



Molekulare und funktionelle Untersuchungen von CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen bei Patienten mit multiplem Myelom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Büst
aus Krefeld

Düsseldorf, Dezember 2010

aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Rainer Haas)

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. R. Haas
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2011

Teile dieser Arbeit sind eingereicht zur Publikation beim Journal Blood:

Multiple myeloma-related mechanisms of molecular deregulation and functional impairment of bone marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells

Bruns, I., Buest, S., Brückmann, I., Cadeddu, R.P., Fröbel, J., Wilk, C.M., Schildberg, F., Fischer, J.C., Roels, F., Schroeder, T., Huenerlituerkoglu, A.N., Jaeger, M., Kobbe, G., Fenk, R., Brors, B., Trumpp, A., Czibere, A. & Haas, R.

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die Hämatopoese	1
1.2	Das multiple Myelom (MM)	3
1.2.1	Inzidenz	3
1.2.2	Geschichtlich	3
1.2.3	Malignität & Unterscheidung vom Plasmozytom	4
1.2.4	Diagnostische Kriterien & Einteilung der Krankheitsstadien	4
1.2.5	Diagnostische Nachweisverfahren an Blut, Urin & Knochenmark	5
1.2.6	Röntgendiagnostik	6
1.2.7	Symptomatik	7
1.2.8	Therapie (Stadium I)	9
1.2.9	Therapie (Stadium II)	9
1.2.10	Therapie (Stadium III)	10
1.2.11	Stand der Forschung	11
2.	ZIELSETZUNG	13
3.	MATERIAL & METHODEN	14
3.1	Molekularbiologische Methoden	14
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	14
3.1.1.1	Standard-Mini-Präparation von Plasmid-DNA	14
3.1.1.2	Standard-Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	15
3.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA	15
3.1.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	16
3.1.4	Präzipitation von DNA	16
3.1.4.1	Ethanol-fällung	16
3.1.4.2	Isopropanol-fällung	17
3.1.5	Agarosegelelektrophorese	17
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	18
3.1.7	Elution von DNA aus Agarosegelen	19
3.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
3.1.8.1	Primerdesign	21
3.1.8.2	Reverse Transkription	22
3.1.8.3	Quantitative- <i>Realtime</i> -PCR	23
3.1.9	DNA-Sequenzierung	23
3.1.10	RNA- und cDNA-Qualitätsanalyse	23
3.1.11	Hybridisierung von Affymetrix™ GeneChips	24
3.1.12	Bioinformatische & statistische Auswertung von Affymetrix™ GeneChips	26

3.1.13	Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung)-----	28
3.1.14	Protein- & RNA-Isolation mittels Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion-----	28
3.1.15	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford -----	30
3.1.16	Immunologischer Nachweis von Proteinen -----	30
3.1.17	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) -----	30
3.1.18	Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Gelen -----	32
3.1.19	Proteintransfer auf PVDF-Membranen-----	32
3.1.20	Immunodetektion (Western blot) -----	33
3.2	Methoden der Zellkultur und Arbeiten an Primärzellen-----	34
3.2.1	Herkunft von Primärzellen und Patientencharakteristika -----	34
3.2.2	Zellkulturmedien -----	37
3.2.3	Zelllinien-----	39
3.2.3.1	Zelllinie AFT024 -----	39
3.2.3.2	Zelllinie HEK-293FT-----	40
3.2.4	Separation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) & immuno- magnetische Isolierung von CD34 ⁺ -Zellen (MACS) aus Knochenmark (KM) oder peripherem Blut (PB) -----	41
3.2.5	Kryokonservierung & Lagerung von humanen Knochenmark- oder peripheren Blut-Zellen -	43
3.2.6	Auftauen von humanen Knochenmark- oder peripheren Blut-Zellen-----	43
3.2.7	Funktionelle Analysen in der Zellkultur-----	44
3.2.8	Untersuchungen der Proliferations- und Überlebensraten von CD34 ⁺ -Zellen aus dem Knochenmark in <i>in vitro</i> Kultur -----	44
3.2.9	CFC-Ansatz (<i>colony-forming-cell</i>) -----	45
3.2.10	Myeloischer Differenzierungsansatz (LTC-IC-Ansatz) -----	46
3.2.11	<i>In vitro</i> Versuche zum Migrationsverhalten von HSPC-----	47
3.2.12	<i>In vitro</i> Versuche zum Adhäsionsverhalten von HSPC-----	48
3.2.13	Immunhistochemische & Immunfluoreszenz Analysen -----	49
3.2.13.1	Immunhistochemische Analysen mittels Peroxidase-Färbung -----	49
3.2.13.2	Extrazelluläre Markierung mittels Fluorochrom konjugierter Antikörper -----	51
3.2.13.3	Intrazelluläre Markierung mittels Fluorochrom konjugierter Antikörper -----	52
3.2.13.4	Intrazelluläre Markierung mittels Hoechst33342 -----	52
3.2.13.5	Antikörper-----	53
3.2.13.6	Immunfluoreszenz Färbungen zum stressbedingten F-Aktin Status des Zytoskeletts und des Zelloberflächen assoziierten Hyaluronsäurerezeptors (CD44) -----	54
3.2.14	Durchflusszytometrie: FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>) -----	55
3.2.14.1	Durchflusszytometrische Zellsortierung von humanen HSPC aus peripherem Blut oder Knochenmark-----	56
3.2.14.2	Bestimmung der Reinheit und Ausbeute von CD34 ⁺ -Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark-----	58
3.2.14.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zusammensetzung der HSPC-Subpopulationen (Quantitativ)-----	58

3.2.14.4	Durchflusszytometrische Bestimmung des Apoptosestatus von HSPC mittels <i>cleaved-Caspase3</i> Messung -----	58
3.2.14.5	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen von HSPC mittels Anti-Ki67-Antikörpers und Hoechst33342-----	59
3.2.14.6	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen von CD34 ⁺ -Zellen aus dem Knochenmark mittels Bromodeoxyuridin (BrdU) und 7-Amino-Actinomycin D (7AAD)-----	60
3.2.14.7	Auswertung durchflusszytometrischer Daten & Definitionen der Signifikanzniveaus -----	60
3.3	Univariate- & multivariate-Analysen -----	60
4.	ERGEBNISSE -----	62
4.1	Erstellung von HSPC-Subpopulations-spezifischen Profilen des MM-----	63
4.1.1	Profile des Transkriptoms von myeloiden Stamm- und Progenitorsubpopulationen basierend auf der Affymetrix™ GeneChip Technologie-----	63
4.1.2	Vergleichende quantitative Untersuchungen zur Zusammensetzung von Stamm- und Progenitorsubpopulationen im Knochenmark von MM-Patienten und gesunden Spendern -	71
4.2	Funktionelle Analysen des MM -----	73
4.2.1	Retrospektive Untersuchungen zum Zellschicksal später myeloischer Progenitoren durch Bestimmung der Koloniebildung im klonogenen <i>colony forming cell</i> (CFC)-Versuch (<i>colony forming cell</i>)-----	73
4.2.2	Vergleichende Untersuchungen des Langzeitpotentials früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von gesunden Spendern und MM-Patienten mittels der <i>long-term-colony-initiating-cell</i> (LTC-IC)-Methode-----	77
4.2.3	Untersuchungen zum „programmierten“-Zelltod (Apoptose) von myeloiden HSPC im Vergleich von gesundem und MM-Knochenmark-----	78
4.2.3.1	Cell-Death-Detection-ELISA-----	78
4.2.3.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der Caspase 3 Aktivität an HSPC aus gesundem und MM-Knochenmark -----	79
4.2.4	Zellzyklusuntersuchungen an myeloiden HSPC aus dem Knochenmark von gesunden Spendern und MM-Patienten-----	80
4.2.5	Untersuchungen zur Adhäsionsfähigkeit von HSPC aus dem Knochenmark von gesunden Spendern im Vergleich zu MM-Patienten-----	82
4.2.6	Untersuchung zum Migrationsverhalten von HSCP aus dem Knochenmark von gesunden Spendern im Vergleich mit MM-Patienten -----	85
4.2.7	Immunfluoreszenzanalysen an HSPC zur Stressbedingten F-Aktin Formierung und deren Einflüsse auf das Zytoskelett der Zellen und Erfassung der Oberflächenexpression von CD44, dem HA-Rezeptor-----	86
4.2.8	Immunhistochemische Analysen des Smad2 Phosphorylierungsgrades an Paraffin-fixierten Knochenmarkstanzen von MM-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen-----	89

4.2.9	Immunodetektion von pSmad2 mittels Western blot Analyse an CD34 ⁺ -Primärzell-lysatenen-----	91
4.3	Funktionelle Analysen zum Einfluss von TGFβ auf HSPC aus dem Knochenmark von MM-Patienten und gesunden Spendern und Analysen zur Wirkung des TGFβ-Rezeptor-Antagonisten SD208-----	92
4.3.1	Analysen zum Einfluss von TGF β und SD208 auf die Proliferation und das Überleben von CD34 ⁺ -Zellen aus dem Knochenmark-----	92
4.3.2	Retrospektive Untersuchungen zum Zellschicksal später myeloischer Progenitoren unter dem Einfluss von SD208 (CFC)-Versuch-----	94
4.3.3	Untersuchungen des Langzeitpotentials früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mittels der <i>long-term-colony-initiating-cell</i> -Methode (LTC-IC) unter dem Einfluss von SD208-----	96
4.3.4	Analysen zum Einfluss des TGF β -Signalweges auf den Zellzyklus von CD34 ⁺ -Zellen aus dem Knochenmark und Auswirkungen einer Stimulation mit SD208 mittels BrdU und 7AAD-----	97
4.4	Univariate- & multivariate-Analysen-----	97
5.	DISKUSSION-----	100
6.	ZUSAMMENFASSUNG-----	106
6.1	<i>Summary</i>-----	107
7.	LITERATURVERZEICHNIS-----	108
8.	TABELLENVERZEICHNIS-----	108
9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS-----	108
ANHANG-----		120
DANKSAGUNG-----		124
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG-----		125

ABKÜRZUNGEN**A**

7AAD	7-Amino-Actinomycin D	
A. dest.	destilliertes Wasser	<i>Aqua destillata</i>
AK	Antikörper	
APC	Allophycozyanin	
APP	Programm	<i>Advanced Pathway Painter</i>
APS	Ammoniumpersulfat	
atm	Atmosphären [1 atm ≈ 0,99 bar]	
ATP	Adenosintriphosphat	

B

BFU-E	Kolonie bildender Erythrozyten Vorläufer (<i>burst</i> Form)	<i>burst-forming-unit-erythroid</i>
BLAST	Intenet Datenabgleich für z.B. Gensequenzen	<i>Basic Lokal Alignment Search Tool</i>
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungs- zentrum (Uniklinikum-Düsseldorf)	
bp (M; k)	Basenpaar(e) (mega; kilo)	
BPB	Bromphenolblau	
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin	
BSA	Rinderserumalbumin	<i>bovines Serum Albumin</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit	

C

°C	Grad Celsius	
CAFC		<i>cobblestone-area-forming-cells</i>
CDx	Differentierungsmarker	<i>cluster of differentiation molecules</i>
CDx ⁺	CDx positiv	
CDx ⁻	CDx negativ	
CDx ^{lo}	CDx schwach positiv bis negativ	
CFC	Kolonie formierende Zelle	<i>colony forming cell</i>
CFU-E	Kolonie bildender Erythrozyten Vorläufer	<i>colony-forming-unit-erythroid</i>
CFU-G	Kolonie bildender Granulozyten Vorläufer	<i>colony-forming-unit-granulocyte</i>
CFU-GEMM	Kolonie bildender Granulozyten/ Erythrozyten/Makrophagen/ Megakaryozyten Vorläufer	<i>colony-forming-unit- granulocyte- erythroid- macrophage-megakaryocyte</i>
CFU-GM	Kolonie bildender Granulozyten/ Makrophagen Vorläufer	<i>colony-forming-unit- granulocyte/macrophage</i>
CFU-M	Kolonie bildender Makrophagen Vorläufer	<i>colony-forming-unit-macrophage</i>
CLSM	konfokale Laserscanningmikroskopie	<i>confocale laserscanning microscopy</i>
CMP	allgemeiner myeloider Vorläufer	<i>common myeloid progenitor</i>
CRP	C-reaktives Protein	

D

Da (k)	Dalton (kilo)	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPG	Eppendorfgefäß
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZ	Eppendorf-Tischzentrifuge

F

FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothioyanat	
FS		<i>forward-scatter</i>

G

g (k; m; µ; n; p)	Gramm (kilo; milli; mikro; nano; piko)	
GMP	Granulozyten/Makrophagen Vorläufer	<i>granulocyte/macrophage progenitor</i>
GSP	genereller Sekretionsweg	<i>general secretory pathway</i>
GZL	Ganzzelllysate	

H

h	Stunde(n)	
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	
HA	Hyaluronsäure	<i>hyaluronic acid</i>
HPC	hämatopoietische Vorläuferzelle(n)	<i>haematopoietic progenitor cell(s)</i>
HPP	hoch proliferatives Potential	<i>high proliferative potential</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase	<i>horseradish peroxidase</i>
HSA	humanes Serum-Albumin	
HSC	hämatopoietische Stammzelle(n)	<i>haematopoietic stem cell(s)</i>
HSPC	hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzelle(n)	<i>haematopoietic stem- and progenitor-cell(s)</i>

I

Ig	Immunglobulin	
IMiD	immunmodulatorisches Arzneimittel	
IMWG	Internationale Myelom Arbeitsgruppe	<i>International Myeloma Working Group</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid	

K

KPi Kaliumphosphatpuffer (Der Index i ist die Konzentration der KH_2PO_4)

L

l (m; μ) Liter (milli; mikro)
 λ Wellenlänge [nm]
 LDH Laktatdehydrogenase
 LTC-IC *long-term culture initiating cell*

M

M Molar
 MACS Magnetpartikel assoziierte Zellsortierung *magneto-bead associated cell-sorting*
 MDS myelodysplastisches Syndrom
 MEP Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer *megakaryocyte/erythrocyte progenitor*
 MFI durchschnittliche Fluoreszenz Intensität *mean fluorescence intensity*
 min Minute(n)
 MGUS monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
 ML-IC *myeloid-lymphoid-initiating-cell*
 MM Multiples Myelom
 MNC mononukleäre Zellen
 MRT Magnetresonanztomographie

N

NaDoc Natriumdesoxycholat
 NaOH Natriumhydroxid
 NK-IC *natural killer initiating cell*
 NTA Nitrilo-3-Essigsäure

O

O.D. optische Dichte

P

PA-Gel Polyacrylamit-Gel
 PB peripheres Blut
 PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung *phosphate buffered saline*
 PBST Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Tween20 *phosphate buffered saline + Tween20*
 PCR Polymerasekettenreaktion *polymerase-chain-reaction*
 PE R-Phycoerythrin
 Pen Penicillin
 pH negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [H^+]
 ppm Teile pro Millionen *parts per million*

pSMAD2 PVDF	phosphoryliertes SMAD2 Polyvinylidenfluorid	
Q		
q-RT-PCR	quantitative-echtzeit-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
R		
Rbs	Ribosomenbindungsstelle	
RNA	Ribonukleinsäure	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur	
rT	reverse Transkription	
RT-PCR	Echtzeit-PCR	<i>real time PCR</i>
S		
s	Sekunde	
SDS	Natriumdodecylsulfat	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
SS		<i>side-scatter</i>
Strep	Streptomycin	
T		
TBE	Tris-Borat-EDTA	
TCA	Trichloressigsäure	
TE	Tris-EDTA	
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin	
Tm	Schmelztemperatur	
TMF	Transformationspuffer	
Tween20	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat	
U		
U	Einheit	<i>unit</i>
ÜK	Über Nacht Kultur	
ÜN	über Nacht	
Upm	Umdrehungen pro Minute	
UV	Ultraviolett	
V		
V	Volt	
VAD	Vincistrin, Adrimycin, Dexamethason	
VID	Vincistrin, Idarubicin, Dexamethason	
v/v	Volumen pro Volumen	<i>volume per volume</i>
W		
W	Watt	
Wt	Wildtyp	
w/v	Gewicht pro Volumen	<i>weight per volume</i>

1. Einleitung

1.1 Die Hämatopoiese

Der Begriff Hämatopoiese stammt von den griechischen Wörtern *haimatos* – Blut und *poiesis* – Herstellung ab. Da sich die Blutbildung beim Erwachsenen von der embryonalen unterscheidet und in dieser Arbeit nur von der adulten Hämatopoiese die Rede ist, wird nur diese im folgenden Abschnitt näher beleuchtet. Die Hämatopoiese vollzieht sich unter physiologischen Bedingungen in den platten Knochen des Skelettsystems, wo das Knochenmark ein sehr zellreiches, von Gefäßen durchsetztes Organ bildet. Zum Einen besteht es aus den unterschiedlichen blutbildenden Stamm- und Vorläuferzellen bis hin zu den reifen Blutzellen sowie einem Stroma, das sich aus verschiedenen Zellen mesenchymalen Ursprungs und speziellen Matrixproteinen zusammensetzt (Lam, B. S. & Adams G. B., 2010). Das komplexe Netzwerk des Stroma stellt zum einen das *microenvironment* (Seita, J. & Weissman, I. L., 2010) für die proliferierenden, sich differenzierenden hämatopoietischen Zellen dar, bis diese im reifen Zustand in das periphere Blutsystem entlassen werden. Zum anderen ist es das *microenvironment* des Stroma, welches die sogenannte „Stammzellnische“ bildet, in der die fein abgestimmten Prozesse von Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung durch intrinsische Programme der Stammzellen dirigiert werden (Seita, J. & Weissman, I. L., 2010). Hierfür verwenden Stammzellen eine Vielzahl verschiedener Mechanismen basierend auf externen Stimuli auf dem Weg der zellulären Interaktion, der Rezeptoraktivierung durch Matrixproteine sowie durch humorale und parakrin angebotene Wachstumsfaktoren und Zytokine, um die oben genannten Prozesse zu beeinflussen (Lam, B. S. & Adams G. B., 2010; Seita, J. & Weissman, I. L., 2010). Unterteilt wird die Hämatopoiese in die Myelopoese und die Lymphopoese (Abbildung 1.1). Beiden Differenzierungswegen ist gemein, dass ihre Basis die pluripotente Stammzelle darstellt. Aus der pluripotenten Stammzelle entwickelt sich im Verlauf der Myelopoese ein allgemeiner myeloider Vorläufer (*common myeloid progenitor*), auch als CMP bezeichnet. Der CMP differenziert sich entweder weiter zum Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer, kurz GMP (*granulocyte/macrophage progenitor*), oder zum Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer, auch MEP genannt. Das gerade erläuterte Differenzierungsmodell der myeloiden Entwicklung wurde etabliert von Manz, M. G. *et al.* (2002) und ist nach heutigem Wissensstand weitestgehend akzeptiert. Da die weitere Differenzierung der GMP-Zellen Leukozyten (weiße Blutzellen) hervorbringt, wird diese der Leukopoese zugeordnet, während die Differenzierung von MEP-Zellen in die Thrombopoese und Erythropoese untergliedert wird

(Lodish, H. F., 2003). Ähnlich wie in der Myelopoiese bildet sich auch in der Lymphopoiese zunächst ein gemeinsamer Vorläufer, der sogenannte CLP (*common lymphoid progenitor*), dessen Differenzierung ebenfalls der Leukopoiese zugeordnet wird. Hierbei können sich im weiteren Verlauf über diverse Übergangsstadien reife B-Zellen oder natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) im Knochenmark entwickeln oder es entstehen durch die Wanderung von Übergangsstadien in den Thymus reife T-Lymphozyten. Die Abwanderung von reifen B-Zellen in die Lymphknoten wiederum führt zur Bildung von reifen Plasmazellen, die die Basis des Immunsystems darstellen (Abbildung 1.1) (Hahn, H. *et al.*, 2008).

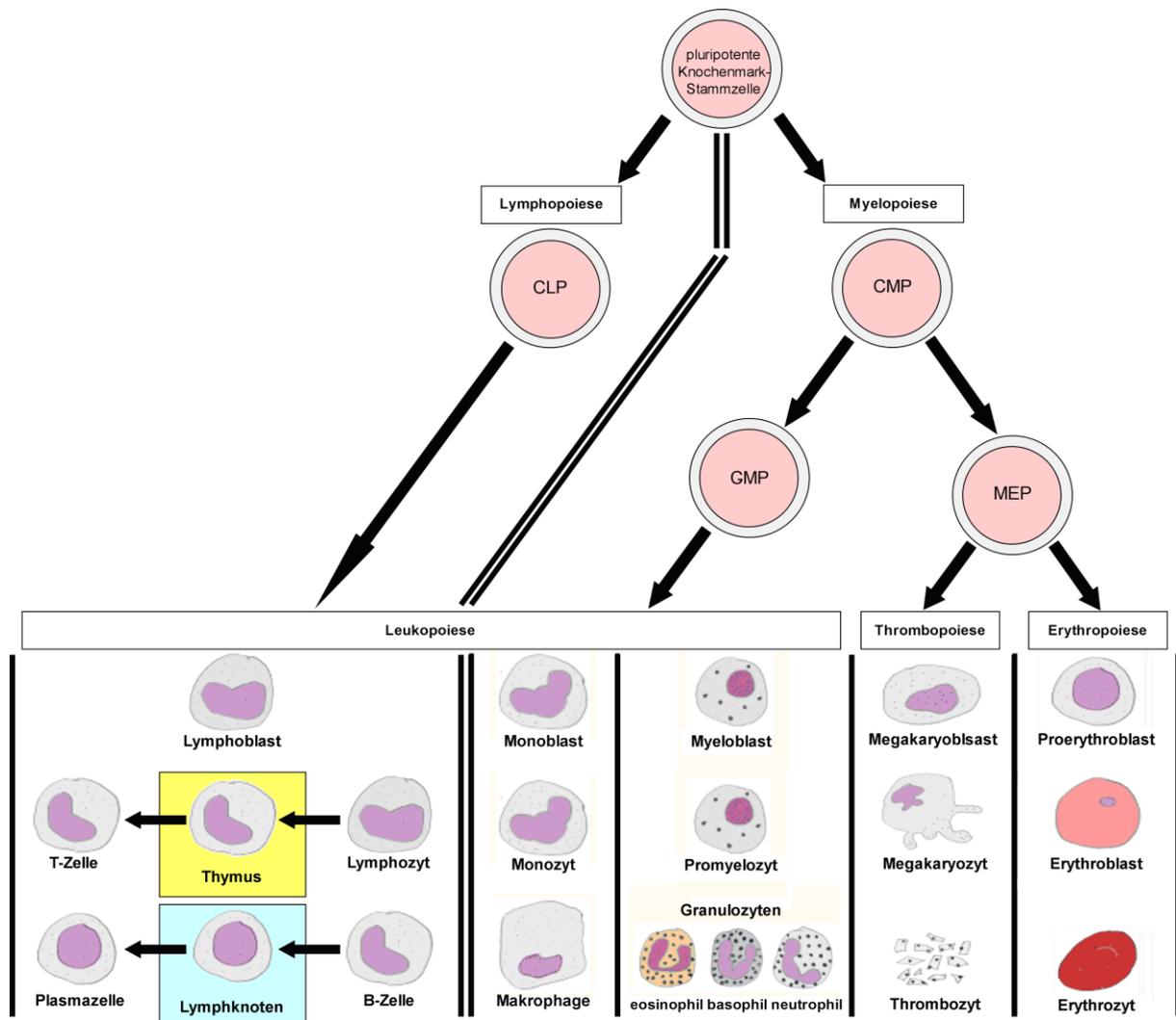


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese

1.2 Das multiple Myelom (MM)

Das MM ist eine unheilbare hämatopoietische Erkrankung charakterisiert durch die Invasion klonaler Plasmazellen in das Knochenmark, Knochenschädigungen und eine erhöhte Produktion von meist defekten Antikörpern oder deren Leichtketten. Nach der aktuellen WHO-Klassifizierung [<http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>] ICD10 Version 2007 (C90.0) wird das multiple Myelom zu der Gruppe der Plasmozytome und Erkrankungen mit bösartigen Plasmazellen-Neubildungen gezählt. Das MM gehört zu den aggressiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen.

1.2.1 Inzidenz

Die Inzidenz des MM liegt bei 4-6 Neuerkrankungen/100.000 Menschen pro Jahr (Harousseau, J. L. & Moreau, P., 2009). Somit sind ca. 10 % aller hämatologischen- bzw. 1 % aller onkologischen Erkrankungen ein MM. Das mediane Alter der Neudiagnosen liegt bei 65 Jahren und nur 2 % der Patienten sind jünger als 40 Jahre. Das MM wird bei Männern geringfügig häufiger als bei Frauen diagnostiziert (Kyle, R. A. *et al.*, 2003).

1.2.2 Geschichtlich

Bei dem MM handelt es sich um eine sogenannte monoklonale Gammopathie mit pathologischer Produktion von Immunglobulinen (Ig). Das MM kennzeichnet sich durch die bösartige Vermehrung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark aus (Landgren, O. & Kyle, R. A., 2007). Da die entarteten Plasmazellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen, produzieren diese identische (monoklonale) Antikörper oder deren Bruchstücke (Leichtketten). Die erste Fallbeschreibung eines MM lässt sich auf Macintyre, W. 1850 zurückverfolgen, in dieser beschreibt Dr. Macintyre die Krankheitssymptome von T. A. McBean. Im weiteren Verlauf der Erkrankung wurden der Arzt Dr. Watson und der Arzt und Chemiker Dr. Bence Jones hinzugezogen. Dr. Bence Jones gelang es zum ersten Mal, die für das MM typischen Proteine im Urin ausfindig zu machen und zu beschreiben (Bence Jones, H., 1848). Die Behandlung von Herrn McBean endet mit seinem Tod im Januar 1846. Eine genauere Beschreibung des MM gelang erst Otto Kahler (1849-1893†) in den Jahren zwischen 1882-1890, weshalb das MM auch als Morbus Kahler bezeichnet wird (Kahler, O., 1888).

1.2.3 Malignität & Unterscheidung vom Plasmozytom

Der Grad der Malignität reicht von der Krebsvorstufe, der so genannten „monoklonalen Gammopathie mit unklarer Signifikanz“ (MGUS) über das langsam progrediente „indolente Myelom“ (*smoldering myeloma*) bis zum hochmalignen symptomatischen MM, das ohne Behandlung zu einem schnellen Tod des Erkrankten führen kann. Der Übergang von einem MGUS zu einem aktiven Myelom kann wenige Monate bis mehrere Jahrzehnte dauern. Eine klinische Studie an 1384 MGUS Patienten belegte, dass das Risiko des Übergangs von einem MGUS zu einem aktiven MM jährlich bei ca. 1 % liegt (Kyle, R. A. *et al.*, 2002). Der Begriff des Plasmozytoms hingegen beschreibt in diesem Zusammenhang ausschließlich einen solitären, intramedullären (lat. *Medulla* = das Mark; *Medulla ossium* = das Knochenmark) oder mehr als einen extramedullären Herd maligner Plasmazellen, wohingegen ein MM sich durch mehrere intramedulläre Herde auszeichnet.

