen ab. Generell wurden diese Gene in den erythropoetischen Zellen nicht allzu stark reguliert. Tabelle 6.4 und Abbildung 6.14 fassen die Ergebnisse dieses Clusters zusammen.

Tabelle 6.4: Gruppe der Gene mit Expressionsabnahme ab Tag 10. In dieser Gruppe sind unter anderem *KIT* und *ITGB3* vertreten.

Rezeptorproteine	<i>KIT</i>
Glycoproteine	<i>VWF</i>
Proteinase, -inhibitor, -aktivator	<i>MMP2</i>
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	<i>IGFBP3</i>

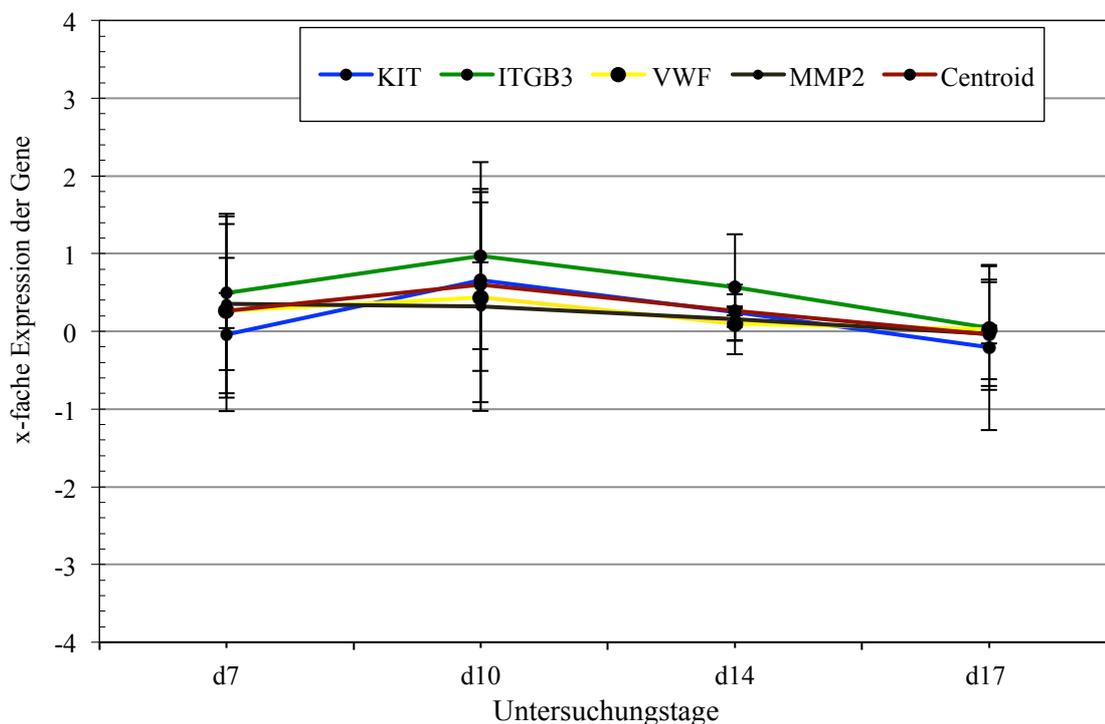


Abbildung 6.14: Expressionsmuster der Gene mit Expressionsabnahme ab Tag 10. In diesem Cluster sind einige Rezeptor- und Glycoproteine wie *KIT* bzw. *VWF* vertreten ($n=6$) (d =Tag).

Das Protein VWF (Von-Willebrand-Faktor) fungiert als Carrier für den Blutgerinnungsfaktor VIII und wird von Endothelzellen gebildet. Die Expression dieses Gens zeigt im Vergleich zu der Expression anderer Gene dieses Clusters einen relativ flachen Verlauf. *KIT* als Rezeptor für SCF wird in der ersten und zum Teil in der zweiten Phase der Erythropoese-Kultur hochreguliert und zeigt die höchste Expression am Tag 10 der Kultur (*KIT*: $0,66 \pm 1,17$). Ab Tag 10 nimmt die Expression von *KIT* ab und erreicht einen Wert von $-0,21 \pm 1,06$. Das *MMP2* gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen. Ähnlich wie VWF zeigt dieses Gen einen flachen Expressionsverlauf.

Gruppe 3: Cluster der Gene mit stetigem Anstieg über die Kulturdauer

Die Gene in diesem Cluster zeigten einen Anstieg in ihrer Expression, der in der Regel zwischen Tag 7 und 10 der Kultur, also direkt nach EPO-Zugabe einsetzte. Die Expression nahm in einigen Fällen noch bis zum Ende der Kultur zu. Bei den meisten Genen zeigte die Expression ab Tag 14 entweder eine Stagnation oder eine Abnahme ab Tag 14 der Kultur. Tabelle 6.5 und Abbildung 6.15 fassen diese Gene zusammen.

Tabelle 6.5: Gruppe der Gene mit stetigem Anstieg über die Kulturdauer. In dieser Gruppe sind Kanäle wie CLCN3 und das Glycoprotein HBZ vertreten.

Rezeptorproteine	<i>CD47</i>
Integrine	<i>ITGA3, ITGA8, ITGB6, ITGB7</i>
Transportproteine, Kanäle	<i>CLCN3, CLCN5</i>
Glycoproteine	<i>HBZ</i>
Proteinase, -inhibitor, -aktivator	<i>TIMP1, TIMP3</i>
Motorprotein	<i>MYL4</i>

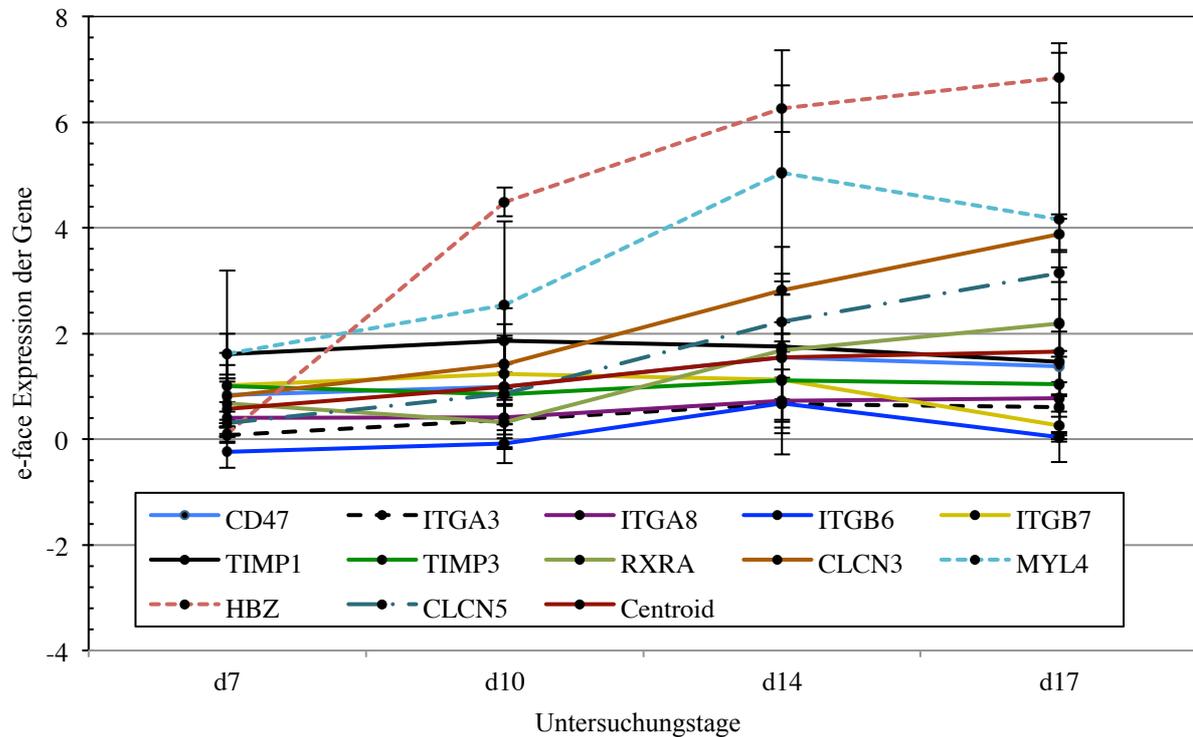


Abbildung 6.15: Expressionsmuster der Gene mit stetigem Anstieg über die Kulturdauer. Hier sind Gene wie das Glycoprotein HBZ vertreten ($n=6$) ($d=$ Tag).

Die stärkste Expression in diesem Cluster zeigte das Gen *Hämoglobin zeta (HBZ)*, das bereits ab Tag 7 einen hohen Anstieg der Expression aufweist (HBZ: $4,48 \pm 1,7$ im Vergleich zu Tag 0). Die Expression von *HBZ* steigt mit der Kulturdauer weiter an und erreicht seinen Maximum am Tag 17 der Kultur (HBZ: $2,02 \pm 3,15$ im Vergleich zu Tag 0). Dieses Hämoglobin wird im Dottersack der frühen Embryonen gebildet und ist dem Hämoglobin alpha ähnlich, wobei das Alpha-Globulin im fetalen und im adulten Organismus gebildet wird [12]. Ein weiteres Gen mit auffällig hoher Expression in diesem Cluster ist Myosin light chain 1 (*MYL 4*, oder *MLC1*), welches das „Alkali-Myosin light chain“ kodiert, das in Embryonenmuskeln und adulten Arterien vorkommt [12]. Weiterhin sind Proteinaseinhibitoren *TIMP1* und *TIMP3* in dieser Gruppe vertreten. Während der Expressionsverlauf von *TIMP1* ab Tag 10 der Kultur abnimmt, zeigt *TIMP 3* eine Expression zwischen $1,868 \pm 0,61$ mit der höchsten Expression am Tag 10 und $1,43 \pm 1,51$ mit der niedrigsten Expression am Tag 14.

Weitere Gene in dieser Gruppe sind die Chloridkanäle *CLCN3* und *CLCN5*, die während der gesamten Kulturzeit einen stetigen Anstieg der Expression zeigen und die höchste

Expression am Tag 17 der Kultur erreichen (Expression am Tag 17: *CLCN3*: $3,83 \pm 0,3$; *CLCN5*: $3,15 \pm 1,11$ im Vergleich zu Tag 0).

Gruppe 4: Cluster der Gene mit steilem Anstieg bis Tag 14

Die Gene wurden in der ersten und zweiten Phase der Kultur recht stark reguliert und zeigten eine hohe Expression bis Tag 14. Ab Tag 14, d.h. mit dem Eintritt in die dritte Phase der Kultur und nach dem die SCF-Zugabe unterbunden wurde, bleibt die Expression der Gene dieser Gruppe auf dem gleichen Stand wie am Tag 14. Tabelle 6.6 und Abbildung 6.16 fassen diese Gene zusammen.

Tabelle 6.6: Gruppe der Gene mit steilem Anstieg bis Tag 14. In dem ersten Cluster dieser Gruppe sind Rezeptorproteine wie *CD58* und *TFRC_3PRIME* vertreten.

Rezeptorproteine	<i>CD58</i> , <i>TFRC_MIDDLE</i> , <i>TFRC_3PRIME</i> , <i>TFRC_5PRIME</i>
------------------	--

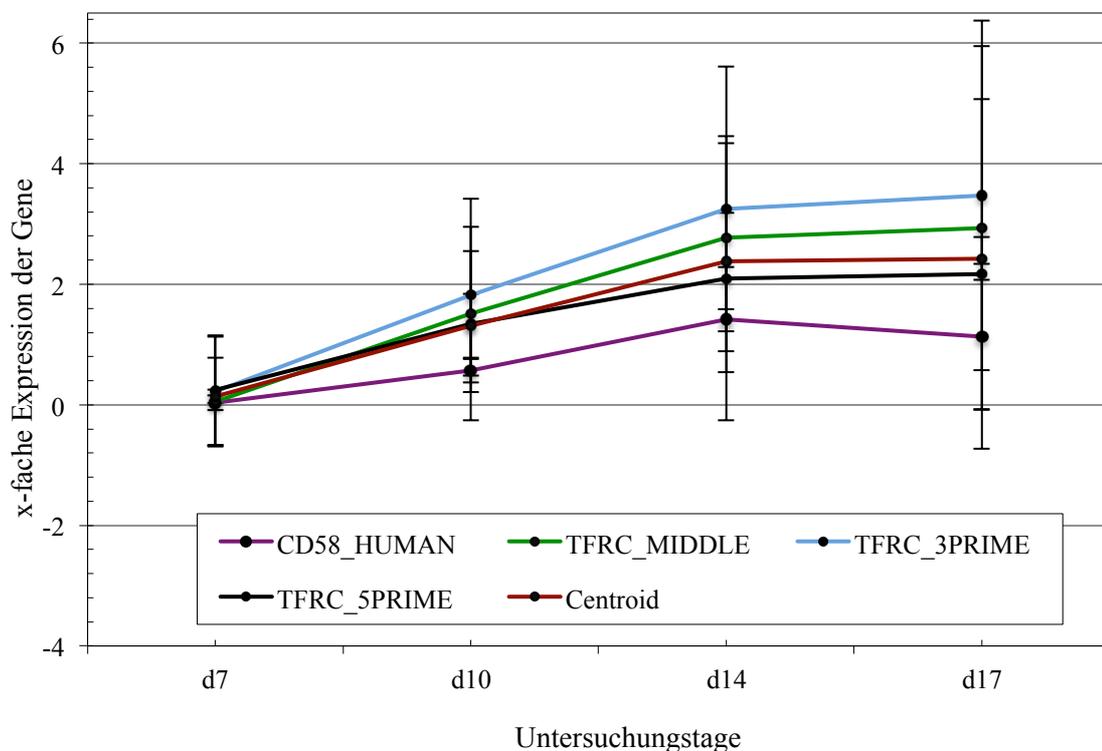


Abbildung 6.16: Expressionsmuster der Gene mit steilem Anstieg bis Tag 14. Hier sind Rezeptorproteine wie *CD58* und *TFRC_3PRIME* vertreten ($n=6$) ($d=$ Tag).

Die auffälligste Expression zeigten die TFRC-Rezeptorgene (*TFRC_3PRIME*, *TFRC_MIDDLE* und *TFRC_5PRIME*). Die Expression dieser Gene steigt mit der Kulturdauer stetig an und erreicht seinen Maximum am Tag 17 der Kultur (*TFRC_3PRIME*: $3,48 \pm 3,31$; *TFRC_MIDDLE*: $2,93 \pm 3,02$; *TFRC_5PRIME*: $2,17 \pm 2,90$ im Vergleich zu Tag 0). Die Eisenaufnahme der Zelle gelingt über die Transferrin-Rezeptoren (CD71) durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Durch die „Acidifizierung“ wird das Eisen dann in die Zelle abgegeben [12]. Diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Erythrozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde CD71 als ein typischer erythropoetischer Marker durchflusszytometrisch gemessen: Anhand der glockenkurvenförmigen Expression konnte die ordentliche erythropoetische Entwicklung der HSCs bestimmt werden.

CD58 ist der Ligand des T-Lymphozytenproteins CD2 und spielt eine Rolle in Aktivierung und Adhäsion der T-Lymphozyten [12].

Gruppe 5: Cluster der Gene mit steilem Anstieg ab Tag 10

In dieser Gruppe sind Gene vertreten, deren Expression ab Tag 10 der Kultur, also ab der zweiten Phase und Zugabe von EPO steil anstieg. Tabelle 6.7 und Abbildung 6.17 fassen diese Gene zusammen.

Tabelle 6.7: Gruppe der Gene mit steilem Anstieg ab Tag 1. In diesem Cluster ist unter anderem der Transkriptionsfaktor TAL1 Rezeptorproteine vertreten.

GTPasen, -aktivator, -inhibitor	CDC42_1
Transkriptionsfaktoren	TAL1
Desoxygenasen	HPD
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	VEGF

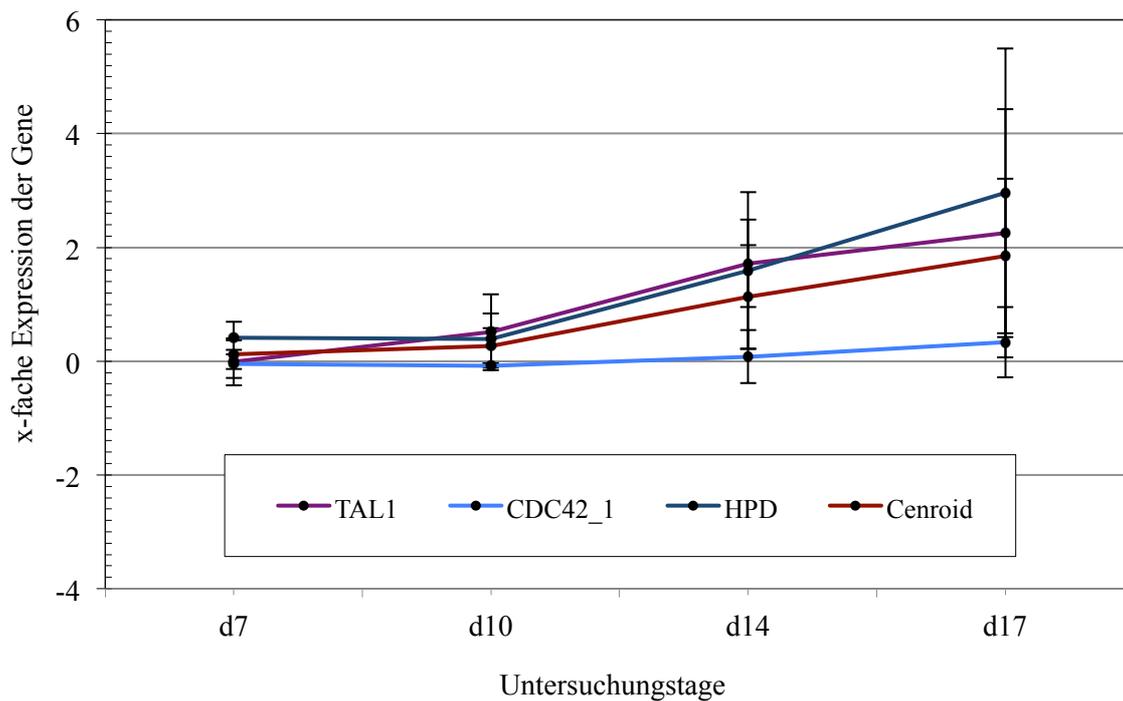


Abbildung 6.17: *Expressionsmuster der Gene mit steilem ab Tag 10. Hier ist unter anderem der Transkriptionsfaktor TAL1 vertreten (n=6 (d=Tag)).*

Die höchste Expression zeigten die Gene *HPD* und *TAL1*. Am letzten Tag der Kultur erreicht die Expression von *HPD* einen Wert von $2,96 \pm 2,94$ fach im Vergleich zu Tag 0. *TAL1* zeigt am Tag 17 der Kultur $2,25 \pm 2,16$ -fache Expression im Vergleich zum Referenztag 0. Das Gen *HPD* (4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase). Dieses Gen kodiert das gleichnamige Enzym, welches häufig in der Niere vorkommt und für die Spaltung von Tyrosin benötigt wird.

Auf das Gen *TAL1* wurde in der Einleitung eingegangen. Aufgrund seiner Bedeutung für die Entwicklung erythropoetischer Zellen wurde es für die siRNA-Transfektion ausgesucht, um die Auswirkung seines Fehlens in den Erythropoeseulturen zu untersuchen. *TAL1* zeigte die zweithöchste Expression in dieser Gruppe.

Gruppe 6: Cluster der Gene mit geringer Expressionsveränderung

Die Gene dieses Clusters veränderten ihre Expression im Vergleich zum Referenztag 0 kaum und wurden kaum in der Erythropoesekultur reguliert. Tabelle 6.8 und Abbildung 6.18 fassen die Gene zusammen, die in diesem Cluster vertreten sind.

Tabelle 6.8: Gruppe der Gene mit geringer Expressionsveränderung. In diesem Cluster sind die Gene der Proteinkinase MAPK14 sowie des Rezeptorproteins FLT4 vertreten.