1.2.4 Diagnostische Kriterien & Einteilung der Krankheitsstadien

Die von den malignen Zellen produzierten Antikörper bzw. Leichtketten sind für einige Symptome bzw. Komplikationen der Erkrankung verantwortlich und werden entsprechend der gebildeten Antikörper in die folgenden Typen unterteilt. Mit > 50 % stellt das IgG-Myelom die häufigste Form des MM dar, gefolgt von IgA-MM (ca. 25 %) und dem eher seltenen IgD-MM. Eine weitere seltenere Form des MM stellen die Leichtkettenmyelome (Bence Jones-Myelome) dar. Diese werden anhand der betroffenen Leichtkette klassifiziert λ -Leichtketten-Myelom (λ -L-MM) oder κ -Leichtketten-Myelom (κ -L-MM). Die diagnostischen Kriterien für das MM sind in Haupt- und Nebenkriterien unterteilt und der Tabelle 1.1 zu entnehmen. Tabelle 1.2 enthält die Einstufungskriterien für die Stadieneinteilung nach Durie, B. G. & Salmon, S. E. (1975) und Tabelle 1.3 beinhaltet die Kriterien für die neuere Einteilung der Stadien nach dem Internationalen Staging System (ISS), in der ausschließlich die Konzentrationen von β_2 -Mikroglobulin und Albumin Berücksichtigung finden (Greipp, P. R. *et al.*, 2005).

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Monoklonale Paraproteinämie: Serum: IgG > 35 g/l; IgA > 20 g/l Urin: Bence-Jones-Proteinurie > 1 g/24h	Monoklonale Paraproteinämie: geringer als im Hauptkriterium
Knochenmarkinfiltration von > 30 % Plasmazellen	Knochenmarkinfiltration von > 10 % Plasmazellen
Histologischer Plasmozytom-Nachweis in Knochenmarkbiopsien	Osteolysen
	Antikörpermangel: IgM < 0,5 g/l; IgA < 1 g/l; IgG < 6 g/l

Tabelle 1.1: Diagnostische Kriterien zur Kategorisierung des Malignitätsgrades des MM

Stadium I	Stadium II	Stadium III (mindestens eines der folgenden Kriterien)
Hämoglobin > 10 g/dl	Werte liegen zwischen Stadium I und Stadium III	Hämoglobin > 10 g/dl
Kalzium im Serum normal		Kalzium im Serum > 3,0 mmol/l
Maximal eine Osteolyse		> 2 Osteolysen
IgG < 5 g/dl bzw. IgA < 3 g/dl		IgG > 7 g/dl bzw. IgA > 5 g/dl
Leichtkettenausscheidungen im Urin < 4 g/24h		Leichtkettenausscheidungen im Urin > 12 g/24h
Zusatz: A falls Kreatinin < 2 mg/dl (177 µmol/l); B falls Kreatinin ≥ 2 mg/dl (177 µmol/l)		

Tabelle 1.2: Einteilung der Stadien des multiplen Myeloms nach Durie, B. G. & Salmon, S. E. (1975)

Klassifizierung	Merkmale
ISS I	β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Albumin ≥ 35 g/l
ISS II	β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Albumin < 35 g/l oder
	β_2 -Mikroglobulin 3,5-5,5 mg/l
ISS III	β_2 -Mikroglobulin > 5,5 mg/l

Tabelle 1.3: Einteilung der Stadien des multiplen Myeloms nach ISS (Greipp, P. R. *et al.*, 2005)

1.2.5 Diagnostische Nachweisverfahren an Blut, Urin & Knochenmark

Der diagnostische Nachweis eines MM bedarf zunächst der Feststellung einer monoklonalen Gammopathie im Blut und/oder einer Leichtkettenausscheidung im Urin (> 1,0 g/24 h). Für die Feststellung einer monoklonalen Gammopathie eignen sich die Serum-, Immun- oder Immunfixations-Elektrophorese. Einen wichtigen Hinweis geben hierbei erhöhte Ig-Spiegel im Serum (IgG > 3,5 g/dl; IgA > 2,0 g/dl).

Üblicherweise gehen mit der monoklonalen Gammopathie weitere Veränderungen diverser Blutparameter einher. Typisch für das MM sind eine sehr stark erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH), ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und ein erhöhter β_2 -Mikroglobulin-Spiegel. Der β_2 -Mikroglobulin-Spiegel wird neben dem Albumin-Spiegel zur Klassifizierung des MM nach ISS verwendet (Tabelle 1.3).

Im Anschluss an die Feststellung einer monoklonalen Gammopathie empfiehlt sich die Durchführung einer Knochenmarkpunktion zur Feststellung des Plasmazell-Infiltrationsgrads, zumal die häufig atypischen Plasmazellen eines MM in einer histologisch-morphologischen Begutachtung näheren Aufschluss über die Erkrankung liefern können. Von einer akuten Knochenmarkinfiltration durch Plasmazellen ist erst bei > 30 % auszugehen, da vermehrte Plasmazellen im Knochenmark auch bei Entzündungsreaktionen gefunden werden können.

Finden sich zusätzlich zum Paraprotein (meist defekte Antikörper oder Leichtketten) und den vermehrten Plasmazellen im Knochenmark weitere MM typische Symptome, wie eine eingeschränkte Nierenfunktion, Hyperkalziämie, Anämie oder Osteolysen, kann die Diagnose des MM als gesichert gelten. Differentialdiagnostisch abzugrenzen ist neben reaktiven Knochenmarkveränderungen (z.B. Osteoporose), das niedrig maligne MGUS, das indolent progrediente *smoldering myeloma* und andere maligne Lymphome.

1.2.6 Röntgendiagnostik

In der konventionellen röntgendiagnostischen Bildgebung lassen sich Osteolysen darstellen. Diese unterscheiden sich von anderen Knochenmetastasen durch das Fehlen der üblichen osteoblastischen Randsäume (Abbildung 1.2). Das Fehlen osteoblastischer Randsäume ist auch der Grund, dass Osteolysen in einem Knochenszintigramm nicht darstellbar sind. Das Knochenszintigramm ist jedoch geeignet, die durch Osteolysen entstandenen pathologischen Frakturen darzustellen. Die Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchung hingegen kann zur Früherkennung einer MM-spezifischen Plasmazellinfiltration beitragen, da hierbei auch Reaktionen im Weichteilmantel der Knochen dargestellt werden können, bevor es zur Bildung von Osteolysen kommt. In einer vergleichenden Studie an 29 MM Patienten konnten Kröpil, P. *et al.*, 2008 in Zusammenarbeit mit der hiesigen Klinik zeigen, dass die Niedrigdosis-Computertomographie des gesamten Körpers mit multiplen Detektoren (MDCT / *whole-*

body multidetector CT) im Vergleich zur konventionellen Röntgendiagnostik sensitiver ist, daher wird die MDCT seitdem in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf als Mittel der Wahl für die Identifikation von Osteolysen angesehen und wurde auch im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt.

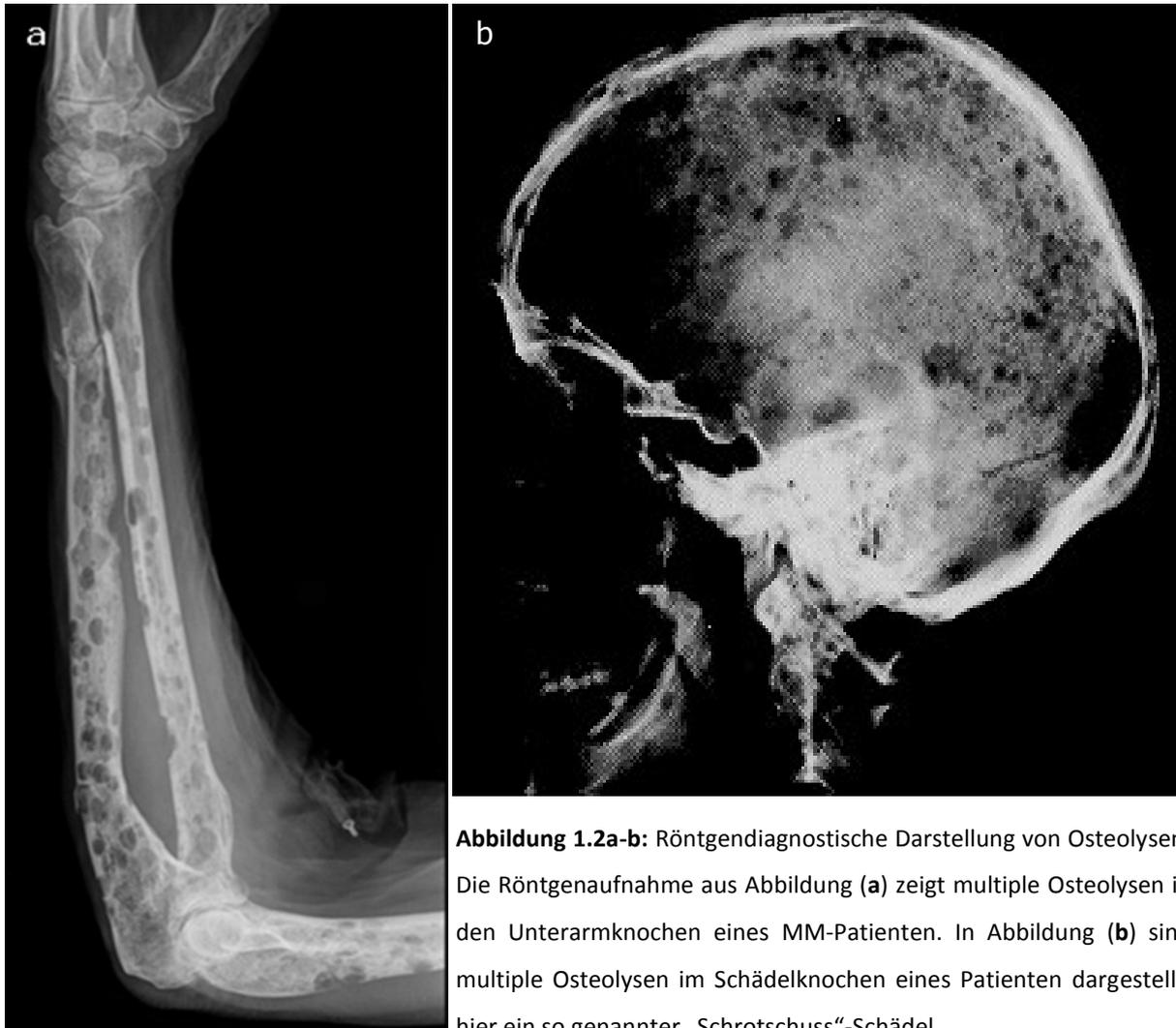


Abbildung 1.2a-b: Röntgendiagnostische Darstellung von Osteolysen. Die Röntgenaufnahme aus Abbildung (a) zeigt multiple Osteolysen in den Unterarmknochen eines MM-Patienten. In Abbildung (b) sind multiple Osteolysen im Schädelknochen eines Patienten dargestellt, hier ein so genannter „Schrotschuss“-Schädel.

1.2.7 Symptomatik

Die mannigfaltigen Krankheitssymptome entstehen zumeist entweder durch die entartete Vermehrung der Plasmazellen oder durch die von diesen Plasmazellen gebildeten Antikörper oder deren Leichtketten. Die ungehemmte Proliferation der Plasmazellen und deren Invasion in den Knochen führen in der Regel zu Knochenschmerzen, der Auflösung der Knochenstrukturen (Osteolyse) bis zu spontanen Knochenbrüchen. Die Entstehung von Osteolysen wird funktionell beeinflusst von verstärkter Osteoklastenformierung und deren Aktivitäts-

steigerung, verringerter Anzahl an Osteoblasten und folglich reduzierter Knochenformierung. Die gesteigerte Osteoklastenaktivität wird auf diverse Moleküle zurückgeführt, z.B. NFκB Ligand Rezeptor (RANKL), VEGF, Interleukin-1β (IL) und IL-6 (Juárez, P. & Guise, T. A., 2010; Qiang, Y. W. *et al.*, 2008; Esteve, F. R. & Roodman, G. D., 2007). Die Entstehung von Osteolysen führt meist zu einem Anstieg des Kalzium-Wertes im Blut (Hyperkalziämie). Oft ist der sehr starke Abbau der Knochensubstanz (Knochenmarkinsuffizienz) ähnlich einer Osteoporose das erste Symptom, das zur Diagnose eines MM beiträgt. Die Osteoporose stellt die häufigste Fehldiagnose dar.

Die übermäßige Produktion der abnormen Antikörper oder ihrer Leichtketten kann zu einer Beeinträchtigung der Durchblutung oder durch die Ablagerung in diversen Organen, wie zum Beispiel den Nieren, zu Funktionsstörungen oder dem jeweiligen Organversagen führen. Häufig wird eine Veränderung der Hämatopoese beobachtet, die sich meist in Form einer Anämie, seltener in Form von Leukopenie und/oder Thrombozythopenie manifestiert.

Einhergehend mit einer Leukopenie führen die zumeist funktionslosen Antikörper der entarteten Plasmazellen zu einer Immunsuppression mit resultierender Infektanfälligkeit. Die durch Knochenabbau bedingte Hyperkalziämie kann sich in Schwäche und Nierenschäden manifestieren. Die überschießende Produktion der Ig kann die Viskosität des Serums erhöhen und somit dessen Mikrozirkulation beeinträchtigen, was in Kopfschmerzen, Benommenheit, Schwindel, Nystagmus (z.B. Augenzittern), Schläfrigkeit, Hör- und Sehstörungen, Krampfanfällen und im Extremfall zum Koma des Patienten führt. Diese Veränderungen werden als Hyperviskositätssyndrom bezeichnet (Capra, J. D. & Kunkel, H. G., 1970).

Die Ausscheidungen von Leichtketten im Urin kann die Nierenfunktion erheblich beeinträchtigen und die Folgen für den Patienten können mannigfaltig sein. Die Ausfällung der Leichtketten in den Nierenkanälchen in Gegenwart von Uromodulin (Tamm-Horsfall-Protein) wirkt toxisch auf die Zellen der Niere und kann zum akuten Nierenversagen führen. Weiterhin können Leichtkettenablagerungen in den Nierenkanälchen das Fanconi-Syndrom auslösen, das sich in einer verminderten Ausscheidung von Säuren (Azidose) sowie einem erhöhtem Verlust von Phosphat, Glukose, Harnsäure und Aminosäuren äußert. Ablagerungen

von Leichtketten in den Basalmembranen von Nierenkörperchen hingegen gehen in der Regel mit erhöhter Proteinausscheidung im Urin und einem chronischen Nierenfunktionsverlust einher, der sogenannten Leichtketten-Ablagerungs-Krankheit (*light-chain deposition disease*). Dieselben Auswirkungen können auch eine Folge von Fibrillen-Bildungen sein, die sich durch die Verkettung von Leichtketten in ihren β -Faltblatt-Strukturen, in Form von Amyloid, Stärke-ähnlichen Strukturen im Nierengewebe und in den Nierengefäßen ablagern können (Dember, L. M., 2006).

1.2.8 Therapie (Stadium I)

Das Frühstadium (Stadium I) des MM, meist diagnostiziert durch Blutuntersuchungen, Röntgenbefunde der großen Knochen, gefolgt von einer Knochenmarkbiopsie mit anschließenden histologischen und/oder zytomorphologischen Untersuchungen, wird normalerweise zunächst nur beobachtet. Nur bei drohender Gefahr einer Nierenschädigung durch die meist defekten Antikörper oder deren Leichtketten wird eine Therapie eingeleitet.

1.2.9 Therapie (Stadium II)

Treten Symptome oder Komplikationen im Fortschreiten der Erkrankung (Stadium II) auf, wird eine Erstlinienbehandlung eingeleitet. Die Wahl der Erstlinientherapie hängt stark von patientenspezifischen Faktoren, z. B. zytogenetischen Risikofaktoren, den biologischen Eigenschaften des malignen Klon sowie der Verfügbarkeit neuester Medikamente ab. Die zu Beginn der 1980iger Jahre entwickelte Kombinationstherapie bestehend aus Melphalan-Hochdosischemotherapie mit nachfolgender Transplantation autologer Stammzellen gilt als „Meilenstein“ der Myelomtherapie. Hierbei wird entweder einmalig oder im Abstand weniger Monate zweimalig hoch dosiert Melphalan verabreicht, gefolgt von autologen Transplantationen. Dies gilt aktuell als Behandlungsoption mit der längsten rezidivfreien Überlebenszeit. Bei älteren (>70 Jahre) Patienten und/oder Patienten mit multiplen Komorbiditäten, die für eine Hochdosischemotherapie mit folgender Transplantation autologer Blutstammzellen nicht geeignet sind, wird häufig eine konventionelle Therapie (z.B. nach Alexanian, R., Barlogie, B. & Dixon, D., 1986) empfohlen. Durch die Einführung neuer Substanzen wie Thalidomid, Bortezomib und Lenalidomid konnte in den letzten Jahren das therapeutische Spektrum sowie die Therapieergebnisse deutlich verbessert werden. Bisphosphonate beispielsweise werden zur Hemmung der fortschreitenden Entwicklung von Osteolysen

verabreicht. Im Falle eines Rückgangs der Ig-Konzentration um 50 % im Serum kann von einer Remission gesprochen werden ([IMWG] *International Myeloma Working Group*, 2003).

1.2.10 Therapie (Stadium III)

Das Auftreten von Knochenschmerzen im Stadium III steigert die Gefahr pathologischer Frakturen. Das Mittel der Wahl zur Vermeidung von Frakturen ist die lokale Bestrahlung. Bereits bestehende Frakturen werden operativ fixiert. Bei Infektanfälligkeit werden Antikörper verabreicht, Anämien werden mit Bluttransfusionen behandelt. Das Hyperviskositäts-Syndrom kann vorübergehend mittels Plasmapherese behandelt werden. Als „Arzneimittel für seltene Leiden“ (*orphan drug*) steht seit 2001 das ehemals unter dem Namen Contergan bekannte Medikament Thalidomid nach dem „*compassionate use*“-Prinzip (Streurer, M. *et al.*, 2004) zur Verfügung. In Kombination mit einer Melphalan/Prednison-Therapie verbessert sich die Überlebensrate der Patienten wesentlich. Unter „*compassionate use*“ wird die Anwendung eines möglicherweise wirksamen, jedoch nicht zugelassenen Arzneimittels im Einzelfall bei Patienten in lebensbedrohlichen Situationen oder mit schwerwiegenden nicht oder nicht mehr anderweitig therapierbaren Erkrankungen im Rahmen der ärztlichen Behandlungspflicht und Therapiefreiheit verstanden. Im Jahr 2007 wurde von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) die perorale Darreichungsform von Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason bei Patienten zugelassen, die bereits mindestens eine vorausgegangene Therapie erhalten haben. Lenalidomid ähnelt in seiner Struktur dem Thalidomid, seine biologische Aktivität ist jedoch weitaus stärker. Beide Arzneimittel gehören zur Gruppe der immunmodulatorischen Arzneimittel (IMiDs). Im Falle von Rückfällen oder Therapieversagen ist die Kombinationstherapie von Lenalidomid und Dexamethason aussichtsreicher als die Behandlung mit Dexamethason alleine (Dimopoulos, M. *et al.*, 2007).

In der weiteren Behandlung von MM Patienten hat sich die autologe Knochenmarkstransplantation nach vorhergehender Bestrahlung bewährt. Nach dem Auftreten von Komplikationen liegt die mediane Lebenserwartung eines MM-Betroffenen ohne Behandlung bei 6 Monaten, eine Chemotherapie mit Melphalan und Prednison kann das mediane Überleben der Patienten auf 3 Jahre erhöhen und die Kombinationstherapie aus Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation erhöht das mediane Überleben der MM-Patienten weiter auf 5 Jahre.

1.2.11 Stand der Forschung

Die maligne Entartung der Plasmazellen findet nach heutigem Stand der Forschung außerhalb des Knochenmarks in den Keimzentren peripherer lymphatischer Organe statt. Die B-Zellen, die in die Lymphknoten abwandern, um zu reifen Plasmazellen auszudifferenzieren, haben bereits die ersten Differenzierungsschritte (*V-D-J-rearrangement*; *Isotyp-switch*) durchlaufen. Nach dem heutigen Wissensstand wird vermutet, dass es bei der Ausdifferenzierung der Plasmazellen in den Lymphknoten zu genetischen Veränderungen kommt, die letztendlich zur Ausprägung eines MM führen. Bei den meisten MM-Patienten (ca. 80 %) können chromosomale Translokationen entdeckt werden, bei denen das *Ig-enhancer*-Gen auf Chromosom 14q31 mit dem auf Chromosom 4 liegenden Gen des *Fibroblast Growth Factor Receptors* (4q16.3), dem auf Chromosom 6 befindlichen Gen von Cyclin D3 (6p21), den auf dem Chromosom 11 lokalisierten Genen Bcl-1 und Cyclin D1, dem auf Chromosom 20 gelegenen *maf8* (20p11) Gen oder dem auf Chromosom 16 befindlichem C-*maf* (16q23) Gen fusioniert vorliegt. Selten wurden auch Translokationen mit den Genen *c-myc* (8q24), *bcl-2* (18q21), *MLL-1* (11q23) sowie *mafB* (20q11) festgestellt.

Einige dieser Gene sind in Bezug auf diese Arbeit von größerer Relevanz, da sie sich entweder direkt in den Expressionsprofilen als differentiell exprimiert nachweisen ließen oder die Signalwege, an denen sie beteiligt sind, anderweitig reguliert waren (Bergsagel, L. P. & Kuehl, M. W., 2001). Näheres hierzu entnehmen sie Abschnitt 4.1.1 aus dem Ergebnisteil Kapitel 4 dieser Arbeit.

Anschließend an die klonale Vermehrung einer entarteten Plasmazelle beginnt die Infiltration des Knochenmarks mit einhergehender Zerstörung des Knochens (Osteolysen) und der Veränderung der „normalen“ Hämatopoiese.

In klinischen Beobachtungen erkannte die hiesige Arbeitsgruppe, dass sich bei ca. 75 % aller neudiagnostizierten MM eine Anämie ausprägt. Die Mechanismen, die zur Ausprägung einer solchen Anämie führen, sind bis *dato* weitestgehend spekulativ und waren daher Teil und Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit.

Die Entstehung von Osteolysen während der Infiltration des Knochenmarks durch entartete Plasmazellen ist vermutlich die Folge der erhöhten Ausscheidung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch die malignen Zellen, die zur Aktivierung von Osteoklasten führen, welche für den systematischen Abbau des Knochengewebes verantwortlich sind. Dies führt zumeist wiederum zu einem erhöhten Kalzium-Spiegel im peripheren Blut (Hyperkalziämie).

2. Zielsetzung

Patienten mit MM zeigen häufig bereits bei Initialdiagnose hämatopoietische Insuffizienzen meist in Form einer ausgeprägten Anämie, seltener einer Leukopenie oder Thrombopenie (Zhang, L. *et al.*, 2010; Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V., 2009, 2008; Li, J. *et al.*, 2008; Kyle, R. A. *et al.*, 2003). Daher stehen im Fokus dieser Arbeit die Einflüsse maligner Zellen des MM auf die Hämatopoiese. Im Speziellen sollten die Einflüsse auf hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst transkriptionelle Expressionsprofile von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellsubpopulationen (HSPC) aus MM- und gesundem Knochenmark verglichen, um nähere Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Mechanismen und beteiligten intrazellulären Signalwege der Veränderungen zu erlangen. Anschließend an die Identifizierung betroffener Mechanismen soll deren funktionelle Relevanz in MM-HSPC im Vergleich mit einem gesunden Kontrollkollektiv überprüft werden.

3. Material & Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die für molekularbiologische Methoden verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Zusammensetzung der Versuchsansätze wurden, wenn nicht gesondert angegeben, nach den Beschreibungen und Angaben aus *Molecular Cloning* von Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., 1989 angesetzt und durchgeführt. Als Wasser für Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (A. dest.), für sämtliche molekularbiologischen Techniken DNase- und RNase-freies Wasser (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), verwendet.

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

3.1.1.1 Standard-Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte modifiziert nach der von Birnboim, H. C. & Doly, J. (1997) entwickelten Methode beruhend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.

Mix I (pH 8.0):	50	mM	Tris-HCl
	10	mM	EDTA
Mix II:	200	mM	NaOH
	1	%	SDS (w/v)
Mix III (pH 4.8):	3	M	Kaliumacetat
	1,8	M	Natriumformiat
TE-Puffer (pH 8.0):	10	mM	Tris-HCl
	1	mM	EDTA

Aus einer unter Selektionsdruck angezogenen ÜK wurden 2 ml entnommen und die Bakterienzellen durch Zentrifugation (3 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT) geerntet. Nach vollständiger Entfernung des Kulturüberstandes wurde das verbliebene Sediment in 300 µl Mix I resuspendiert und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Mix II

hinzugegeben, das Gemisch vorsichtig mehrmals invertiert und für max. 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Mix III und 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die entstandenen Protein-SDS-Präzipitate, die gefällte chromosomale DNA sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (25 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT) sedimentiert. Der klare, die Plasmid-DNA enthaltende, Überstand wurde abgenommen, mit 10 µl einer Stammlösung Ribonuklease A [2 mg/ml] versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Ethanol- (Abschnitt 3.1.4.1) oder Isopropanolfällung (Abschnitt 3.1.4.2) wurde die Plasmid-DNA in 30-50 µl A. dest. oder 0,1 × TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.1.2 Standard-Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von größeren Mengen endotoxinfreier Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem EndoFree© Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer.

3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde in dieser Arbeit vorrangig an CD34⁺-Primärzellen aus Knochenmark vorgenommen. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus immunomagnetisch angereicherten CD34⁺-Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben unter Verwendung der beinhalteten Puffer durchgeführt. Zur Entfernung unerwünschter DNA wurde das RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen verwendet. Die RNA wurde anschließend an die Präparation bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Abweichend wurde Gesamt-RNA aus sortierten Subpopulationen aufgrund der meist geringen Zellzahlen mittels des RNeasy Micro Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben gewonnen.

3.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Chloroform-Isoamylalkohol:	96	%	Chloroform (v/v)
	4	%	Isoamylalkohol (v/v)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol:	50	%	Phenol(TE-gesättigt) (v/v)
	48	%	Chloroform (v/v)
	2	%	Isoamylalkohol (v/v)

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Aufreinigung von Nucleinsäuren aus nucleinsäure- und proteinhaltigen Lösungen. Die Probe wurde mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol intensiv durch Schütteln auf einem Rührschüttler gemischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT). Die nucleinsäurehaltige Oberphase wurde sorgfältig abgenommen, mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol vermischt und erneut zentrifugiert (3 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT). Anschließend wurde die von Phenolresten gereinigte, nucleinsäurehaltige Oberphase in ein neues Eppendorf- (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) Gefäß (EPG) überführt und die enthaltene DNA durch eine Ethanol-fällung (Abschnitt 3.1.4.1) präzipitiert.

3.1.4 Präzipitation von DNA

Bei der alkoholischen Fällung wird die Eigenschaft des Alkohols genutzt, die Hydrathülle der Nucleinsäuren in wässriger Lösung zu verdrängen. Die DNA fällt dabei in Gegenwart eines Salzes (z.B. Kaliumacetat in Mix III; Abschnitt 3.1.1.1) aus.

3.1.4.1 Ethanol-fällung

Wässrige nucleinsäurehaltige Lösungen wurden mit dem 2,5 fachen Volumen eiskaltem Ethanol (absolut) und 0,1 Volumen 3 M Kaliumacetat (Mix III; Abschnitt 3.1.1.1) durch Invertieren gemischt und für 10 min bei -80 °C oder ÜN bei -20 °C inkubiert. Die so präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT) sedimentiert und überschüssige Salze durch Waschen mit 70 %igem Ethanol (v/v) entfernt. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT) wurde die DNA

an der Luft oder in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde sie in A. dest. oder 0,1 × TE-Puffer (Abschnitt 3.1.1.1) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.4.2 Isopropanolfällung

Bei mittels Standard-Mini-Präparation (Abschnitt 3.1.1.1) gewonnener Plasmid-DNA zum Einsatz in Testrestriktionen mittels Restriktionsendonukleasen wurde auf eine Phenol-Chloroform-Extraktion verzichtet und statt der Ethanol- (Abschnitt 3.1.4.1) eine Isopropanolfällung (Abschnitt 3.1.4.2) durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-haltige wässrige oder salzige Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) vermischt und anschließend zur Sedimentierung der präzipitierten DNA zentrifugiert (30 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT). Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Sediment mit 400 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und zentrifugiert (5 min, 13000 Upm, Heraeus Biofuge, RT). Die gefällte DNA wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge oder an der Luft getrocknet und in A. dest. oder 0,1 × TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Ethidiumbromid-Lösung:	0,5	%	Ethidiumbromid (v/v)
TBE-Puffer (pH 8.3):	89	mM	Tris-Base
	89	mM	Borsäure
	2,5	mM	EDTA
DNA-Probenpuffer (5x):	100	mM	EDTA
	43	%	Glycerol (v/v)
	0,05	%	Bromphenolblau (w/v)
DNA-Molekulargewichtsstandard:	Quick-Load™ 2-Log DNA Ladder [10kb - 0,1kb] (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)		

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Trennverfahren basierend auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld. Nukleinsäuren, die auf Grund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis besitzen, wandern durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht und ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Diese Form der Gelelektrophorese fand Verwendung zur Analyse von PCR-Fragmenten (Abschnitt 3.1.8) und zur präparativen Isolierung bestimmter DNA-Fragmente. Für die Gelmatrix wurden abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente Agarosegelskonzentrationen zwischen 0,8 % - 1,5 % (w/v) in $0,5 \times$ TBE-Puffer eingesetzt. Zur Sichtbarmachung der DNA im Gel wurden je ml der aufgekochten Agaroselösung $0,1 \mu\text{l}$ einer Ethidiumbromidstammlösung ($10 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem entsprechenden Volumen eines $5 \times$ DNA-Probenpuffers versetzt. Die Elektrophoresen wurden in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand mit $0,5 \times$ TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach der Elektrophorese durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254\text{-}366 \text{ nm}$). Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA-Doppelstränge interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht Strahlung im sichtbaren Bereich ($\lambda = 590 \text{ nm}$) emittiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (*Alpha-Imager*) von Cell Biosciences Inc. (Santa Clara, CA, USA).

3.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von sowohl DNA, RNA als auch Protein erfolgte an einem Spektralphotometer (Nanodrop™) der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland). Als Referenz diente das verwendete Wasser oder der die Nukleotide oder Proteine beinhaltende Puffer.

3.1.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten im Anschluss an eine Agarosegelelektrophorese erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit der Firma GE Healthcare unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach den Herstellerangaben.

3.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(modifiziert nach Saiki, R. K. *et al.*, 1988)

Bei der PCR werden bestimmte DNA-Bereiche *in vitro* aus einem Gemisch von DNA-Molekülen selektiv angereichert. Ein typischer PCR-Ansatz besteht aus einer thermostabilen DNA-Polymerase, genomischer- oder Plasmid-DNA als Matrize, zwei Oligonukleotid-Primern, die in weiten Bereichen ihrer Sequenz komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind, sowie dem DNA-Polymerasepuffer und einem dNTP-Mix.

Das Prinzip der PCR beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten innerhalb von 25-40 Zyklen:

- 1. Denaturierung der Matrizen-DNA
- 2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen
- 3. Elongation der an die Matrizen-DNA angelagerten Oligonukleotide durch die DNA-Polymerase

Die in Punkt 2. aufgeführte Hybridisierung erfolgt an beide Strängen der Matrizen-DNA, wodurch sich die DNA in einem Zyklus theoretisch verdoppelt. Zur Amplifizierung wurden die *Phusion® Hot Start High-Fidelity-Polymerase* von New England Biolabs verwendet. Diese besitzt eine 5' → 3' Exonuklease-Aktivität (*proofreading*).

Reaktionskomponente	Konzentration
Oligonukleotid Up	5-10 pmol
Oligonukleotid Down	5-10 pmol
Polymerase-Puffer	1 × Puffer
dNTP-Mix	0,2 mM
DNA-Polymerase	2,5 U
Matrizen-DNA	50 ng
A. dest.	ad 50µl

Tabelle 3.1: Konzentrationen der Reaktionskomponenten einer Standard-PCR

Die PCR wurde in dem PCR-Automaten *Mastercycler Gradient* der Firma Eppendorf durchgeführt.

Schritte	Temperatur / °C	Dauer / min
vollständige Denaturierung	98	5
Denaturierung	98	0,8
Hybridisierung	55-70	0,5-1
Elongation	72	0,5-3
finale Elongation	72	10


 × 25-40

Tabelle 3.2: Standard PCR-Programm

Die Hybridisierungstemperatur wurde nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide anhand der Formel nach Baldino, F. *et al.* (1989) berechnet:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot (\log_{10}[J^+]) + 0,41 \cdot (\%(G + C)) - \left(\frac{675}{n} \right) - (\%Fehlpaarungen) - 0,63 \cdot (\%FA)$$

Einen Richtwert stellt folgende Formel dar: $(T_{m1} + T_{m2})/2$, weniger 2–5 °C. Die Elongationsdauer wurde abhängig von der Prozessivität der eingesetzten Polymerase gewählt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in Agarose-Gelelektrophoresen analysiert (Abschnitt 3.1.5).

3.1.8.1 Primerdesign

Oligonukleotide (Primer) wurden *in silico* unter Verwendung der NCBI- und *Ensemble-Genome-Browser*-Datenbanken, des *Jena-Bioscience-Oligocalculator* und der NCBI-BLAST-Funktion (*basic-local-alignment-tools*) erstellt und als Auftragsarbeit von der Firma Invitrogen (San Diego, CA, USA) bezogen.

Online-Datenbanken und Programme:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/154_oligonucleotide_data_calculation.html

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Ein Standard-Primer sollte mindestens 13, maximal 25 hybridisierende Basen besitzen. Die Schmelztemperaturen sollten im Idealfall ≥ 60 °C sein, dies gilt sowohl für Oligos < 20 Basen im Tm_1 als auch für Oligos > 20 Basen im Tm_2 . Als Hinweis auf die Spezifität der einzelnen Primer wird der Datenbankabgleich (BLAST) verwendet, wobei eine höchst mögliche Übereinstimmung des Oligos mit dem Zielgen ausschlaggebend ist.

Je nach Verwendungszweck wurden weitere Voraussetzungen an die Primer gestellt:

Primer für Sequenzierungen wurden so erstellt, dass ihre Amplifikationsprodukte nicht größer als 750 Basen lang waren. Sollten längere DNA-Fragmente sequenziert werden, wurden mehrere, sich überlappende Primerpaare verwendet.

Primer, die in der quantitativen-*Realtime*-PCR Verwendung fanden, wurden so erstellt, dass mindestens ein Oligo eines Primerpaares exonübergreifend war, um Amplifikate aus Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden.

Klonierungsprimer wurden nach Bedarf mit den Restriktionsendonuklease-spezifischen, kodierenden Sequenzen verlängert.

3.1.8.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (rT) wird durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen, auch reverse Transkriptasen genannt, katalysiert. Bei der rT wird mRNA in DNA umgeschrieben, hierbei entsteht zunächst aus einer einzelsträngigen RNA ein RNA-DNA-Hybridstrang. Der RNA-Anteil dieser Hybriden kann durch die RNase H Aktivität des Enzyms abgebaut werden und anschließend durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase zu einem doppelsträngigen DNA-Strang vervollständigt werden.

Vorrangig wurde in dieser Arbeit Gesamt-RNA aus immunomagnetisch angereicherten CD34⁺-Zellen (Abschnitt 3.2.4) in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mittels der *M-MLV-RT* der Firma Invitrogen in einem Reaktionsvolumen von 40 µl. Zunächst wurde die Gesamt-RNA (mindestens 20 ng) in 20 µl RNase freiem Wasser für 5 min bei 65 °C denaturiert, anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Darauffolgend wurde die RNA mit 20 µl rT-Mastermix versetzt und für 2 h bei 37 °C in einem PCR-Automaten *Mastercycler Gradient* der Firma Eppendorf inkubiert. Im Anschluss folgte die Inaktivierung der rT-Reaktion durch eine 10 minütige Inkubation bei 65 °C. Die so erzeugte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Zusammensetzung des rT-Mastermix ist der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

rT-Reaktionen, die an Gesamt-RNA sortierter Subpopulationen durchgeführt wurden, wurden verwendet, um Affymetrix™ GeneChips (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) zu erstellen, daher sind diese abweichenden Präparationen dem Abschnitt 3.1.2 zu entnehmen.

Bestandteile	Menge	Endkonzentration im Mastermix	Firma
RT-First-Strand-Buffer (5x)	8 µl	1x	Invitrogen
dTT (0,1M)	0,4 µl	0,4 µM	Invitrogen
dNTPs (10 mM)	4 µl	40 mM	GE Healthcare
N6-Primer	1,2 µl	100 ng	New England Biolabs
M-MLV-RT (200 Einheiten/µl)	1,25 µl	250 Einheiten	Invitrogen
RNAsin (≈30 Einheiten/µl)	0,65µl	≈19,5 Einheiten/µl	Promega

Tabelle 3.3: rT-Mastermix

3.1.8.3 Quantitative-*Realtime*-PCR

Die quantitative-*Realtime*-PCR (q-RT-PCR) wurde zur Validierung der in den Affymetrix™ GeneChips (Affymetrix Inc.) differentiell exprimierten Gene verwendet. Hierfür wurde das *LightCycler*® *FastStart* DNA *Master*^{PLUS} *SYBR Green* I Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet. Die Minimumgrenze eingesetzter Gesamt-RNA war 20 ng. Als interne Reverenz wurden Oligonukleotide gegen GapDH verwendet. Das Standardprotokoll ist in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Schritte	Temperatur / °C	Dauer / min
vollständige Denaturierung	98	5
Denaturierung	98	0,5
Hybridisierung	57-62	0,5-1
Elongation	72 (Endpunktmessung)	0,5-1
finale Elongation	72 (Endpunktmessung)	10
Schmelzkurvenanalyse	98 bis 20 (Messung je °C Temperaturabsenkung)	10

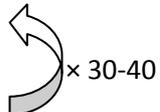


Tabelle 3.4: Standard RT-PCR-Programm

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit erstellten Sequenzierungen von rekombinanten Plasmiden wurden als Auftragsarbeit vom BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

3.1.10 RNA- und cDNA-Qualitätsanalyse

Die Qualitätskontrollen isolierter Gesamt-RNA und amplifizierter cDNA wurde mittels des Agilent 2100 *Bioanalyzer* und der zugehörigen *LabChip*™-Technologie (RNA-6000 Pico-Chip-Kit) der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) als Auftragsarbeit durch das BMFZ des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

3.1.11 Hybridisierung von Affymetrix™ GeneChips

Die Affymetrix™ Genechip-Technologie (Affymetrix Inc.) basiert auf dem quantitativen Nachweis von spezifischen RNA- oder DNA-Molekülen von Interesse in isolierten Gesamt RNA- bzw. DNA-Proben. Diese RNAs oder DNAs von Interesse binden an spezifische, auf den Genechips verankerten Oligonukleotiden und werden unter Verwendung von Fluorochromen detektiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Affymetrix Genechips™ *Human Genome 133a 2.0* (Affymetrix Inc.) beinhalten 18400 unterschiedliche Bindungsstellen für die Transkripte bzw. Varianten von 14500 bekannten Genen. Die Hybridisierung der Chips zum Nachweis exprimierter RNAs aus isolierten Gesamt-RNA Proben setzt vier präparative Schritte voraus.

Schritt 1: Synthese und Aufreinigung doppelsträngiger cDNA

Sowohl die Erststrang- und Zweitstrang-cDNA-Synthese als auch die Reinigung der doppelsträngigen cDNA wurden nach Herstellerangaben mit dem *WT-Ovation™* Pico RNA *Amplification System* der Firma NuGEN Technologies Inc. (San Carlos, CA, USA) durchgeführt. Hefe-transfer (t)RNA als Träger (*carrier*) wurde ergänzend von der Firma Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX, USA) bezogen und den Magnet-basierten Reinigungs-Reaktionen mit je 50 ng zugefügt.

Schritt 2: Amplifikation und Reinigung der Gesamt-cDNA

Auch die Amplifikation der Gesamt-cDNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *WT-Ovation™* Pico RNA *Amplification*-Kit der Firma NuGEN Technologies Inc. nach Herstellerangaben unter Verwendung der beinhalteten Puffer.

Die Reinigung der Gesamt-cDNA erfolgte abweichend mit dem *DNA-Clean & Concentrator™* Kit der Firma Zymo Research Corporation (Orange, CA, USA) nach Herstellerangaben.

Schritt 3: Fragmentierung der Gesamt-cDNA

Die Fragmentierung der Gesamt-cDNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *FL-Ovation™* cDNA Biotin *Module V2* Kit der Firma NuGEN Technologies Inc. durchgeführt.

Schritt 4: Biotin Konjugierung der cDNA-Fragmente

Die Markierung (*labeling*) der cDNA-Fragmente mittels Biotin erfolgte nach den Herstellerangaben mit dem *FL-Ovation™* cDNA Biotin *Module* V2 Kit der Firma NuGEN Technologies Inc. mit den beigefügten Reagenzien.

Chip-Hybridisierung:**Nicht stringenter Waschpuffer (A):**

6	×	SSPE	(BioWhittaker, Inc., Walkersville, MO, USA)
0,01	%	Tween 20	(Pierce Chemical Company, Rochford, IL, USA)

Stringenter Waschpuffer (B):

100	mM	MES	
0,1	M	NaCl	(Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NY, USA)
0,01	%	Tween 20	(Pierce Chemical)

2x Stain Puffer:

100	mM	MES	
1	M	NaCl	(Sigma Aldrich)
0,05	%	Tween 20	(Pierce Chemical)

2x MES Hybridisierungspuffer:

100	mM	MES	
1	M	NaCl	
20	mM	EDTA	(Sigma Aldrich)
0,01	%	Tween 20	(Pierce Chemical)

12x MES Stock-Lösung pH 6,6:

1,22	M	MES	(Sigma Aldrich)
0,89	M	NaCl	(Sigma Aldrich)

Alle hier aufgeführten Puffer müssen steril filtriert werden (0,2 µm Porengröße) und können kurzzeitig bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Für die eigentliche Hybridisierung wurden je Chip mindestens 5 µg der vorbereiteten Gesamt-cDNA verwendet. Der Ablauf der Hybridisierung wird nachfolgend näher erläutert. Zunächst wurden je Ansatz 15 µl der 20 × Eukaryotischen Hybridisierungs-kontrolle für 5 min bei 65 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden je 300 µl des Hybridisierungsmix je Ansatz pipettiert:

Bestandteil	Angabe in µl
Fragmentierte cDNA	30
Kontroll Oligo B2	5
20x-Eukaryotische	15
DNA aus Lachssperma	3
Acetyliertes BSA	3
DMSO	30
A. dest.	64
2x-MES-Hybridisierungspuffer	150
Gesamt	300

Tabelle 3.5: Standard Hybridisierungsmix

Im Anschluss wurde der Hybridisierungsmix in einem Heizblock erst für 5 min bei 99 °C und dann für 5 min bei 45 °C inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungsmix für 5 min bei 16000 × g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Währenddessen wurden die Chips mit je 200 µl MES-1 × Hybridisierungspuffer über die Septa befüllt und für 10 min bei 45 °C und 60 Upm in einem Hybridisierungs-Ofen prähybridisiert. Nach Entfernung der Prähybridisierungslösung wurden die Proben in 200 µl Hybridisierungslösung aufgenommen und auf die Chips gegeben. Dann folgte die 16 stündige Hybridisierung im Hybridisierungs-Ofen bei 45 °C und 60 Upm ÜN.

3.1.12 Bioinformatische & statistische Auswertung von Affymetrix™ GeneChips

Die Auswertung der Affymetrix™ Chip (Affymetrix Inc.) Daten erforderte zunächst eine Normalisierung der Datensätze, hierfür wurde die „*variance stabilizing*“ Methode und die von Huber, W. *et al.*, 2002 für diesen Zweck entwickelte Software verwendet (<http://www.dkfz.de/abt0840/whuber>). Die zusammenfassende Gruppierung der Datensätze

wurde mittels „*median polish*“ durchgeführt, einem Forschungsdatenanalyseverfahren das von den Statistikern Mosteller, F. & Tukey, J. (1977) entwickelt wurde. Zur Identifikation der differentiellen Expression der Gene zwischen den verschiedenen HSPC-Subpopulationen wurde der auf Breitling, R. *et al.*, 2004 zurückzuführende „*rank product*“ Test verwendet. Der „*rank product*“ Test ist ein nicht parametrischer Test, der für kleine Stichprobengrößen in den Microarrayanalysen besonders gut anwendbar ist. Gene wurden zwischen zwei Subpopulationen als differentiell exprimiert bzw. reguliert angesehen, wenn das sogenannte „*rank product*“ eine falsch positive Rate niedriger 0,05 aufwies. Gene, deren „*rank product*“ oberhalb dieses Schwellenwertes lag, wurden als nicht reguliert angenommen. Die Gesamtheit aller als signifikant regulierten Gene des „*rank product*“ Testes wurden anschließend verwendet, um eventuell beeinträchtigte, intrazelluläre, Signalwege zu identifizieren. Hierfür wurden die Daten mit der Datenbank von Biocarta abgeglichen (http://pid.nci.nih.gov/browse_pathways.shtml#biocarta). Zur Überprüfung der Relevanz der Beeinträchtigung der aus dem Abgleich resultierenden Signalwege wurde der von Goeman, J. J. *et al.*, 2004 entwickelte „Globaltest“ durchgeführt. Zur Feststellung der Signifikanz einer Beeinträchtigung wurde der „Cochran´s Q“ Test verwendet. Die so ermittelten Signifikanzen kombiniert mit den Resultaten des „Globaltest“ sind ein Maß dafür, wie stark die Gengruppen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen der Versuchsreihe unterschieden werden können. Statistische und numerische Analysen wurden in R-statistischer Programmierungsumgebung vorgenommen, wobei das "Bioconductor *toolset*" (<http://www.bioconductor.org>) verwendet wurde. Datenbankabfragen und Restrukturierung wurden mittels eigens erstellten PERL-„*scripts*“ (*Practical Extraction and Report Language* / spezielle Programmiersprache) vorgenommen.

Weitere Datenbankabgleiche zur Identifizierung und Klassifizierung einer Regulation wurden mittels des *Advanced Pathway Painter* (APP) Programmes und den Datenbanken von Biocarta, Kegg und NCBI durchgeführt. Die gezeigten Abbildungen von Signalwegen in dieser Arbeit wurden ebenfalls mit dem frei erhältlichen Programm APP erstellt (<http://pathway.painter.gsa-online.de>).

Die Genexpressionsanalysen erfüllen die von Staal, F. J. *et al.*, 2006 publizierten Richtlinien von drei Europäischen Leukämie Netzwerken.

Die Bestimmung der *Correlation entropy* wurde als Kooperationsarbeit von Dr. Frederik Roels aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt.

3.1.13 Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung) (Peterson, G. L., 1977)

Zur Fällung von Proteinen wurde 1 Volumen der wässrigen Proteinprobe mit 0,1 Volumen 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat versetzt, intensiv vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 70 % (v/v) TCA und weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Proteine sedimentiert (10 min, 13000 Upm, EZ, RT) und zweimal mit 80 % Aceton gewaschen. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge oder an der Luft getrocknet und in SDS-Probenpuffer (Abschnitt 3.1.17) aufgenommen. Ein durch TCA-Reste auftretender Farbumschlag des SDS-Proben-puffers von blau nach gelb konnte durch Zugabe von 1 µl 1 M NaOH abgepuffert werden. Die so behandelten Proteinproben wurden durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.1.17) analysiert.

3.1.14 Protein- & RNA-Isolation mittels Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion

Die Extraktion mittels Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform ermöglicht sowohl die Isolation von Gesamt-RNA, -DNA als auch von -Protein aus Zellen oder Geweben. Für die Isolation von Gesamt-RNA und -Protein aus CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark wurden bis zu 3×10^6 Zellen anschließend an die in Abschnitt 3.2.4 beschriebene immunomagnetische Anreicherung in jeweils 200 µl PBS aufgenommen und im Anschluss mit 200 µl TriFast-Reagenz (PEQLAB), in Chloroform-resistenten Gefäßen vermischt. Für adhärente Zellen in der Zellkultur wurden jeweils 1 ml TriFast-Reagenz pro 10 cm² Fläche (Zellkulturschale) bzw. 100 mg Gewebe verwendet und schnell homogenisiert. Nach erfolgter Homogenisation wurden die Proben für 5 min zur Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurde den Homogenisaten 0,2 ml Chloroform/ml Reagenz hinzugeben und für 15 sec kräftig geschüttelt. Anschließend an eine 3 minütige Inkubation bei RT wurden die Homogenisate bei $5000 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation entstehende Auftrennung enthält die Gesamt-RNA in der oberen, wässrigen

Phase, DNA und Protein befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der Inter- und organischen-Phase. Die wässrige, die RNA beinhaltende Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.

RNA-Isolation:

Durch das Vermischen der wässrigen, die RNA beinhaltenden Phase mit 0,5 ml Isopropanol/ml Reagenz wurde die RNA in einer 10 minütigen Inkubation bei RT präzipitiert und anschließend bei $10000 \times g$ für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Das Pellet wurde dann mit 1 ml 75 %igem EtOH/ml Reagenz gewaschen. Hierbei war darauf zu achten, dass der 75 %ige EtOH zuvor mit RNase-freiem-A. dest. hergestellt wurde. Nach anschließender 5 minütiger Zentrifugation bei $5000 \times g$ und 4°C konnte der Überstand vollständig dekantiert werden und die RNA in einem adäquaten Volumen RNase-freim-A. dest. aufgenommen werden. Dann folgte noch eine 10 minütige Inkubation bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, bevor die RNA-Konzentration wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben photometrisch bestimmt und anschließend bei -80°C gelagert wurde.

Proteinisolation:

Durch die Zugabe von 0,3 ml 98 %igem EtOH/ml Reagenz zu Inter- und organischer-Phase, wurde die DNA nach mehrfachem Invertieren in einer 3 minütigen Inkubation bei RT präzipitiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei $1500 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min konnte der Phenol-EtOH-Überstand, der ausschließlich das Gesamt-Protein enthält, abgenommen werden. Der die Proteine beinhaltende Überstand wurde im nächsten Schritt mit jeweils 1,5 ml Isopropanol/ml Reagenz durch Invertieren vermischt. Nach anschließender, 10 minütiger Inkubation bei RT erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei $12000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das die Proteine enthaltene Pellet wurde dann mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 %igem EtOH jeweils $3 \times$ gewaschen. Hierfür wurden die Proben 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min bei $12000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach der vollständigen Dekapitation wurde das Protein-Pellet mit 98 %igem EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Protein-Pellets in 1 %iger SDS-Lösung resuspendiert und auf $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die Messung der Konzentration erfolgte mittels Bradford-Analyse (Abschnitt 3.1.15). Die Lagerung der Proteine erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

(Bradford, M. M., 1976)

Referenzlösung:	100	μl	A. dest.
	900	μl	Bradford-Reagenz
Bradford-Reagenz:	100	mg	Serva-Blau G
	in 85	%	Ortho-Phosphorsäure (v/v)
	460	ml	Ethanol
	ad 1000	ml	A. dest.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurden 100 μl der Probe mit 900 μl Bradford-Reagenz vermischt, 5 min bei RT inkubiert und die O.D._{595 nm} spektralphotometrisch gegen die Referenzlösung ermittelt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit BSA-Standard-lösungen (25, 50, 100, 150 μg/ml) vor jeder Messreihe neu erstellt wurde. Alternativ wurde das *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.16 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine zunächst in einer SDS-PAGE (Abschnitt 3.1.17) aufgetrennt, anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Immunoblot-Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) transferiert (Abschnitt 3.1.19), somit immobilisiert und dann über einen indirekten Enzym-Immunversuch (Abschnitt 3.1.20) nachgewiesen.

3.1.17 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, U. K., 1970)

Acrylamid-Stammlösung:	29,2	g	Acrylamid (37:1)
	0,8	g	N,N'-Methylenbisacrylamid
	ad 100	ml	A. dest.

SDS-Probenpuffer:	50	mM	Tris-HCl, pH 6,8
	10	%	Glycerol (v/v)
	4	%	SDS (v/v)
	2	%	β -Mercaptoethanol (v/v)
	0,03	%	Bromphenolblau (w/v)

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8):	25	mM	Tris-HCl
	192	mM	Glycin
	0,1	%	SDS (w/v)

Molekulargewichtsstandards:

Precision Plus ProteinTM Standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 200 kDa

PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

11; 17; 24; 33; 40; 55; 72; 100; 120; 170 kDa

Lösungen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid-Stammlösung	0,83 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	---	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	---
A. dest.	2,77 ml	3,35 ml
10 % SDS (w/v)	50 μ l	100 μ l
10 % APS (w/v)	50 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Tabelle 3.6: Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamidgelen (PA-Gel)

(die Mengenangaben gelten für zwei Gele mit den Maßen 7 cm [Länge] \times 8 cm [Breite])

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt und die Proteine während der Elektrophorese aufgrund ihres ähnlichen Masse/Ladungsverhältnisses nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer

versetzt, für 5-10 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur *Mini-PROTEAN Gelkammer II* (Bio-Rad Laboratories) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurde, während sich die Proben im Sammelgel befanden, eine Spannung von 100 V angelegt, welche beim Übertritt der Proben ins Trenngel auf 200 V erhöht wurde.

3.1.18 Coomassie Brilliant Blue-Färbung von SDS-Gelen

(nach Merril, C. R., 1990)

Entfärbelösung:	7	%	Essigsäure (v/v)
	5	%	Methanol (v/v)
Färbelösung:	10	%	Essigsäure (v/v)
	25	%	Methanol (v/v)
	0,2	%	Coomassie Brilliant Blue R250 (v/v)

Die Färbung von SDS-Gelen in Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung erfolgte nach der Elektrophorese bei RT unter langsamem Schütteln. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt, die alle 20 min bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes gewechselt wurde. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (Alpher-Imager).

3.1.19 Proteintransfer auf PVDF-Membranen (nach Yuen, S. W. *et al.*, 1989)

Transferpuffer:	48	mM	Tris
	39	mM	Glycin (pH 9,2)
	20	%	Methanol (v/v)
	0,0375	%	SDS (v/v)

Die mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.1.17) aufgetrennten Proteine wurden mittels des „*semi dry*“-blot Moduls der Firma Labor-Brand/Micro-Bio-Tec (Gießen, Deutschland) auf eine

PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurde das Modul an den *Elektrophoresis Power Supply EPS301* (Amersham Biosciences/GE-Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) angeschlossen. Der Transfer wurde für 30 min bei 15 V bzw. 400 mA durchgeführt. Vor dem Transfer wurde die Membran für 1 min in Methanol (absolut), dann für 5 min in A. dest. aktiviert. Anschließend für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Auch das Gel wurde für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in einem „semi dry“-blot Modul unter Verwendung von oben aufgeführtem Transferpuffer, der Apparaturaufbau ist der Abbildung 3.1 zu entnehmen.