Proteinkinasen	MAPK14
Rezeptorproteine	FLT4

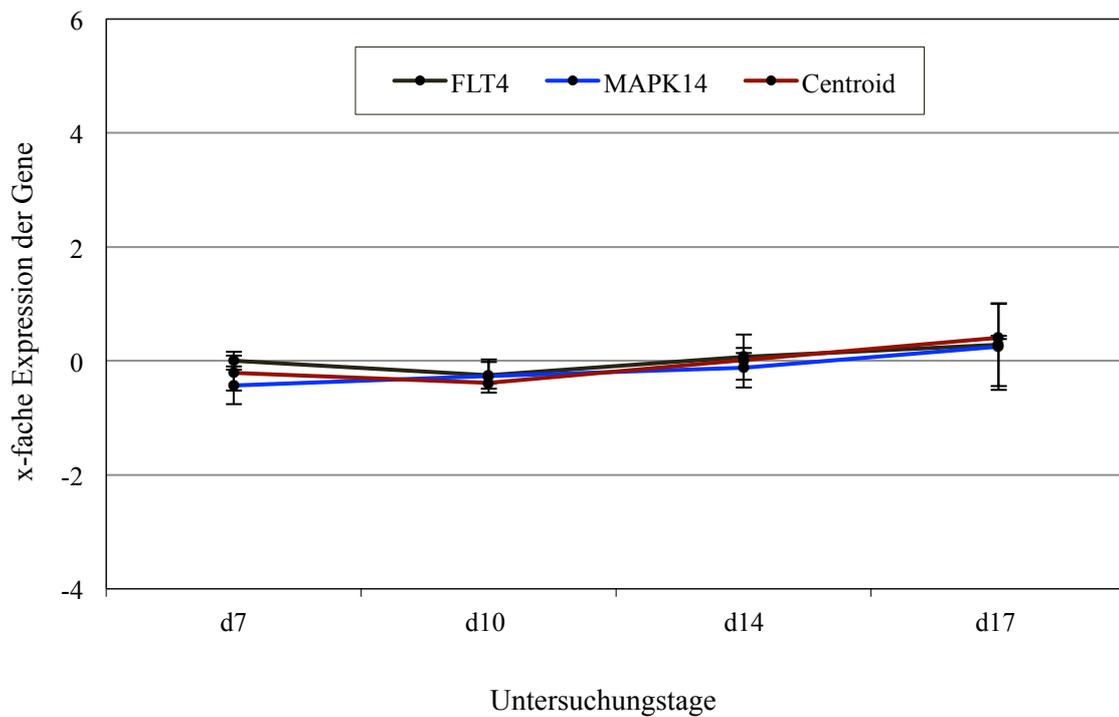


Abbildung 6.18: Expressionsmuster der Gene mit geringer Expressionsveränderung. In diesem Cluster sind der Rezeptorprotein FLT4 und die Proteinkinase MAPK14 vertreten ($n=6$) ($d=$ Tag).

Der Expressionsverlauf der beiden in diesem Cluster vertretenen Gene ähnelt sich stark. Ab Tag 10 der Kultur ist eine leichte Zunahme der Expression zu beobachten. Alles in allem bleibt aber die Expression dieser Gene auf dem Niveau des Referenztages 0.

Das Enzym MAPK14 (*mitogen-activated protein kinase 14*) wird durch Umgebungsstress, proinflammatorische Zytokine und Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert und phosphoryliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie ELK1 und ATF2 [12]. Es spielt auch eine wichtige Rolle in der Produktion von Zytokinen, wie IL-6. Wahrscheinlich spielt es außerdem eine Rolle in der Stabilisierung von EPO-mRNA während des hypoxischen Stresses [12]. Generell fungieren MAPKs als ein Vernetzungspunkt für unterschiedliche biochemische Signale und sind an vielen zellulären Prozessen wie Proliferation,

Differenzierung, Regulation der Transkription und Zellentwicklung beteiligt [12]. FLT4 ist der Rezeptor für VEGF und ist in die Lymphangiogenese involviert [12].

Gruppe 7: Cluster der Gene mit verringerter Expression relativ zum Referenztag 0

Die folgenden zwei Cluster in dieser Gruppe beinhalteten die meisten Gene des Arrays. Insgesamt 246 Gene wurden nach der Clusteranalyse diesen beiden Gruppen zugeordnet. Die für die Erythropoese relevantesten Gene werden in den beiden folgenden Grafiken 6.19 und 6.20 und in den Tabelle 6.9 und 6.10 zusammengefasst. In der ersten Gruppe blieb der Expressionsverlauf auf dem Niveau des Tages 7. Die Expression in der zweiten Gruppe wies eine abfallende Tendenz auf.

Tabelle 6.9: Gruppe der Gene mit negativer Expression. In dem ersten Cluster der Gruppe sind einige Transkriptionsfaktoren der Matrix-Metalloproteinase 11 vertreten.

Transkriptionsfaktoren	<i>NFκB1, NFκB2, NFκB3, P53</i>
Phosphatase, -aktivator, -inhibitor	<i>MMP11</i>
Enzyme des Citratzyklus:	<i>ID1</i>

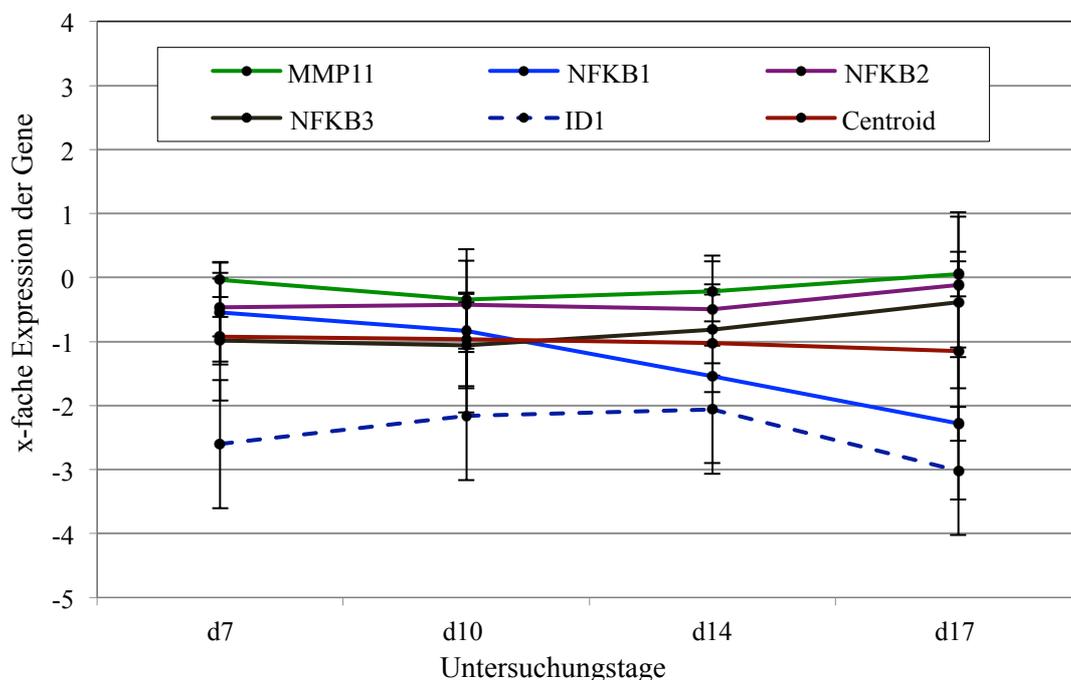


Abbildung 6.19: Expressionsmuster der Gene negativer Expression. Hier sind unter anderem Transkriptionsfaktoren aus der Familie NFκB vertreten (n=6).

Die Transkriptionsfaktoren *NF-κB1*, *NF-κB 2* und *NF-κB3* sind während der gesamten Kultivierungsdauer im Vergleich zum Referenztag 0 herunterreguliert. *NF-κB 2* und *NF-κB 3* zeigen einen nur leichten Anstieg ab dem Tag 14 der Kultivierung, deren Expression bleibt allerdings unter dem Expressionslevel des Referenztages 0.

Das Gen *MMP11* wird während der Kulturdauer kaum reguliert. Anders als andere Matrix-Metalloproteinasen ist das *MMP11* nur geringfügig in der Degradierung der ECM beteiligt. *ID1* zeigte in diesem Cluster mit $-3,022 \pm 1,15$ -fache Expression die „negativste“ Expression im Vergleich zur Referenz. Die stärkste Herunterregulierung zeigt das Gen *SELL* mit dem Tiefpunkt am Tag 14 ($-5,29 \pm 3,47$).

Tabelle 6.10: Gruppe der Gene mit negativer Expression. In dem zweiten Cluster dieser Gruppe sind die Gene wie der Transkriptionsfaktor *GATA2* sowie des der L-Selectin *SELL* vertreten.

Rezeptorproteine	<i>FLT3, CD34</i>
Transkriptionsfaktoren	<i>GATA2</i>
L-Selectin	<i>SELL</i>

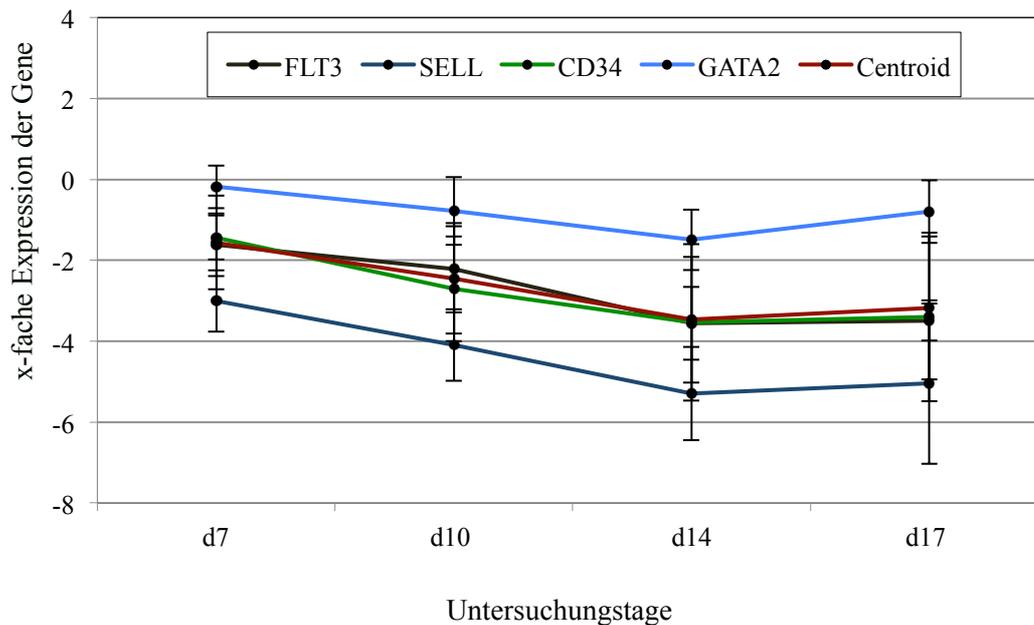


Abbildung 6.20: Expressionsmuster der Gene mit negativer Expression. Hier sind unter anderem der Transkriptionsfaktoren GATA2 und das Rezeptorprotein CD34 vertreten ($n=6$).

Einige Gene in diesem *Cluster* waren auf mehr als -3Fache herunterreguliert (CD34-Expression am Tag 14: $-3,53 \pm 1,93$). Diese Gene sind in der Tabelle 6.2 aufgeführt. Die stärkste Herunterregulierung zeigt das Gen SELL.

6.3.1.2 Diskriminatorische Genanalyse

Die diskriminatorische Genanalyse erlaubt die Detektion von Genen, die in unterschiedlichen Proben und Versuchsansätzen immer gleich exprimiert werden. Diese Analyse wurde als Bestätigung für die *Clustering*-Analyse durchgeführt, mit dem zusätzlichen Vorteil, dass alle „Störfaktoren“ wie das Alter der Patienten, ihre Krankheit usw. herausgefiltert werden konnten. Da sich die Gene, die hier identifiziert wurden, in jeder Erythropoese-Kultur gleich verhielten, wurden die Gene für die Transfektionsexperimente mit siRNA aus dieser Analyse herausgesucht.

Die Analyse zeigte 2 Gruppen die im Laufe der Erythropoese-Kultur in allen Kulturen gleich exprimiert worden sind: die erste Gruppe beinhaltete Gene, die hochreguliert wurden (Abbildung 6.21; Tabelle 6.11), die Gene der zweiten Gruppe (Abbildung 6.22 und Tabelle 6.12) werden im Verlauf der Erythropoese herunterreguliert.

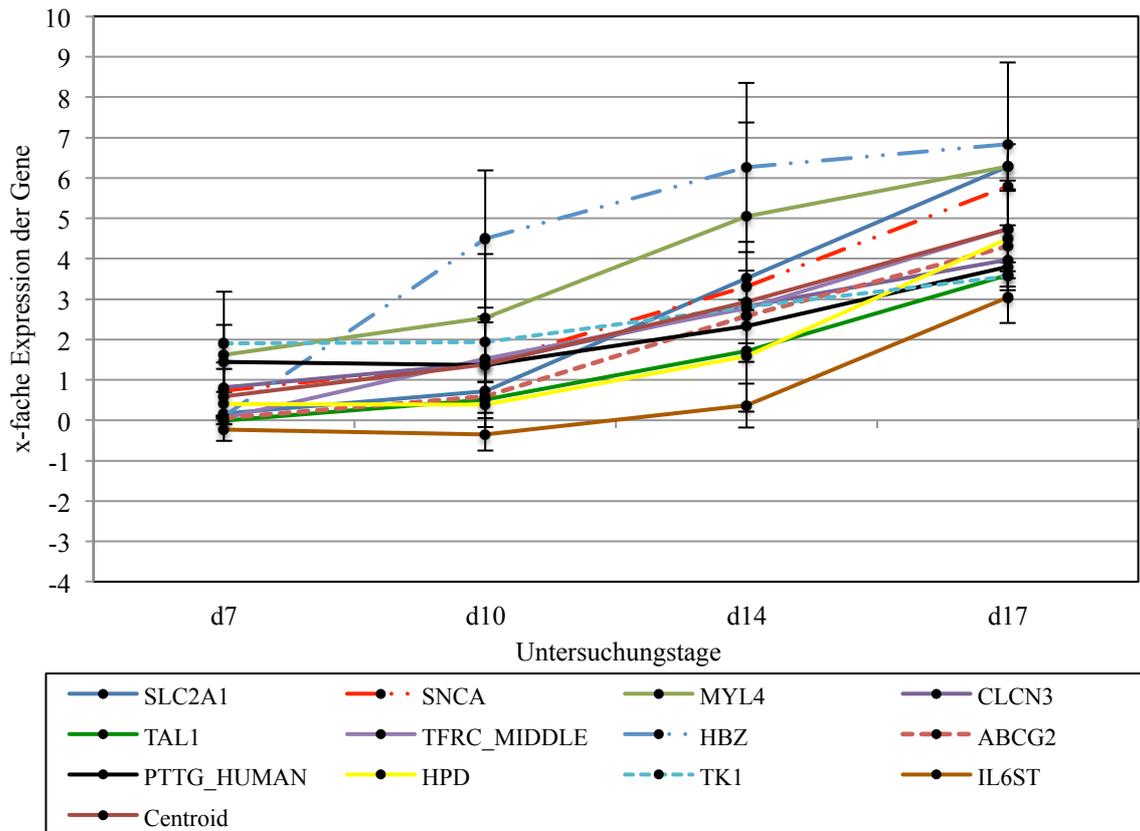


Abbildung 6.21: Expressionsverlauf der hochregulierten Gene aus der diskriminatorischen Genanalyse. Nach der bioinformatischen Datenanalyse unter Verwendung von SAM (Significance Analysis of Microarrays)-Algorithmus galten diese Gene im Vergleich zum Referenztag 0 als signifikant höher exprimiert. SAM wird verwendet, um herauszufinden, ob Veränderungen in der Genexpression statistisch signifikant sind oder nicht (d=Tag).

Im Allgemeinen wurden diese Gene im Verlauf der Kultur immer stärker exprimiert. Am Tag 17 der Kultur erreichten diese Gene ihre höchste Expression.

In dieser Gruppe sind Gene wie *TAL1*, *CLCN3*, *HBZ* vertreten. Die Gene *TAL1* und *CLCN3* wurden für die Transfektionsexperimente mit siRNA ausgesucht. Bereits zwei Datenanalysemethoden der *Microarrays* haben die Hochregulation dieser zwei Gene in der Erythropoesekultur bestätigt. *TAL1* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Erythropoese. Das Fehlen dieses Gen in Mäuseembryonen führte zum Ausbleiben der Produktion von hämatopoetischen Zellen [54]. Der Chlorichanal *CLCN3* spielt eine indirekte Rolle bei der Zellapoptose. Generell spielen Cl^- Kanäle wahrscheinlich eine Rolle bei der Apoptose von Erythrozyten [73]. Da die Enukleation der Erythrozyten einige

Parallelen zur Apoptose aufweist, könnten Gene die in der Apoptose involviert sind auch eine Rolle in der Eukleation spielen. Daher wurde dieses Gen für die Transfektionsexperimente mit siRNA ausgesucht. In der Tabelle 6.11 sind die hochregulierten Gene und ihre Funktion aufgelistet.

Tabelle 6.11: Zusammenstellung der hochregulierten Gene aus der diskriminatorischen Datenanalyse; zusammengestellt aus [12]

GENNAME	BESCHREIBUNG	FUNKTION DES PROTEINS
SLC2A1	Solute carrier family 2	Glucose-Transporte, spielt möglicherweise eine Rolle bei Entwicklung der Chondrozyten
SNCA	Synclein alpha	Involviert in Dopaminausschüttung und –transport, mindert die Neuronensensibilität für apoptotische Stimuli
MYL4	Myosin light chain 4	Involviert in Muskelkontraktion
TFRC	Transferrin Rezeptor (CD71)	Eisenionentransport, wichtig für die Entwicklung der Erythrozyten und des Nervensystems
HBZ	Homoglobin zeta	Wird in frühen Embryonen gebildet, hat Ähnlichkeiten mit Hämoglobin alpha
ABCG2	ATP-binding cassette, subfamily G, member 2	Spielt eine wichtige Rolle beim Ausschluss von Xenobiotika aus dem Gehirn. involviert in Gehirn-Blut-Efflux
CLCN3	Chloridkanal 3	CL-Ionen Regulation, Mitwirkung in der Apoptose
PTTG_HUMAN	Pituiatry tumor-transforming human	Ein Protooncogen, induziert Angiogenese <i>in vitro</i>
HPD	4-Hydroxyphenylpyruvat dioxygenase	Enzym des katabolischen Singnalweges von Tyrosin
TAL1	T-cell acute leukemia 1	Positiver Regulator der Erythropoese
TK1	Tymidinkinase 1	Hat eine hohe Aktivität in proliferierenden Zellen während der S-Phase
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer	Überträgt das Signal verschiedener Zytokine wie IL6, LIF und OSM.

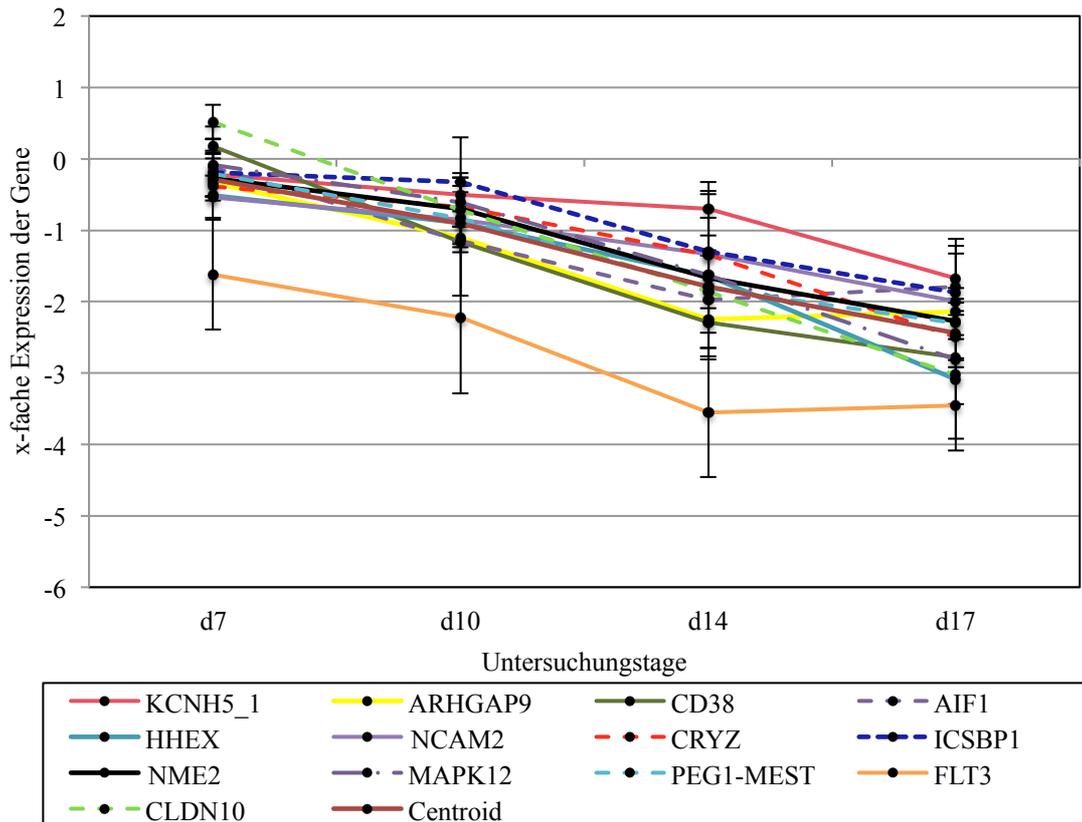


Abbildung 6.22: Expressionsverlauf der herunterregulierten Gene aus der diskriminatorischen Genanalyse. Nach der bioinformatischen Datenanalyse unter Verwendung von SAM (Significance Analysis of Microarrays)-Algorithmus galten diese Gene als signifikant exprimiert. SAM wird verwendet, um herauszufinden, ob Veränderungen in der Genexpression statistisch signifikant sind oder nicht (d=Tag).

In dieser Gruppe der herunterregulierten Gene nach der diskriminatorischen Genanalyse sind Gene wie *FLT3*, *HHEX* und *MAPK14* vertreten, die auch in der Hämatopoese oder Erythropoese wichtig sind. Die Gene dieser Gruppe zeigen fast alle bereits am Tag 7 einen niedrigeren Expressionswert als die Referenz. Eine weitere Expressionsabnahme konnte am Tag 10 beobachtet werden. Die Expression der meisten Gene nahm am Tag 14 noch einmal ab. Das Gen *FLT3* zeigt die auffälligste Expression. Bereits am Tag 7 der Kultur zeigte dieses Gen eine -1,5-fache Expression im Vergleich zur Referenz. Die Expression nahm am Tag 10 weiter ab und erreichte einen Wert von -3,5-fach und damit die niedrigste Expression. In der Tabelle 6.12 sind die herunterregulierten Gene und ihre Funktion aufgelistet.

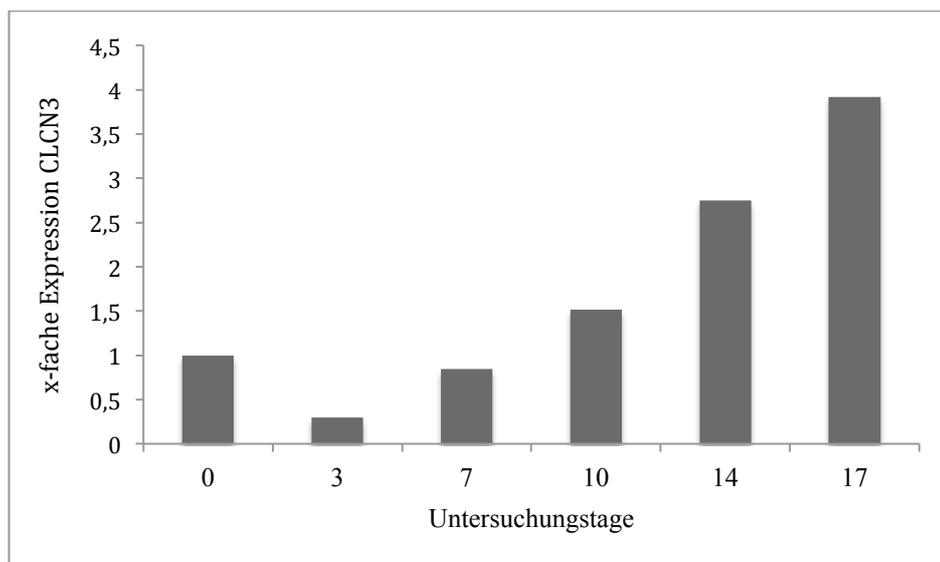
Table 6.12: Zusammenstellung der herunterregulierten Gene aus der diskriminatorischen Datenanalyse; zusammengestellt aus [12].

GENNAME	BESCHREIBUNG	FUNKTION DES PROTEINS
KCNH5_1	Potassium voltage-gated channel, subfamily H	Regulation der Ausschüttung von Neurotransmitter, Insulinsekretion, Muskelkontraktion
ARHGAP9	Rho GTPase activating protein	Zeigt eine hohe Aktivität für verschiedene Rho-GTPasen und wandelt sie in die inaktive Form um. Reguliert die Bindung der hämatopoetischen Zellen an die ECM
CD38	ADP-Ribosylcyclase	Wird bes. in Leukozyten exprimiert. Rezeptor im Immunsystem
AIF1	Allograft inflammatory factor 1	Negative Regulation des Wachstums von glatten Muskelzellen. Spielt eine Rolle in Makrophagenaktivität und -funktion
HHEX	Hematopoietically expressed homeobox	Wahrscheinlich aktiv in hämatopoetischer Differenzierung.
NCAM2	Neural cell adhesion molecule 2	Spielt eine Rolle in der selektiven Fasciculation der olfaktorischen Axonen
CRYZ	Crystallin zeta	Bindet NADP. Interagiert mit AU-reichen Elementen (ARE) in Ziel-mRNA
ICSBP1	interferon consensus sequence binding protein, IRF-8	Transkriptionsfaktor für IFN. Spielt einen negativen regulatorischen Effekt in Zellen des Immunsystems
NME2	Non-metastasic cells 2	Spielt eine wichtige Rolle in der Nucleosid-Triphosphat-Synthese
MAPK12	Mitogen-activated kinase 12	Produktion von IL6. Stabilisierung von EPO mRNA während hypoxischem Stress
PEG1-MEST	Mesoderm-specific transcript homolog protein	Bekannt als ein Kandidatengen für das Russel-Silver-Syndrom
FLT3	Fms-related tyrosine kinase	Unterstützt die Langzeitexpansion von CD34 ⁺ - Stamm- und Vorläuferzellen und sog. repopulierende Zellen
CLDN10	Claudin 10	Spielt eine große Rolle in der tight junctions-spezifischen Vernichtung von intrazellulären Zwischenräumen
MMRN	Multimerin	Ein Carrier für den Plättchenfaktor V. Kann als Protein der extrazellulären Matrix oder als Adhäsionsprotein fungieren

6.4. siRNA-Transfektion zur Hemmung von zwei hochregulierten Kandidatengen

Aus der Reihe der Gene, die in allen Kulturen verstärkt transkribiert wurden (siehe 6.3.1.2) wurden *TALI* und *CLCN3* für die siRNA-Transfektionsversuche ausgesucht. Beide Gene wurden bis zum Ende der Kultur im Vergleich zum Referenztag 0 signifikant hoch exprimiert (siehe Abbildung 6.17). Die siRNAs gegen diese Gene wurde von der Firma Qiagen bezogen. Die Transfektionsversuche erfolgten an den Untersuchungstagen 7, 10 und 14, um den Effekt der Hemmung in verschiedenen Stadien der Kultur verdeutlichen zu können. Bei einem Teil der Zellen wurden alle Transfektionsschritte durchgeführt, ohne dass dem Transfektionsansatz siRNA zugegeben wurde. Diese Kultur diene als negative Kontrolle (Mock-Kontrolle). Die Mock-Kontrolle diene als Bezugsgröße für die späteren Untersuchungen und Messungen. Von den transfizierten Kulturen wurde nach 20 und 72 Stunden Proben für die mRNA-Isolierung entnommen.. Der Effekt der Transfektion wurde nach mRNA-Isolierung mittels *real time* RT-PCR nachgewiesen. Diese Zeitpunkte wurden so gewählt, da der Effekt der Herunterregulierung nach 20 Stunden auf schon zu erkennen ist und bis zu 72 Stunden erhalten bleibt. Genau wie in der Standard-Erythropoesekultur wurde die Expression der Oberflächenantigene gemessen und Zytospins angefertigt. Abbildung 6.23 zeigt den Verlauf der Expression von *TALI* und *CLCN3* in der Standard-Erythropoesekultur gemessen in *real time* RT-PCR. Die PCR-Ergebnisse zeigen die gleiche zunehmende Tendenz der Regulation dieser zwei Gene, die bereits in der *Microarray*-Analyse beobachtet werden konnte. Da die folgenden Untersuchungen nur zwei mal reproduzierbar wiederholt werden konnten, wurde für die folgenden Ergebnissen keine Statistik berechnet. Bei en Ergebnissen der Transfektionsanalysen handelt es daher nur um eine Tendenz, die gezeigt wird.

A



B

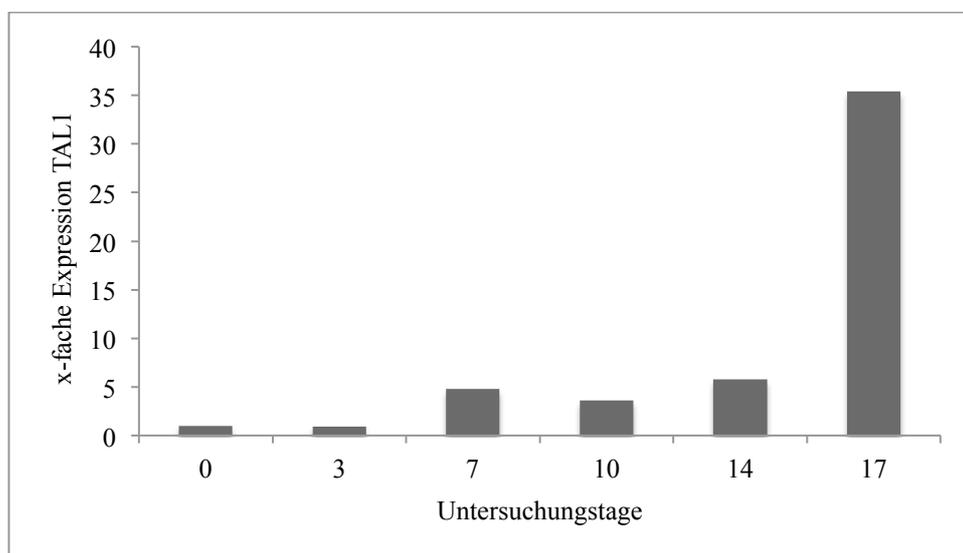
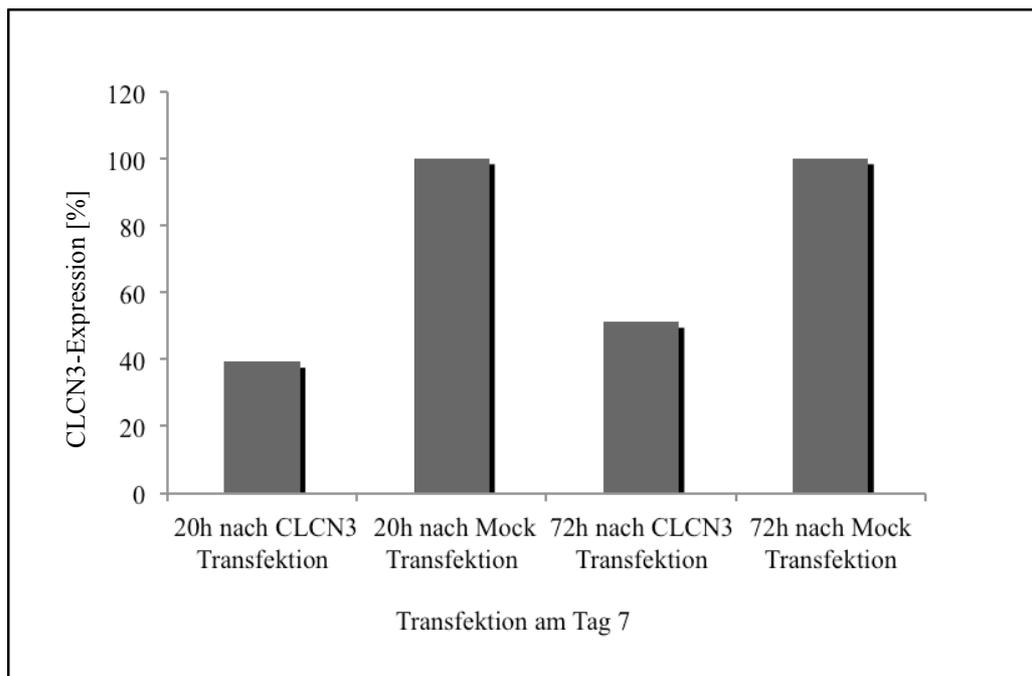


Abbildung 6.23: real time RT-PCR Messung der Expressionen von CLCN3 (A) und TAL1 (B) in der Standard-Erythropoesekultur. Die Balkendiagramme zeigen die x-fache Expression der Gene CLCN3 (A) und TAL1 (B) in der Erythropoesekultur im Vergleich zum Referenztag0. Die mRNA der erythropoetischen Zellen wurde an definierten Untersuchungstagen entnommen und einer real time RT-PCR unterzogen (n=2). Beide Gene zeigen eine zunehmende Expression im Laufe der Kulturzeit.

Abbildung 6.24 zeigt die Hemmung der CLCN3 und TAL1 mRNA Expression 20 und 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion am Tag 7 der Kultur. Durch die Transfektion sank der Expressionslevel von CLCN3 nach 20h auf 39,2% im Vergleich zu Mock-Kontrolle. Nach 72h war ließ der Wirkung der Transfektion etwas nach. Trotzdem war nur eine CLCN3-Expression von 51,2% der Mock-Kontrolle zu detektieren. Im Falle von TAL1 betrug die Expression der mRNA Expression nach 20h 53% und nach 72h 27,4%

verglichen mit der Mock-Kontrolle. Ähnliche Werte konnten auch nach der siRNA-Transfektion am Tag 10 und 14 erreicht werden (siehe Abbildungen 6.25 und 6.26 und Tabelle 6.12). Die Transfektionsversuche wurden zweimal wiederholt und der Hemmungseffekt hat sich bestätigt. Daher lässt sich hier eine Tendenz zur Reduzierung der Expression von TAL1 und CLCN3 beobachten. Die Abnahme des Expressionslevels bestätigt die Funktionalität der siRNA-Transfektion.

A



B

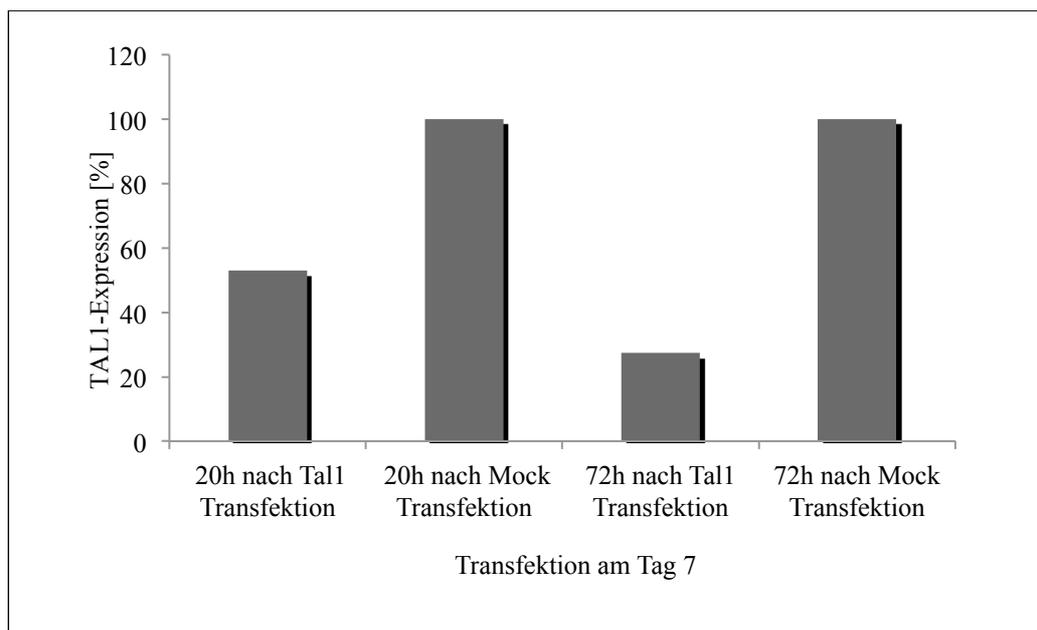
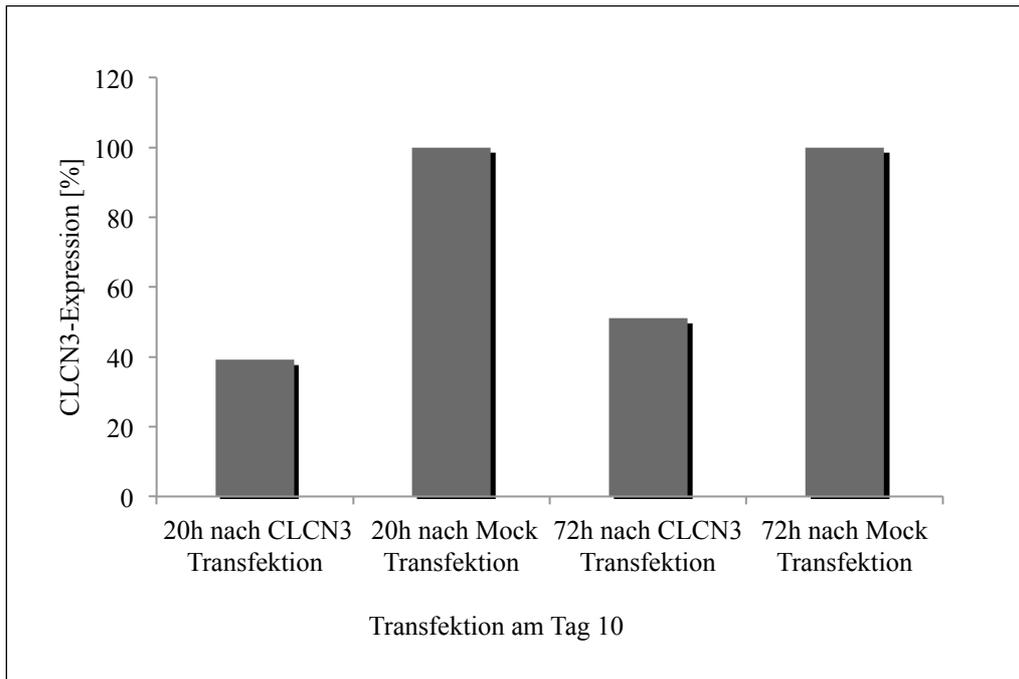


Abbildung 6.24: Hemmung der CLCN3 (A) und TAL1 (B) Expression. Die mRNA der erythropoetischen Zellen wurde 20h und 72h nach der siRNA-Transfektion am Tag 7 entnommen und einer real time RT-PCR unterzogen und mit Mock-transfizierten Zellen verglichen (n=2). Die Balkendiagramme zeigen die Expression von CLCN3 (A) und TAL1 (B) in der Erythropesekultur am Tag 7. Im Vergleich zur Mock-Kontrolle konnte eine Abnahme der Expression dieser Gene nach der siRNA-Transfektion beobachtet werden.

A



B

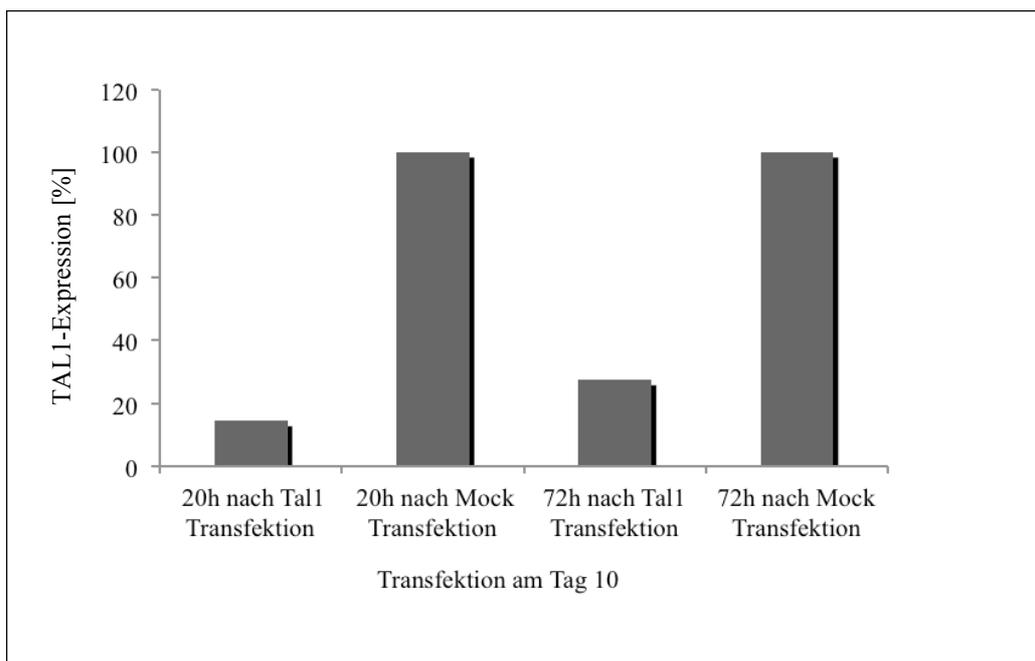
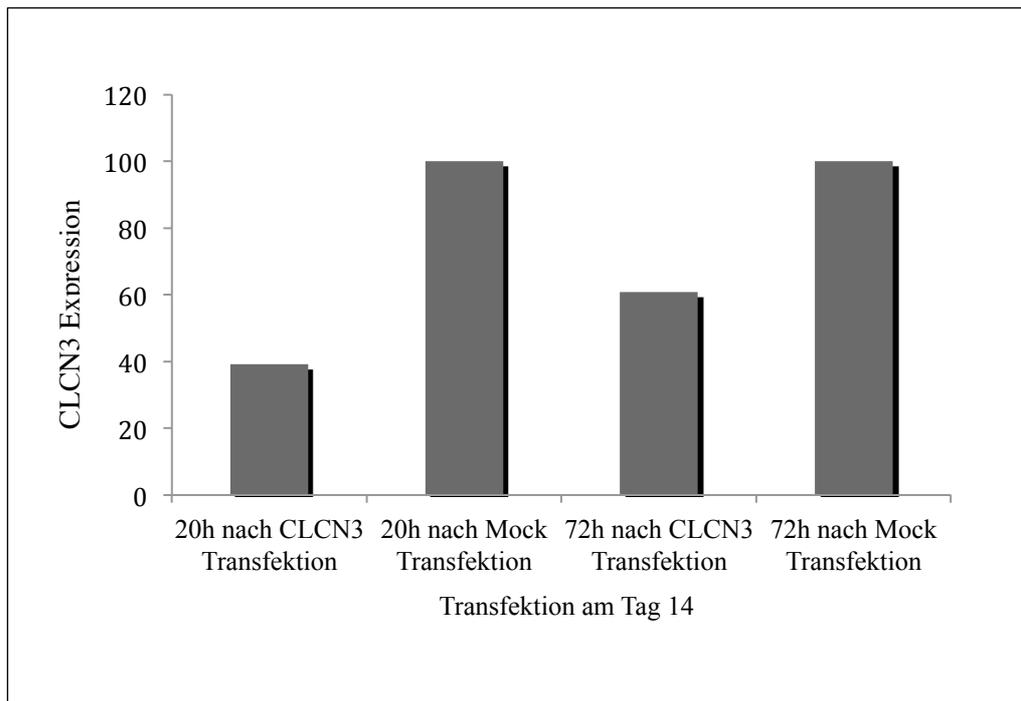


Abbildung 6.25: Hemmung der CLCN3 (A) und TAL1 (B) Expression. Die mRNA der erythropoetischen Zellen wurde 20h und 72h nach der siRNA-Transfektion am Tag 14 entnommen und einer real time RT-PCR unterzogen und mit Mock-behandelten Zellen verglichen (n=2). Die Balkendiagramme zeigen die Expression von CLCN3 (A) und TAL1 (B) in der Erythropesekultur. Im Vergleich zur Mock-Kontrolle konnte eine Abnahme der Expression dieser Gene nach der siRNA-Transfektion beobachtet werden.