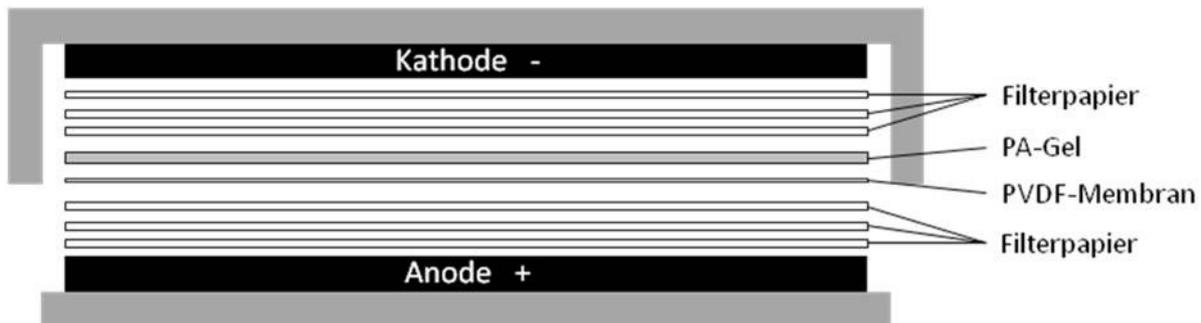


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des „semi dry“-Blotmoduls für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-PA-Gel auf eine PVDF-Membran

3.1.20 Immunodetektion (Western blot)

Färbelösung:	0,1	%	Amidoschwarz (w/v)
	45	%	Methanol (v/v)
	10	%	Essigsäure (v/v)

PBST-Puffer: 0,2 % Tween20 (v/v) in PBS-Puffer

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen wurden diese entweder für 1 Stunde bei 30 °C oder ÜN bei 4 °C in PBST-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden bei 30 °C und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurden die PVDF-Membranen zunächst für 10 min mit 25 ml PBST-Puffer gewaschen, anschließend für 3 h mit dem Erstantikörper, anti-phospho-SMAD2-AK (phosphoryliertes SMAD2 / pSMAD2) der Firma Cell Signaling Technology 1:1000 verdünnt in PBST-Puffer inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Membranen anschließend zweimal 30 min in

PBST-Puffer gewaschen. Danach wurden die Membranen mit dem Ziege-anti-Kaninchen-Zweitantikörper-HRP-Konjugat (Amersham Biosciences/GE-Healthcare Bio-Sciences) in einer 1:5000 Verdünnung in PBST-Puffer für 1 h inkubiert und erneut mit PBST-Puffer gewaschen (2×30 min, 4×5 min). Das auf die Membranen gebundene Protein konnte dann indirekt über die an den Zweitantikörper gebundene HRP mit Hilfe des ECL-Systems (*Amersham Enhanced Chemiluminescence Advanced Western Blotting Detection Kit*, GE-Healthcare) nachgewiesen werden. Dieses wurde nach den Herstellerangaben verwendet, wobei die Dokumentation entweder über die Belichtung eines Röntgen-films in einer Dunkelkammer oder an einem Luminographen, *Alpha-Imager* (Cell Bioscience Inc.), erfolgte.

Anschließend wurden die Membranen für 10 min in der Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt und an der Luft getrocknet, um die transferierten Proteinbanden inklusive des Molekulargewichtsstandards sichtbar zu machen.

3.2 Methoden der Zellkultur und Arbeiten an Primärzellen

3.2.1 Herkunft von Primärzellen und Patientencharakteristika

Alle Primärzellen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, stammten aus dem peripheren Blut oder aus Knochenmarkaspirationen von MM-Patienten oder von freiwilligen, gesunden Spendern.

Das Probenmaterial wurde ausschließlich nach Unterweisung und Zustimmung der Spender nach den gültigen rechtlichen Richtlinien akquiriert. Bei den gesunden Spendern wurde darauf geachtet, dass der Altersdurchschnitt dem der MM-Patienten ähnelt.

In Tabelle 3.7 sind die Patientencharakteristika dargestellt, die für die Klassifizierung des Stadiums des MM nach Duria und Salmon (DS) verwendet wurden.

Die Tabelle 3.8 beinhaltet die erfolgte Stadieneinteilung nach DS inklusive der Subtypzuordnung, einer Einteilung der MM-Stadien nach ISS, sofern möglich das Alter und

Geschlecht der Patienten sowie eine Zuordnung zu den Versuchsreihen, in denen die jeweiligen Proben Verwendung fanden.

Nummer	KM-Infiltration [%]	HB [g/dL]	Leukozyten [1000/ μ L]	Thrombozyten [1000/ μ L]	Kalzium [mM]	Osteolyse [0-1=0 / 1-5=1 / >5=2]
1	16	12.8	5.5	267	2.36	2
2	27	13	10	179	2.22	0
3	15	13.2	9	160	2.43	0
4	65	7.5	2.9	94	1.94	2
5	75	10.6	3.2	44	2.42	2
6	35	10.2	8	122	2.37	2
7	30	10.4	5.3	189	1.87	2
8	65	6.4	3.2	129	2	2
9	10	13.5	4.9	123	2.27	0
10	40	13.3	10.1	284	2.18	2
11	10	11.3	15.6	198	2.44	1
12	25	10.3	7.7	253	2.38	1
13	30	8.4	2.5	197	2.06	2
14	18	11.3	6.3	295	2.39	0
15	18	12.7	8.4	277	2.11	0
16	15	8.3	9.4	179	2.32	2
17	35	10.4	1.4	21	2.37	0
18	45	9.4	10.5	128	2.13	2
19	65	9.1	5.1	53	3.3	2
20	<5	8.8	3.7	208	2.24	0
21	20	11.8	8	324	2.1	2
22	12	15.8	9.8	350	2.47	2
23	30	10.7	2.4	246	2.21	0
24	40	8.1	13.6	167	1.97	0
25	>80	10.1	5.7	123	2.27	2
26	20	13.1	7.7	289	2.38	2
27	20	12.4	3.7	182	2.45	2
28	30	15.7	4	157	2.38	2
29	10	15.2	7.6	199	2.46	2
30	90	11.3	4.6	191	2.21	0
31	60	9.6	4.6	286	2.23	2
32	X	10.5	11.2	240	2.44	2
33	50	8.7	7.9	240	2.65	2
34	60	13	8.6	332	2.14	0
35	15	15.6	11.6	332	2.49	0
36	10	8.5	13.6	449	2.22	0
37	10	14.3	6.8	316	2.42	1
38	40	10.2	4.5	253	2.33	2
39	15	10.8	6.1	344	2.18	2
40	40	10.4	4.1	192	2.1	1
41	40	9.4	3.3	132	2.06	1
42	X	11.2	4.5	269	2.26	1
43	30	16.1	7.9	288	2.45	2
44	60	10.7	5.1	270	2.14	0
45	15	13.1	15.9	394	2.14	2
46	80	8.5	3.9	179	2.75	2
47	50	9.2	8	517	2.05	2
48	50	10.9	5.3	163	2.09	2
49	10	12.2	9.4	228	2.15	0
50	>90	10	10.5	69	3.87	2
51	80-90	9.9	6.1	199	2.17	2
52	>10	12.3	9.9	272	2.17	0
53	90	11.8	4.9	229	2.69	2
54	70-80	10	7.7	171	2.3	0
55	100	9.2	6.2	136	2.52	2
56	30	10	4.3	154	2.29	0
57	70	8.6	12.9	220	2.21	2

Tabelle 3.7: Patientencharakteristika für die Einteilung des MM-Stadiums nach DS

Nr.	Alter	Geschlecht	MM-Subtyp	Stadium [DS]	Stadium [ISS]	Versuchsreihe
1	72	w	IgG Kappa	III	I	CCS-FACS, QSA
2	71	m	IgG Kappa	IA	II	CCS-FACS, CFU-GEMM, LTC-IC, PA, QSA, SD-CFU-GEMM, SD-LTC-IC
3	82	m	IgG Lambda	IA	I	CCS-FACS, QSA, SM-FACS
4	74	w	IgG kappa	IIIA	III	CFU-GEMM
5	75	w	LC lambda	IIIB	II	QSA
6	79	m	LC Kappa	IIIB	III	x
7	84	w	IgA Lambda	IIIB	II	IF
8	80	m	IgG Kappa	IIIA	II	IF
9	79	w	IgG Lambda	IA	I	LTC-IC
10	45	m	IgA Lambda	IIIA	I	x
11	78	m	IgG Lambda	IIIA		MA, QSA
12	84	w	IgG+IgA Kappa	IIIA	II	x
13	79	w	IgA Kappa	IIIA	II	AA, BChA, IF
14	79	w	IgG kappa	IA	II	x
15	73	w	IgG Lambda	IA	x	CFU-GEMM, LTC-IC
16	70	w	IgG Lambda	IIIA	x	CFU-GEMM, MA, QSA
17	81	m	LC Kappa	IA	II	AA, BChA, QSA
18	69	w	IgA Kappa	IIIB	II	CCS-FACS, QSA
19	80	m	IgA Lambda	IIIB	I	CFU-GEMM
20	55	w	IgG Kappa	IIA	II	MA, QSA
21	61	m	IgG kappa	IIIA	x	x
22	78	w	IgG Lambda	IIIA	x	LTC-IC
23	52	m	IgG Lambda	IA	I	AA, IF
24	56	w	IgG Lambda	IIIA	II	CFU-GEMM, MA, QSA
25	78	m	IgG Kappa	IIIA	III	x
26	66	m	IgG Kappa	IIIA	II	x
27	63	m	IgG Kappa	IIIA	II	CFU-GEMM
28	59	m	IgA Lambda	IIIA	I	x
29	59	m	LC Kappa	IIIA	I	x
30	57	w	IgG Kappa	IA	I	CFU-GEMM, QSA
31	79	m	Bence Jones Kappa	IIA	I	CFU-GEMM
32	51	m	IgG Lambda	IIIA	I	x
33	52	w	IgG Lambda	IIIA	II	x
34	64	w	IgG Lambda	IIA	I	AA, BChA, IF
35	73	w	IgA Lambda	IA	I	LTC-IC
36	50	w	IgA Kappa / Bence Jones	IIA	II	LTC-IC
37	59	m	IgG Kappa	IIIA	I	x
38	66	m	IgA Kappa	IIIA	II	CFU-GEMM, MA, QSA
39	68	w	IgG Kappa	IIIA	I	x
40	69	m	IgG Kappa	IA	II	CFU-GEMM, QSA
41	71	w	IgG Kappa	IIIA	I	QSA
42	65	m	IgA Kappa	IIA	II	x
43	49	m	IgA Lambda	IIIA	I	x
44	48	m	IgA Lambda	IIIA	III	x
45	62	m	IgG Kappa	IIIA	II	PA
46	62	m	IgG lambda	IIIB	III	IHI
47	71	w	IgG Kappa	III	I	IHI
48	66	m	IgG Kappa	III	III	IF
49	70	f	IgG Kappa	<i>smoldering myeloma</i>		IF
50	65	m	Leichtkette lambda	IIIB	III	IF, IHI
51	54	m	IgG lambda	IIIA	II	IF, PA, SD-CFU-GEMM, SD-LTC-IC
52	49	m	LC lambda	IA	II	CC-FACS-BrdU, LTC-IC, PA, SD-CFU-GEM, SD-LTC-IC
53	52	m	LC kappa	IIIA	II	IHI, PA, SD-CFU-GEMM, SD-LTC-IC
54	65	m	LC lambda	IIIB	III	x
55	55	f	IgA kappa	IIIA	II	IHI
56	72	f	LC kappa	IIIB	III	CC-FACS-BrdU, PA, SD-CFU-GEMM, SD-LTC-IC
57	51	f	IgG kappa	IIIA	II	CC-FACS-BrdU, PA, SD-CFU-GEMM, SD-LTC-IC

Tabelle 3.8: Klassifizierung der MM-Stadien und Zuordnung der Patientenproben zu den jeweiligen Versuchsreihen

Die Erläuterung der Kürzel, die für die Zuteilung der Patienten zu den jeweiligen, funktionellen Versuchsreihen verwendet wurde, ist in Tabelle 3.9 mit dem Verweis auf den Abschnitt der Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihe dokumentiert. Alle in den Tabellen 3.7 und 3.8 erfassten Patientendaten wurden für Multivariat-Analysen verwendet. Proben, die in Tabelle 3.8 in der Spalte „Versuchsreihen“ mit einem x gekennzeichnet sind, wurden ausschließlich für die Multivariat-Analysen verwendet. Die Ergebnisse der Multivariat-Analysen sind in Abschnitt 4.4 aufgeführt.

Abkürzung	Versuchsreihe	Abschnitt im Kapitel Ergebnisse
AA	Adhäsionsversuche	4.2.5
BChA	Boyden Kammer basierte Migrationsversuche	4.2.6
CC-FACS-BrdU	Durchfulsszytometrische Zellzyklus Untersuchungen an CD34 ⁺ -Zellen mittels BrdU-Flow-Kit	4.3.4
CCS-FACS	Durchfulsszytometrische Zellzyklus Untersuchungen an HSPC-Subpopulationen mittels Ki67 und Hoechst33342	4.2.4
CFU-GEMM	<i>Colony forming unit-granulocyte_erythrocyte_monocyte_megaharyocyte</i> / Versuche zum Koloniebildungspotential später myeloider Vorläufer	4.2.1
IHI	Immunhistochemische Versuche	4.2.8
IF	Immunfluoreszenz Versuche	4.2.7
LTC-IC	<i>Long term culture-initiating cell</i> / Versuche zum Koloniebildungspotential früher myeloider Vorläufer	4.2.2
MA	<i>Mikro array</i> / Erstellung von Genexpressionsprofilen aus HSPC mittels Affymetrix™ Genchips	4.1.1
QSA	Quantitative HSPC-Subpopulations-Analyse	4.1.2
SD-CFU-GEMM	<i>Colony forming unit-granulocyte_erythrocyte_monocyte_megaharyocyte</i> / Versuche zum Koloniebildungspotential später myeloider Vorläufer unter Stimulationsbedingungen mit SD208	4.3.2
SD-LTC-IC	<i>Long term culture-initiating cell</i> / Versuche zum Koloniebildungspotential früher myeloider Vorläufer unter Stimulationsbedingungen mit SD208	4.3.3

Tabelle 3.9: Erläuterung der in Tabelle 3.8 verwendeten Kürzel und Zuordnung zu den jeweiligen Abschnitten der Versuchsreihen.

3.2.2 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt. Hierbei wurden die einzelnen Komponenten unter einer Sterilbank gemischt und mit einer Vakuumpumpe durch einen Flaschenaufsatzfilter in autoklavierte Schott-Flaschen steril filtriert. Medienreste wurden bei erneutem Gebrauch nach spätestens einer Woche erneut steril filtriert und mit den entsprechenden Mengen an L-Glutamin 100 U/ml und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetzt. Der pH-abhängige Farbindikator Phenolrot im Medium zeigt an, ob für

die Zellen im Medium optimale Bedingungen vorliegen (rot). Ein mangelnder CO₂-Gehalt wird durch eine pinke Färbung angezeigt. Gelbes Medium ist ein Indiz für einen erhöhten Stoffwechsel, dem starkes Zellwachstum oder auch Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze zugrunde liegen können.

AFT-Medium

80	%	DMEM (low Glucose)	(Sigma Aldrich)
20	%	FCS	(Biochrom)
100	U/ml	L-Glutamin	(Sigma Aldrich)
100	U/ml	Pen/Strep	(Sigma Aldrich)
0,03	mM	β-Mercaptoethanol	(Sigma Aldrich)

LTB-MC Medium

75	%	IMDM	(Gibco)
12,5	%	HSA for human long-term culture	(Stemcell Technologies)
12,5	%	FCS for human long-term culture	(Stemcell Technologies)
100	U/ml	L-Glutamin	(Sigma Aldrich)
100	U/ml	Pen/Strep	(Sigma Aldrich)

Iscoves 20⁺⁺⁺ (I20⁺⁺⁺)

Medium mit früh wirksamen Zytokinen zur Kultivierung primärer CD34⁺-Zellen in Suspensionskultur.

80	%	IMDM	(Sigma Aldrich)
20	%	FCS	(Biochrom)
100	U/ml	L-Glutamin	(Sigma Aldrich)
100	U/ml	Pen/Strep	(Sigma Aldrich)
10	ng/ml	Flt-3L	(PeproTech, New Jersey, NY, USA)
25	ng/ml	SCF	(PeproTech)
10	ng/ml	TPO	(PeproTech)

Iscoves 20 (I20)

80	%	IMDM	(Sigma Aldrich)
20	%	FCS	(Biochrom)
100	U/ml	L-Glutamin	(Sigma Aldrich)
100	U/ml	Pen/Strep	(Sigma Aldrich)

HEK293FT – Medium

80	%	DMEM	(Sigma Aldrich)
20	%	FCS	(Biochrom Ltd., Cambridge, UK)
100	U/ml	L-Glutamin	(Sigma Aldrich)
100	U/ml	Pen/Strep	(Sigma Aldrich)

CFU-GEMM-Medium

Klonogenes Methylzellulose-Medium wurde kommerziell erworben bei StemCell Technologies (Vancouver, BC, Canada). Das CFU-Medium wurde für CFU-GEMM Versuche oder die Überschichtung von LTC-IC-Platten verwendet.

3.2.3 Zelllinien**3.2.3.1 Zelllinie AFT024**

Die AFT024 ist eine Stromazelllinie aus der fetalen Leber von Mäusen (Moore K. A., Ema, H. & Lemischka, I. R., 1997a). Durch die Kokultivierung mit AFT024-Stromazellen als konfluente Bodenschicht können HSC und Vorläuferzellen *in vitro* ungefähr sieben Wochen erhalten werden (Punzel, M. *et al.*, 1999a; Moore, K. A. *et al.*, 1997b). Somit eignen sich die Kulturbedingungen zur Identifizierung von Stammzellen mit Hilfe von LTC-IC-, ML-IC- oder NK-IC-Versuchen. Die Anzucht dieser adhärent wachsenden Zelllinie erfolgte in Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90 %. Die Zellen wurden nach Erreichen der erwünschten Konfluenz für 5-10 min mittels Trypsin-Verdau bei 37 °C von den Flaschenböden abgelöst und im Verhältnis von 1:5 - 1:6 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Präparation von AFT024 Platten:

Die Zelllinie AFT024 wird in AFT-Medium bei 33 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Bei Erreichen der erwünschten Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und auf den mit 0,1 % Gelatine (Stem Cell Technology) vorbeschichteten 96-Well (Vertiefungen) -Platten ausplattiert. Dabei wird das folgende Protokoll verwendet:

Das Medium wurde vom Rand aus abgenommen und der Zellrasen mit 10 ml PBS gespült. Dann wurden 5 ml 37 °C-warmes 1 × Trypsin in die Flasche gegeben. Zum Stoppen der Trypsinierungsreaktion wurden 20 ml 4 °C kaltes I20- oder AFT-Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Gefäß gegeben und der Füllstand mit PBS oder Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert (bei 600 × g für 5 min), der Überstand abgegossen und das Pellet anschließend in 5 ml AFT-Medium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Die Zelldichte wurde auf 1 × 10⁵ Zellen/ml eingestellt, zum Ausplattieren in die 96-Well-Platten in ein *Reagent-Reservoir* gegeben und je 150 µl pro Vertiefung pipettiert (11 Wells pro Reihe). Für die weitere Kultivierung der AFT024-Zellen wurden in 75 ml Zellkulturflaschen 20 ml AFT-Medium vorgelegt und ca. 1-2 × 10⁶ Zellen hinzugegeben. Die Zellkulturplatten und Flaschen wurden erneut bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Sobald die einzelne Zellschicht in den 96-Well-Platten konfluent war, wurden diese mit einem Cobalt-Irradiator mit 30 Gray bestrahlt, um weiteres Wachstum zu verhindern. 24 Stunden nach Bestrahlung musste das Medium in den Platten gegen frisches AFT-Medium ausgetauscht werden. Die Zellen konnten nach der Bestrahlung bei 37 °C gehalten werden.

3.2.3.2 Zelllinie HEK-293FT

Die Zelllinie HEK-293FT ist eine humane, adhärent wachsende Zelllinie. Sie ist als Transformationsprodukt aus einer humanen embryonalen Nierenzelle (*human embryonic kidney*) erstellt worden und trägt daher DNA-Anteile des menschlichen Adenovirus 5 in ihrem Erbgut. Sie ist einfach zu kultivieren und nimmt Fremd-DNA mittels Transformation gut auf. Durch diese Eigenschaften eignet sie sich gut, um die Transformationseffizienz und Funktionalität von Plasmiden zu testen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bis zu einer Adhärenz von ca. 80 %. War die Adhärenz erreicht, mussten die Zellen

aufgeteilt werden, wobei sie für 5-10 min bei 37 °C trypsiniert wurden. Anschließend erfolgte eine Aussaat von ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen in 20 ml HEK293FT-Medium.

3.2.4 Separation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) & immunomagnetische Isolierung von CD34⁺-Zellen (MACS) aus Knochenmark (KM) oder peripherem Blut (PB) (modifiziert nach Steidl, U. *et al.*, 2002)

Die Anreicherung von CD34⁺-Zellen erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die mononukleären Zellen (MNC) von den restlichen Blut- bzw. Knochenmarkbestandteilen mittels einer Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) getrennt. Aus der so gewonnenen MNC-Fraktion wurden im zweiten Schritt mittels immunomagnetischer Zellseparation (MACS) die CD34⁺-Zellen isoliert.

Schritt 1: Dichtegradientenzentrifugation

Zur Separation der MNC-Fraktion wurde zunächst das Volumen der Knochenmark- oder peripheren Blutprobe (PB) bestimmt, anschließend auf 20 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1.077 ρ bei RT, Biochrom Ltd.) in 50 ml Falcon-Gefäßen aufgeschichtet und in einer Heraeus Megafuge 1.0R, bei 400 x g, 20 min ohne Bremse, bei RT, zentrifugiert. Im Anschluss waren mehrere Phasen zu erkennen. In der untersten Phase befanden sich die pelletierten Erythrozyten, gefolgt von einer Interphase aus Ficoll-Lösung, auf der eine dünne Schicht Leukozyten/MNC aufliegt und der obersten Phase bestehend aus einem Serum-Ficoll-Gemisch. Die Schicht mononukleärer Zellen wurde anschließend mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml Gefäß überführt, mit PBS (Sigma Aldrich) auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (500 x g, 7 min, RT). Dieser Waschschrift wurde wiederholt und anschließend 500 μ l aus den 50 ml dieser Zellsuspension für weitere Analysen entnommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet anschließend für die Erythrozyten-Lyse in 10 ml kaltem, 0,83 %igem Ammoniumchlorid (Apotheke Universitätsklinik Düsseldorf) resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Im weiteren Verlauf erfolgte ein erneuter Waschschrift wie oben beschrieben, bevor das Pellet in einem für die Zellzählung adäquaten Volumen MACS-Puffer (PBS + 2 mM EDTA und 0,1 % HSA) resuspendiert wurde. Die MNC-Zellzahlen wurden entweder mittels Neubauer-

kammer oder Casy[®] *Cell Counter* der Firma (Innovatis) Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) ermittelt, der Gehalt an CD34⁺-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden die Zellen erneut mittels Zentrifugation pelletiert (500 × g, 7 min, RT).

Schritt 2: MACS

MACS-Puffer:	PBS			(Sigma Aldrich)
	EDTA	2	mM	(Sigma Aldrich)
	HSA	0,25	%	(Sigma Aldrich)

Anschließend an Schritt 1 der Gewinnung der MNC-Fraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die CD34⁺-Zellen mittels immunomagnetischer Zellanreicherung gewonnen. Diese Form der Zellseparation basiert auf der Interaktion zwischen spezifischen *magneto-bead*-konjugierten Antikörpern und dem Zielepitop auf der Oberfläche der anzureichernden Zellfraktion, welche in einem magnetischen Feld (*Midimacs Separation unit*) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), Säulen-basiert (*magnetic antibody cell separation columns LS*, Miltenyi Biotec) von den restlichen Zellen bzw. Blut- oder Knochenmarksbestandteilen getrennt wurden. In dieser Arbeit wurden vorrangig anti-CD34-*magneto-bead* markierte Antikörper aus dem *Direct MBC CD34 Progenitor Cell Isolation Kit* der Firma Miltenyi Biotec verwendet.

Für die Separation von CD34⁺-Zellen aus MNC-Fractionen wurden diese mit je 300 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 MNC-Zellen resuspendiert und mit je 100 µl *blocking*-Reagenz und *magneto-bead* konjugiertem Antikörper versetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 25 min inkubiert und im Anschluss mit MACS-Puffer ad 50 ml aufgefüllt und gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation (500 × g, 7 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2-3 ml MACS-Puffer resuspendiert und über einen Zellfilter (*Pre-Seperation-filter*; Miltenyi) auf die Separationssäule im Magneten gegeben, die vorher mit einem Säulenvolumen MACS-Puffer äquilibriert wurde. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hat, wurde diese dreimalig mit einem Säulenvolumen MACS-Puffer gespült, um unmarkierte Zellen aus der Säule zu waschen. Der gesamte Durchfluss wurde als CD34⁻-Fraktion bezeichnet und in einem 50 ml-Falcon-Gefäß gesammelt. 500 µl der CD34⁻-Fraktion wurden für die durchflusszytometrische Bestimmung

der Ausbeute an CD34⁺-Zellen verwendet. Die Elution der CD34⁺-Zellen aus der Säule erfolgte außerhalb des Magnetfeldes durch das Spülen der Säule mit MACS-Puffer. Die Zellen wurden in einem 15 ml Falcon-Gefäß aufgefangen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauerkammer oder Casy[®] *Cell Counter* der Firma (Innovatis) Roche Diagnostics GmbH. Der CD34⁺-Gehalt wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

3.2.5 Kryokonservierung & Lagerung von humanen Knochenmark- oder peripheren Blut-Zellen

Einfriermedium (EM):	IMDM	60	% (v/v)	(Sigma Aldrich)
	FCS	20	% (v/v)	(Biochrom)
	DMSO	20	% (v/v)	(Sigma Aldrich)

Mononukleäre Zellen wurden im Anschluss an die in Abschnitt 3.2.4 beschriebene Dichtegradientenzentrifugation und CD34⁺-Zellen nach der darauffolgenden immunomagnetischen Anreicherung bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren gelagert. Hierfür wurden bis zu 3×10^8 MNC oder bis zu 6×10^6 CD34⁺-Zellen in je 1 ml MACS-Puffer (Abschnitt 3.2.4) aufgenommen und mit je 1 ml Einfriermedium versetzt. Anschließend wurden die Proben in speziellen Kryo-Röhrchen ÜN in einem Gefriergefäß (Alcoboy) bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden konnten die Proben in den Flüssigstickstoff-Lagerungstank überführt werden.