A



B

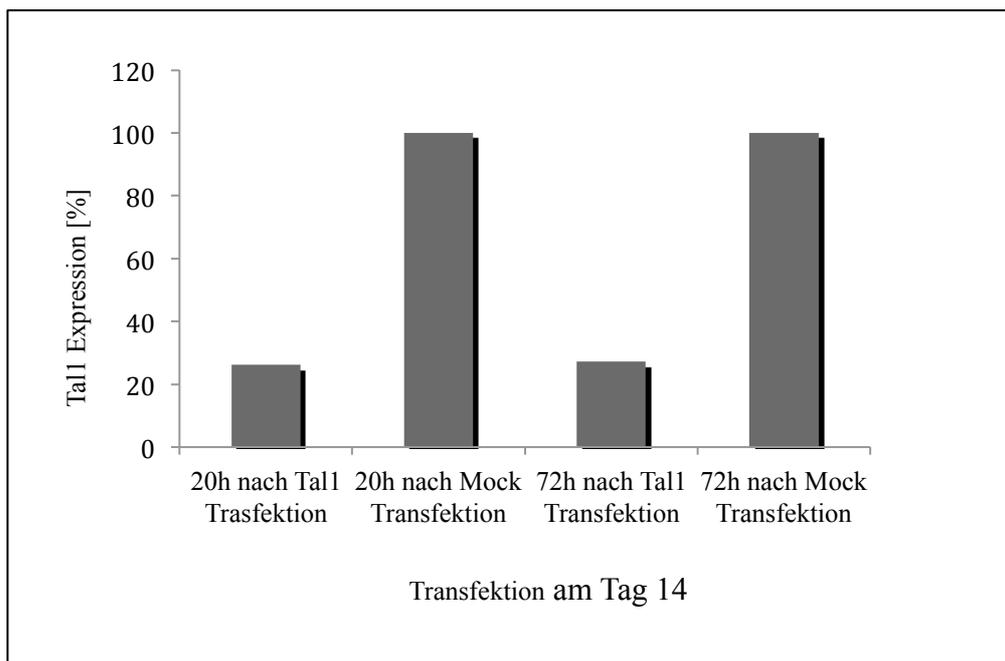


Abbildung 6.26: Hemmung der CLCN3 (A) und TAL1 (B) Expression. Die mRNA der erythropoetischen Zellen wurde 20h und 72h nach der siRNA-Transfektion am Tag 14 entnommen und einer RT-PCR unterzogen und mit Mock-behandelten Zellen verglichen (n=2). Die Balkendiagramme zeigen die Expression von CLCN3 (A) und TAL1 (B) in der Erythropesekultur. Im Vergleich zur Mock-Kontrolle konnte eine Abnahme der Expression dieser Gene nach der siRNA-Transfektion beobachtet werden.

Tabelle 6.12: Hemmung der Expression von CLCN3 und TAL1 durch siRNA Transfektion an Kulturtagen 10 und 14. Die Mock-Kontrolle wurde hier als Bezugsgröße gesetzt (n=2).

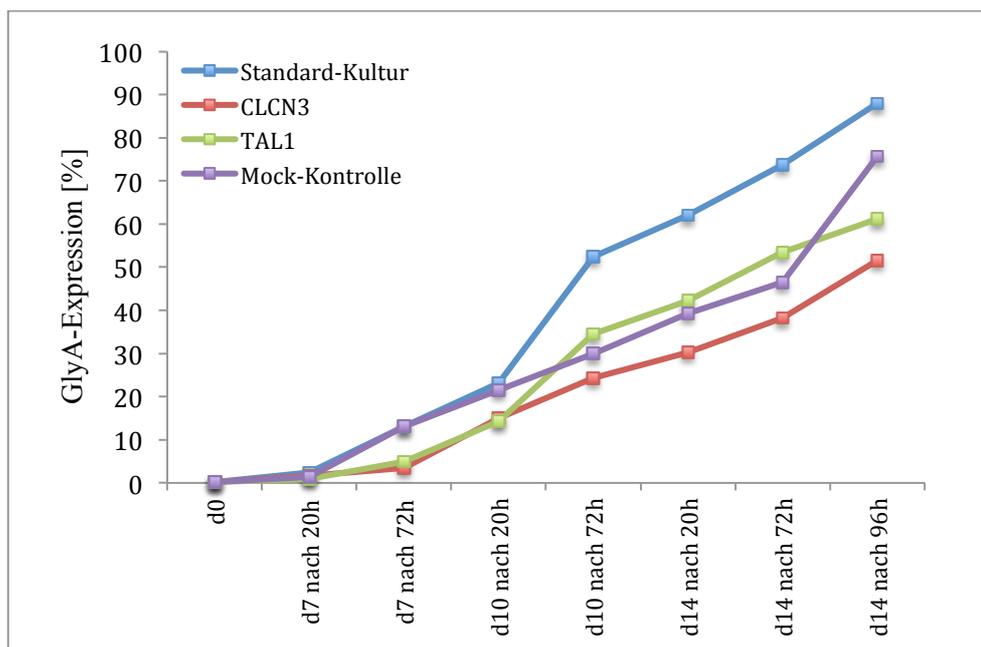
			CLCN3 [%]	TAL1 [%]
<i>Transfektion</i>	<i>am</i>	Nach 20h	39,2	14,6
<i>d10</i>		Nach 72h	51,1	27,4
<i>Transfektion</i>	<i>am</i>	Nach 20h	39,2	26,2
<i>d14</i>		Nach 72h	61	27,2

6.4.1 Differenzierung und Reifung der mit siRNA-behandelten Zellen in der Flüssigkultur

Die Oberflächenexpression von GPA, CD36, CD71 und CD45 der transfizierten erythropoetischen Zellen wurden durchflusszytometrisch 20 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion untersucht, um ihre Differenzierung zu kontrollieren. Der letzte Zeitpunkt der Untersuchung hier war 96 Stunden nach der letzten Transfektion. Zusätzlich wurden Zytospinpräparate hergestellt und Pappenheim bzw. Neutral-Benzidin gefärbt und bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht (siehe 5.4 und 5.5). Die Hochregulierung von GPA, die Herunterregulierung von CD45 und die Expression von CD36 und CD71 zeigten, dass auch die transfizierten Zellen alle Differenzierungsstadien einer Standard-Erythropoesekultur durchlaufen. Die GPA-Expression 96h nach Transfektion betrug in den CLCN3-transfizierten Zellen $51,5 \pm 14,1\%$, in den TAL1-transfizierten Zellen $61,2 \pm 11,9\%$ und in der Mock-Kontrolle $75,6 \pm 7,4\%$. Im Vergleich dazu stieg die GPA-Expression in den nicht-transfizierten Zellen in der Standard-Kultur zum diesem Zeitpunkt auf $88,0 \pm 5,5\%$. Parallel dazu sank die Expression des CD45 Antigens am letzten Untersuchungstag (Tag 14, 96 h nach Transfektion) in allen Kulturen mit $55,6 \pm 10,6$ bei CLCN3-transfizierten Zellen, $39,9 \pm 2,8\%$ bei TAL1-transfizierten Zellen und $23,4 \pm 14\%$ bei der Mock-Kontrolle. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen, dass auch die transfizierten Zellen die gleiche erythropoetische Zellreifung durchlaufen, wenn auch nicht im gleichen Maße, wie die Standard-Erythropoese (Abbildung 6.27 und 6.28). Auch die Zytospinergebnisse der transfizierten Kulturen bestätigten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie im Sinne der Entwicklung der Zellen zu erythrozytären Zellen. Allerdings wurden sowohl in CLCN-transfizierten Kulturen als auch in TAL1-transfizierten Kulturen kaum Retikulozyten

beobachtet (TAL-transfizierte Kultur $1 \pm 2,8\%$, CLCN3-transfizierte Zellen 0% am Tag 14 und 72 h nach der Transfektion). Gleichzeitig waren bei Tal1 transfizierten Zellen $39 \pm 7,1\%$ und bei CLCN-transfizierten Zellen $55,5 \pm 20,5\%$ Zellen aus der weißen Zellreihe beobachtet werden (Abbildungen 6.29-6.31).

A



B

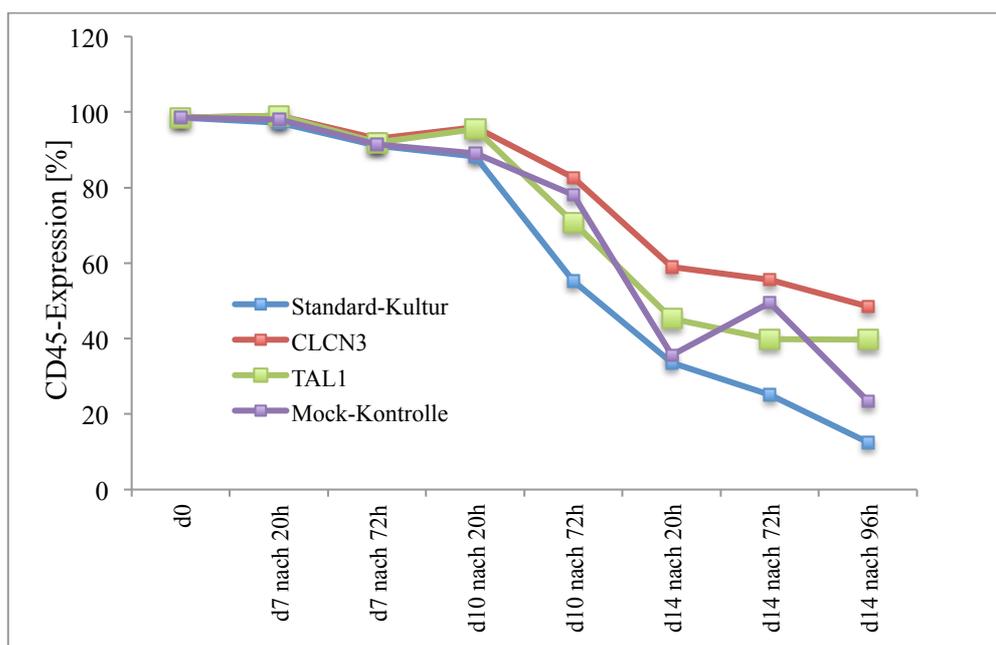
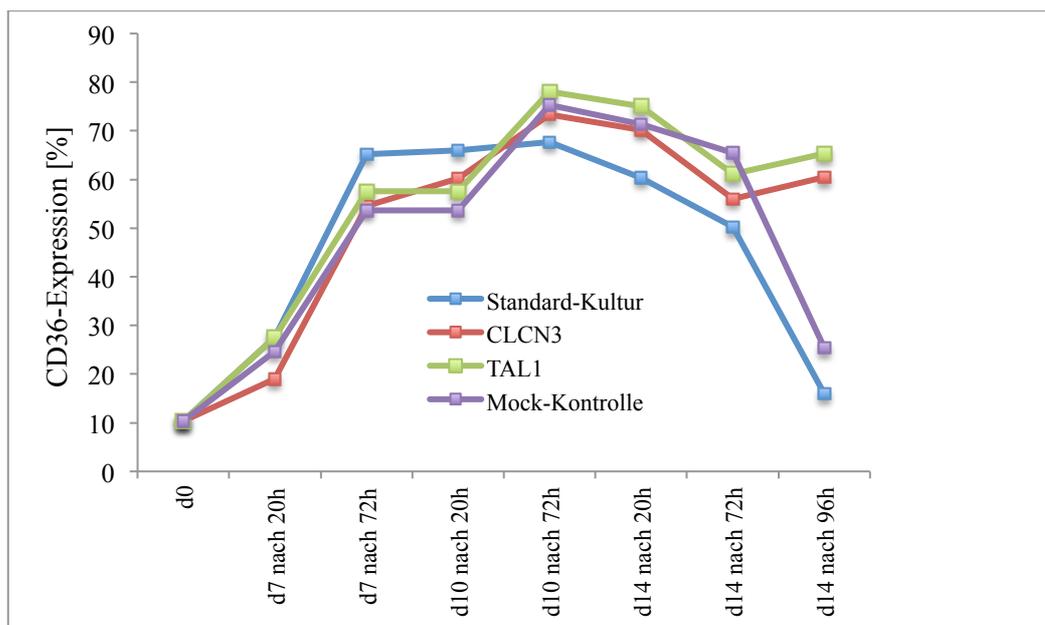


Abbildung 6.27: Oberflächenexpression nach Transfektion in Flüssigkultur im Vergleich zu Standard-Erythropoese und zur Mock-Kontrolle: Die Abbildung zeigt den Verlauf der Expression von erythropoetischen Markern GPA und CD45 auf erythropoetischen Zellen nach einer siRNA-Transfektion gegen die Gene *TAL1* und *CLCN3*, 20 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion. Der größte Unterschied konnte in der GPA-Expression zwischen der Standard Kultur und den transfizierten Kulturen beobachtet werden ($n=2$) (d =Tag; h =Stunden nach Transfektion).

C



D

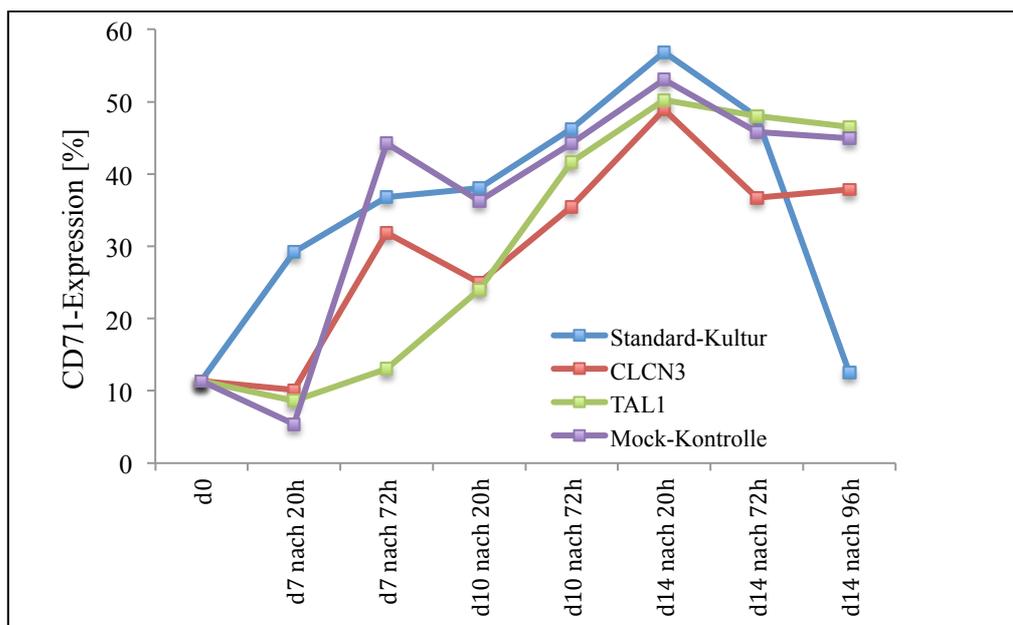
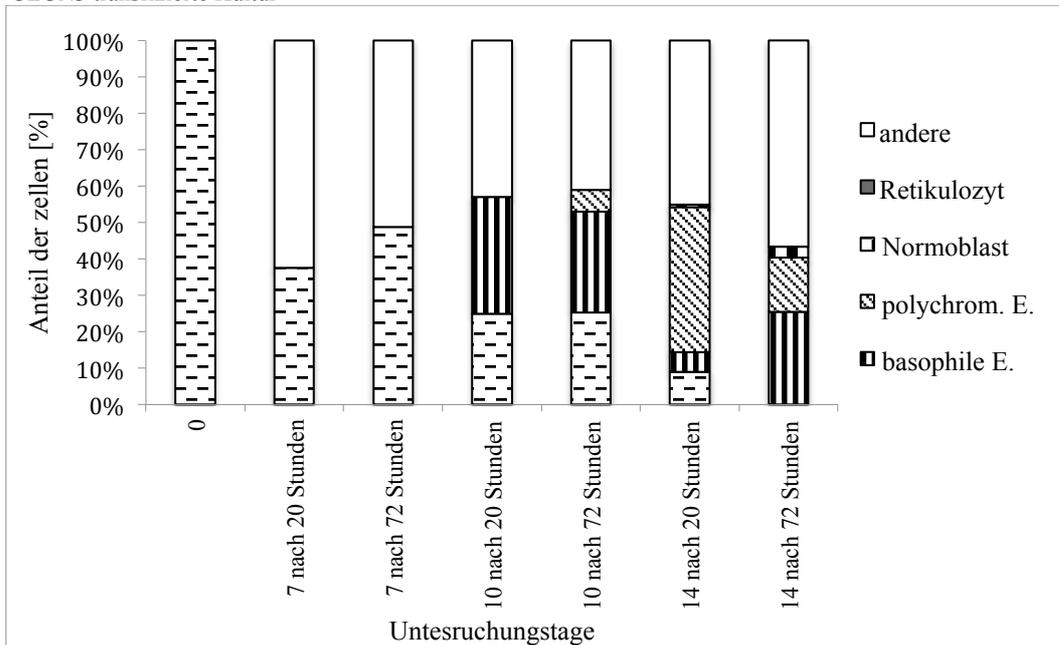


Abbildung 6.29: Oberflächenexpression nach Transfektion in Flüssigkultur im Vergleich zu Standard-Erythropoese und zur Mock-Kontrolle: Die Abbildung zeigt den Verlauf der Expression von erythropoetischem Marker CD36 und CD71 auf erythropoetischen Zellen nach einer siRNA-Transfektion gegen die Gene TAL1 und CLCN3, 20 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion. Der größte Unterschied konnte in der GPA-Expression zwischen der Standard Kultur und den transfizierten Kulturen beobachtet werden ($n=2$) (d =Tag; h =Stunden nach Transfektion).

A

CLCN3 transfizierte Kultur



B

TAL1-transfizierte Kultur

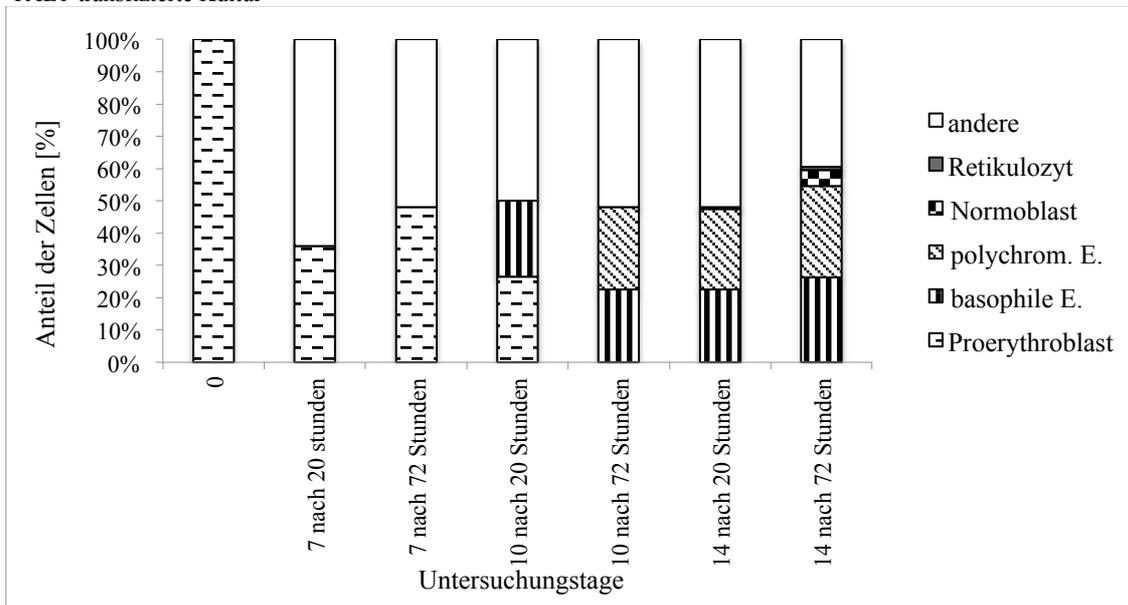


Abbildung 6.30: Vergleich der Zytospinpräparate der Transfektionsversuche mit siRNA gegen *CLCN3* (A) und *TAL1* (B). Proben aus der siRNA-transfizierten Zellen gegen die Gene *TAL1* und *CLCN3* bzw. Mock-Kontrolle wurden jeweils 20 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion entnommen und Pappenheim bzw. Neutral-Benzidin gefärbt. Aufgetragen sind die prozentualen Anteile an verschiedenen Zelltypen gegen Untersuchungstage der Kultur (n=2). (andere = Zellen der weißen Reihe; Basophile E. = Basophile Erythroblasten; Polychromatische E. = Polychromatische Erythroblasten).

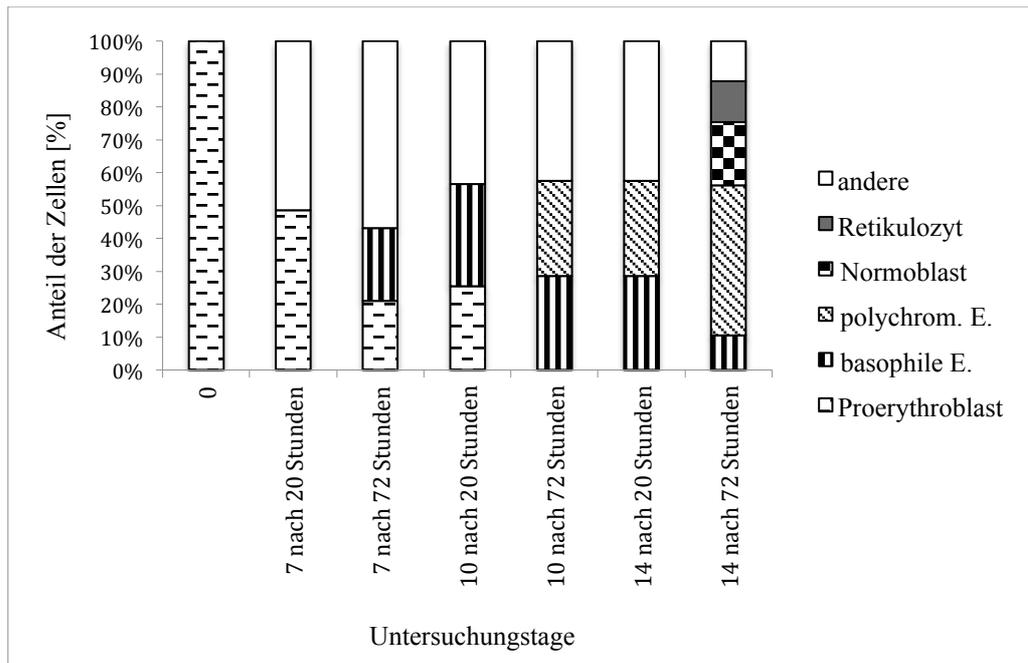
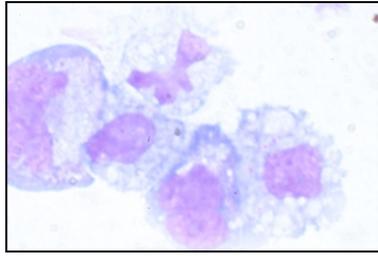


Abbildung 6.21: Vergleich der Zytospinpräparate der Transfektionsversuche der Mock-Kontrolle. Proben aus der siRNA-transfizierten Zellen gegen die Gene *TAL1* und *CLCN3* bzw. Mock-Kontrolle wurden jeweils 20 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion entnommen und Pappenheim bzw. Neutral-Benzidin gefärbt. Aufgetragen sind die prozentualen Anteile an verschiedenen Zelltypen. ($n=2$). (andere = Zellen der weißen Reihe; Basophile E. = Basophile Erythroblasten; Polychromatische E. = Polychromatische Erythroblasten).

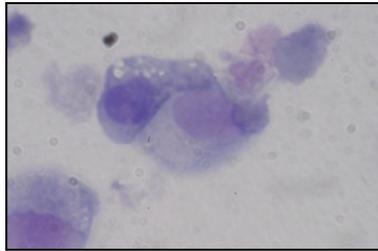
72 Stunden nach der Transfektion am Transfektionstag 10 und zeigten alle drei Kulturen die ersten Hämoglobin-bildenden Zellen. Die Gesamtanzahl der erythropoetischen Zellen nahm in allen transfizierten Kulturen mit der Kultivierungszeit zu und erreichte zu dem Ende der Kultur und trotz dreimaliger Transfektion einen Wert von $42,5 \pm 4,8\%$ bei *CLCN3*-Transfektion und $60 \pm 3,1\%$ bei *TAL1*-Transfektion. Die Mock-Kontrolle bestand zum selben Zeitpunkt zu $79,5 \pm 7,1\%$ aus erythrozytären Zellen. Der Anteil an Retikulozyten am letzten Kulturtag betrug bei den *TAL*-transfizierten Zellen $1 \pm 0,4\%$. Bei der *CLCN3* Hemmung konnten keine Retikulozyten 72 Stunden nach der Transfektion beobachtet werden. Die Mock-Kontrolle bestand zu diesem Zeitpunkt zu $19,5 \pm 10,6$ aus Retikulozyten. Der Hauptunterschied zwischen *TAL1*- und *CLCN3*-transfizierten Kulturen bestand im Anteil an polychromatischen Zellen. Während *TAL1*-transfizierten Kulturen $28 \pm 9,9\%$ polychromatische Zellen hervorbrachten, betrug der Anteil dieser Zellen bei den *CLCN3*-transfizierten Kulturen $14,5 \pm 2,1\%$. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Herunterregulierung von *TAL1* und *CLCN3* die Erythropoese beeinträchtigt wird.

CLCN3 D7 nach 20h

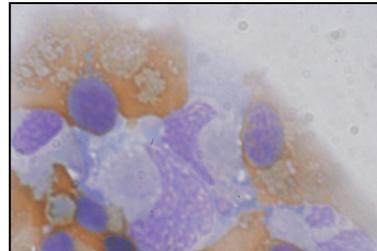


D10 nach 20 h

D10 nach 72h



D14 nach 20h



D14 nach 72h

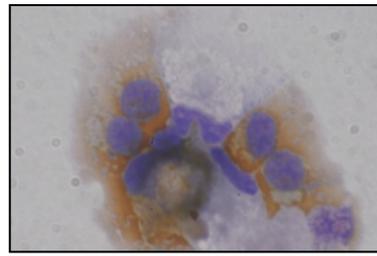
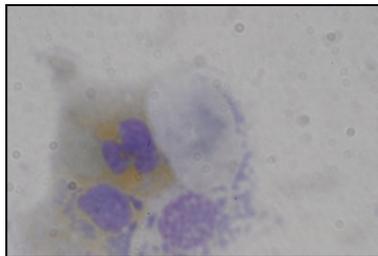


Abbildung 6.30: Zytospinpräparate der gegen *CLCN3* siRNA-transfizierten Zellen. Die Zellen wurden 20 bzw. 72 Stunden nach Transfektion Neutral-Benzidin gefärbt. 72 Stunden nach Transfektion am Tag 14 kann zwar eine Hämoglobinproduktion aber keine Retikulozytengenerierung beobachtet werden.

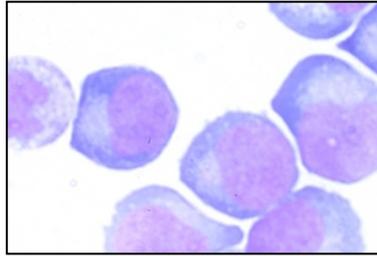
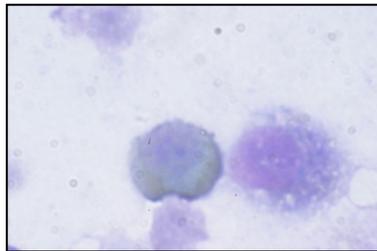
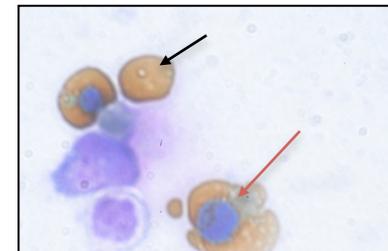
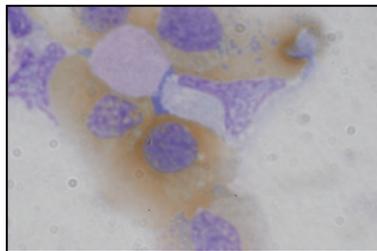
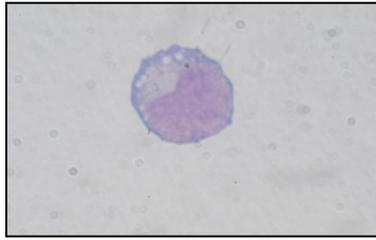
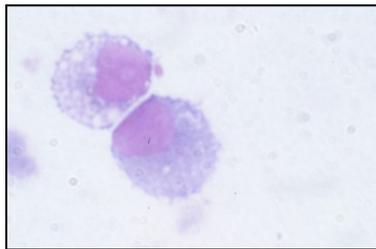
*Mock-Kontrolle**D7 nach 20h**D10 nach 20 h**D10 nach 72h**D14 nach 20h**D14 nach 72h*

Abbildung 6.31: Zytospinpräparate der Mock siRNA-transfizierten Zellen. Die Zellen wurden an 20 bzw. 72 Stunden nach Transfektion Neutral-Benzidin gefärbt. 72 Stunden nach der Transfektion am Tag 14 der Kultur konnten Normoblasten und Retikulozyten in der Kultur beobachtet werden. Der schwarze Pfeil zeigt einen Retikulozyten und der rote Pfeil einen Normblasten.

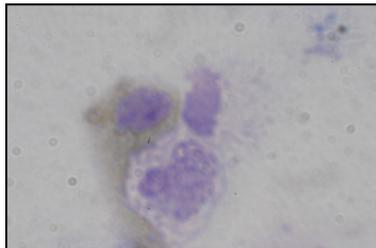
TAL1 D7 nach 20h



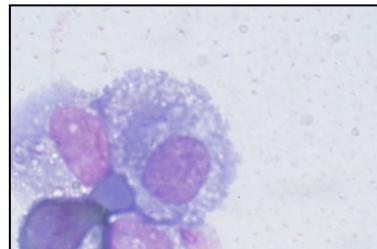
D10 nach 20 h



D14 nach 20h



D10 nach 72h



D14 nach 72h

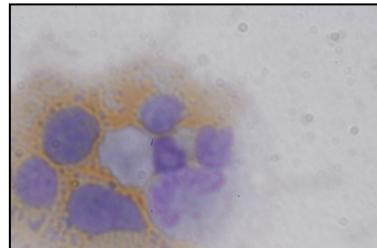


Abbildung 6.32: Zytospinpräparate der TAL1 siRNA-transfizierten Zellen. Die Zellen wurden an 20 bzw. 72 Stunden nach Transfektion Neutral-Benzidin gefärbt. 72 Stunden nach der Transfektion am Tag 14 kann zwar eine Hämoglobinproduktion aber keine Retikulozytengenerierung beobachtet werden.

7. Diskussion

Der Prozess der Differenzierung von Erythrozyten ist komplex und besteht aus mehreren Schritten. Er beginnt mit der Differenzierung der Stammzellen zu frühen erythropoetischen Vorläuferzellen (*burst-forming units-erythroid*, BFU-E), dann zu späten erythropoetischen Vorläuferzellen (*colony-forming unit-erythroid*, CFU-E). Die Erythrozyten der Mammalia sind einzigartig im Vertebratenreich, da sie ihren Kern ausschleusen und eine dramatische Formveränderung durchlaufen, um als ausgereifte und funktionell einsatzfähige Zellen in den Blutkreislauf zu gelangen. Dabei nimmt das Zellvolumen ab, die Nukleoli werden kleiner, bis sie nicht mehr sichtbar sind, das Kernchromatin wird dichter und der Zellkern pyknotisch. Schließlich wird dieser ausgestoßen. Der reife Erythrozyt nimmt eine bikonkave Form an und besitzt keine Actinfilamente und Microtubuli mehr. Frühere morphologische Studien haben gezeigt, dass der E nukleationsprozess Ähnlichkeiten zu dem der Zytokinese aufweist, insofern als dass sich eine Zytoplasmaabschnürung, ähnlich einer Teilungsfurche zwischen dem auszuschleusenden Kern und dem zukünftigen Retikulozyt bildet [66, 67, 108-110]. Skutelsky und Danon [110] haben gezeigt, dass der Mikrotubulus wichtig für die richtige Positionierung der Abschnürung zwischen dem Retikulozyten und dem Kern ist. Die Gruppe um Rouzbeh et al. identifizierte verschiedene miRNAs, die eine potenzielle Rolle in der erythropoetischen E nukleation spielen [161]. Eine andere Studie [111] zeigte anhand von Versuchen an murinen Milzerythroblasten, die für eine kurze Zeit *in vitro* kultiviert wurden, dass Cytochalasin B die E nukleation inhibieren kann. Dieses Ergebnis diente als Hinweis für die Bedeutung von Filament-Actin (F-Actin). Durch Inkubation von FVA-Zellen (*Friends virus anemia cells*) mit Cytochalasin B konnte in einer weiteren Studie eine reversible Inhibierung der E nukleation erreicht werden, welche als Hinweis für die Bedeutung von F-Actin und somit auch als Beweis der Ähnlichkeit der E nukleation zur Zytokinese diente [40]. Allerdings wurden keine Veränderungen der Actinfilamente vor der E nukleation gezeigt, auch wurde kein Actin in enukleierenden Zellen nachgewiesen und die Rolle von anderen Zytoskelett-Elementen bisher nicht genau untersucht. Die Mechanismen der E nukleation sind also noch nicht vollkommen bekannt. In diesem Zusammenhang ist die Aufklärung der Genexpression während des E nukleationsvorgangs und die Identifizierung von differentiell regulierten Genen hilfreich.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei bereits veröffentlichte Erythropoeseulturen [49, 50] miteinander in ihrer Proliferations- und Differenzierungskapazität – unter anderem in Kokultivierung mit MSCs (n Stammzellen) – verglichen [146]. Dabei zeigte die Kultur

nach Panzenböck eine bessere Reifung der Zellen und brachte einen höheren Anteil an Retikulozyten hervor, während die Kultur nach Neildez-Nguyen eine höhere Proliferation zeigte. Nach einer *Microarray*analyse der Erythropoesekultur nach Neildez-Nguyen wurden die Gene *TAL1* und *CLCN3* für eine funktionelle Studie ausgesucht, da diese einen konstanten Anstieg der Expression im Verlauf der Kultur zeigten. Zudem ist *TAL1* ein wichtiger Faktor für die erythropoetischen Zellreifung [156]. Durch die siRNA Transfektion gegen diese zwei Gene konnte eine Herabsetzung der Zellreifung in der Erythropoesekultur beobachtet werden, wie anhand der Zytopsin- und durchflußzytometrieergebnisse gezeigt werden konnte. In den tranfzierten Kulturen waren kaum Normoblasten und so gut wie keine enukleierten Retikulozyten zu sehen.

7.1 In vitro Erythropoese

Ziel dieser Untersuchungsreihe war die Etablierung und Optimierung einer stabilen Zellkulturtechnik, die aus $CD34^+$ humanen Stammzellen reife, enukleierte Retikulozyten hervorbringt und während der alle Zwischenstadien einer *in vivo* Erythropoese möglichst synchronisiert und mikroskopisch visualisierbar nachvollzogen werden können.

In beiden hier untersuchten Modelle waren konnte ich aus $CD34^+$ Stammzellen, reife enukleierte und Hämoglobin produzierende Zellen differenzieren. Auch waren alle Zwischenstadien einer Erythropoese, wie der basophile und polychromatische Erythroblast, oxophiler Normoblast und der kernlose Retikulozyt in Abhängigkeit vom Kulturtag nachweisbar. Die Expression der typischen Erythropoesemarker, *CD71* und *CD36* zeigte entsprechend der Zugabe von EPO einen erwartungsgemäßen Verlauf bezüglich der unterschiedlichen Reifestadien der Zellen. Diese typische Expression wird auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [156]. Gleichzeitig mit der Zunahme der GPA- Expression nahm die Expression von *CD45* – einem Marker für multipotente Stammzelle und für myeloide Vorläuferzellen und für die Kontamination der Kultur mit Zellen der weißen Reihe – ab und sank auf unter 5% entsprechend einer hohen Reinheit der *in vitro* generierten Erythropoese. GPA –ein später Marker für erythropoetische Zellen– wurde am Ende der Kultur von nahezu allen Zellen exprimiert. Die morphologischen Untersuchungen zur Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung (siehe 5.5) bestätigte die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Marker. Über die Kulturdauer nahm die Anzahl der hämoglobinbildenden Zellen zu und am Ende der Kulturzeit beinhalteten beide Kulturmodelle hauptsächlich erythropoetische Zellen, darunter auch enukleierte Retikulozyten.

In dieser Arbeit wurde anders als in der Publikation von Neildez-Nguyen [50] FCS (*fetal calf serum*) im Basismedium verwendet. Dadurch konnten, anders als in der Veröffentlichung ein hoher Anteil an reifen und enukleierten Zellen generiert werden. In den Kulturen von Neildez–Nguyen et al. [50] konnte im Gegensatz zu unseren Kulturen keine E nukleation beobachtet werden. FCS enthält eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Vitaminen, die das Wachstum und die Differenzierung von humanen Zellen in der Kultur unterstützen können. Der Verzicht auf FCS kann das Ausbleiben von enukleierten Zellen in den Kulturen von Neildez–Nguyen erklären. Häufig wird allerdings auf den Zusatz von FCS in der Kultur verzichtet, um eine xenogene Quelle für Nährstoffe zu vermeiden und die Wirkung von einzelnen Wachstumsfaktoren oder deren Kombination besser untersuchen zu können. Die Zusammensetzung von FCS kann außerdem von Charge zu Charge variieren, was die Standardisierung von Kulturbedingungen schwierig macht. In unserer Versuchsreihe wurde eine vorgetestete FCS-Charge verwendet, um die Bedingungen soweit wie möglich konstant zu halten [13].