3.2.6 Auftauen von humanen Knochenmark- oder peripheren Blut-Zellen

Für das Auftauen humaner CD34⁺-Zellen oder MNCs wurden je Probe 2×30 ml I20-Medium (Abschnitt 3.2.2) auf 37 °C vorgewärmt. Die aufzutauenden Proben wurden auf Eis zur Sterilbank geholt und durch wiederholtes Pipettieren in vorgewärmtem Medium aufgetaut und bei $535 \times g$ für 5 min zentrifugiert, das Medium dekantiert und die Proben erneut in jeweils 30 ml I20-Medium resuspendiert. Im Anschluss konnten die Proben nach einer weiteren Zentrifugation für weitergehende Untersuchungen verwendet werden.

3.2.7 Funktionelle Analysen in der Zellkultur

Wie oben beschrieben stehen für die Identifizierung humaner Stammzellen prinzipiell verschiedene Auswertungssysteme in der Zellkultur zu Verfügung. Für die Testung bereits determinierter Vorläuferzellen auf ihre Koloniebildungsfähigkeit fand in dieser Arbeit der *Colony-Forming Cell* (CFC)-Versuch Verwendung. Die Untersuchung von funktionellen Eigenschaften von primitiven HSC wurde in veränderter Form mittels des von Punzel entwickelten ML-IC-Versuchsansatz (*Myeloid-Lymphoid-Initiating-Cell*) als Stammzellversuch übernommen (Punzel, M. *et al.*, 1999b). Dieser beruht auf dem Nachweis der Entwicklungsfähigkeit von Zellen in myeloische (LTC-IC) und lymphatische Effektorzellen (NK-IC). In diesem Auswertesystem ist die Kokultivierung der HSC mit einer stammzellerhaltenden Zelllinie (AFT024) notwendig. Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz misst über Verdünnungsreihen die Frequenz zur Koloniebildung oder Generierung lymphatischer Zellen nach einer Langzeitkultur von 5-7 Wochen. Die verschiedenen Auswertesysteme werden im Folgenden detaillierter dargestellt.

3.2.8 Untersuchungen der Proliferations- und Überlebensraten von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark in *in vitro* Kultur

Die Untersuchung der Proliferations- und Überlebensraten von CD34⁺-Zellen *in vitro* wurde vergleichend zwischen gesunden und MM-Zellen aus dem Knochenmark durchgeführt. Hierfür wurden jeweils $4-5 \times 10^5$ Zellen für sieben Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ Anteil in 1 ml I20⁺⁺⁺-Medium kultiviert. Gemessen wurde an den Tagen 0, 2, 3, 6 und 7 sowohl die Gesamtzellzahl, die Zahl viabler Zellen als auch die Viabilität mit dem Casy[®] Cell Counter der Firma (Innovatis) Roche Diagnostics GmbH. Für die statistische Auswertung in Excel wurde die eingesetzte Zellzahl auf 1×10^4 Zellen normalisiert.

Für die Untersuchung der Einflüsse von TGFβ auf die Proliferation und das Überleben von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark in *in vitro* Kulturen wurden die Zellen wie auf Seite 47 beschrieben unstimuliert kultiviert oder mit 0,5 μM SD208, einem selektiven, 2,4-disubstituierten Pteridin abstammenden TGFβ-Rezeptor I Kinase Inhibitor mit hoher Spezifität (Hayashi, T. *et al.*, 2004; Uhl, M. *et al.*, 2004) für eine Stunde vor- oder mit 0,5 ng/ml (Endkonzentration) TGFβ direkt-stimuliert. SD208 wurde als 20 mM Lösung in

DMSO bei -20 °C gelagert. Daher wurden als weitere Kontrolle auch immer Zellen mit äquivalenten Mengen DMSO in den jeweiligen Versuchsreihen kultiviert.

3.2.9 CFC-Ansatz (*colony-forming-cell*)

Ogawa und Mitarbeiter entwickelten Anfang der achtziger Jahre den ersten *in vitro* Versuch für humane hämatopoetische Stammzellen, der 5-Fluorouracil (5-FU)-resistente Vorläuferzellen mit sekundärem, Selbsterneuerungspotential beschreibt (Leary, A. G. *et al.*, 1984; Nakahata, T. & Ogawa, M., 1982). Hierbei bilden diese so genannten *Colony-Forming-Cells* (CFC) Kolonien in semisolidem Methylcellulosemedium, die aus unreifen hämatopoetischen Zellen bestehen. Anhand der entstehenden Kolonietypen können Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad und das Proliferationspotential der CFC gezogen werden. Bradley und Hodgson haben diesen Versuchsansatz weiterentwickelt und sogenannte *High proliferative potential-CFC* (HPP-CFC) beschrieben. Mit 5×10^4 Zellen/Kolonie kann der HPP-CFC-Versuch das Proliferationspotential bestimmter Vorläuferzellen bewerten (Bradley, T. R. & Hodgson, G. S., 1989).

Zur Bestimmung der Differenzierung von determinierten Vorläuferzellen wird der CFC-Ansatz mit klonogenem Methylcellulosemedium Methokult (Stemcell Technologies) verwendet. Dazu wurden in der Regel 2000 Zellen zu 2,5 ml möglichst luftblasenfreiem Methylcellulosemedium gegeben und zu gleichen Teilen auf vier Wells einer 24-Well-Platte aufgeteilt. Die Kulturen wurden für maximal 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An den Tagen 12-14 wurde die Anzahl der Kolonien in fünf verschiedenen Kategorien bestimmt. Es werden CFU-E- (*Colony-Forming-Unit-Erythroid*), BFU-E- (*Burst-Forming-Unit-Erythroid*), CFU-G- (*Colony-Forming-Unit-Granulocyte*), CFU-M- (*Colony-Forming-Unit-Macrophage*), CFU-GM- (*Colony-Forming-Unit-Granulocyte, Macrophage*) und CFU-GEMM- (*Colony-Forming-Unit-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte*)-Kolonien unterschieden. Die frühesten Progenitoren sind die CFU-GM und CFU-GEMM Kolonie-bildenden Zellen, wobei die CFU-GEMM-Zellen in der Lage sind, Zellen sämtlicher myeloischer Linien hervorzubringen und hingegen bei den CFU-GM-Zellen nur Zellen der weißen Linie entstehen können. CFU-E- und BFU-E Kolonie-bildende Zellen sind späte Progenitoren der roten Linie. Die CFU-G- und CFU-M Kolonie-bildenden Zellen kennzeichnen spät determinierte Vorläuferzellen der weißen Linie.

Außerdem lässt sich mit diesem Ausleseverfahren die Gesamtzahl und die Frequenz der Kolonie-bildenden Zellen bestimmen (CFC-Frequenz; *Colony-Forming-Cell*).

Für die retrospektiven Untersuchungen zum Zellschicksal später myeloischer Progenitoren unter dem Einfluss von SD208 und/oder TGF β wurden die Zellen mit den in Abschnitt 3.2.8 beschriebenen Konzentrationen, durch eine einmalige Zugabe in das klonogene Methylzellulosemedium stimuliert. Ausschließlich die Vorstimulation mit SD208 erfolgte vorab für eine Stunde in Flüssigkultur.

3.2.10 Myeloischer Differenzierungsansatz (LTC-IC-Ansatz)

Die Arbeitsgruppe um Sutherland entwickelte Ende der achtziger Jahre den so genannten *Long-Term-Culture-Initiating-Cell* (LTC-IC)-Ansatz, der wesentlich unreifere und den Stammzellen enger verwandte Progenitoren beschreibt als der CFC-Ansatz. Diese Vorläuferzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach mehr als fünf Wochen *in vitro*-Kultur noch in der Lage sind, sekundäre Kolonien aus den primär gebildeten Kolonien zu generieren (Sutherland, H. J. *et al.*, 1990). Ähnlich wie die LTC-IC-Ansätze beschreiben sogenannte CAFC-Ansätze (*Cobblestone-Area-Forming-Cells*) den gleichen Progenitortyp (Gordon, M. Y. *et al.*, 1985; Cohen, G., Canellos, G. & Greenberger, J., 1980). Crooks und Hao haben den LTC-IC Versuch auf mehr als 60 Tage Langzeitkultur erweitert und nennen diese Zellen E („*extended*“)-LTC-IC (Hao, Q. L. *et al.*, 1996; 1995). Das folgende Protokoll beschreibt den Ablauf des LTC-IC-Ansatzes wie er in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Initial wurden 6000 CD34⁺-Zellen direkt in 5 ml LTB-MC-Medium sortiert und bis zum Ausplattieren auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann über eine Verdünnungsreihe auf die 96-Well-Platten gegeben. Dazu wurden die Zellen in 5 ml Zellsuspension in ein *Reagent-Reservoir* gegeben und gemischt. Für das Ausplattieren wurde für exaktes Pipettieren eine RAININ-Multipipette mit einem Satz Spitzen benutzt. Für die ersten beiden Reihen wurden pro Reihe 11 Wells mit je 150 μ l/Well befüllt. Die restliche Zellsuspension wurde mit 3,3 ml LTB-MC-Medium verdünnt und gut gemischt. Die nächsten beiden Reihen wurden befüllt und die nächsten Verdünnungen erfolgten mit 3 ml (Reihe 5+6) und 2,7 ml (Reihe 7+8) LTB-MC-Medium. Der Rest der Zellsuspension wurde auf die letzten beiden Reihen verteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 35 Tage kultiviert. Das Medium wurde bei

Bedarf, spätestens jedoch alle sieben Tage, erneuert. Nach fünf Wochen Kultur wurde das Medium nahezu komplett abgenommen, die Zellen mit klonogenem Methylzellulosemedium (CFU-GEMM) überschichtet und weitere 10-14 Tage kultiviert, um anschließend die Platten mikroskopisch auszuwerten. Es wurden die Wells als positiv für LTC-IC gewertet, in denen Zellen in der Lage waren, sekundäre CFC-Kolonien zu generieren. Die Frequenzen wurden statistisch ausgewertet.

Für die Untersuchung des Langzeitpotentials früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark unter den Einfluss von SD208 und/oder TGF β wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und die in Abschnitt 3.2.8 angegebenen Konzentrationen SD208 und/oder TGF β zugefügt. Die Vorstimulation mit SD208 erfolgte zuvor in Flüssigkultur. Äquivalente Mengen DMSO wurden als Kontrolle verwendet.

3.2.11 *In vitro* Versuche zum Migrationsverhalten von HSPC

Die Untersuchungen des Migrationsverhaltens von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark von MM-Patienten und gesunden Spendern wurden mit handelsüblichen Transwell-Migrationskammern (Polycarbonat; 5 μ m Porengröße) der Firma Corning Incorporated (NY, USA) gegen einen SDF1 α -Gradienten durchgeführt. Hierfür wurden je 1×10^5 CD34⁺-Zellen in 200 μ l I20⁺⁺⁺-Medium auf die Membranen der Transwell-Kammern aufgebracht und diese anschließend in die je 500 μ l Medium (100 ng/ml SDF1 α) beinhaltenden Reaktionsräume der Transwell-Kammern eingebracht. Im Anschluss migrierten die Zellen erschütterungsfrei für drei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Anteil. Die migrierten Zellen wurden nach Abschluss der Inkubationszeit aus den Reaktionsräumen entnommen und wie in Abschnitt 3.2.13.2 beschrieben mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörper gegen CD34 (APC) und CD38 (FITC) markiert. Anschließend an die immunhistochemische Markierung der Zellen wurden diese mit einer definierten Anzahl so genannter *Count Beads* der Firma BD Biosciences (San Diego, CA, USA) versetzt und durchflusszytometrisch ausgezählt. Hierbei wurde das Verhältnis gemessener zu den eingesetzten *beads* bestimmt und der so ermittelte Faktor für die Kalkulation der migrierten Zellen verwendet. Die prozentualen Anteile wurden über die Anzahl der in den Versuch eingebrachten Zellen bestimmt. Sofern nicht anders angegeben, handelte es sich bei den CD34⁺-Zellen um Knochenmarkszellen aus Aspirationen, die immunomagnetisch angereichert wurden.

Abweichend zu obiger Beschreibung der Migrationsversuche an CD34⁺-Zellen wurden Migrationsversuche auch an hämatopoietischen Stammzellen und Vorläufersubpopulationen durchgeführt. Hierfür fanden spezielle Migrationskammern im 96-Well-Plattenformat der Firma Neuro Probe Inc. Verwendung. Diese Kammern zeichnen sich durch ihre kleinen Volumina aus, die auch die Handhabung von geringeren, durch Sortierung erlangten Zellzahlen ermöglichen. Die Platten bestanden aus 96 Vertiefungen, die mit je 30 µl Medium (100 ng/ml SDF1 α) befüllt werden konnten und die bündig mit einer Polycarbonatmembran mit 5 µm Porengröße verschlossen werden. Über jeder Vertiefung der Platte befindet sich ein hydrophober Ring auf der Membran, der das obere Reservoir darstellt. In diese hydrophoben Begrenzungen können die Zellen in bis zu 50 µl Medium eingebracht werden. In dieser Arbeit wurden je Vertiefung 2500 sortierte Zellen eingebracht und zwecks Migration für drei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Anteil inkubiert. Anschließend wurden die nicht migrierten Zellen vorsichtig mit PBS von der Oberseite der Membran gespült, ohne diese von der Platte zu entfernen. Daraufhin wurden je Vertiefung 50 µl einer 2 mM EDTA-Lösung auf die Membran aufgetragen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Durch diese Inkubation lösten sich die Zellen auf der Unterseite der Membran ab und sanken in das Medium. Nach einer weiteren Spülung der Membranoberseite mit PBS konnte die gesamte Platte zentrifugiert werden. Anschließend wurde die Membran vorsichtig entfernt und die migrierten Zellen mikroskopisch ausgezählt.

3.2.12 *In vitro* Versuche zum Adhäsionsverhalten von HSPC

Zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von CD34⁺-Zellen wurden in dieser Arbeit kommerziell erhältliche Fibronectin- oder auch Kollagen-beschichtete, 24-Well-Platten der Firma BD Biosciences verwendet. Weiterhin wurden Versuche an HSPC auf eigens beschichteten Objektträgern durchgeführt. Hierfür wurden unbeschichtete Objektträger mittels 70 %igem Ethanol für 10 min gereinigt und entfettet. Anschließend an die Trocknung der Objektträger unter der Sterilbank wurden auf diesen mittels eines hydrophoben Stiftes der Firma Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA) je zwei Areale mit einer Schablone eingezeichnet, die durch die genormte Größe bis zu 80 µl Flüssigkeit aufnehmen können. Anschließend an die Trocknung der hydrophoben Bereiche wurden diese je nach Versuch entweder mit je 80 µl einer 300 µg/ml Hyaluronsäure (HA)-haltigen PBS-Lösung oder mit 50 µg/ml Fibronectin oder mit 50 µg/ml Collagen über Nacht (ÜN) bei 4 °C beschichtet. Nach der Beschichtung wurden die Areale zweimalig mit 80 µl PBS vorsichtig gewaschen, indem

die Flüssigkeit auf der Innenseite des hydrophoben Randes aufpipettiert wurde und durch eine 90 °-Drehung und leichtes Abklopfen auf saugfähige Tücher wieder entfernt wurde. Im Anschluss wurden die Areale für 30 min bei RT mit 1 % HSA (humanes Serum-Albumin) in PBS gegen unspezifische Bindungen geblockt, bevor je Areal bis zu 5000 Zellen in 80 µl I20⁺⁺⁺-Medium aufgetragen wurden. Nach Aufbringung der Zellen wurden die Objektträger im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Anteil für 3 h inkubiert. Die adhärenen Zellen wurden anschließend nach zweimaliger Waschung direkt lichtmikroskopisch ausgewertet und für weitere Versuche verwendet (Abschnitt 3.2.13.6).

3.2.13 Immunhistochemische & Immunfluoreszenz Analysen

3.2.13.1 Immunhistochemische Analysen mittels Peroxidase-Färbung

Die immunhistochemischen Versuche dieser Arbeit wurden an Knochenmarkszylindern durchgeführt, die bei den routinemäßig durchgeführten Knochenmarkpunktionen der MM-Patienten und bei den Punktionen der freiwilligen Gesundspender entnommen wurden. Hierfür wurden die Knochenmarkszylinder als Kooperationsarbeit in der Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf dekalzifiziert, in Paraffin eingebettet und als 5 µm dicke Schnitte auf Objektträgern fixiert. Diese Paraffin-Schnitte wurden zunächst mittels Histol (Sigma Aldrich) für 10 min deparaffinisiert und im Anschluss für jeweils 5 min in 98 %, 95 % und 70 % EtOH in PBS rehydriert. Darauffolgend wurden die Schnitte für 10 min in PBS gewaschen, bevor die Antigen-Demaskierung mittels *VectorStain™ AG-unmasking solution* (Vector H-3300) durchgeführt wurde. Die Konzentration der *VectorStain™ AG-unmasking solution* wurde nach Herstellerangaben mit A. dest. angesetzt und vor dem Gebrauch für 3 min bei 630 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach 3 minütiger Abkühlphase wurden die Schnitte in die Lösung gegeben und für 20 min auf einem Orbitalschüttler bei maximal 120 Upm inkubiert. Im Anschluss an eine weitere 5 minütige Waschung in PBS wurden die Knochenmarkschnitte mittels eines hydrophoben Stiftes eingekreist. Im Falle der Verwendung eines auf Peroxidase-Aktivität basierenden *VectorStain*-Kits wurden anschließend in einer 5 minütigen Inkubation mit 3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in A. dest. alle unspezifischen endogenen Peroxidase-Aktivitäten abreagiert. Nach einer weiteren 5 minütigen Waschung in PBS wurde nach Herstellerangaben mit dem im Kit enthaltenem Serum für 30 min gegen unspezifische Antikörperbindungen geblockt. Auch die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mittels dieser Serum-Lösung. Für den immunhistochemischen Nachweis von phosphoryliertem-SMAD2 (pSMAD2) wurde der kommerziell erwerbliche

anti-pSMAD2-AK der Firma Cell Signaling Technology mit der Serumlösung 1:1000 verdünnt und ÜN bei 4 °C inkubiert. Vor der 30 minütigen Inkubation mit dem Kit-spezifischen Sekundärantikörper am nächsten Morgen wurden die Schnitte 2-malig für jeweils 5 min in PBS bei 120 Upm auf einem Orbitalschüttler gewaschen. In der Inkubationszeit des Sekundärantikörpers wurde die Kit-spezifische ABC-Enzymlösung nach Herstellerangaben angesetzt, da diese eine 25-30 minütige Ruhephase benötigt. Nach anschließender 5 minütiger Waschung in PBS wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit der fertigen ABC-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut gründlich in PBS gewaschen und parallel die gewünschte Substratlösung nach Herstellerangaben angesetzt. Im Falle der pSMAD2-Nachweise wurde der Farbstoff *VectorRed™* der Firma Vector Labs verwendet. Die angefertigte Substratlösung wurde im Falle der Verwendung eines auf Peroxidase-Aktivität basierenden Kits bis zu 15 min, im Falle der Verwendung eines auf alkalischer-Phosphatase-Aktivität basierenden Kits bis zu 30 min, unter ständiger mikroskopischer Beobachtung bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades inkubiert. Hierbei wurde strikt darauf geachtet, dass alle Schnitte einer Versuchsreihe gleich behandelt wurden. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde das übrige Substrat mittels einer 5 minütigen Waschung in PBS entfernt. Optional konnte im Anschluss eine Gegenfärbung mittels Hämalaun durchgeführt werden, um morphologische Kriterien der Zellen des Knochenmarks sichtbar zu machen. Hierfür wurden auf die Schnitte einige Tropfen Hämalaun (Sigma Aldrich) aufgebracht und nach 10 sekundiger Einwirkzeit mit Leitungswasser in einer 10 minütigen Inkubation bei 120 Upm auf einem Orbitalschüttler wieder entfernt. Die vollständige Entfernung des überschüssigen Hämalaun wurde festgestellt, wenn bei der Entnahme der Objektträger aus dem Leitungswasser keine Farbschlieren mehr zu erkennen waren. Im Anschluss folgte die Dehydrierung der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe mit 70 %-, 95 %- und 98 %-EtOH für jeweils 5 min, der Abschluss der Dehydrierung erfolgte durch eine 20 minütige Inkubation in Histol. Zur Fixierung der fertigen Knochenmarkschnitte wurden diese mit jeweils 50 µl *Mounting Medium (VectorMount™)* der Firma Vector Labs beträufelt und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckt. Bis zur vollständigen Aushärtung des *Mounting Mediums* wurden die Objektträger horizontal bei RT gelagert.

Als Methodenkontrolle wurde zu jeder Probe ein sogenannter Mok-Objektträger mitgeführt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass er die gesamte Methode durchläuft, aber keinerlei Antikörper verwendet wird. Die fehlenden Antikörper der Mok werden durch A. dest. ersetzt.

Weitere Kontrollen sind die Verwendung von jeweils entweder nur den Primär- oder ausschließlich den Sekundär-Antikörpern.

Die Auswertung der immunhistochemisch-gefärbten Schnitte erfolgte an einem Axioplan II Mikroskop der Firma Carl Zeiss *MicroImaging* GmbH (Göttingen, Deutschland). Die Fotodokumentation erfolgte mittels Moticam 2300 (Beyersdörfer GmbH, Mandelbachtal, Deutschland). Die Auswertung der Fotodokumentation wurde unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Hierbei wurden die positiv gefärbten Zellen einer Probe in drei sogenannten *Hot-Spots* ausgezählt und in Bezug zur Gesamtzellzahl der jeweiligen Bereiche gesetzt und somit ihr prozentueller Anteil ermittelt. Ein *Hot-Spot* ist definiert als ein vollständiger Bildausschnitt bei zweihundertfacher Vergrößerung mit überdurchschnittlicher Färberate.

Für die statistische Auswertung wurden sowohl die Zellzahlen der positiv gefärbten- als auch der Negativ-Zellen der jeweils drei Bereiche jeder Probe gemittelt und anschließend die Zahlen im Vergleich gesund versus MM mittels Student`s t-Test gegeneinander verglichen und Abweichungen auf ihre Signifikanz hin untersucht.

3.2.13.2 Extrazelluläre Markierung mittels Fluorochrom konjugierter Antikörper

Die Markierung mit primären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurde in Suspensionen durchgeführt. Die Inkubationszeiten der Antikörper betragen zwischen 10-25 min. Für durchflusszytometrische Sortierungen wurde die Inkubationszeit auf 30 min erhöht. Vor den FACS-Analysen wurde der überschüssige Antikörper durch Waschen mit PBS aus den Färbansätzen entfernt. Hierfür wurden die Zellen in einem adäquatem Volumen PBS aufgenommen, bei $500 \times g$ für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Im Abschnitt 3.2.13.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt. Während der Isolierung von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark wurde zu mehreren Zeitpunkten der CD34⁺-Gehalt mittels FACS-Analysen überprüft. Die oben beschriebene Kontrolle des CD34⁺-Gehalts der MNC wurde mit anti-CD45-FITC (1:10)- und anti-CD34-PE (1:10)-Färbungen im Durchflusszytometer kontrolliert.

3.2.13.3 Intrazelluläre Markierung mittels Fluorochrom konjugierter Antikörper

Intrazelluläre Färbungen mittels Fluorochromkonjugierter Antikörper wurden in Suspension durchgeführt. Sollten intrazelluläre mit extrazellulären Färbungen kombiniert werden, so wurde, sofern nicht anders angegeben, zuvor extrazellulär gefärbt (Abschnitt 3.2.13.2) und erst im Anschluss daran mit der intrazellulären Färbung begonnen. Hierfür wurden die Zellen zunächst in 2 %igem Formaldehyd in PBS (Formaldehyd [*Methanol free*] 10 % *Ultra Pure*) der Firma Polysciences Inc. für 10 min bei 37 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei RT auf einem Wankler bei 120 Upm in 0,1 % Tween20 in PBS im Dunkeln permeabilisiert. Alternativ zu Tween20 wurde 0,1 % TritonX100 (Sigma Aldrich) verwendet, sofern die anzufärbenden Epitope mit sogenannten „*lipid rafts*“ assoziiert waren, da diese Regionen durch Tween20 beeinträchtigt werden. In den folgenden zwei Waschungen mit Triton oder Tween (0,01% TritonX100 oder Tween20 in PBS) wurden die Zellen bei 400 × g für jeweils 5 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die Zellen in einem adäquatem Volumen Triton oder Tween resuspendiert und mit den zu verwendenden Antikörpern laut Herstellerangaben ad 100 µl versetzt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C dunkel im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss folgte eine erneute Waschung und sofern kein sekundärer Antikörper nötig war, wurden die Zellen in 0,1 %igem Formaldehyd refixiert und entweder in den jeweiligen Versuchen weiterverwendet oder bis zu 24 h bei 4 °C dunkel gelagert. Bei Verwendung eines sekundären Antikörpers wurde nach einer weiteren Waschung und 30 minütiger Inkubation mit diesem Antikörper wie oben beschrieben verfahren.

3.2.13.4 Intrazelluläre Markierung mittels Hoechst33342

Für intrazelluläre Färbungen mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (Invitrogen) wurde wie in den Abschnitten 3.2.13.2 und 3.2.13.3 verfahren und Hoechst33342 in einer 1:5000 Verdünnung den Antikörperinkubationen in den letzten 10 min zugefügt. Im Falle von mehreren Antikörper-inkubationen wurde Hoechst33342 immer den letzten 10 min der letzten Inkubation beigemischt.

3.2.13.5 Antikörper

Die in Tabelle 3.10 aufgeführten Antikörper wurden für die Durchflusszytometrie, Zellseparation und diverse Versuche dieser Arbeit verwendet. Ein × in der Spalte Konzentration/Verdünnungen deutet auf die Verwendung der Antikörper nach Herstellerangaben hin.

Antikörper	Herkunft	Klon-Nr.	Verdünnungen
Anti-CD2	BD Biosciences	RPA-2.10	1:60
Anti-CD3	BD Biosciences	HIT3a	1:60
Anti-CD4	BD Biosciences	RPA-T4	1:60
Anti-CD7	BD Biosciences	M-T701	1:60
Anti-CD8	BD Biosciences	3B5	1:60
Anti-CD10	BD Biosciences	HI10a	1:60
Anti-CD11b	BD Biosciences	ICRF44	1:60
Anti-CD14	BD Biosciences	Tük4	1:60
Anti-CD19	BD Biosciences	HIB19	1:60
Anti-CD20	BD Biosciences	2H7	1:60
Anti-CD34	BD Biosciences	8G12	1:10
Anti-CD38	BD Biosciences	HIT2	1:10
Mouse-Anti-CD44	BD Biosciences	L178	1:1000
Anti-CD45	BD Biosciences	HI30	1:10
Anti-CD45RA	Beckman Coulter	2H4LDH11LDB	1:10
Anti-CD56	BD Biosciences	B159	1:60
Anti-CD123	BD Biosciences	7G3	1:10
Anti-CD235a	BD Biosciences	GA-R2 (HIR2)	1:60
Anti- <i>cleaved</i> -Caspase3 (Asp175 / Alexa Fluor®488 conjugate)	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)	×	1:10
Anti-human-Ki67	BD Biosciences	B56	1:10
Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor488®	Invitrogen	×	1:1000
Maus-Anti-Human PhosphoSMAD2	Cell Signaling Technology	138D4	1:1000

Tabelle 3.10: Verwendete Antikörper, Herkunft, Klon-Nummer und Konzentration

Nähere Angaben zu den Fluorochromen der Antikörper werden bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt. Nicht aufgeführte Antikörper sind Kit-zugehörig und werden in den jeweiligen Versuchen erwähnt und wenn nicht anders angegeben nach Herstellerangaben verwendet und gelagert.