Durch Kultivierung der Zellen in der 3-Phasen-Kultur konnte im Vergleich zur 2-Phasen-Kultur eine höhere Proliferation erreicht werden. Dies lag einerseits an der längeren Kultivierungsdauer der Zellen, andererseits an der zusätzlichen Initiationsphase. Die Zellen wurden in der ersten Phase der 3-Phasen-Kultur ohne Zugabe von EPO und nur durch SCF, TPO (Thrombopoetin) und FLT-3 (*Fms-like tyrosin kinase 3-ligand*) stimuliert. So konnte eine größere Zellvermehrung der initial in das Modell eingebrachten Zellen erreicht werden. Daher war die 3-Phasen-Kultur besser geeignet für die Genexpressions- und Transfektionsversuche und wurde hierfür verwendet. Außerdem konnte die Genexpressionsveränderung aufgrund der später einsetzenden Wirkung von EPO während der Reifung der Zellen besser nachvollzogen werden. Ein weiterer Vorteil lag darin, dass sich das 3-Phasenmodell über einen längeren Zeitraum erstreckte. Aufgrund dieser verlängerten Phase war es den Zellen zudem möglich, sich nach der Transfektion regenerieren zu können und dies ließ die Durchführung mehrerer Transfektionen innerhalb eines Modells zu [13]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide in dieser Arbeit etablierten Kulturmodelle einen stabilen Verlauf zeigten und dass beide in der Lage sind, vitale enukleierte und reife Erythrozyten mit einer recht guten Proliferationsrate zu liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde außer der Wirkung von unterschiedlich langer Kultivierungsdauer und unterschiedlichen Mediumzusätzen auch die Wirkung der Kokultivierung von HSCs (hämatopoetische Stammzellen) mit MSCs (mesenchymale

Stammzellen) untersucht. Als Teil der hämatopoetischen Stammzellnische spielen die MSCs eine entscheidende Rolle im Reifungsprozess der HSCs. Physiologisch interagieren HSCs innerhalb der Knochenmarknische entweder direkt oder indirekt über Zytokine und anderen löslichen Faktoren mit unterschiedlichen zellulären Elementen. Giarratana et al. [51] haben gezeigt, dass nach Kultivierung von CD34⁺ Zellen in einem serumfreien Proliferationsmedium, diese erst dann entkernten, als sie mit den murinen Stromazelllinie MS-5 kokultiviert wurden. Analog konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass neben der Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auch die Kokultur der HSCs mit aus Knochenmark gewonnenen MSCs die Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wie BFU-Es erhöhte [90, 112, 113, 151]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der MSCs auf die Langzeit-Erythropoese eher durch die von ihnen sezernierten, löslichen Faktoren beruht, als durch den direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen den MSCs und HSCs [114, 158]. Perucca et al. postulierte, dass MSCs die Proliferation und die Reifung der erythropoetischen Zellen initialisieren [151]. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Kokulturversuche von G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) mobilisierten CD34⁺ Zellen aus peripherem Blut mit primären humanen Knochenmark-MSCs durchgeführt, um eine der *in vivo* Situation nahekommende *in vitro* Generierung von erythrozytären Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten zu erreichen.

Die Ergebnisse der Kokultivierungsversuche haben deutliche Hinweise auf den Einfluss von MSCs auf die Entwicklung der blutlinienspezifischen Vorläuferzellen geliefert. In dem von uns gewählten experimentellen Design wurden durch die Kokultivierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen mit MSCs die Vitalität der Zellen von durchschnittlich 91% auf 96% bei der direkten Kokultivierung und 98% bei der indirekten Kokultivierung verbessert. Dieser Effekt konnte bereits auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden [94, 114-117]. Giarratana et al. [51] verwendeten für den finalen Schritt der erythropoetischen Differenzierung und E nukleation der Zellen in ihrem *ex vivo* Modell die murine Stromazelllinie M5. Sie fanden heraus, dass die murine Zelllinie –mit Einschränkung– auch durch primäre humane MSCs ersetzt werden kann. Durch Kokultivierung von murinen, embryonalen pluripotenten Stammzellen mit der aus Knochenmark gewonnenen OP9 Stromazelllinie konnten Vodanik et al. [118] 20% mehr CD34⁺ Vorläuferzellen erhalten und für nachfolgende Experimente isolieren (maximal 10⁷ CD34⁺ Vorläuferzellen mit einer Reinheit von über 95%) als bei einer Kultivierung ohne MSCs. Diese Beobachtungen erhärten die Hypothese, dass die von MSCs produzierten

Faktoren und der zusätzliche Zell-Zell-Kontakt die Proliferation unreifer Vorläuferzellen günstig beeinflussen. Die verbesserte Überlebensrate der Zellen, besonders während der ersten Tage der Kultur, zeigt dass diese Faktoren die kultivierten erythropoetischen Vorläuferzellen vor Apoptose bewahren. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete kumulative Zellproliferation bei den beiden Kokultivierungsansätzen um ein Vielfaches höher (4- bis 5-fach) war als bei der Standard-Kultur. Alle diese Ergebnisse zeigen, dass die MSCs eine wichtige Rolle bei der Imitierung der hämatopoetischen Knochenmarksnische in *ex vivo* Modellen spielen (siehe auch Einleitung 2.2.) [18, 114-117]. Die Differenzierung der Zellen in den Kokultivierungsansätzen zeigt allerdings am Ende der Kulturdauer einen ungewöhnlich hohen „Verunreinigungsgrad“ mit Zellen der weißen Reihe. Während es sich unter Standard-Kulturbedingungen bei mindestens 90% der Zellen um Normoblasten oder bereits enukleierte Retikulozyten handelte, und nur etwas weniger als 5% myeloische Zellen beobachtet werden konnten, zeigten die Kokultivierungsmodelle zu mehr als der Hälfte (indirekte Kokultur) bzw. Dreiviertel (direkte Kokultur) granulozytäre Vorläuferzellen. Diese primär über Zytospinpräparate mikroskopisch erhobenen Daten konnten durch durchflusszytometrische Analysen, insbesondere durch den Nachweis von myeloischen Zellen, die den Pan-Leukozytenmarker CD45 exprimierten, bestätigt werden. Korrespondierend hierzu waren nur 30% (direkt) bis 40% (indirekt) der kokultivierten Zellen am Ende positiv für den Erythrozytenspezifischen Marker Glykophorin A. Unsere Ergebnisse lassen zwei mögliche Interpretationen zu:

Erstens, die Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu reifen und enukleierten Retikulozyten wird durch die Kokultivierung auf MSCs eher unterdrückt als gefördert. Dieser hemmende Effekt war in beiden Kokulturmodellen (direkt oder indirekt) gleich stark ausgeprägt, so dass die Zytokine, die durch MSCs sezerniert werden, hierfür verantwortlich zu sein scheinen und der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen MSCs und HSCs für diesen Effekt nicht nötig ist. Die terminale Differenzierung von erythrozytären Vorläufern zu Normoblasten und Retikulozyten und der damit verbundene Prozess der Enukleation scheinen also nicht unmittelbar von Zell-Zell-Kontakten abhängig zu sein. Darüber hinaus gibt es Publikationen, die darauf hinweisen, dass durch einen Zell-Stroma-Kontakt zwischen MSCs und HSCs die letzteren in noch sehr unreifen Stadien in der Knochenmarksnische zurückgehalten werden, wohingegen eine geringere oder aufgehobene Zelladhäsion zwischen MSCs und den reiferen Stadien wie Normoblasten

und Retikulozyten die Migration dieser Zellen aus ihrer Nische in die Blutzirkulation erleichtern würde [116].

Zweitens: Nicht die Erythropoese wird primär durch „Inhibitoren“ unterdrückt, sondern die Granulopoese bevorzugt stimuliert, z.B. durch sezernierte Wachstumsfaktoren wie G-CSF und IL-6. Für die letztere Hypothese spricht die Beobachtung, dass die Erythropoese sich *in vitro* wie erwartet entwickelt hat, jedoch ihr relativer Anteil durch eine signifikant gesteigerte Myelopoese geringer ausfiel. Diese Beobachtung ist sowohl für zukünftige Fragestellungen in der Grundlagenforschung als auch für die Vision der *in vitro* Generierung von Blut zum Zweck der Transfusion von großer Relevanz, weil die Ausbeute der Erythropoese einen wichtigen Faktor darstellt.

Die fördernde Wirkung der MSCs auf die Eukleation von Normoblasten, die Giarratana et al. beobachteten, kann somit im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Unterschiede in der Kulturführung (Zugabe von IL-3 und Hydrocortison; das Fehlen von SCF) und die Tatsache, dass die Zellenkultur zuerst ohne MSC geführt wurde, könnten die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Der fördernde Effekt von MSCs auf die humane Granulopoese wurde bereits zuvor beschrieben [17, 74]. Da in unseren Experimenten dieser Effekt durch die von MSCs produzierten Wachstumsfaktoren begünstigt zu sein schien, war eine Analyse der in den Kulturüberstand sezernierten Zytokine der nächste logische Schritt. Zu diesem Zweck wurden die Überstände der Kulturstage 8, 12 und 16 zuerst in einem Proteinarray analysiert, um die wichtigsten beteiligten Zytokine, zu identifizieren. Als Kontrolle dienten die Standard-Erythropoesekulturen und der Überstand einer konfluenten MSC-Kultur, welche ebenfalls im Proliferation- bzw. Differenzierungsmedium der Standard-Kultur gehalten wurde, um mögliche Einflüsse der manuell hinzugegebenen Wachstumsfaktoren innerhalb der Kokulturansätze auszuschließen. Eine anschließende Testung der Überstände im ELISA sollte die Ergebnisse stichprobenartig bestätigen. Die Ergebnisse des Proteinarrays zeigten ein Zytokinprofil, das aufgrund der hohen Konzentration an IL-5, IL-6, IL-8 und LIGHT eindeutig unsere Vermutung bestätigte, dass die Myelopoese fördernden Wachstumsfaktoren die Homogenität aus den Standard-Erythropoesekulturen aufgehoben hatten.

Gupta et al. [119] konnten zeigen, dass bei einer Kokultivierung von CD34⁺-HSCs und MSCs sowohl im direkten als auch im indirekten System eine Interaktion über IL-6 und G-CSF stattfindet. Es wurde bereits beschrieben, dass die Kokultivierung von HSCs die IL-6-Produktion der MSCs stimuliert [120]. G-CSF ist als Förderer der Proliferation

myeloopoetischer Zellen bekannt [123]. Weiterhin ist G-CSF essentiell wichtig für die Induktion und Unterhaltung des Ausdifferenzierungsprozesses entlang der Granulopoese [19, 121-126]. Im Überstand unserer Kokulturen und der MSC-Kulturen konnte eine besonders hohe Konzentration von IL-6 sowohl im Proteinarray als auch im Einzelnachweis (ELISA) gemessen werden. Im Vergleich dazu fiel die IL-6-Konzentration im Überstand der Standardkulturen gering aus. Zwar zeigte der Proteinarray die höchste IL-6-Produktion in MSC-Kultur, was durch den der ELISA-Ansatz nicht bestätigt werden, da hier in der indirekten Kokultur die höchste IL-6 Konzentration gemessen wurde, trotzdem kann IL-6 als ein Zytokin, welches von den MSCs produziert und in den Überstand unserer Kokultur sezerniert wird, identifiziert werden. Zudem zeigt das Ergebnis, dass in unseren Experimenten MSCs möglicherweise über die Freisetzung von IL-6 eine proliferationsfördernde Wirkung auf die HSCs ausüben. Zusätzlich kann die Hypothese aufgestellt werden, dass MSCs und HSCs in der Kokultur sich wechselseitig in Zytokinproduktion beeinflussen. Majumdar et al [94] zeigte, dass eine Stimulierung der MSCs mit IL-1 α die Expression von *IL-6* mRNA und die Produktion von IL-6 und G-CSF induziert. Sennikov et al. [127] konnten zeigen, dass erythropoetische Zellen, die aus der Mausmilz isoliert wurden, in der Lage sind, in der Kultur IL-1 α zu sezernieren. Diese Beobachtung spricht für eine wechselseitige Beeinflussung auf die Zytokinproduktion, so auch z.B. auf das Zytokinprofil von MSCs durch die mögliche IL-1 α Sezernierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Eine Hinzugabe von rekombinantem IL-1 α oder dessen Blockade durch Antikörper in der Zellkultur könnten für die detaillierte Untersuchung dieser wechselseitigen Wirkung aufschlussreich sein. Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Kokultivierung der HSCs mit MSCs wurden veröffentlicht [147].

Eine Alternative zu Primärkulturen, die nur eine kurze Überlebensspanne haben, wären immortalisierte Zellen, die als Zelllinien viel länger lebensfähig sind. Die Gruppe um Seto et al. [165] gelang es, eine renale EPO-produzierende Zellkultur zu generieren, mit dem fernen Ziel, bei Anämien EPO aus Zellkultur zur Verfügung zu stellen. Allerdings unterscheiden sich immortalisierte Zellen drastisch von primären Zellkulturen, da sie eine hohe Mutationslast aufweisen können.

7.2. *Transkriptomanalyse*

Es wurden 6 verschiedene *in vitro* Erythropoesekulturen einer PIQOR™- *Immunology Microarray*-Analyse der Firma Miltenyi-Biotec™, unterzogen, um Gene zu identifizieren, die ihre Expression innerhalb der Kulturzeit signifikant verändern und somit an der Induktion von Differenzierungsprozessen in der humanen Erythropoese beteiligt sein könnten. Die 6 Kulturen wurden aufgrund ihrer Qualität ausgesucht, das heißt, sie haben die beste Differenzierung und Enukleation und die geringste Kontamination mit granulopoetischen Zellen gezeigt.

7.3. *Clustering-Analyse*

Bei der *Clustering*-Analyse der Daten war das Ziel, die Expressionsveränderung der Gene über die Kulturdauer zu verfolgen und festzustellen, wie die Expression sich unter Einfluss von verschiedenen Zytokinen verändert. Diese Analyse brachte 8 verschiedene Cluster mit ähnlichen Expressionsverläufen hervor, die in 7 Gruppen unterteilt wurden. Die erste Gruppe der Gene beinhaltete das *Cluster* der Gene mit stetiger Expressionsabnahme über die Kulturdauer. In der zweiten Gruppe war der *Cluster* der Gene vertreten, deren Expression eine Abnahme ab Tag 10 der Kultur zeigten. Die Gene in diesen beiden Gruppen spielen wahrscheinlich keine bedeutende Rolle in der terminalen Reifung und Entkernung der Erythropoese. Einige Gene für Rezeptor- und Signaltransduktionsproteine wurden in diesen Gruppen nachgewiesen, so z.B. das Gen *ITGA2B*, ein Integrinmolekül und Rezeptor für Fibronectin, Fibrinogen, Plasminogen und Thrombospondin, welches die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparginsäure von Liganden (RGD-Sequenz) in einem breiten Spektrum erkennen kann [12]. Integrine gehören zu einer großen Familie von Rezeptorproteinen, die vor allem an der Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt sind und die u.a. Signale an das Zytoskelett der Zelle weitergeben [12]. Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Integrinen in der humanen Hämatopoese [128] und deren Liganden z.B. Fibronectin sind bereits erfolgt. Eine Kultivierung von HSCs beispielsweise auf einer Fibronectinmatrix erhält deren Multipotenz und gegebenenfalls auch ihr Selbsterneuerungspotenzial [128]. Eine Bindung der HSCs an Fibronectin könnte also wichtig für die lebenslange Erhaltung des Stammzellpools sein. Daher erscheint es plausibel, dass die Genaktivität während der initialen Phase, in der durch G-CSF *in vivo* stimulierten und mobilisierten Stammzellen hochreguliert ist. Zwar

haben die meisten dieser Proteine eine Funktion in der Hämatopoese, eine spezielle Funktion in der Erythropoese konnte ihnen aber bislang nicht zugeordnet werden. Die Bedeutung der Integrine nimmt mit der linienspezifischen Reifung der Zellen ab. Ein weiteres Integrin *ITGB3* ist in diesen Gruppen vertreten, das ebenfalls als Rezeptor für Fibronectin bekannt ist. Marker wie CD33, ein Marker für frühe, morphologisch nicht leicht charakterisierbare, vermutlich eher myeloische Progenitoren, geben einen Hinweis auf den initial heterogenen Charakter der Stammzellkultur. Mit Zunahme der erythropoetischen Ausreifung wird die Genaktivität des genannten Antigens geringer. Auch einige Transporter-Proteine und Kanäle kommen in diesem Cluster vor. Diese spielten eher in der Proliferations- und Wachstumsphase der Zelle eine entscheidende Rolle als in der Differenzierungs- und E nukleationsphase.

Die Gene der beiden Gruppen 3 und 4 zeigen tendenziell eine ansteigende Expression im Kulturverlauf. Gruppe 3 zeigt einen stetigen Anstieg über die gesamte Kulturdauer, Gruppe 4 einen steilen Anstieg der Expression bis Tag 14 der Kultur. Die Gene der Gruppe 3 waren bereits recht früh, also schon vor Tag 7 und der Stimulation mit EPO aktiv. Diese Gene werden möglicherweise während der gesamten Reifung und Proliferation der hämatopoetischen Zellen benötigt. In dieser Gruppe sind Gene vertreten wie Hämoglobin zeta (HBZ), dessen Expression ab Tag 7 der Kultur, d.h. nach der EPO-Zugabe steil anstieg. Die Hämoglobinbildung durch die Erythropoiesekultur nach der Zugabe von EPO ist erwartungsgemäß und bestätigt auch auf der Genebene die Reifung der erythroiden Zellen in unserem Kulturmodell. Weiterhin findet man proapoptotische Gene wie *CLCN3*, den Rezeptor *CD47*, *TIMP-1* und *-3* und Gene, die in der Differenzierung (*TFRC*) wichtig sind. Auf einige dieser Gene wird im weiteren Verlauf eingegangen.

Die Chloridkanäle (*CLCN3* und *CLCN5* in diesem Cluster) übernehmen die Cl-Ionen Regulierung der Zelle, nachdem die Zelle aufgrund eines Schockzustandes Kalzium und Kalium verloren hat. Als Folge dieser Ionenverluste schrumpft die Zelle und die Bildung von Phosphatidylserinen, die für die Apoptose typische sind, tritt ein. Daher wird eine Mitwirkung von Chloridkanälen in der Apoptose vermutet. Die direkte Auswirkung von *CLCN3* auf die Erythropoese ist bisher nicht beschrieben worden. Allerdings wurde bereits beobachtet, dass der Ausfluss von K⁺-Ionen durch die Aktivierung eines nicht selektiven Ca²⁺-Ionenkanals nach einem osmotischen Schock oder einem oxidativen Stress und die damit verbundene Zunahme der Ca²⁺-Konzentration in Zellen ein Ausströmen von Cl⁻-Ionen nach sich zieht, was wiederum zum Schrumpfen der Erythrozyten und Einsetzen der Apoptose in diesen Zellen führt [73]. Daher kann auch dem Chloridkanal eine Bedeutung

bei der Apoptose von Erythrozyten beigemessen werden. Durch Chloridkanal-Blocker wie NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid) oder Niflumicsäure kann das Zellschrumpfen und das Einsetzen der Apoptose reduziert werden [73]. Auch EPO gilt als ein Inhibitor für den nicht selektiven Ca^{2+} -Ionenkanal und kann die Apoptose der Erythrozyten aufhalten [129].

CD47 (Integrin-assoziiertes Protein) ist involviert in die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die durch die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix auftritt [12]. Es verhindert außerdem die Eliminierung von unreifen Erythrozyten. Dieses Protein fungiert als ein „*of self*“-Marker für murine Erythrozyten. Anders als MHC-I Moleküle besitzen die Erythrozyten CD47-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Das Fehlen von CD47 führt zur Phagozytose von Erythrozyten [130]. Es fungiert als ein „*don't eat me*“ – Signal und schützt somit autologe Zellen vor Phagozytose.

Die *TIMP* (*metallopeptidase inhibitor* 1)-Gene 1 und 3 gehören zu der Gruppe der *tissue inhibitors of metalloproteases*, die als endogene Inhibitoren der MMPs gelten [131]. Außerdem treiben sie die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen voran und haben möglicherweise eine antiapoptotische Funktion. *TIMP1* stimuliert die Proliferation und Reifung der humanen und murinen erythropoetischen Vorläuferzellen, vor allem *in vitro* [12]. Generell enthält der *Cluster* der Gruppe 3 viele Gene, deren Produkte an Zellzyklus, DNA-Replikation und Proliferation beteiligt sind. Insbesondere die zahlreichen Proteinkinasen sind ein Hinweis auf hohe Proliferationsaktivität, da sie größtenteils als Regulatoren der Proliferation bekannt sind. Diese Ergebnisse stimmen mit der hohen Zellteilungsaktivität überein, welche die Zellen nach Stimulierung mit EPO und anderen Zytokinen aufweisen.

Die Hochregulierung von *TFRCs* (Transferrinrezeptorgene) im *Cluster* der Gruppe 4 als typische Proteine der erythropoetischen Differenzierung zeigt die Vorbereitung des Übertritts von langsam proliferierenden multipotenten Stammzellen zu schneller proliferierenden Vorläuferzellen mit der Fähigkeit Kolonien auszubilden (CFU-GEMM und BFU-E). Insgesamt kann die Hochregulation vieler antiapoptotischen Gene beobachtet werden. Gleichzeitig werden aber auch proapoptotische Gene wie *CLCN3* hochreguliert. Auch wenn diese Beobachtung wenig sinnvoll erscheint, ist die Tatsache, dass schnell proliferierende Zellen nicht nur pro- sondern auch antiapoptotische Gene hochregulieren, sinnvoll. Schnell proliferierenden Zellen haben einen hohen Umsatz an DNA-Replikation. Dadurch können sich schnell Fehler einschleichen und die Zellen

können entarten. Es ist also sinnvoll für die Zelle, genügend proapoptotische Proteine zu akkumulieren, um diesem Umstand entgegen zu wirken [145].

Die Expression der Gene der Gruppe 5 nimmt ab Tag 7 der Kultur recht stark zu. Ab diesem Tag wurde der Kultur EPO hinzugefügt, um die Entwicklung und Differenzierung der Zellen in Richtung erythropoetischen Zellen voran zu treiben. Der Beginn der Differenzierung der Zellen wird durch die Expression einiger Gene in diesem *Cluster* verdeutlicht. Dieses *Cluster* zeigt die Hochregulation des VEGF. Dieser Wachstumsfaktor spielt eine Rolle im Hämangioblasten, einer bipotenten Stammzelle mit Differenzierungspotential für die Vaskulogenese und Hämatopoese [101-103, 132]. Darüber hinaus konnte im Zebrafisch-Embryo gezeigt werden, dass dieses Protein die Hämatopoese durch die Formation von ausgereiften Erythrozyten stimulieren kann [132].