3.2.13.6 Immunfluoreszenz Färbungen zum stressbedingten F-Aktin Status des Zytoskeletts und des Zelloberflächen assoziierten Hyaluronsäurerezeptors (CD44)

Phalloidin ist ein Toxin aus dem grünen Knollenblätterpilz, das eine hohe Affinität zu Aktin hat. Genauer bindet Phalloidin spezifisch F-Aktin Untereinheiten und ermöglicht somit in Fluoreszenz-konjugierter Form, mit z.B. Rhodamin, eine Detektion der F-Aktin-Untereinheiten in Zellen.

Der Hyaluronsäurerezeptor ist eines der wichtigsten Adhäsion-vermittelnden Epitope auf der Zelloberfläche humaner hämatopoietischer HSPC und wurde in diesem Versuchsaufbau auf seine Expression hin untersucht, da die Expressionsprofile von MM-Patienten auf eine Verminderung an CD44-Molekülen hinwies.

Die Sichtbarmachung des Aktin Zytoskeletts in HSPC wurde in dieser Arbeit an adhärennten Zellen auf Objektträgern fluoreszenzmikroskopisch durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen/Objektträger wie in Abschnitt 3.2.12 beschrieben vorbereitet, wobei in dieser Versuchsreihe nur Fibronectin-Beschichtungen verwendet wurden. Anschließend an diese vorbereitenden Arbeitsschritte wurden die Zellen mit je 80 µl pro Areal in 2 % Formaldehyd in PBS für 8 min fixiert. Daraufhin folgten zwei 5 minütige Waschungen mit 0,2 % Formaldehyd in PBS. Die Permeabilisierung wurde danach bei RT für 20 min mit 2 % TritonX100 in PBS durchgeführt. Triton wurde in dieser Versuchsreihe verwendet, da CD44 in hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen *lipid raft*-assoziiert vorliegt. Im Anschluss wurde erneut zweimalig für 10 min in 0,02 % TritonX100 in PBS mit 1 % HSA gewaschen. Das HSA sollte unspezifische Antikörperreaktionen blockieren. Daraufhin wurde die 30 minütige Inkubation mit dem Primärantikörper Maus-Anti-Human-CD44 in einer 1:1000 Verdünnung bei RT durchgeführt, gefolgt von drei weiteren 5 minütigen Waschungen. Als Nächstes wurde 30 min mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus (1:1000), Phalloidin-Rhodamin-Konjugat (1:1000) und Hoechst33342 (1:5000) bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren drei 5 minütigen Waschungen wurden die Objektträger mit Fluoreszenz-geeignetem *Mounting*-Medium der Firma Vector Laboratories Inc. eingedeckelt und ÜN bei 4 °C im Kühlschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser mit

Nagellack fixiert und getrocknet, lichtgeschützt bei 4 °C bis zu 24 h gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Objektträger nach 24 h bei -20 °C eingefroren.

3.2.14 Durchflusszytometrie: FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde für das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom verwendet. Die Methode der Durchflusszytometrie benutzt die physikalische Brechungseigenschaft einer Zelle, auftreffendes Licht zu streuen. Die gemessenen Intensitäten in der Brechung des Lichtes geben Informationen über die Größe und Granularität der entsprechenden Zelle. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht einer durch einen Laserstrahl kreuzenden Zelle. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen, was an 2 Stellen gemessen wird. In der Richtung des ursprünglichen Strahls wird das Vorwärtsstreulicht (*Forward-Scatter*, FS) detektiert und gibt Informationen über die Größe der Zelle. Im etwa rechten Winkel zum Laserstrahl wird das Seitwärtsstreulicht (*Side-Scatter*, SS) detektiert, dessen Signalintensität von der Größe der Zellen, aber auch sehr stark von der Granularität der Zellen abhängt. Die Zellen können nach den Intensitäten in ihrem Vorwärtsstreulicht und ihrem Seitwärtsstreulicht in einem Diagramm dem sogenannten Dot-Plot dargestellt werden. Dabei werden die Zellen, die ähnliche Streulichteigenschaften haben, in wolkenähnlichen Projektionen dargestellt. In diesen Darstellungen entspricht jeder Punkt einem gemessenen Ereignis.

Eine weitere Form der durchflusszytometrischen Anwendung besteht darin, die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf oder innerhalb von Zellen quantitativ zu bestimmen. Die Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Ein Photodetektor registriert die entsprechende Menge der Fluoreszenzsignale, welche sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper pro Zelle verhalten und somit eine Aussage z.B. über die Expression von Oberflächenmolekülen erlaubt. Zusätzlich werden durch die oben beschriebene Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zelle (Kerngröße, Granularität) gewonnen.

Eine gleichzeitige Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist möglich, wenn sich die eingesetzten Antikörper-konjugierten Farbstoffe in ihren Emissionsspektren unterscheiden.

Die Darstellungs- und Auswertungssoftware für FACS-Analysen ermöglicht die graphische Darstellung der physikalischen Ereignisse in FACS-Diagrammen (FACS-Plots). Zur Auswertung der FACS-Analysen wird in der Regel nur ein Teil der Messereignisse herangezogen. Zur Untersuchung einer Auswahl bestimmter Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenz- (Antigen-) Eigenschaften wurde ein Software-Fenster (*gate*) um bestimmte „Zellwolken“ gelegt, das als *gating* bezeichnet wird. Diese selektierten Zellen ließen sich nun auch bezüglich anderer Parameter in neuen Diagrammen darstellen. Die Zellsortierung wurde mit einem Coulter EPICS Elite ESP Fluorescence Zellsortierungssystem durchgeführt, das mit der Expo32-Software (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) ausgestattet ist. Sonstige Analysen der Durchflusszytometrie erfolgten mit dem Cytomics FC 500 Durchflusszytometer unter Verwendung der RXP-Software (Beckman Coulter).

3.2.14.1 Durchflusszytometrische Zellsortierung von humanen HSPC aus peripherem Blut oder Knochenmark

Die durchflusszytometrische Zellsortierung von humanen Stamm- und Progenitor-Subpopulationen aus peripherem Blut bzw. Knochenmark erfolgte, sofern nicht anders angegeben, aus bereits CD34⁺-angereicherten Zellsuspensionen (Abschnitt 3.2.4) entweder im Anschluss an die Separation oder nach dem Auftauverfahren von gelagerten Proben (Abschnitt 3.2.6).

Zur näheren Charakterisierung CD34 positiver (⁺) Stamm- und Progenitor-Subpopulationen wurden in dieser Arbeit einer Vielzahl verschiedenster Oberflächenmarker verwendet. Zunächst wurden alle Zellen einer Fraktion CD34⁺-immunomagnetisch-angereicherter Zellen, die nicht zu den Populationen HSC, CMP, GMP oder MEP zählten, über den sogenannten *Lineage Marker* (Ausschluss Marker) ausgeschlossen. Ausgeschlossene Zellen wurden als Lin⁺ bezeichnet. Der verwendete *Lineage Marker* war ein Antikörper-Cocktail bestehend aus den Antikörpern gegen die die Epitope CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 und CD235a, der zur Depletion von reifen- T-Zellen, NK-Zellen,

Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen benötigt wurde. Sofern nicht anders angegeben, waren alle verwendeten Antikörper des Ausschluss Markers mit dem Fluorochrom Phycoerythrin (PE) konjugiert. Die HSC-Fraktion ist in dieser Arbeit als Lin^- , CD34^+ und CD38^{lo} definiert. Das Kürzel „ lo “ beinhaltet sowohl negative als auch sehr schwach positive Signale. Weiter differenziert wurden die Vorläufersubpopulationen in dieser Arbeit wie folgt: $\text{CMP} = \text{Lin}^-$, CD34^+ , CD38^+ , CD45RA^- , CD123^+ ; $\text{GMP} = \text{Lin}^-$, CD34^+ , CD38^+ , CD45RA^+ , CD123^+ ; $\text{MEP} = \text{Lin}^-$, CD34^+ , CD38^+ , CD45RA^- , CD123^- .

In Abbildung 3.2 ist schematisch dargestellt, wie die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten HSPC-Subpopulationen aus Blut und Knochenmark gewonnen wurden. Beginnend bei der Knochenmarkaspiration, über die Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll, weiter über die immunomagnetische Anreicherung bis hin zur durchflusszytometrischen Zellsortierung mit den verwendeten Oberflächenmarkern. Weiterhin ist beispielhaft eine anschließende Anwendung mit der Erstellung der HSPC-Transkriptomprofile mittels der Affymetrix™ Genechip (Affymetrix Inc.) Technologie aufgezeigt.

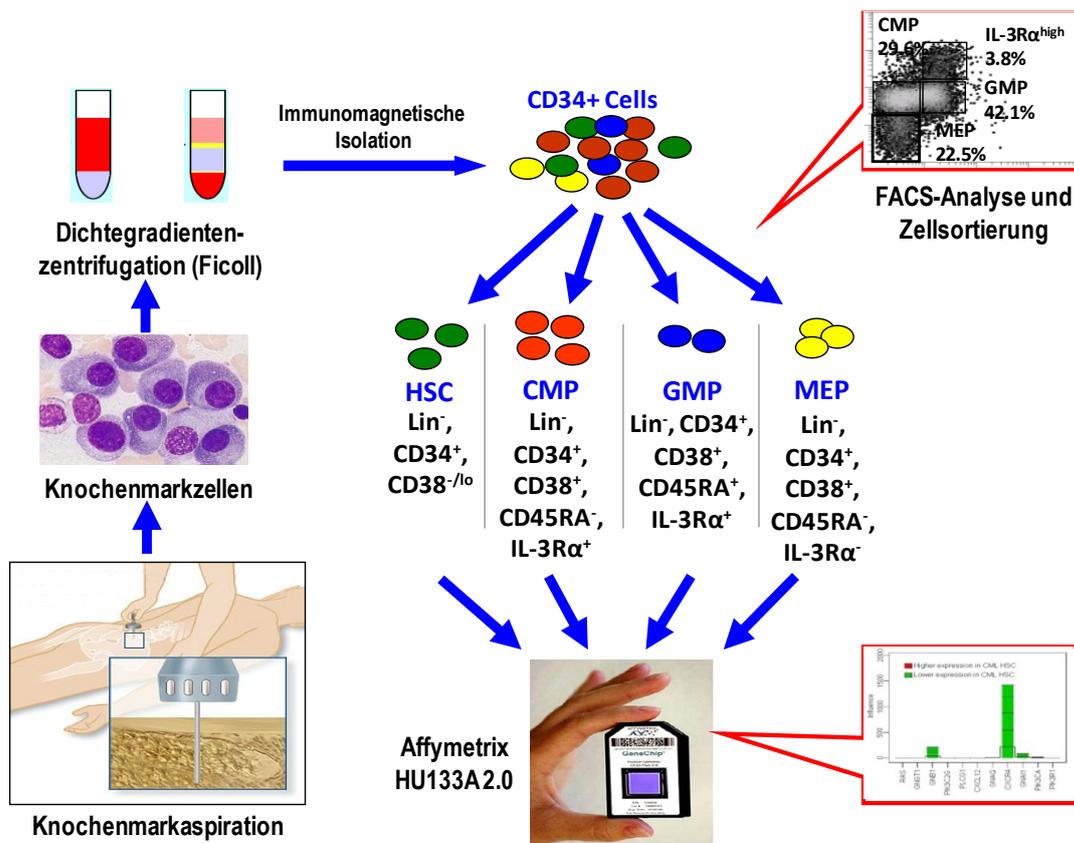


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Gewinnung von HSPC Subpopulationen aus Blut und/oder Knochenmark. Auflistung der Oberflächenmarker zugeordnet zu den einzelnen Subpopulationen. Beispielhafte Darstellung einer an die durchflusszytometrie angeschlossene Verwendung der Subpopulationen

3.2.14.2 Bestimmung der Reinheit und Ausbeute von CD34⁺-Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark

Die Bestimmung der Reinheit angereicherter CD34⁺-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch im Anschluss an die Zellseparation. Die Zellen wurden hierfür extrazellulär mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörper gegen die Oberflächen-epitope CD34 und CD45, wie in Abschnitt 3.2.13.2 beschrieben, markiert. Die Analyse der Ausbeute erfolgte äquivalent an der CD34⁺-Fraktion der Zellseparation (Abschnitt 3.2.4).

3.2.14.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zusammensetzung der HSPC-Subpopulationen (Quantitativ)

Das gesamte Probenmaterial, das im Verlauf dieser Arbeit mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung in die HSPC-Subpopulationen unterteilt wurde, lieferte die Daten für die Ermittlung der quantitativen Subpopulationsanalyse. Hierfür wurden die prozentualen Anteile der HSPC-Subpopulation während der laufenden Zellsortierung am FACS-Gerät erfasst und anschließend mittels des Programmes Summit 5.1 (Beckman Coulter) in Excel übertragen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Student`s t-Test. Für die durchflusszytometrische Zellsortierung wurden die in Abschnitt 3.2.14.1 aufgeführten Selektionsmarker verwendet.

3.2.14.4 Durchflusszytometrische Bestimmung des Apoptosestatus von HSPC mittels *cleaved*-Caspase3 Messung

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Caspasen-abhängigen Apoptose-Raten von HSPC aus dem Knochenmark wurde vergleichend zwischen MM-Proben und Proben von gesunden Spendern erstellt. Hierfür wurde die FACS-Strategie aus Abschnitt 3.2.14.1 um einen AK gerichtet gegen den intrazellulären Apoptosemarker *cleaved*-Caspase3 ergänzt. Der verwendete AK der Firma Cell Signaling Technology Inc. war mit dem Fluorochrom Alexa Fluor[®]488 konjugiert und gegen die aktivierte Form der Caspase3 gerichtet. Verwendet wurde dieser AK nach Herstellerangaben.

3.2.14.5 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen von HSPC mittels Anti-Ki67-Antikörpers und Hoechst33342

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen vergleichend zwischen HSPC aus MM- und gesund-Knochenmark wurde die in Abschnitt 3.2.14.1 beschriebene FACS-Strategie zur Auftrennung der HSPC-Subpopulation um einen AK, gerichtet gegen intrazelluläres Ki67 und um den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342, erweitert. Diese Erweiterung der FACS-Strategie ermöglicht die von Marieke, A. G. *et al.*, 2009 in Nature beschriebene Auftrennung der Zellzyklusphasen in Kombination mit der Differenzierung in die verschiedenen HSPC-Subpopulationen (Abbildung 3.3). Das Ki67-Protein ist ein zellulärer, Nukleus-assoziiertes Proliferationsmarker der Interphase des Zellzyklus. In der Mitose selbst kann es Zelloberflächen relokalisiert vorliegen. Dieses Protein kann in jeder aktiven Phase des Zellzyklus detektiert werden (G_1 , S, G_2 und M [Mitose]) und fehlt lediglich in der inaktiven Phase des G_0 -Arrestes. In dieser Versuchsreihe wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Ki67 verwendet. Dieser war mit dem Fluorochrom FITC konjugiert, Hoechst33342 diente als DNA-Marker, seine Anregungswellenlänge liegt bei 350 nm und sein Emissionsmaximum bei 461 nm.

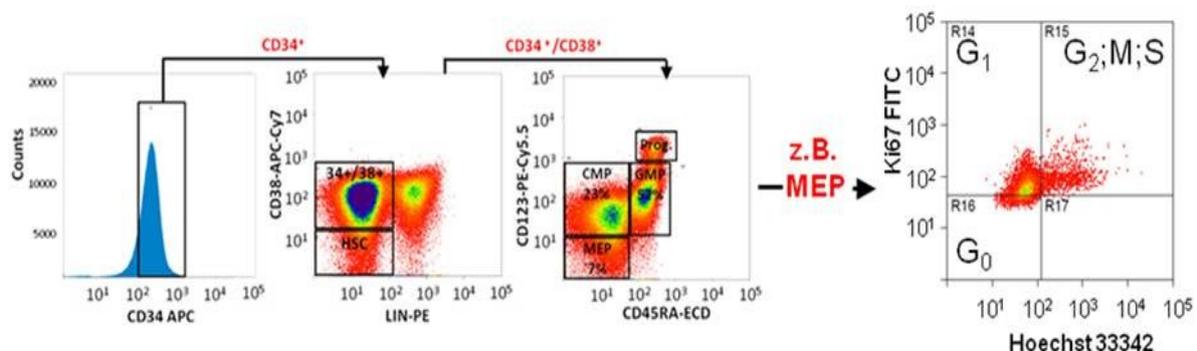


Abbildung 3.3: Repräsentative Darstellung der „gating“-Strategie zur Analyse des Zellzyklus von myeloiden HSPC aus gesundem Knochenmark im Vergleich zu Knochenmark von MM-Patienten. Abgebildet sind die Zellzyklusphasen, die mittels Ki67- und Hoechst 33342-Färbung aufgeschlüsselt werden können, rechts im Bild. HSC und HPC-Subpopulationen wurden wie folgt aufgetrennt: HSC (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^{-10}$); CMP (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^+$, $CD45RA^-$); GMP (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^+$, $CD45RA^+$); MEP (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^-$, $CD45RA^-$). Die Antikörper waren wie folgt Fluorochrom-konjugiert: Ki67-FITC; Lin-PE; CD34-APC; CD38-APC-Cy7; CD123-PE-Cy5.5; CD45RA-ECD. Hoechst 33342 diente als DNA-Marker (Anregungswellenlänge 350 nm; Emissionsmaximum 461 nm).

Die extrazellulären Markierungen wurden wie in Abschnitt 3.2.13.2 beschrieben durchgeführt, bevor das Ki67 Protein intrazellulär immunologisch markiert wurde (Abschnitt 3.2.13.3). Die DNA-Markierung mit Hoechst33342 ist in Abschnitt 3.2.13.4 näher erläutert.

3.2.14.6 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark mittels Bromodeoxyuridin (BrdU) und 7-Amino-Actinomycin D (7AAD)

Die Bestimmung der Zellzyklusphasen von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark wurde mit dem BrdU Flow Kit der Firma BD Biosciences nach Herstellerangaben mit den beinhalteten Antikörpern und Reagenzien durchgeführt.

Verwendet wurden jeweils bis zu 5×10^5 CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark nach immunomagnetischer Anreicherung wie beschrieben in Abschnitt 3.2.4. Die Inkubation mit 10 μ M BrdU wurde für 6 h in I20⁺⁺⁺-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Anschließend an die Inkubation mit BrdU wurden die Zellen extrazellulär mittels anti-CD34 Ak immunologisch markiert, bevor das Protokoll nach Herstellerangaben fortgesetzt wurde. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACS Calibur der Firma BD Biosciences.

Für die Analysen zum Einfluss des TGF β -Signalweges auf den Zellzyklus von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark wurden die Zellen vor der Durchführung des oben beschriebenen BrdU-Färbeprotokolls, wie in Abschnitt 3.2.8 ausgiebig erläutert für sieben Tage unter Stimulationsbedingungen kultiviert.

3.2.14.7 Auswertung durchflusszytometrischer Daten & Definitionen der Signifikanzniveaus

Die Daten der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit den Programmen Summit 5.1 der Firma BD Biosciences oder FCS-Express der Firma De Novo Software (Los Angeles, CA, USA) aufbereitet und für statistische Auswertungen in Excel

(Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) exportiert. Hierfür wurde sofern nicht anders angegeben der Student's t-Test verwendet.

Die Grenzwerte der Signifikanzniveaus dieser Arbeit wurden wie folgt definiert: Ein p-Wert $< 0,05$ wird als signifikant definiert und mit * markiert, ein p-Wert $< 0,01$ wird mit ** markiert, ein p-Wert $< 0,001$ wird mit *** markiert.

3.3 Univariate- & multivariate-Analysen

Den Uni- und Multivariatanalysen dieser Arbeit liegen die Daten der Patientencharakteristika zugrunde, die in den Tabellen 3.7 und 3.8 aufgeführt sind.

Zur Identifikation von Krankheitsparametern, die die drei Blutzellreihen, Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten beeinflussen, führten wir univariate- und multivariate-Analysen anhand eines Regressionsmodells durch.

Die untersuchten Parameter waren:

Das Alter, das Geschlecht, die Stadieneinteilung nach ISS bzw. DS, inklusive der Zusatzeinteilung der Subtypen A und B, der Knochenmarkinfiltrationsgrad, die Anzahl der Osteolysen und die Konzentrationen von Laktatdehydrogenase (LDH) und Creatinin im Serum sowie die Konzentration des Gesamteiweiß im Urin.

Parameter, die in der univariaten Analyse signifikant waren, wurden in die multivariate Kalkulation eingeschlossen. Die multivariaten-Analysen wurden mit der SPSS Statistik *Software* (SpSS Statistics, Version 19, 2010) der Firma IBM Corporation (Armonk, NY, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Eine Knochenmarkinfiltration durch hämatologische Erkrankungen wie das Multiplen Myelom (MM) kann zu einer Unterdrückung der Hämatopoiese führen. Diese Form der hämatopoietischen Insuffizienz wurde bislang eher mechanistisch und deskriptiv als „Verdrängungsmyelopathie“ interpretiert. Über die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der Anämie ist bis dato noch wenig bekannt. Als eine mögliche Ursache der Anämie in MM-Patienten wurde von Maes, K. *et al.* (2010) das BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) als Hpcidin-Promotor-Aktivator identifiziert. Hpcidin selbst ist am physiologischen Eisenstoffwechsel beteiligt (Katrodritou, E. *et al.*, 2009).

Diese Arbeit fokussiert auf die Wechselwirkungen zwischen den malignen Myelomzellen und den myeloiden Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark, die nach dem heutigen Verständnis der Erkrankung nicht direkt betroffen sind. Für die Untersuchungen von HSC und den HPC wurde im Institut für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie eine durchflusszytometrische Zellsortierung etabliert, die es gestattet, HSC, CMP, GMP und MEP anhand spezifischer Zelloberflächenmarker zu separieren. Hierzu wurden Zellen verwendet, die zuvor immunomagnetisch nach CD34⁺ Expression (Abschnitt 3.2.4) angereichert wurden. Im Durchflusszytometer wurde ein Raster (*gate*) auf die lebenden Zellen gelegt und anschließend die Zellsubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker wie folgt getrennt: HSC (Lin⁻, CD34⁺, CD38^{lo}); CMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁻); GMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁺) und MEP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁻, CD45RA⁻) (Abschnitt 3.2.14.1). Der Ausschlussmarker *lineage* (Lin⁺) setzt sich aus einem Antikörpercocktail zusammen, der zur Depletion von reifen T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen benötigt wird. Der im hiesigen Institut verwendete Lin⁺-Marker beinhaltet Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 und CD235a. Diese durchflusszytometrische Methode ermöglichte zum Einen, die Zusammensetzung der genannten Zellsubpopulationen im Knochenmark zu bestimmen und zum anderen, Untersuchungen an den einzelnen Subpopulationen durchführen zu können. Eine der aufwendigsten Untersuchungen, die an Stamm- und Progenitorsubpopulationen durchgeführt wurden, war die Erstellung transkriptioneller Expressionsprofile mittels der Affymetrix™ GeneChip Technologie (Affymetrix Inc.). Hierfür musste zunächst eine Methode etabliert werden, die es gestattete, aus kleinsten Zellzahlen (< 1 × 10⁴ Zellen) geringste Mengen

Gesamt-RNA zu isolieren und im Anschluss auf eine für die Affymetrix™ Technologie (Affymetrix Inc.) ausreichende Menge cRNA zu vervielfältigen. Für die Amplifikation der RNA wurde das WT-Ovation™ System (*whole transcriptome*) der Firma NuGEN Technologies Inc. verwendet, das durch sein neuartiges Magnet basiertes Markierungssystem eine verlustfreie Amplifikation der Gesamt-RNA gewährleistet (Abschnitt 3.1.11).

4.1 Erstellung von HSPC-Subpopulations-spezifischen Profilen des MM

4.1.1 Profile des Transkriptoms von myeloiden Stamm- und Progenitor-subpopulationen basierend auf der Affymetrix™ GeneChip Technologie

Mittels der Affymetrix™ GeneChip Technologie (Affymetrix Inc.) wurden im Verlauf dieser Arbeit Genexpressionsprofile von CD34⁺ Stamm- und Progenitorsubpopulationen erstellt, die zuvor wie in Abschnitt 3.2.14.1 beschrieben durchflusszytometrisch isoliert (sortiert) wurden. Für die Erstellung der Profile wurde der Chip Human Genome U133A 2.0 der Firma Affymetrix Inc. verwendet. Dieser Chip erlaubt die Bestimmung der Expression von 14500 annotierten Genen.

Die erhaltenen Datensätze der einzelnen Subpopulationen wurden mittels der *variance stabilizing* Methode normalisiert und mit dem *Globaltest* Algorithmus ausgewertet. Für diesen Versuch wurde die Gesamt-RNA von mindestens 6×10^3 Zellen der jeweiligen Subpopulationen von jeweils 5 MM-Patienten und 5 gesunden Spendern verwendet. Hierbei ergaben sich im Vergleich gesund versus MM die folgende Verteilungen differentiell exprimierter Gene im MM. Aus 925 differentiell exprimierten Genen im MM waren 434 Gene herauf- und 491 Gene herunter-reguliert. Mittels dieses Algorithmus konnten für die MM-HSC-Population 326 Gene differentiell herauf- und 292 Gene herunter-reguliert identifiziert werden. Die Verteilung in den MM-CMP-Population zeigte 126 Gene herauf- und 198 Gene herunter-reguliert, in den MM-GMP-Population waren 100 Gene herauf-, 170 Gene herunter- und in den MM-MEP-Populationen 96 Gene herauf- und 184 Gene herunter-reguliert. Eine „Top 10“-Liste der differentiell exprimierten Gene sortiert nach Signifikanzen der jeweiligen MM-Subpopulationen ist den Tabellen 4.1 und 4.2 zu entnehmen. Die Gesamtheit aller

differentiell exprimierten Gene der Subpopulationen sind im Internet auf der NCBI/GEO Webseite (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) unter der Einsendenummer: GSE24870 hinterlegt.

Einen Überblick über die Gene, die in mehr als einer Subpopulation differentiell exprimiert wurden, ist im Anhang in Tabelle 0.1 dargestellt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die differentiell exprimierten Gene der jeweiligen Subpopulationen zur Identifizierung betroffener intrazellulärer Signalwege mit den Datenbanken von Biocarta, KEGG und NCBI abgeglichen. Die sich daraus ergebende Zuordnung der Signalwege der einzelnen Subpopulationen ist nach Signifikanz geordnet und zu funktionellen Gruppen zusammengefasst der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Von besonderem Interesse und gestützt von weiteren funktionellen Untersuchungen rückten im weiteren Verlauf dieser Arbeit der TGF β -Signalweg (Abbildung 4.1a) und der p38-MAPKinase Signalweg (Abbildung 4.1b) in den engeren Fokus. So konnten im weiteren Verlauf dieser Arbeit, z.B. die funktionellen Einflüsse des TGF β -Signalweges auf die Proliferation (Abschnitt 4.3.1), die Differenzierung (Abschnitt 4.3.2), das Koloniebildungspotential (Abschnitt 4.3.3), den Zellzyklus (Abschnitt 4.3.4) und die Aktinformierung und somit die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit gezeigt werden.

„Top 10“ herauf regulierter Gene in HSC				„Top 10“ herunter regulierter Gene in HSC			
Gen	Beschreibung	FC	P-value	Gen	Beschreibung	FC	P-value
TGFB111	TGF beta 1 induced transcript 1	3.00	1.08E-04	SKIL	SKI-like oncogene	-8.13	7.60E-06
MEX3D	mex-3 homolog D (C. elegans)	2.87	3.99E-04	RAD23B	homolog (S. cerevisiae)	-4.46	9.00E-07
SOCS3	Sup. of cytokine signaling 3	2.77	6.49E-04	CD44	CD44 (Indian blood group)	-3.98	1.06E-05
VWF	von Willebrand factor	2.70	3.61E-04	ATP5C1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	-3.10	7.97E-05
UCHL1	Ubiquitin thiolesterase L1	2.56	1.19E-04	PSPH	phosphoserine phosphatase	-3.09	4.70E-04
PRR16	proline rich 16	2.47	5.40E-06	ARL17P1	ADP-ribosylation factor-like 17 pseudogene 1	-3.00	1.49E-04
CLU	Clusterin	2.38	4.91E-05	LRRC37A	leucine rich repeat contain. 37A	-2.86	5.62E-04
VANGL1	vang-like 1 (Drosophila)	2.37	1.65E-04	RUFY2	RUN & FYVE dom. containing 2	-2.84	3.05E-05
NBL1	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	2.30	7.10E-05	SMEK2	SMEK homolog 2, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	-2.78	8.09E-05
FLOT2	flotillin 2	2.28	2.70E-04	LRP5L	low density lipoprotein receptor-related protein 5-like	-2.72	6.05E-04
„Top 10“ herauf regulierter Gene in CMP				„Top 10“ herunter regulierter Gene in CMP			
Gen	Beschreibung	FC	P-value	Gen	Beschreibung	FC	P-value
FMO5	flavin containing monooxygenase 5	3.06	1.18E-05	MME	membrane metallo-endopeptidase	-9.83	8.00E-06
TSPAN6	tetraspanin 6	2.77	3.80E-05	CD24	CD24 molecule	-7.70	1.01E-05
HSPB11	heat shock protein family B (small), member 11	2.66	5.49E-05	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	-6.44	1.30E-06
MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	2.48	7.97E-05	POU2AF1	POU class 2 associating factor 1	-5.93	2.78E-05
EIF1	eukaryotic translation initiation factor 1	2.40	5.22E-05	RAG2	recombination activating gene 2	-5.19	1.01E-04
CFH	complement factor H	2.34	3.17E-04	DNTT	Deoxynucleotidyl-transferase, terminal	-4.27	6.81E-04
TUBD1	tubulin, delta 1	2.22	3.13E-04	RAG1	recombination activating gene 1	-4.24	5.32E-05
ADORA2B	adenosine A2b receptor	2.17	7.96E-04	IER3	immediate early response 3	-4.03	6.43E-04
EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)	2.12	7.36E-05	BLNK	B-cell linker	-3.79	6.59E-04
TXNIP	thioredoxin interacting protein	2.11	5.29E-04	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	-3.29	5.47E-05

Tabelle 4.1: „Top 10“ differentiell exprimierter Gene der HSC und CMP Populationen (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

„Top 10“ herauf regulierter Gene in GMP				„Top 10“ herunter regulierter Gene in GMP			
Gen	Beschreibung	FC	P-value	Gen	Beschreibung	FC	P-value
CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3	3.36	4.19E-04	MTMR6	myotubularin related protein 6	-3.68	2.89E-04
KCNK5	potassium channel, subfamily K, member 5	3.26	1.65E-04	PELI1	pellino homolog 1 (Drosophila)	-3.31	1.35E-04
NBL1	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	2.78	1.71E-04	RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	-3.22	3.21E-05
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	2.74	1.95E-04	KIF1A	kinesin family member 1A	-3.15	0.000845
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	2.73	5.68E-04	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	-3.00	4.53E-04
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	2.39	8.79E-05	DUSP10	dual specificity phosphatase 10	-2.88	1.35E-04
LEPR	leptin receptor	2.39	7.28E-05	YTHDC1	YTH domain containing 1	-2.80	3.30E-04
CLU	clusterin	2.38	7.84E-05	JMJD1C	jumonji domain containing 1C	-2.79	6.50E-05
PTPN7	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	2.23	4.47E-04	B3GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase	-2.71	3.02E-04
UBAP2L	ubiquitin associated protein 2-like	2.20	2.65E-04	CDC73	cell divis. cycle 73, Paf1/RNA pol. II compl. homolog (S. cerevisiae)	-2.67	9.37E-04
„Top 10“ herauf regulierter Gene in MEP				„Top 10“ herunter regulierter Gene in MEP			
Gen	Beschreibung	FC	P-value	Gen	Beschreibung	FC	P-value
TXNIP	thioredoxin interacting protein	3.95	1.58E-05	NIACR2	niacin receptor 2	-5.79	2.20E-04
TLR3	toll-like receptor 3	3.87	3.51E-04	BLNK	B-cell linker	-4.55	4.31E-04
VWF	von Willebrand factor	3.64	1.93E-04	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	-4.09	7.70E-05
STXBP6	syntaxin binding protein 6 (amisyn)	3.48	4.39E-04	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	-4.00	3.48E-04
CCNF	cyclin F	3.22	6.02E-04	KIF1A	kinesin family member 1A	-3.99	1.16E-05
DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	3.16	8.69E-04	HERPUD1	homocyst.-inducible, ER stress-induce, ubiquitin-like d. member 1	-3.92	1.25E-04
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	3.00	7.92E-05	CD44	CD44 (Indian blood group)	-3.85	1.08E-04
ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	2.94	5.00E-05	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	-3.67	6.11E-04
MTMR3	myotubularin related protein 3	2.91	9.24E-04	RBM34	RNA binding motif protein 34	-3.62	1.14E-04
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2.85	1.82E-04	SMEK1	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	-3.42	2.14E-05

Tabelle 4.2: „Top 10“ differentiell exprimierter Gene der MEP und GMP Populationen (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

Organisation des Zytoskeletts, Adhäsion und Migration				
Signalweg	HSC p-Wert	CMP p-Wert	GMP p-Wert	MEP p-Wert
- γ branching of actin filaments	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- role of pi3k subunit p85 in regulation of actin organization and cell migration	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- role of mal in rho-mediated activation of srf	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- signalling pathway from g-protein families	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- mcalpain and friends in cell motility	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- integrin signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- cell to cell adhesion signalling	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
Zellzyklus und Proliferation				
Signalweg	HSC p-Wert	CMP p-Wert	GMP p-Wert	MEP p-Wert
- cell cycle: g1/s check point	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- cell cycle g2/m checkpoint	0,0079365	0,01587302	0,00793651	0,00793651
- cyclins and cell cycle regulation	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- influence of ras and rho proteins on g1 to s transition	0,0079365	0,01587302	0,00793651	0,00793651
- inhibition of cellular proliferation by gleevec	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- regulation of cell cycle progression by plk3	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
Signal Kaskaden aktiviert durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsion				
Signalweg	HSC p-Wert	CMP p-Wert	GMP p-Wert	MEP p-Wert
- akt signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- erk1/erk2 mapk signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- growth hormone signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- nfkb signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- p38 mapk signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- ras signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- tgf beta signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- tnfr 1 signalling pathway	0,0079365	0,01587302	0,00793651	0,00793651
Diverse				
Signalweg	HSC p-Wert	CMP p-Wert	GMP p-Wert	MEP p-Wert
- bone remodelling	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- epo signalling pathway	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- hypoxia and p53 in the cardiovascular system	0,0079365	0,01587302	0,00793651	0,00793651
- hypoxia inducible factor in the cardiovascular system	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- oxidative stress induced gene expression via nrf2	0,0079365	0,01587302	0,00793651	0,00793651
- telomeres, telomerase cellular aging and immortality	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651
- vegf hypoxia and angiogenesis	0,0079365	0,00793651	0,00793651	0,00793651

Tabelle 4.3: Auswahl regulierter Signalwege in HSC, CMP, MEP und GMP (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

Die weiterführende Untersuchung der Expression des TGF β -Signalweges in den HSPC-Subpopulationen ergab, dass 20 von 64 Genen des Signalweges differentiell exprimiert vorliegen. Hiervon waren 7 Gene herauf- und 13 Gene herunter-reguliert (Abbildung 4.1). Die Verteilung und die Richtung der differentiellen Expression der Einzelgene führte zu der Schlussfolgerung, dass verstärkte Einflüsse auf die Apoptose, den Zellzyklus, die Aktin/Myosin-Formierung, somit die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit, das Wachstum und

die Differenzierung der HSPC im MM durch eine ständige Überaktivierung des Signalweges vorliegt. Eine ständige Überaktivierung des TGFβ-Signalweges ist eine mögliche Ursache der Anämie in MM-Patienten. Maes, K. *et al.* zeigten 2010 das BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) an der STAT3-Bindungstelle als Heparin-Promotor-Aktivator über die SMAD-Mediatoren des TGFβ-Signalweges fungiert. Heparin selbst ist am physiologischen Eisenstoffwechsel beteiligt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die funktionellen Einflüsse des TGFβ-Signalweges auf die Proliferation (Abschnitt 4.3.1), die Differenzierung (Abschnitt 4.3.2), das Koloniebildungspotential (Abschnitt 4.3.3), den Zellzyklus (Abschnitt 4.3.4) und die Aktinformierung und somit die Adhäsions- und Stress- und Migrationsfähigkeit gezeigt werden.

Die Untersuchung des p38-MAPKinase Signalweges zeigte 10 von 37 Genen differentiell exprimiert, davon lagen 6 Gene herauf- und 4 Gene herunter-reguliert vor. Die detektierten Veränderungen deuten auf eine gestörte Transkription hin, deren Einflüsse zu einer veränderten Zytokinproduktion und Apoptose führen (Abbildung 4.1).

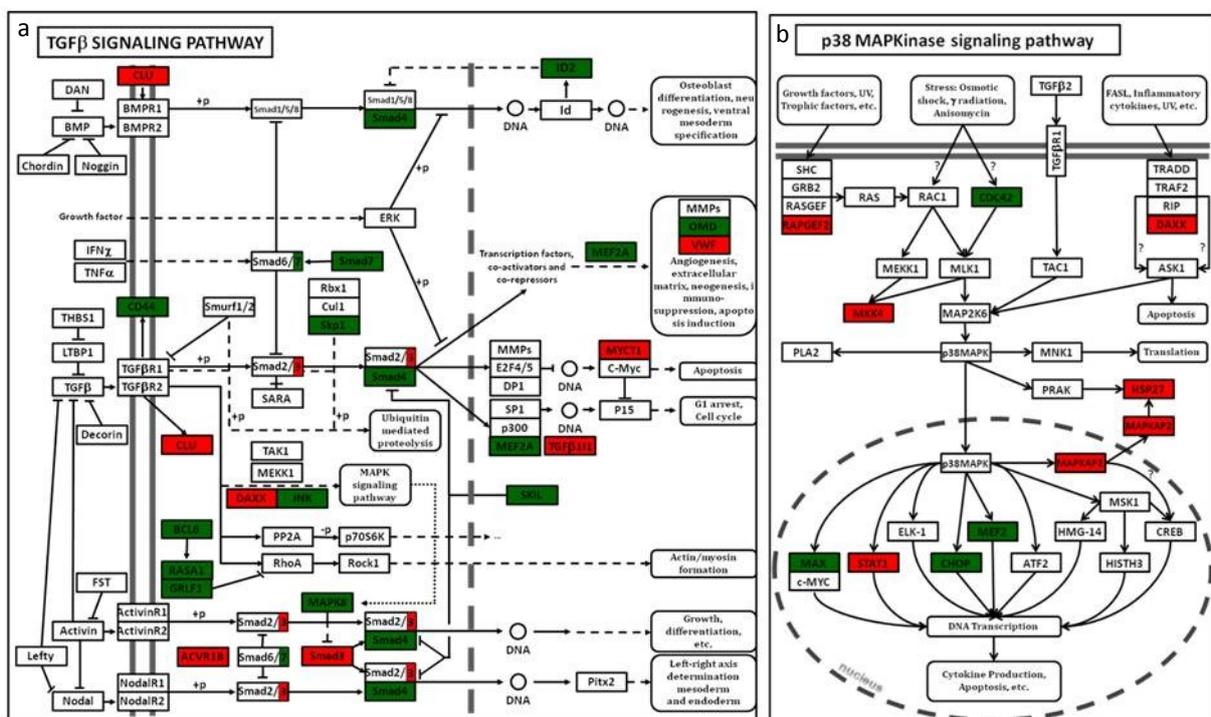


Abbildung 4.1a-b: Differentiell exprimierte Gene im TGFβ-Signalweg (a) und im p38-MAPKinase Signalweg (b) (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

Ein neu etablierter Modell Algorithmus ermöglicht die Identifizierung der hierarchischen Entwicklungsreihenfolge der HSPC-Subpopulationen *in silico*. Dieser neue Algorithmus zeigt die Entwicklung der HSPC-Subpopulationen aus gesundem Knochenmark basierend auf bedingten Veränderungen in ausgewählten Gengruppen ausgehend von dem heutigen Verständnis der Entwicklung von HSPC-Subpopulationen nach Manz, M. G. *et al.*, (2002) fortlaufend aus der HSC als Ursprungspopulation. Vergleichend mit der Entwicklung von HSPC-Subpopulationen aus dem Knochenmark von gesunden Spendern konnten mittels dieser neuen Methode Veränderungen in der Differenzierungsreihenfolge von MM-HSPC-Subpopulationen ausgeschlossen werden (Abbildung 4.2).

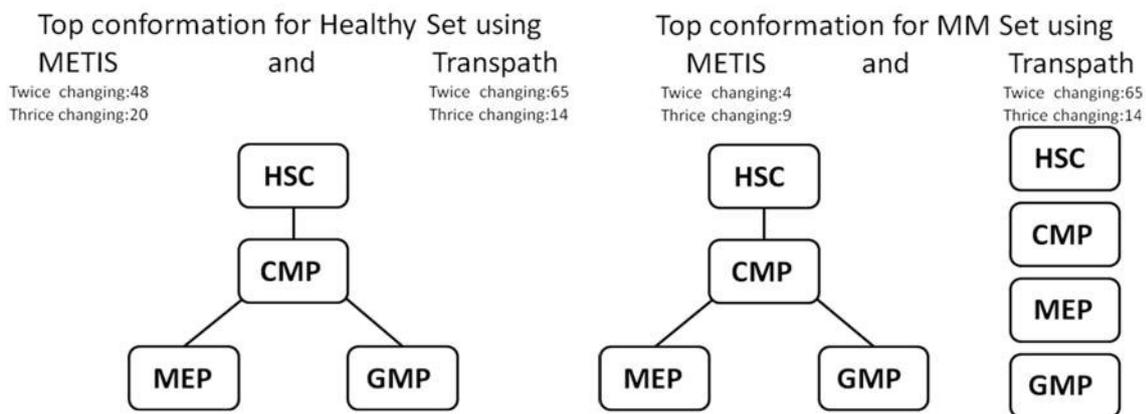


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der mittels Modell Algorithmus, *in silico*, bestimmten Differenzierungskaskade humaner HSPC (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

Mittels der Methode der euklidischen Distanzanalyse (Bruns, I., Buest, S. *et al.*, 2009) war es in dieser Studie nicht möglich, die wahrscheinlichste Differenzierungsreihenfolge von HSPC-Subpopulationen, *in silico*, zu bestimmen. Sie zeigte jedoch, dass sich die Expressionsmuster von HSPC des MM zu denen gesunder HSPC-Subpopulationen unterscheiden. Weiterhin offenbarte die euklidische Distanzanalyse, dass die HSPC-Subpopulationen im MM trotz ihrer Veränderungen in sich eine ähnliche Verteilung und Distanz zueinander haben wie gesunde HSPC-Subpopulationen (Abbildung 4.3).

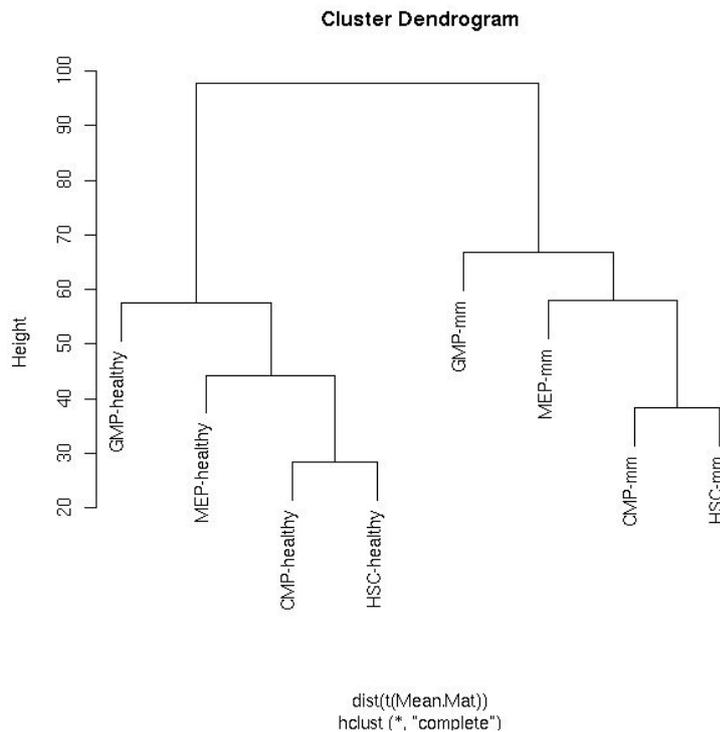


Abbildung 4.3: Vergleichendes *cluster* Dendrogramm einer euklidischen Distanzanalyse der Genexpressionsdaten von HSPC aus gesundem und MM-Knochenmark (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

Zum gleichen Ergebnis wie die Methode der euklidischen Distanzanalyse führte auch die vergleichende Analyse der *relative message entropy* der HSPC-Subpopulationen (Abbildung 4.4) basierend auf der differentiellen Expression ausgewählter Signalwege. Die Bestimmung der *relative message entropy* der HSPC-Subpopulationen wurde als Kooperationsarbeit von Dr. Frederik Roels angefertigt.

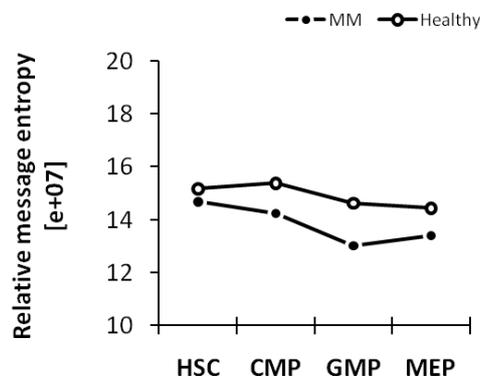


Abbildung 4.4: Vergleichende Analyse der *relative message entropy* von HSPC-Subpopulationen aus gesundem und MM-Knochenmark (aus Bruns, I., Buest, s. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

4.1.2 Vergleichende quantitative Untersuchungen zur Zusammensetzung der Stamm- und Progenitorsubpopulationen im Knochenmark von MM-Patienten und gesunden Spendern

Mittels der einleitend beschriebenen Methode der Durchflusszytometrie war es möglich, vergleichend die Zusammensetzung der Stamm- und Progenitor-subpopulationen von MM-Patienten und gesunden Spendern zu untersuchen. Hierfür wurden aus bis zu 20 ml Knochenmark mittels Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen isoliert und anschließend immunomagnetisch nach $CD34^+$ angereichert (Abschnitt 3.2.4). Der immunologische Nachweis der HSC und HPC-Subpopulationen erfolgte im Durchflusszytometer mittels spezifischer monoklonaler, Fluorochrom-konjugierter Antikörper gegen $CD34$ (APC), $CD38$ (APC-Cy7), $CD45RA$ (ECD) und $CD123$ (PE-Cy5.5). Der eingangs erläuterte Antikörpercocktail Lin^+ als Ausschlussmarker für reife T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen bestand in dieser Untersuchungsreihe ausschließlich aus Antikörpern, die mit dem Fluorochrom PE konjugiert waren. Durchflusszytometrisch wurden die HSC-Population als Lin^- , $CD34^+$, $CD38^{-10}$, die CMP-Population als Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^+$, $CD45RA^-$, die GMP-Population als Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^+$, $CD45RA^+$ und die MEP-Population als Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^-$, $CD45RA^-$ deklariert (Abbildung 4.5).

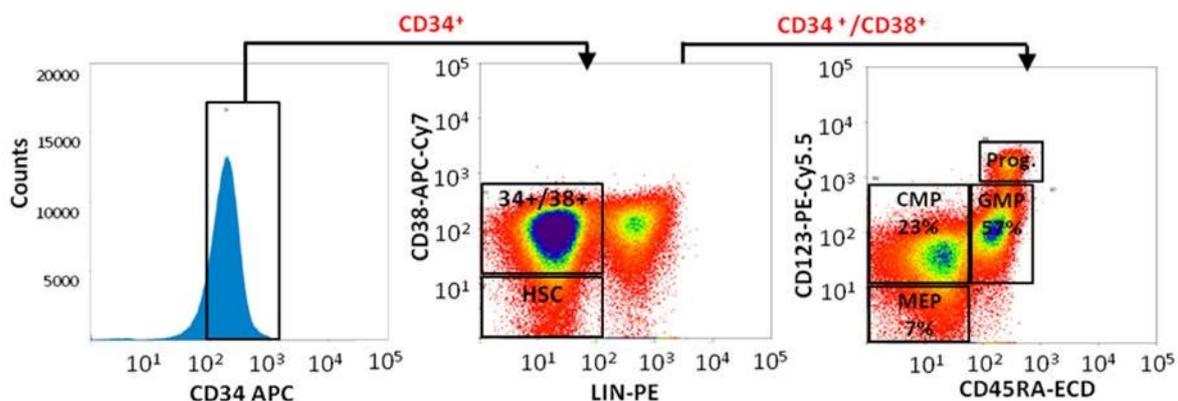


Abbildung 4.5: Dargestellt ist exemplarisch die durchflusszytometrische Strategie zur Auftrennung der HSC und HPC-Subpopulationen [HSC (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^{-10}$); CMP (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^+$, $CD45RA^-$); GMP (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^+$, $CD45RA^+$); MEP (Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD123^-$, $CD45RA^-$)] erstellt aus einer Messung von gesundem Knochenmark

Die Ergebnisse der vergleichenden, quantitativen Untersuchung der Verteilung der HSC und HPC-Subpopulationen im Knochenmark von gesunden Spendern ($n=5$) und Knochenmark von neudiagnostizierten MM-Patienten ($n=12$) ergab prozentuell eine signifikante

Verminderung ($p = 0,024$) in der MEP-Fraktion bei einer ebenfalls signifikanten Zunahme der CMP-Subpopulation ($p = 0,044$) gezeigt in Abbildung 4.6. Die Abweichung der Einzelmessungen der MEP-Fraktionen variierte im prozentuellen Bereich zwischen 1,15 % und 9,52 % im MM, die Variation der Gesundproben lag im Bereich von 4,70 % und 10,01 %. Der Abweichungsbereich der CMP-Fraktion der MM-Proben umfasste 22,79 % bis 31,04 %, die Abweichung der Gesundproben beinhaltete den Bereich von 20,60 % bis 26,90 %. Für die MEP-Fraktion des MM resultierte hieraus eine 2,32 fache Verminderung und für die CMP-Population eine 1,05 fache Vermehrung.

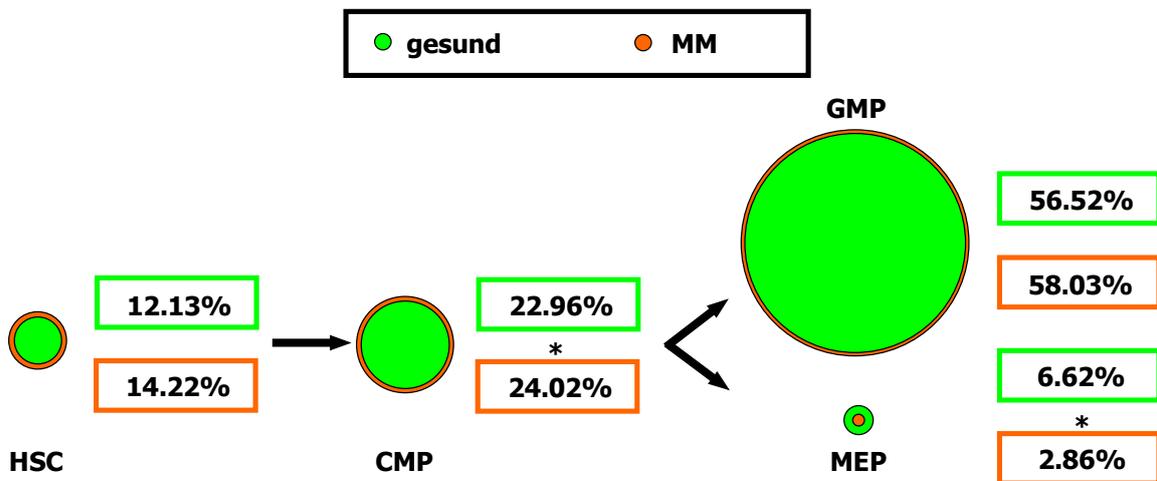


Abbildung 4.6: Prozentuelle Verteilung von HSC und HPC-Subpopulationen im Knochenmark. Verglichen wird Knochenmark von gesunden Spendern (grün) mit dem von MM-Patienten (orange). Die Kreise repräsentieren die einzelnen Subpopulationen. Ihre Größe ist auf die gesunde HSC als Wert 1 normiert und sie stehen diesbezüglich in ihrer Größe in Relation. Signifikante Veränderungen sind mit einem Sternchen markiert ($p < 0,05$)

Die Kalkulation der Gesamtzellzahlen/ μl Knochenmark ergab hingegen in jeder der Subpopulation eine Verminderung im MM. Die HSC-, CMP- und GMP-Populationen lagen signifikant vermindert vor (HSC $p = 0,018$; CMP $p = 0,0074$; GMP $p = 0,0095$). Die MEP-Population war signifikant vermindert ($p = 0,00012$) im MM dargestellt in Abbildung 4.7.

Die Abweichungen der Einzelmessungen waren wie folgt verteilt:

HSC-MM 1,7 Zellen/ μ l - 68,8 Zellen/ μ l; HSC-gesund 36,3 Zellen/ μ l - 56,3 Zellen/ μ l; CMP-MM 2,8 Zellen/ μ l - 58,7 Zellen/ μ l; CMP-gesund 53,1 Zellen/ μ l - 128,6 Zellen/ μ l; GMP-MM 6,7 Zellen/ μ l - 146,7 Zellen/ μ l; GMP-gesund 103,4 Zellen/ μ l - 376,9 Zellen/ μ l; MEP-MM 0,4 Zellen/ μ l - 21,7 Zellen/ μ l; MEP-gesund 19,7 Zellen/ μ l - 40,2 Zellen/ μ l

Hierdurch ergaben sich für die HSC- eine 2,1 fache, die CMP- eine 2,3 fache, die GMP- eine 2,6 fache und für die MEP-Fraktion eine 4,2 fache Reduktion im MM.