In diesem *Cluster* wurde auch die Hochregulation von *TALI* festgestellt. Der Transkriptionsfaktor TAL1 wird in hämatopoetischen Stammzellen und in den erythropoetischen Vorläuferzellen exprimiert [54, 57, 133] und vermittelt die erythropoetische Zellreifung durch Ubiquitinierung [159]. Das Fehlen von *TALI* verhindert die Reifung von CD34⁺ Zellen zu erythroiden Zellen [134-136]. Tornack et al. beobachteten zudem, dass eine Runx-1 rekonstituierte *Tal1*^{-/-} Zellkultur nicht in der Lage ist, enukleierte Retikulozyten hervorzubringen. Eine erzwungene Expression von *TALI* ermöglicht, unabhängig vom Vorhandensein von EPO, eine frühere Reifung von CD34⁺- zu GPA⁺ Zellen [137]. Frühere Studien haben eine erhöhte Transkription von *TALI* in BFU-E erzwungen und eine erhöhte Anzahl an BFU-E Kolonien beobachtet [138]. TAL1 interagiert mit apoptotischen Mechanismen und einer der Faktoren, die diesen Effekt vermitteln, ist der SCF-Rezeptor c-KIT [139]. Da *TALI* eines der wenigen hochregulierten Gene war, die eine Rolle in der Regulierung der Erythropoese spielten, wurde die Bedeutung dieses Gens im späteren Verlauf dieser Arbeit durch siRNA-Transfektionsexperimente untersucht.

Die beiden *Cluster* der Gruppe 7 zeigt die verringerte Expression vieler Strukturgene, die in der Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation, Inhibition der Differenzierung und der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. Diese Gene wurden im Vergleich zu Tag 0 dauerhaft herunterreguliert oder nahmen kontinuierlich ab. Zum zweiten *Cluster* dieser Gruppe gehört z.B. *GATA2*. Die Familie der GATA-Zinkfingerproteine, zu der auch *GATA2* gehört, ist nach ihrer Eigenschaft benannt, an bestimmte DNA-Sequenzmotive (WGATAR) zu binden [148]. Diese Familie besitzt 6 Mitglieder. *GATA2* tritt überwiegend bei der Regulation der Genexpression des hämatopoetischen Systems auf. In

Expressionsstudien und *knock-out*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass GATA-1 und GATA-2 im Verlauf der Erythropoese umgekehrt proportionales Expressionsmuster aufweisen [106, 107, 148]. GATA-1 reguliert die terminale Differenzierung und Funktion von erythrozytären Zellen [44, 148, 157] und koordiniert die Zelldifferenzierung und den Zellzyklusarrest in G₁ durch p21 während der späten Phase der erythropoetischen Zellreifung [145, 146, 148, 162, 164], wohingegen GATA-2 die frühen Phasen der Hämatopoese reguliert und hier verstärkt die Proliferation der Zellen fördert, während es die Differenzierung inhibiert [45, 148, 163]. GATA-1 scheint auch im Zusammenhang mit der Inhibierung von Caspase-3 eine Rolle zu spielen. Boehm et al. [147] beobachteten eine Verzögerung von Wachstum und Differenzierung der erythropoetischen Zellen nach Inhibierung von Caspase-3 und vermuteten, dass unter anderem GATA-1 als ein wichtiger Regulator der Erythropoese bei dieser Verzögerung fungieren könnte. GATA2 wird unter anderem auch in frühen erythropoetischen Vorläufern exprimiert. In erythropoetischen Zellen von Hühnern wirkt die erzwungene Expression von GATA2 positiv auf die Proliferation und negativ auf die Differenzierung dieser Zellen [135]. GATA2 reguliert die frühe Phase der Hämatopoese und fördert ihre Proliferation, hemmt jedoch die Differenzierung [39, 148]. Damit steht die Herunterregulation dieses Gens im Laufe der Kulturdauer im Einklang.

In beiden *Clustern* dieser Gruppe befinden sich einige regulatorische GTPasen. *NFKB1*, *NFKB2* und *NFKB* sind ebenfalls im ersten *Cluster* dieser Gruppe vertreten. In der Analyse nahm die NF- κ B-Expression mit fortschreitender Kulturdauer ab. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Zhang et al. [136] überein, die eine erhöhte NF- κ B-Expression in FU-E messen konnten, welche mit fortschreitender Reifung der Zellen zurückging. Das kann darauf hindeuten, dass in unserer Erythropoesekultur der NF- κ B-Signalweg für die Reifung der Erythrozyten keine entscheidende Rolle spielt. Die NF- κ B-Proteine sind pleiotropische Transkriptionsfaktoren, die in den meisten Zelltypen vorkommen und in biologischen Prozessen wie inflammatorischen und immunologischen Vorgängen, Differenzierung, Zellwachstum, Tumorgenese und Apoptose involviert sind [148]. Die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren kann möglicherweise direkt über den *c-myc* Promotor das Zellwachstum regulieren [104, 105].

7.4. Diskriminatorische Genanalyse und SAM-Algorithmus

Um signifikante Unterschiede zwischen den Expressionen der Gene in den unterschiedlichen Kulturansätzen analysieren zu können, wurde ein sogenannter *SAM*-Algorithmus verwendet und eine diskriminatorische Genanalyse durchgeführt. Hierbei werden Gene identifiziert, die in allen Versuchen gleichgerichtet exprimiert waren, also entweder im Kulturverlauf signifikant hochreguliert oder signifikant herunterreguliert wurden. Zu erwähnen wäre hier, dass mittlerweile auch andere statistischen Methoden (wie *Principal Component Analysis*, *Gen Set Enrichment*) für die Auswertung von Genearrays heran gezogen werden, die helfen, die umfangreichen Datensätze zu strukturieren und zu vereinfachen und verständlich zu machen und die Gene heraus zu filtern, die im Array überexprimiert werden.

Genen mit permanent hoher Genaktivität während der erythropoetischen Ausreifung kann eine besondere funktionelle Bedeutung zukommen. Zu den hochregulierten Genen aus dieser Analyse gehören *CLCN3*, *HBZ*, *TALI* und *TFRC*. Außerdem fanden sich Transport- und Signaltransduktionsproteine wie *ABCG*, *SLC2A*, und *IL6St* in dieser Analyse. Da die Hochregulation der Gene am Tag 10 der Kultur – also mit der Zugabe von EPO – nachweisbar ist, kann auf eine EPO-vermittelte Stimulierung der Expression dieser Gene geschlossen werden. Die zweite Expressionszunahme fand am Tag 14 statt. An diesem Tag wurde die SCF-Zugabe eingestellt, sodass dies ein Hinweis für die Bedeutung dieser Gengruppe für die erythropoetische Zelldifferenzierung und -reifung sein kann. Für die späteren Transfektionsexperimente wurden zwei Gene ausgewählt, die in der *Microarrayanalyse* im Kulturverlauf hochreguliert waren: *TALI* wegen der Bedeutung dieses Faktors in der Erythropoese und *CLCN3*, da seine mögliche proapoptotische Mitwirkung bereits untersucht worden ist [137]. Da die Eukleation einige Ähnlichkeiten mit Apoptose aufweist [138], war es interessant zu untersuchen, ob das Ausschalten eines proapoptotischen Gens Einfluss auf die Eukleation von *in vitro* gezüchteten Normoblasten haben könnte (siehe auch 2.5).

In der Gruppe der herunterregulierten Gene in der diskriminatorischen Genanalyse fanden sich auch für die Erythropoese wichtige Gene wie *FLT3*, *HHEX* und *MAPK14*. Deren bereits im Vergleich zur Referenz am Tag 0 geringe Expression nahm am Tag 10 mit der Zugabe von EPO weiter ab. Eine weitere Abnahme der Expression zeigte sich bei den meisten Genen am Tag 14 der Kultur, also nach dem Aussetzen der SCF-Zugabe. Diese

Gene spielen also eher eine wichtige Rolle in der erythropoetischen Zellproliferation als in der Differenzierung der Zellen.

7.5 siRNA-Transfektion primärer hämatopoetischer Stammzellen

Bei der diskriminatorischen Genanalyse wurden Gene zusammengefasst, die während der gesamten Kulturdauer signifikant hoch- bzw. herunterreguliert waren. Daraus wurden zwei Gene (*TALI* und *CLCN3*) aus der Gruppe der hochregulierten Gene aus der diskriminatorischen Genanalyse für die siRNA-Transfektion (s. 6.4) ausgesucht.

Die Bedeutung von *TALI* als ein Transkriptionsfaktor, der von EPO phosphoryliert wird wurde bereits beschrieben (siehe 2.5). Daher war es interessant, die Bedeutung dieses Gens während der Kultivierung der erythropoetischen Vorläuferzellen näher zu untersuchen.

Da die Entkernung von Normoblasten sowohl mit pro- als auch mit anti-apoptotischen Regulationsmechanismen in Verbindung gebracht wird, war es darüber hinaus interessant, das Verhalten von Genen auf die Eukleation näher zu untersuchen, die in der Apoptose eine, wenn auch indirekte, Rolle spielen. In der Gruppe der signifikant hochregulierten Gene war *CLCN3* als ein solches Gen identifiziert worden.

Die Transfektion von primären hämatopoetischen Stammzellen gilt als schwierig. Kronenwett et al. transfizierten primäre humane hämatopoetischen Stammzellen mit FITC-konjugierten asODN (antisense Oligodesoxynukleotid). Für die Einschleusung in die Zelle verwendeten sie kationische Lipide (DOTAP und DOSPER) und beschrieben sie als effizient [13, 139]. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden die Transfektion der Stammzellen mit verschiedenen liposomalen Transfektionsreagenzien (DOSPER, DOTAP, Jet Pei) ausprobiert und für eher ineffizient beschrieben [13]. Bessere Ergebnisse wurden nach der Transfektion der Zellen mit der NucleofactorTM Technologie der Firma Amaxa erreicht. Dieses System kombiniert zelltypspezifische Transfektionsreagenzien mit einem für primäre CD34⁺ Zellen optimierten Elektroporationsverfahren [140-142]. Um die Effizienz der einzelnen Transfektionen vergleichen zu können, wurde das Gen für *Green Fluorescent Protein* (GFP) in die Zellen kotransfiziert. Das GFP ist ein Protein der Qualle *Aequoria victoria*, das bei entsprechender Anregung grün fluoresziert und leicht mit dem Fluoreszenzmikroskop oder am Durchflusszytometer für die Analyse des Transfektionseffizienz nachgewiesen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Transfektionseffizienz von annähernd 50% erreicht. Die Transfektion wurde mit spezifischer siRNA gegen *TALI* oder *CLCN3* durchgeführt. 20 Stunden nach der Transfektion am Tag 10 wurde eine Expression von 14,6% bei *TALI* und 39,2% bei

CLCN3 im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Durch die Transfektion der beiden ausgesuchten Gene *TAL1* und *CLCN3* konnte also eine Herunterregulierung dieser beiden Faktoren erzielt werden. Dies galt für alle Transfektionen an den Tagen 7, 10 und 14 der Kultur. Ein Vergleich der Zytospins der transfizierten Kulturen zeigte eine schlechtere Reifung der Zellen zu Zellen der roten Reihe.

In den Transfektionsversuchen war eine deutliche „Verunreinigung“ der Kulturen mit Zellen der weißen Reihe zu beobachten, die bei der *TAL1*-spezifischen Transfektion 72h nach der Transfektion am Tag 14 (siehe Abbildung 6.26) etwa 40% und bei der *CLCN3*-spezifischen Transfektion auch zum selben Zeitpunkt der Kultur 57,5% der Zellen ausmachten. Da diese „Verunreinigung“ bei der Mock-Kontrolle zu diesem Zeitpunkt nur einen Anteil 20,5% erreichte, kann davon gesprochen werden, dass die Herunterregulation von *TAL1* und *CLCN3* sich negativ auf die Reifung der HSCs zu Zellen der erythropoetischen Reihe auswirkt. Auch der niedrige Anteil aller erythropoetischen Zellen in beiden Transfektionskulturen ($42,5 \pm 4,8\%$ bei *CLCN3*-spezifischen Transfektion und $60 \pm 3,1\%$ bei *TAL1*-spezifischen Transfektion) und das Fehlen von Retikulozyten in den Kulturen sprechen für die Hemmung der Reifung. Basophile und polychromatische Erythrozyten machten den größten Anteil an Zellen aus der erythropoetischen Reihe aus.

Die Beobachtung der Hemmung der Erythropoese wird durch Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Mikkola et al. fand heraus, dass das ordentliche Wachstum der erythropoetischen Vorläuferzellen von SCL/*TAL1* abhängig ist [143]. Im Falle des Gens *CLCN3* wurde bereits beschrieben, dass ein Ausströmen von Cl-Ionen durch Chloridkanäle die Erythrozyten zum Schrumpfen bringt und die Apoptose einleitet [71]. Allerdings beschreiben unsere Transfektionsergebnisse nur eine „Tendenz“ dieser Beobachtungen, da die Fallzahl (n=2) sehr niedrig ist und die Kulturen durch die Transfektion derart beschädigt waren, dass eine Auswertung der Zytospins und eine weitere Kulturführung über den Transfektionszeitpunkt hinaus äußerst schwierig war. Eine Optimierung der Transfektion unter den Kulturumständen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, würden die Ergebnisse aussagekräftig machen.

8. Zusammenfassung

Die Erythropoese ist ein komplexer Vorgang, in dem hematopoetischen Stammzellen über mehrere Entwicklungsstufen zu reifen, entkernten Erythrozyten werden. Dieser Vorgang wird durch ein Netzwerk bestehend aus den zellulären Bestandteilen der Knochenmarknische und unterschiedlichen Wachstumsfaktoren reguliert. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren sind Erythropoietin und *stem cell factor*.

Die Untersuchung der Erythropoese und ihrer Mechanismen bedarf einer *in vitro* Kultur, die den Vorgängen im Knochenmark so nahe wie möglich kommt. In der vorliegenden Dissertation wurden zwei Kulturansätzen aus zwei unterschiedlichen Veröffentlichungen, die sich hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Wachstumsmedien und der Kulturdauer unterschieden, miteinander verglichen. Die Reifung der Erythrozyten von kernhaltigen Vorläuferzellen über alle Stadien der Erthropoese, bis hin zum entkernten Retikulozyt wurde untersucht. Um eine weitere Optimierung in der Zelldifferenzierung zu erreichen, wurde die Kultur mit der kürzeren Kultivierungsdauer mit mesenchymalen Stammzellen kokultiviert. Die Wirkung von mesenchymalen Stammzellen auf die Kultur wurde bezüglich der regelhaften Ausdifferenzierung der Vorläuferzelle zu entkernten Erythrozyten untersucht. Anhand eines EISAs und Proteinarrays konnten die von den mesenchymalen Stammzellen in die Kultur sezernierten Proteine identifiziert werden.

Mit Hilfe einer Genearrayanalyse wurden Kandidatengene identifiziert, die während der terminalen Differenzierung der erythropoetischen Zellen zu entkernten Retikulozyten eine Rolle spielen könnten. Nach der bioinformatischen Datenanalyse der Ergebnisse und einer anschließenden Kontrolle mittels *qPCR* wurden 2 Gene herausgesucht, die mit Hilfe von spezifische „short interfering RNA“ (siRNA) in den Zellen der Kultur in unterschiedlichen Stadien der Kultur gehemmt wurden. Ein effizienter Transfer wurde mittels Nukleofektion erreicht, eine Methode, die speziell für schwer transfizierbaren Primärzellen entwickelt wurde. Die Transfektion von der spezifischen siRNA führte sowohl bei *TAL1* als auch bei *CLCN3* zur Inhibition der Expression dieser Gene. So konnte die Wirkung dieser Hemmung auf die Ausreifung der erythropoetischen Vorläuferzellen und deren terminalen Differenzierung zu enukleierten Retikulozyten untersucht werden. Die Kulturen zeigten nach der Transfektion eine hohe „Kontamination“ mit Zellen der weißen Reihe. Außerdem konnte eine schlechte Reifung der Zellen und das Fehlen von Retikulozyten beobachtet werden, sodass angenommen werden kann, dass die Hemmung von *Tal1* und *CLCN3* die Reifung der erythropoetischen Vorläuferzellen hemmt.

9. Literaturverzeichnis

- [1] McCulloch EA, Till JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res.* 1960, 13: 115-125.
- [2] Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:11-21
- [3] Hu M, Krause D, Greaves M, et al. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* 1997;11:774-785.
- [4] Akashi K, He X, Chen J, Iwasaki H, Niu C, Steenhard B, Zhang J, Haug J, Li L. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood.* 2003; 101; 2:383-389
- [5] Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 1995;9:1753-1765.
- [6] Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell.* 2002;109:39-45.
- [7] Krosl J, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med.* 2003;9:1428-1432.
- [8] Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med.* 2003;9:1423-1427.
- [9] Dai C H, Krantz S B, Zsebo K M. Human Burst-Forming Units-Erythroid Need Direct Interaction With Stem Cell Factor for Further Development. *Blood.* 1991;78 (10): 2493-2497
- [10] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:93-106.
- [11] Bahtia M, Wang J C, Kapp U, Bonnet D, Dick J E. Purification of primitive human hematopoietic cells with SCID-repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94: 5320-5325
- [12] <http://www.genecards.org>.
- [13] Inaugural-Dissertation Stefanie Boie. Einfluss und Bedeutung der RNA-abhängigen Adenosin-Deaminase ADAR1 während der humanen Erythropoese. Medizinische Fakultät Lübeck, 2006
- [14] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4:7-25.

- [15] Underwood J. General and systematic Pathologie- Third Edition: Churchill Livingstone; 2000.
- [16] Beresford J N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. Clin Orthop Relat Res. 1989; 240: 270-280.
- [17] Liesveld JL, Abboud CN, Duerst RE, Ryan DH, Brennan JK, Lichtman MA. Characterization of human marrow stromal cells: role in progenitor cell binding and granulopoiesis. Blood. 1989;73:1794-1800.
- [18] Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. J Cell Physiol. 1996;166:585-592.
- [19] Li N, Feugier P, Serrurier B, et al. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. Exp Hematol. 2007;35:507-515.
- [20] Quesenberry PJ. Synergistic hematopoietic growth factors. Int J Cell Cloning. 1986;4:3-15.
- [21] Dolznig H, Habermann B, Stangl K, et al. Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. Curr Biol. 2002;12:1076-1085.
- [22] Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. J Exp Med. 1999;189:1691-1698
- [23] Tepperman AD, Curtis JE, McCulloch EA. Erythropietic colonies in cultures of human marrow. Blood. 1974;44:659-669.
- [24] Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Wickrema A. Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. J Clin Invest. 1994;94:34-43.
- [25] Daniels G, Green C. Expression of red cell surface antigens during erythropoiesis. Vox Sang. 2000;78 Suppl 2:149-153.
- [26] Holländer GA BT, Keller MP, Krenger W, Piali L. Zytokine und ihre Netzwerke. Edited by GA Holländer. Immunologie. 2006;Urban & Fischer Verlag, München:pp.147-182.
- [27] Miyagawa S, Kobayashi M, Konishi N, Sato T, Ueda K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. Br J Haematol. 2000;109:555-562.
- [28] Bonanou-Tzedaki SA, Arnstein, H. R. V. Macromolecular Synthesis and Degradation during Terminal Erythroid Cell Development. J R Harris, ed Erythroid Cells Plenum Press, New York. 1990.
- [29] Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Morphological changes in erythroblasts during erythropoietin-induced terminal differentiation in vitro. Exp Hematol. 1988;16:758-763.

- [30] Bessis, M. Living blood cells and their ultrastructure. 1973. SBN-13: 9786891261761
- [31] Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*. 2008;112:470-478.
- [32] Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med*. 1995;181:411-415.
- [33] Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood*. 1994; 84:3494-3504.
- [34] Mamus SW, Beck-Schroeder S, Zanjani ED. Suppression of normal human erythropoiesis by gamma interferon in vitro. Role of monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1985;75:1496-1503.
- [35] Webb DS, Shimizu Y, Van Seventer GA, Shaw S, Gerrard TL. LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science*. 1990;249:1295-1297.
- [36] Rich IN. A role for the macrophage in normal hemopoiesis. I. Functional capacity of bone-marrow-derived macrophages to release hemopoietic growth factors. *Exp Hematol*. 1986;14:738-745.
- [37] Simpson CF, Kling JM. The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol*. 1967; 35:237-245.
- [38] Ghadially FN. Haemorrhage and haemosiderin. *J Submicrosc Cytol*. 1979; 11:121-129.
- [39] Scicchitano MS, McFarland DC, Tierney LA, Narayanan PK, Schwartz LW. In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression. *Exp Hematol*. 2003; 31:760-769.
- [40] Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol*. 1989;109:3005-3013.
- [41] Rapoport SM, Schewe T. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1986;864:471-495.
- [42] Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:93-100.
- [43] Tsai SF, Strauss E, Orkin SH. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*. 1991;5:919-931.
- [44] Rylski M, Welch JJ, Chen YY, et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5031-5042.

- [45] Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol.* 2000;28:1423-1431.
- [46] Chan JY, Kwong M, Lo M, Emerson R, Kuypers FA. Reduced oxidative-stress response in red blood cells from p45NFE2-deficient mice. *Blood.* 2001;97:2151-2158.
- [47] Scicchitano MS, McFarland DC, Tierney LA, Narayanan PK, Schwartz LW. In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression. *Exp Hematol.* 2003;31:760-769.
- [48] Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S, Rusterholz C. Human mature erythroblasts are resistant to apoptosis. *Exp Cell Res.* 2007;313:1024-1032.
- [49] Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood.* 1998;92:3658-3668.
- [50] Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2002;20:467-472.
- [51] Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23:69-74.
- [52] Begley CG, Green AR. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood.* 1999;93:2760-2770.
- [53] Elefanty AG, Begley CG, Hartley L, Papaevangeliou B, Robb L. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood.* 1999;94:3754-3763.
- [54] Elefanty AG, Begley CG, Metcalf D, Barnett L, Kontgen F, Robb L. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:11897-11902.
- [55] Green AR, DeLuca E, Begley CG. Antisense SCL suppresses self-renewal and enhances spontaneous erythroid differentiation of the human leukaemic cell line K562. *Embo J.* 1991;10:4153-4158.
- [56] Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *Embo J.* 1996;15:4123-4129.
- [57] Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell.* 1996;86:47-57.
- [58] Aplan PD, Nakahara K, Orkin SH, Kirsch IR. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *Embo J.* 1992;11:4073-4081.

- [59] Murrell AM, Bockamp EO, Gottgens B, et al. Discordant regulation of SCL/TAL-1 mRNA and protein during erythroid differentiation. *Oncogene*. 1995;11:131-139.
- [60] Cross MA, Heyworth CM, Murrell AM, Bockamp EO, Dexter TM, Green AR. Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene*. 1994; 9:3013-3016.
- [61] T Tanigawa NE, D Metcalf, D Cary, E DeLuca, N A Nicola, and C G Begley. The SCL gene product is regulated by and differentially regulates cytokine responses during myeloid leukemic cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7864-7868.
- [62] Hsu HL, Wadman I, Baer R. Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3181-3185.
- [63] Wadman IA, Osada H, Grutz GG, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J*. 1997;16:3145-3157.
- [64] Ono Y, Fukuhara N, Yoshie O. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6939-6950.
- [65] Elwood NJ, Zogos H, Pereira DS, Dick JE, Begley CG. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood*. 1998;91:3756-3765.
- [66] Repasky EA, Eckert BS. A reevaluation of the process of enucleation in mammalian erythroid cells. *Prog Clin Biol Res*. 1981;55:679-692.
- [67] Simpson CF, Kling JM. The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol*. 1967;35:237-245.
- [68] Gregoli PA, Bondurant MC. The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood*. 1997;90:630-640.
- [69] Ohneda K, Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*. 2002;108:237-245.
- [70] Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*. 2004;18:1176-1199.
- [71] Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*. 2001;193:247-254.
- [72] Zamai L, Burattini S, Luchetti F, et al. In vitro apoptotic cell death during erythroid differentiation. *Apoptosis*. 2004;9:235-246.
- [73] Myssina S, Lang PA, Kempe DS, et al. Cl- channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca(2+)-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:241-248.

-
- [74] Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2003;31:413-420.
- [75] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-49.
- [76] Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13:69-80.
- [77] Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32:414-425.
- [78] Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood.* 2006;107:1878-1887.
- [79] Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34:565-571.
- [80] Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood.* 1996;87:518-524.
- [81] Teichman RS, Emerson S. G. The role of osteoblasts in e hematopoietic microenvironment. . *The Cells.* 1998;16:7-15.
- [82] Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteosarcomas inhibit hematopoietic colony formation: partial reversal by antibody to transforming growth factor-beta 1. *Bone.* 1997;21:353-361.
- [83] Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:75-79.
- [84] Suda T, Arai F, Shimmura S. Regulation of stem cells in the niche. *Cornea.* 2005;24:S12-S17.
- [85] Haylock DN, Nilsson SK. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle.* 2005;4:1353-1355.
- [86] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425:841-846.
- [87] Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006;116:1195-1201.
- [86] Heissig B, Ohki Y, Sato Y, Rafii S, Werb Z, Hattori K. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology.* 2005;10:247-253.
- [88] Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:349-356.
- [89] Muench MO, Schneider JG, Moore MA. Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 beta, IL-6, and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 1992;20:339-349.
-

- [90] Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, et al. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells*. 2002;20:573-582.
- [91] Devine SM. Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem Suppl*. 2002;38:73-79.
- [92] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28:875-884.
- [93] Teshima T, Harada M, Takamatsu Y, et al. Cytotoxic drug and cytotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. *Bone Marrow Transplant*. 1992;10:215-220.
- [94] Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9:841-848.
- [95] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5116-5121.
- [96] Fire AZ. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death in Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806-811.
- [97] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806-811.
- [98] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998;398:854.
- [99] Timmons L, Tabara H, Mello CC, Fire A. Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 2003;14:2972-2983.
- [100] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411:494-498.
- [101] Nakayama N, Fang I, Elliott G. Natural killer and B-lymphoid potential in CD34+ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presence of vascular endothelial growth factor. *Blood*. 1998;91:2283-2295.
- [102] Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol*. 1995;62:203-215.
- [103] Kennedy M, Firpo M, Choi K, et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*. 1997;386:488-493
- [104] Grilli M, C. J. J.-S., Lenardo MJ. NF- κ B and Rel: Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 143 (1993).

- [105] Duyao MP, B. A., Sonenshein GE. Interaction of an NF- κ B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 27 (1990).
- [106] Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo PH, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood*. 1993;81:647-655.
- [107] Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13158-13163.
- [108] Skutelsky E, Danon D. An electron microscopic study of nuclear elimination from the late erythroblast. *J Cell Biol*. 1967;33:625-635.
- [109] Campbell FR. Nuclear elimination from the normoblast of fetal guinea pig liver as studied with electron microscopy and serial sectioning techniques. *Anat Rec*. 1968;160:539-554.
- [110] Skutelsky E, Danon D. Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis. *Exp Cell Res*. 1970;60:427-436.
- [111] Repasky EA, Eckert BS. The effect of cytochalasin B on the enucleation of erythroid cells in vitro. *Cell Tissue Res*. 1981;221:85-91.
- [112] Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2002;30:870-878.
- [113] Harvey K, Dzierzak E. Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support during development. *Stem Cells*. 2004;22:253-258.
- [114] Verfaillie CM. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood*. 1992;79:2821-2826.
- [115] Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12:2161-2170.
- [116] Jang YK, Jung DH, Jung MH, et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*. 2006;85:212-225.
- [117] Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:321-334.
- [118] Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin, II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*. 2005;105:617-626.

- [119] Gupta P, Blazar BR, Gupta K, Verfaillie CM. Human CD34(+) bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma. *Blood*. 1998;91:3724-3733.
- [120] Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den Bos C, Thiede M. Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology*. 1999;140:3736-3743.
- [121] Yokota H, Goldring MB, Sun HB. CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear. *J Biol Chem*. 2003;278:47275-47280.
- [122] Caldwell J, Emerson SG. IL-1 alpha and TNF alpha act synergistically to stimulate production of myeloid colony-stimulating factors by cultured human bone marrow stromal cells and cloned stromal cell strains. *J Cell Physiol*. 1994;159:221-228.
- [123] Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*. 1993;81:2579-2584.
- [124] Caux C, Moreau I, Saeland S, Banchereau J. Interferon-gamma enhances factor-dependent myeloid proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992;79:2628-2635.
- [125] Verfaillie CM. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood*. 1993;82:2045-2053.
- [126] Cooper AC, Mikhail A, Lethbridge MW, Kemeny DM, Macdougall IC. Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1776-1784.
- [127] Sennikov SV, Eremina LV, Injelevskaya TV, Krysov SV, Silkov AN, Kozlov VA. Cytokine-Synthesizing Activity of Erythroid Cells. *Russ J Immunol*. 2001;6:193-202.
- [128] Dao MA, Creer MH, Nolte JA, Verfaillie CM. Biology of umbilical cord blood progenitors in bone marrow niches. *Blood*. 2007;110:74-81.
- [129] Lang F, Birka C, Myssina S, et al. Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2004;559:211-217.
- [130] Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*. 2000;288:2051-2054.
- [131] Wei S, Xie Z, Filenova E, Brew K. Drosophila TIMP is a potent inhibitor of MMPs and TACE: similarities in structure and function to TIMP-3. *Biochemistry*. 2003;42:12200-12207.

- [132] Liang D, Chang JR, Chin AJ, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mech Dev.* 2001;108:29-43.
- [133] Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature.* 1995;373:432-434.
- [134] Gering M, Rodaway AR, Gottgens B, Patient RK, Green AR. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J.* 1998;17:4029-4045.
- [135] Mead PE, Deconinck AE, Huber TL, Orkin SH, Zon LI. Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development.* 2001;128:2301-2308.
- [136] Zhang MY, Sun SC, Bell L, Miller BA. NF-kappaB transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood.* 1998;91:4136-4144.
- [137] Ravet E, Reynaud D, Titeux M, et al. Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood.* 2004;103:3326-3335.
- [138] Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A. Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood.* 1993;82:2340-2352.
- [139] Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M, Sczakiel G, Haas R. Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood.* 1998;91:852-862.
- [140] Lakshmi U, Pelacho B, Sudo K, et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells.* 2004;22:531-543.
- [141] Gresch O, Engel FB, Nestic D, et al. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods.* 2004;33:151-163.
- [142] J. Greiner JW, M. Wiesneth, T.P. Zwaka, T. Prill, K. Schwarz, M. Bienek-Ziolkowski, M. Schmitt, H. Döhner, V. Hombach, J. Torzewski. Transient Genetic Labeling of Human CD34-Positive Hematopoietic Stem Cells Using Nucleofection. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2004;31:136-141.
- [143] Mikkola HK, Klintman J, Yang H, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature.* 2003;421:547-551.
- [144] Inaugural-Dissertation Gisa Antonia Meyer. Die Bedeutung der hämatopoetischen Nische im Knochenmark für die Erythropoese. Medizinische Fakultät Lübeck 2008.
- [145] Inaugural-Dissertation Stefan Knoth. Regulation der Genexpression by der erythroiden Differenzierung. Heidelberg 2006.

- [146] Dorn I, Lazar-Karsten P, Boie S, Ribbat J, Hartwig D, Driller B, Kirchner H, Schlenke P. In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion*. 2008 Jun; 48(6):1122-32.
- [147] Lazar-Karsten P, Dorn I, Meyer G, Lindner U, Driller B, Schlenke P. The influence of extracellular matrix proteins and mesenchymal stem cells on erythroid maturation. *Vox Sang*. 2011 Jul; 101(1):65-76.
- [148] Master-Arbeit Sven Malchow. Bedeutung von TNF- α und assoziierten Transkriptionsfaktoren bei der erythropoese. Masterstudiengang molekular life science. Lübeck 2006.
- [149] Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1999 10; 56(5): 777-783
- [150] Belay E, Hayes BJ, Blau CA, Torok-Storb B. Human cord blood and bone marrow CD34+ cells generate macrophages that support erythroid islands. *PLoS One*. 2017 Jan30;12(1):e0171096
- [151] Perucca S, Di Palma A, Piccaluga PP, Gemelli C, Zorrati E, Giacomuzzi E, Lojcono A, Borsani G, Tagliafico E, Scupolio MT, Bernardi S, Zanaglio C, Cattina F, Cancelli V, Malagola M, Krampera M, Marini M, Almici C, Ferrari S, Russo D. Mesenchymal stromal cells (MSCs) induce ex vivo proliferation and erythroid commitment of cord blood haematopoietic stem cells (CB-CD34+ cells). *PLoS One*. 2017 Feb; 12(2):e0172430
- [152] Service report. Bioinformatics service report; gene expression analysis of different human RNA samples using topic-defined PIQRTM Stem Cell Microarray. September 12, 2008; Corrina Scholz PhD, senior scientist bioinformatics, Kay Hoffmann PhD, head of bioinformatics.
- [153] Inaugural-Dissertation Christian M. Karsten. Einfluss dendritischer Zellen auf die Entwicklung uteriner natürlicher Killerzellen. Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Lübeck, 2009
- [155] Goldwasser E, Beru N, Smith D. Erythropoietin. *Immunol Ser* 1990; 49:257-276.
- [156] Mello, F. V., Land, M. G. P., Costa, E. S., Teodósio C., María-Luz Sanchez, Bárcena P., Peres, R, T., Pedreira, C. E., Liliane R. Alves, L. R., and Orfao, A. Maturation-associated gene expression profiles during normal human bone marrow erythropoiesis. *Cell Death Discovery* (2019) 5:69.
- [157] Merryweather-Clarke, A. T., Atzberger, A., Soneji, A, Gray, N., Clark,K., Waugh, G.,

- McGowan, S. J., Taylor, T., Nandi, A. K., Wood, W., G., Roberts, D., J., Higgs, D. R., Buckle, V., J., and Robson, K., J., H.. Global gene expression analysis of human erythroid progenitors. *Blood*, 31 March 2011, Volume 117, No. 13.
- [158] Aqmasheh, S., Shamsasanjan, K., Akbarzadehlaleh, P., Pashoutan Sarvar, P., Timari, H. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Adv Pharm Bull*, 2017, 7(2), 165-177
- [159] Lausen, J., Pless, O., Leonard, F., Kuvardina, O. N., Koch, B., and Achim Leutz. Targets of the Tal1 Transcription Factor in Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 2010 Feb 19; 285(8): 5338–5346.
- [160] Kim, W. S., Zhu, J., Deng, Q., Chin, C. J., He, C. B., Grieco, A. J., Gautam, D. G., Parekh, C., Hollis, R. P., Lane, T. F., Bouhassira, E. E., Kohn, D. B. and Gay M. Crooks. Erythropoiesis from Human Embryonic Stem Cells Through Erythropoietin-Independent AKT Signaling. *Stem Cells*. 2014 June ; 32(6): 1503–1514.
- [161] Rouzbeh S, Kobari L, Cambot M, Mazurier C, Hebert N, Saussat A M, Durand C, Douay L, Lapillonne, H. Molecular Signature of Erythroblast Enucleation in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 2015;33:2431–2441.
- [162] Lee WY, Weinberg OK, Pinkus GS. GATA1 Is a Sensitive and Specific Nuclear Marker for Erythroid and Megakaryocytic Lineages. *Am J Clin Pathol*. 2017 Apr; 147(4): 420–426.
- [163] Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol*. 2014;100:417–424.
- [164] Zvot A, Lipton J M, Narla A, and Blanc L. erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular Medicine* (2018) 24:11
- [165] Seto K, Hirano I, Sekine H, Miyauchi L, Nakai T, Kato K, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. An immortalized cell line derived from renal erythropoietin-producing (REP) cell demonstrates their potential to transform into myofibroblasts. *Sci. Rep.* 2019; 9 (11):11254.

10. Anhang

10.1 Publikationen

Lazar-Karsten P, Dorn I, Meyer G, Lindner U, Driller B, Schlenke P. The influence of extracellular matrix proteins and mesenchymal stem cells on erythropoietic cell maturation. *Vox Sang*. 2011 Jul; 101(1):65-76.

Dorn I, **Lazar-Karsten P**, Boie S, Ribbat J, Hartwig D, Driller B, Kirchner H, Schlenke P. In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion*. 2008 Jun; 48(6):1122-32.

Meyer G, **Lazar-Karsten P**, Lindner U, Driller B, Dorn I, Schlenke P. Co-culturing of in vitro erythropoiesis with extra cellular matrix proteins. *J Stem Cells Regen Med*. 2007 May 16;2(1):136.

Lazar-Karsten P, Dorn I, Driller B, Schlenke P. Transcriptional profiling of in vitro erythroid progenitors. *J Stem Cells Regen Med*. 2007 May 16;2(1):131.

Knief J, Reddemann K, **Lazar-Karsten P**, Herhahn T, Petrova E, Wellner U, Thorns C. Prognostic implications of RASAL1 expression in oesophagus adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2017 Mar;70(3):274-276.

Lazar-Karsten P, Belge G, Schult-Badusche D, Focken T, Radtke A, Yan J, Renhabat P, Mohamed SA. Generation and characterization of vascular smooth muscle cell line from a patient with bicuspid aortic valve. *Cells*. 2016 Apr 21;5(2).

Zimmermann N, **Lazar-Karsten P**, Keck T, Billmann F, Schmid S, Brabant G, Thorns C. Expression pattern of CDX2 estrogen and progesterone receptors in primary gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastasis. *Anticancer Res*. 2016 Mar;36(3):921-4.

10.2 Ethikvotum

Dem Antragsteller, Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. Schlenke wurde mit einem Schreiben vom 21.02.2005 unter dem Aktenzeichen 04-183 das beantragte Studienvorhaben zum Arbeiten mit humanen mesenchymalen Stammzellen genehmigt. Die Genehmigung erfolgte durch die Ethikkommission der Universität Lübeck unter dem Vorsitz vom Herrn Prof. Dr. Dr. Raspe.

Dem Antragsteller, Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. Schlenke wurde mit einem Schreiben vom 21.11.2007 unter dem Aktenzeichen 07-167 das beantragte Studienvorhaben zum Arbeiten mit humanen mesenchymalen Stammzellen genehmigt. Die Genehmigung erfolgte durch die Ethikkommission der Universität Lübeck unter dem Vorsitz vom Herrn Prof. Dr. Dr. Raspe.

10.3 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Thorns herzlichst bedanken für seine Bereitschaft, mich als Doktorvater zu betreuen und zu unterstützen, und für sein kritisches Lesen der Arbeit und der konstruktiven Kritik.

Herrn Prof. Dr. Holger Kirchner und Herrn Prof. Dr. Jörg Köhl danke ich, dass ich am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin die Promotion beginnen und am Institut für Systemische Entzündungsforschung beenden durfte.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Manz möchte ich ganz herzlichen für die Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation, dem kritischen Lesen der Arbeit und für sein Interesse und seine Geduld bedanken.

Dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität Lübeck und Herrn Prof. Dr. Görg danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau Birgitt Paula Driller und Petra Langenstrassen für die tolle und freundliche Zusammenarbeit und dafür, dass sie mir mit einem breiten Spektrum an methodischem Wissen zur Seite standen.

Frau Dr. Helen Pasternack gilt mein besonderer Dank für die Bereitschaft, diese Arbeit zu lesen und mir mit konstruktiver Kritik zur Seite zu stehen.

Meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin möchte ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die wertvollen Tipps zur Versuchsdurchführung und der ständigen Hilfsbereitschaft danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Ehemann für die Geduld und seine wertvolle Hilfe und bei meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

10.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Pamela Lazar-Karsten
 Hundestraße 68
 23552 Lübeck
pamela.lazar@gmail.com
 0451-79073103
 Geb. am 16.05.74 in
 Teheran/Iran
 verheiratet, 2 Kinder
 deutsch



Schulbildung

1980-92 Grundschole, Oberschole und Gymnasium in Teheran/Iran, Abitur als Abschluss

Studium

1997-98 Besuch des Studienkollegs für ausländische Studierende an der Universität Hamburg, deutsche Hochschulreife als Abschluss

1998-2004 Studium der Fachrichtung Biologie, Universität Hamburg, Schwerpunkt Mikrobiologie
 Thema der Diplomarbeit: „Optimierung der Gewinnung von extrazellulären polymeren Substanzen von Laugungsbakterien“; Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Sand

Studienbegleitende Tätigkeiten

1998-2001 Studienkollege Hamburg, Biologie-Assistentin

1999-2000 Universität Hamburg, Tutorin der Studenten des ersten Semesters

Naturwissenschaftliche Tätigkeiten

Okt. 2013-Dez. 2016 Klinik für Herz und thorakale Gefäßchirurgie, Arbeitsgruppe PD. Dr. SA. Mohamed; wissenschaftliche Angestellte
 Feb. 2015 -jetzt Institut für Pathologie; wissenschaftliche Angestellte

Promotion

Sept. 2005-Dez. 2009 Anfertigung der Dissertation am Institut für systemische Entzündungsforschung (ehemals Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin)

2010- Okt. 2013 Elternzeit

10.5 Erklärungen

Eidesstattliche Versicherung und Erklärungen

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*In vitro*-Generierung von Erythrozyten aus adulten Stammzellen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigelegte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Zudem erkläre ich mich mit der Verwendung einer Antiplagiatsoftware für die Überprüfung der vorliegenden Arbeit einverstanden.

Der Zulassung von Zuhörerinnen oder Zuhörer bei der mündlichen Prüfung möchte ich hiermit widersprechen.

Lübeck, den 18.09.2019

Pamela Lazar-Karsten