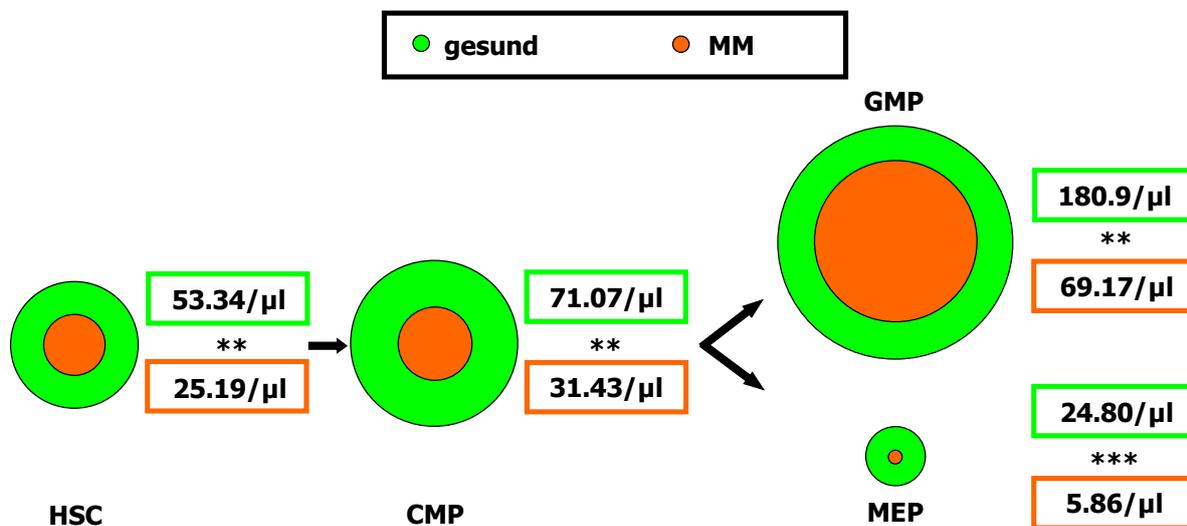


Abbildung 4.7: Verteilung von HSC und HPC-Subpopulationen im Knochenmark von gesunden Spendern (grün) und von MM-Patienten (orange) als Zellzahlen pro μ l Knochenmark. Die Kalkulation basiert auf der Ausgangsmenge Knochenmark, der Anzahl CD34⁺-Zellen und dem durchflusszytometrisch bestimmten prozentualen Anteil der einzelnen Subpopulationen. Die gezeigten Kreise repräsentieren die einzelnen Subpopulationen, sind auf die gesunde HSC als Wert 1 normiert und stehen diesbezüglich in ihrer Größe in Relation. Signifikante Veränderungen sind mit Sternchen markiert ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***)

4.2 Funktionelle Analysen des MM

4.2.1 Retrospektive Untersuchung zum Zellschicksal später myeloider Progenitoren mittels CFC-Versuch (*colony forming cell*)

Die Ergebnisse der vorangegangenen quantitativen Analysen zur Zusammensetzung des Knochenmarks von gesunden Spendern und MM-Patienten warfen zunächst die Frage auf, ob die im Durchflusszytometer beobachteten Veränderungen der Komposition der Subpopulationen der CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen in einer veränderten Koloniebildungs-

kapazität resultieren. Hierfür wurde zunächst mittels der Methode des *colony forming cell* (CFC)-Versuchs das Zellschicksal später myeloider Vorläuferzellen untersucht. In diesem auch als CFU-GEMM-Ansatz bekannten Versuch lässt sich die Frequenz später myeloider Progenitoren bestimmen, indem die aus den Vorläufern differenzierenden Kolonien ausgewertet werden. Die hervorgehenden Kolonietypen werden in rote, weiße und gemischte Kolonien unterteilt (Abbildung 4.8b-d). Diese können bei der Auswertung wiederum in sechs Nebenklassen unterteilt werden. Die roten Kolonien gliedern sich dabei in die rundlichen CFU-E Kolonien (*colony-forming-unit-erythroid*) und die zerstreut wachsenden BFU-E Kolonien (*burst-forming-unit-erythroid*). Die weißen Kolonien differenzieren in Granulozyten Kolonien, die sogenannten CFU-G (*colony-forming-unit-granulocyte*), in Makrophagen Kolonien CFU-M (*colony-forming-unit-macrophage*) und in Granulozyten/Makrophagen Kolonien CFU-GM (*colony-forming-unit-granulocyte, macrophage*). Die gemischten Kolonien werden als Mix Kolonien (CFU-GEMM; *colony-forming-unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte*) bezeichnet. Zum einen wird bei der Auswertung der CFU-Daten die Gesamtzahl der koloniebildenden Zellen bestimmt und in Bezug auf die Zellzahl eingesetzter Zellen gesetzt, diese wird als Kolonienfrequenz (CFU-Frequenz) bezeichnet (Abbildung 4.9), zum Anderen werden die Koloniezahlen der einzelnen Kolonietypen und deren Frequenz in Bezug auf die Gesamtzahl der Kolonien bestimmt (Abbildung 4.10).

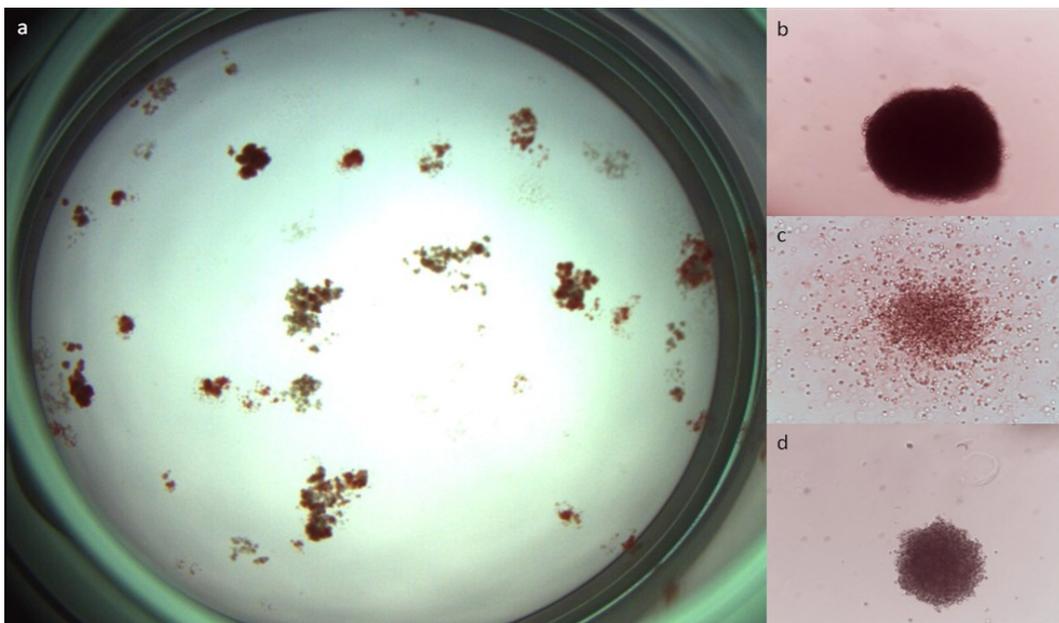


Abbildung 4.8a-d: Überblick über ein Well (Vertiefung) einer 24-Well-Zellkulturplatte eines CFC-Versuches (a). Je ein typischer Vertreter der roten Kolonien BFU-E in (b), der weißen Kolonien CFU-GM in (c) und der Mix-Kolonien CFU-GEMM (d).

Die CFU-Frequenz von gesundem Knochenmark im Vergleich mit MM-Patienten zeigte eine signifikante Verminderung ($p = 0,032$) im MM, was die Ergebnisse der vorangegangenen durchflusszytometrischen, quantitativen Bestimmung der Subpopulationen insofern bestätigte, dass sie die Abnahme der gesamten Subpopulationen widerspiegelte (Abbildung 4.9). Im Median bildeten sich im gesunden Knochenmark 269 Kolonien (Variationsbereich 50-391 Kolonien) aus 2000 eingesetzten $CD34^+$ -Zellen, während es im MM lediglich 58 Kolonien (Variationsbereich 6-222 Kolonien) waren. Hieraus ergibt sich eine 4,65 fache Reduktion der Gesamtkolonien im MM.

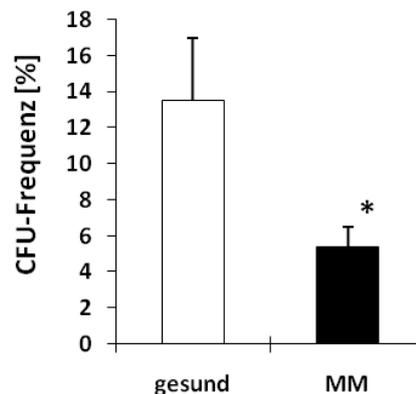


Abbildung 4.9: CFU-Frequenz [%] im Vergleich von gesundem und MM-Knochenmark. In die Versuche wurden je 2000 $CD34^+$ -Zellen eingesetzt. Bestimmt wurde retrospektiv die prozentuelle Frequenz der Koloniebildenden Zellen in Relation zur Gesamtkolonienzahl. Im Median bildeten sich 269 Kolonien aus $CD34^+$ -Zellen des gesunden Knochenmarks ($n=4$) und lediglich 108 Kolonien aus dem MM ($n=8$)

Die Frequenzen der einzelnen Kolonietypen in Bezug auf die Gesamtkolonienzahl spiegelten ebenfalls die Ergebnisse der vorangegangenen durchflusszytometrischen Analysen wider. Die zuvor beobachtete signifikante prozentuale Reduktion der MEP-Fraktion zeigte sich anhand einer ebenfalls signifikanten Verminderung roter Kolonien sowohl der CFU-E ($p = 0,00074$) als auch der BFU-E ($p = 0,014$). Die signifikante prozentuale Erhöhung der CMP-Fraktion zeichnete sich in einer signifikant erhöhten Anzahl gemischter Kolonien (CFU-GEMM; $p = 0,046$) ab (Abbildung 4.10). Für eine bessere Übersicht wurden in dieser Abbildung nur die medianen Frequenzen der roten Kolonien detailliert angegeben und weiterhin von der Frequenz weißer oder gemischter Kolonien unterschieden.

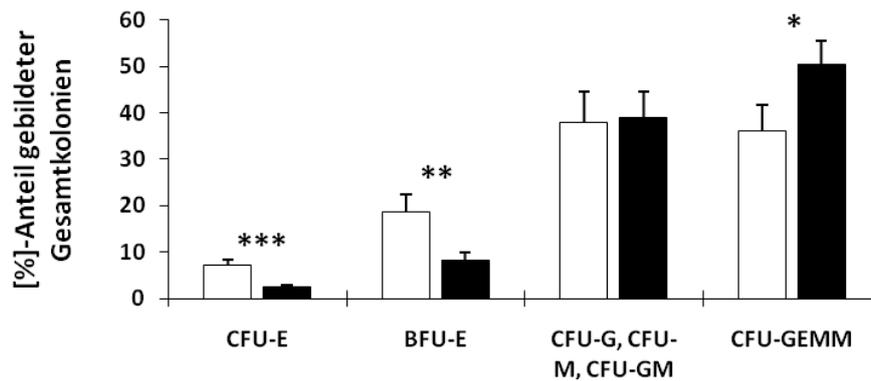


Abbildung 4.10: Vergleichend dargestellt ist der prozentuale Mittelwert gebildeter roter Kolonien aufgeschlüsselt in CFU-E und BFU-E, weißer Kolonien (CFU-G; CFU-M; CFU-GM) und gemischter Kolonien in Bezug auf den Mittelwert der Gesamtanzahl gebildeter Kolonien, die sich aus je 2000 CD34⁺-Zellen aus gesundem Knochenmark (weiß [n=4]) oder aus MM-Patienten (schwarz [n=9]) gebildet haben.

Aus diesen Daten ergaben sich für die CFU-Frequenzen der CFU-E- eine 3,24 fache und der BFU-E-Population eine 1,85 fache Verminderung im MM sowie eine 1,66 fache Vermehrung der CFU-GEMM Fraktion.

Im Median bildeten sich aus 2000 eingesetzten CD34⁺-Zellen eine CFU-E Kolonie (Variationsbereich 0-10 Kolonien) und 3 BFU-E Kolonien (Variationsbereich 0-32 Kolonien) in den MM-Proben im Gegensatz zu 19 CFU-E Kolonien (Variationsbereich 3-39 Kolonien) und 38,5 BFU-E Kolonien (Variationsbereich 8-103 Kolonien) in den Gesundproben. Die weißen Kolonietypen CFU-G, CFU-M und CFU-GM wurden im Median mit 36 Kolonien (Variationsbereich 4-174 Kolonien) je MM-Probe und mit 90,5 Kolonien (Variationsbereich 13-210 Kolonien) je Gesundprobe ermittelt. Weiterhin entstanden im Median 45 Mix-Kolonien (Variationsbereich 8-72 Kolonien) im MM, hingegen 79,5 CFU-GEMM (Variationsbereich 26-123 Kolonien) in den Gesundproben.

4.2.2 Vergleichende Untersuchungen des Langzeitpotentials früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von gesunden Spendern und MM-Patienten mittels der *long-term-colony-initiating-cell* (LTC-IC)-Methode

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen ein Einfluss auf das Zellschicksal später myeloider Progenitoren festgestellt werden konnte, der suggerierte, dass es vermehrt unreife Progenitoren im MM geben muss, war es naheliegend, das Schicksal früher, myeloider Vorläufer näher zu betrachten. Für die Bestimmung der Frequenz früher, myeloischer Progenitorzellen in der hämatopoietischen Zellfraktion wurde der sogenannte LTC-IC-Versuch (*long-term-colony-initiating-cell*) verwendet. Hierbei werden CD34⁺-Zellen, wie im Material & Methoden Teil eingehend beschrieben, auf der adhärent wachsenden, murinen Zelllinie AFT024 ausplattiert. Die AFT024-Zellen fungieren als Zellstroma, welches das primitive Zellschicksal der CD34⁺-Zellen erhalten soll. Bevor CD34⁺-Zellen in einer Verdünnungsreihe auf die AFT024-Zellen ausplattiert werden konnten, wurden die konfluenten AFT024-Zellen in den „96-Well-Zellkulturplatten“ mittels 30 Gray Röntgenstrahlung bestrahlt, um eine weitere Proliferation der Stromazellen zu verhindern. Im Verlauf der 5 wöchigen Kultivierung der CD34⁺-Zellen bilden frühe Vorläuferzellen sogenannte CAFC-Kolonien (*cobblestone-area-forming-cells*-Kolonien), in der die Zellen sich pflastersteinartig anordnen. Späte Vorläuferzellen hingegen differenzieren zu Makrophagen oder Megakaryozyten aus. Zur Ermittlung des Potentials früher Vorläuferzellen zur Bildung von Kolonien wurden anschließend an die 5 wöchige Kultivierung die verbliebenen Zellen mit klonogenem Methylzellosemedium überschichtet. In diesem Medium sollte in den darauf folgenden 2 Wochen Kultivierungszeit die Differenzierung der frühen Progenitoren induziert werden. Zusätzlich verhindert die semisolid Konsistenz des Methylzellosemediums, dass die Zellen der entstehenden sekundären Kolonien auseinander wandern. Die Zellen, die anschließend an die erste, 5 wöchige Kultivierung ihr Koloniebildungspotential beibehalten haben, werden entsprechend des Auswerteverfahrens als LTC-IC (*long-term-culture-initiating-cell*) bezeichnet. Mittels lichtmikroskopischer Auswertung der mit Kolonien besiedelten Zellkulturplatten ließ sich unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms L-Calc (StemSoft Inc., Version 1.1), die LTC-IC-Frequenz der ausgesäten Zellfraktion bestimmen. Bei der Auswertung wurden jeweils die positiven „Wells“ einer „96-Well-Zellkulturplatte“ pro Verdünnung ausgezählt. Als Positiv wurde jedes „Well“ gewertet, in dem die Bildung von sekundären Kolonien nachzuweisen war.

Die vergleichende Auswertung der LTC-IC-Versuche, die an je 6000 CD34⁺-Zellen pro Probe aus gesundem oder MM-Knochenmark durchgeführt wurden, ergab auch hier eine signifikante Verminderung der LTC-IC-Frequenz ($p = 0,002$) und somit einen weiteren Hinweis auf ein vermindertes Selbsterneuerungspotential myeloider Vorläuferzellen im MM (Abbildung 4.11).

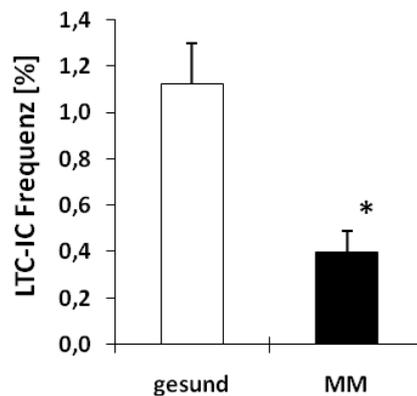


Abbildung 4.11: LTC-IC-Frequenz von (n=4) gesundem Knochenmark und (n=9) Knochenmark von MM-Patienten. Die Frequenzen wurden mittels der Software L-Calc (Version 1.1) der Firma StemSoft Inc. errechnet. Gezeigt ist ein signifikanter Rückgang der LTC-IC-Frequenz im MM

4.2.3 Untersuchungen zum „programmierten“-Zelltod (Apoptose) von myeloiden HSPC im Vergleich von gesundem und MM-Knochenmark.

4.2.3.1 Cell-Death-Detection-ELISA

Die Erkenntnisse aus den vorangegangenen Versuchen legten eine Veränderung im Selbsterneuerungsverhalten von myeloiden HSPC (*hematopoietic stem and progenitor cells*) im Knochenmark von MM-Patienten nahe. Diese Veränderungen deuteten auf eine erhöhte Anzahl unreifer Vorläuferzellen hin bei gleichzeitiger Abnahme der Zellzahlen aller Subpopulationen. Zur Charakterisierung des Phänomens der Verringerung der Subpopulationen sollte die Frage bearbeitet werden, ob eine erhöhte Anzahl HSPC in den „programmierten“-Zelltod eintreten. Hierfür wurden Knochenmarkserum und CD34⁺-Zelllysate (5×10^4 Zellen je Probe) von gesunden Spendern mit dem von MM-Patienten in einem ELISA-basierten *Cell-Death-Detection*-Kit der Firma Roche verglichen. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Messung, gemessen wurde die Absorption der Proben bei 409 nm gegen einen internen Standard. Das generelle Prinzip dieses ELISA-Versuches basiert auf der Detektion Histon-assoziiierter DNA-Fragmentierung (Mono- und Oligo-nukleosomen)

resultierend aus dem induzierten Zelltod. Dieser *sandwich*-ELISA beinhaltet einen Anti-Histon-Antikörper, der mit den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 interagiert und einen Anti-DNA POD Antikörper, der sowohl an einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA bindet.

In dieser Versuchsreihe konnte keine erhöhte DNA-Degradierung detektiert und somit eine erhöhte Histon-basierte Apoptoserate im Knochenmark von MM-Patienten im Vergleich zum Knochenmark von gesunden Spendern ausgeschlossen werden.

4.2.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Caspase 3 Aktivität an HSPC aus gesundem und MM-Knochenmark

Die Erkenntnisse aus den Affymetrix™ Genechip Profilen (Affymetrix Inc.) der myeloiden Subpopulation legten nahe, dass dennoch eine eventuelle Veränderung der Apoptoseregulation in HSCPs der MM-Patienten vorliegen könnte, obwohl keine Veränderungen an Knochenmarkserum oder an CD34⁺-Zelllysaten von MM-Patienten gefunden werden konnten. Neben dem ausschließlich in der HSC-Population regulierten Gen, das für die Caspase 2 kodiert, wurde in HSC, CMP und GMP auch das für die Caspase 8 kodierende Gen differentiell exprimiert vorgefunden. Dies war Anlass, eine eventuelle Veränderung der Apoptoseregulation auf der Ebene der einzelnen Subpopulationen zu untersuchen. Ausgewählt wurde das in Abschnitt 3.2.14.1 näher erläuterte durchflusszytometrische Verfahren zur Auftrennung der myeloiden HSPC-Subpopulationen und erweitert um einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen *cleaved*-Caspase 3 (Alexa Fluor®488-konjugiert). Dieser Antikörper detektiert ausschließlich die aktivierte Form der genannten Caspase. Caspase 3 ist neben den Caspasen 6 und 7 eine der zentralen Effektorcaspasen, unter anderem für die Caspase 8. Diese zelleigenen Effektorcaspasen (*cysteinyl-aspartate specific protease*) spalten enzymatisch Bestandteile des Cytoskeletts, z.B. Aktin und Lamin, weiterhin aktivieren Effektorcaspasen diverse Nukleasen, die im Verlauf der Apoptose nukleäre DNA degradieren.

4.2.4 Zellzyklusuntersuchungen an myeloiden HSPC aus dem Knochenmark von gesunden Spendern und MM-Patienten

Die Ergebnisse sowohl der quantitativen, durchflusszytometrischen Untersuchung der Subpopulationen (Abschnitt 4.1.2) als auch die klonogenen Langzeitkulturversuche (Abschnitt 4.2.1) spiegeln ein Problem im Selbsterneuerungspotential myeloider HSPC im Knochenmark von MM-Patienten wider.

Für genauere Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen wurden die Zellzyklusphasen der Subpopulationen aus gesundem und MM-Knochenmark durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde das in Abschnitt 3.2.14.1 näher erläuterte durchflusszytometrische Verfahren zur Auftrennung der myeloiden Subpopulationen umgewandelt angelehnt an eine Publikation von Marieke A. G. *et al.* (2009). In dieser Publikation wurden die prozentuellen Anteile der Zellzyklusphasen von murinen HSCs durchflusszytometrisch mittels Hoechst33342 und einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen Ki67 bestimmt. Das Ki67-Protein ist ein zellulärer, Nukleus-assoziiertes Proliferationsmarker der Interphase des Zellzyklus. In der Mitose selbst kann es Zelloberflächen relokalisiert vorliegen. Dieses Protein kann in jeder aktiven Phase des Zellzyklus detektiert werden (G_1 , S, G_2 und M (Mitose)) und fehlt lediglich in der inaktiven Phase des G_0 -Arrestes. In dieser Versuchsreihe wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Ki67 verwendet. Dieser war mit dem Fluorochrom FITC konjugiert.

Hoechst33342 diente als DNA-Marker, seine Anregungswellenlänge liegt bei 350 nm und sein Emissionsmaximum bei 461 nm.

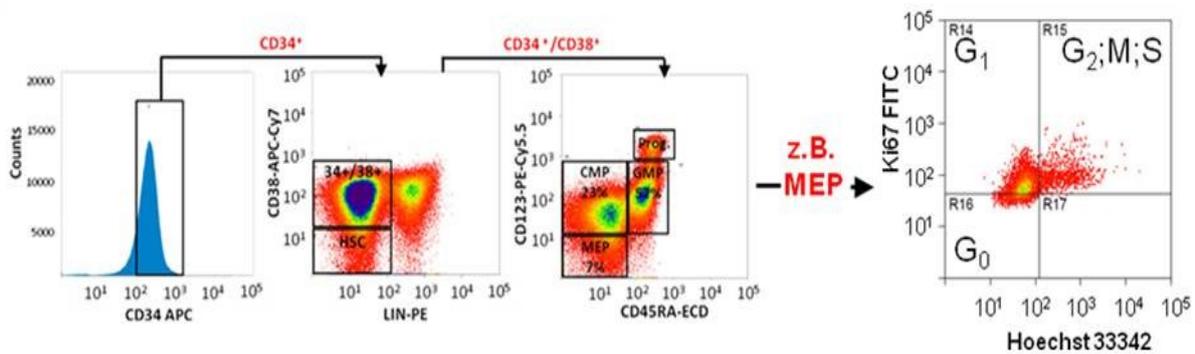


Abbildung 4.12: Repräsentative Darstellung der *gating*-Strategie zur Analyse des Zellzyklus von myeloiden HSPC aus gesundem Knochenmark im Vergleich zu Knochenmark von MM-Patienten. Abgebildet sind die Zellzyklusphasen, die mittels Ki67- und Hoechst 33342-Färbung aufgeschlüsselt werden konnten, rechts im Bild. HSC und HPC-Subpopulationen wurden wie folgt aufgetrennt: HSC (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻); CMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁺); GMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁻); MEP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁻, CD45RA⁻). Die Antikörper waren wie folgt Fluorochrom-konjugiert: Ki67-FITC; Lin-PE; CD34-APC; CD38-APC-Cy7; CD123-PE-Cy5.5; CD45RA-ECD. Hoechst 33342 diente als DNA-Marker (Anregungswellenlänge 350 nm; Emissionsmaximum 461 nm)

Diese neu etablierte, sieben Farben umfassende, durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung der Zellzyklusphasen zeigte im Vergleich von gesund und MM-Knochenmark eine signifikante Verschiebung von der G₁ in die G₀-Phase bei unveränderten G₂-, M- und S-Phasen in der MEP-Fraktion des MM (Abbildung 4.13). Dieser Übergang der MEP-Fraktion in einen G₀-Zellarrest kann einer der Gründe für den in den vorangegangenen Versuchen beobachteten Rückgang der MEP-Fraktion bzw. seiner resultierenden reifen Zellkolonien sein. In den anderen myeloiden Subpopulationen waren keine signifikanten Veränderungen in den Zellzyklusphasen festzustellen.

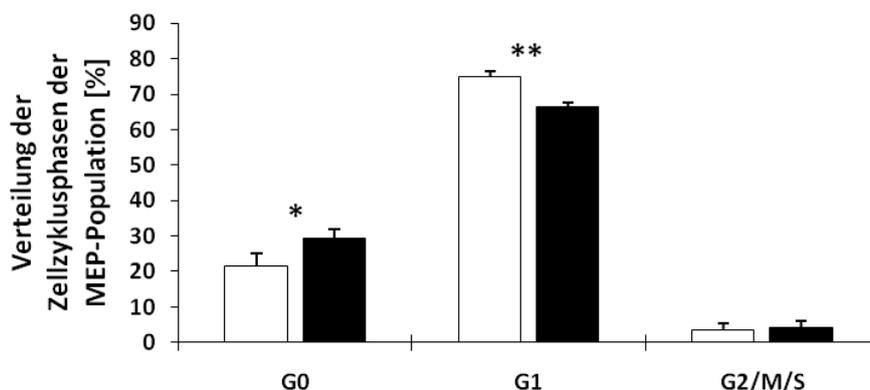


Abbildung 4.13: Prozentuale Verteilung der MEP-Fraktionen in den Zellzyklusphasen. Verglichen wurden MEP aus Knochenmark von n = 6 gesunden Spendern (weiß) und n = 4 MM-Patienten (schwarz). Abgebildet ist die signifikante Erhöhung der in der G₀-Phase befindlichen Zellen bei gleichzeitiger, signifikanter Abnahme der in der G₁-Phase befindlichen Zellen im MM

4.2.5 Untersuchungen zur Adhäsionsfähigkeit von HSPC aus dem Knochenmark von gesunden Spendern im Vergleich zu MM-Patienten

Neben Hinweisen zur transkriptionellen Dysregulation von Apoptose- und Zellzyklusfaktoren ergaben die Auswertungen der subpopulationsspezifischen Expressionsprofile auch differentiell exprimierte Gene, die mit der Fähigkeit zur Adhäsion von Zellen in Verbindung gebracht werden. Als prominentester differentiell exprimierter Vertreter dieser Gene im MM sei an dieser Stelle der HA-Rezeptor CD44 genannt. Da insbesondere für hämatopoietische Stammzellen die Fähigkeit, in der Stammzellnische zu adhären und mit dieser zu interagieren von größter Bedeutung ist und auch für Progenitorzellen die Fähigkeit zur Adhäsion als Grundlage der Migration eine entscheidende Rolle spielt, wurde aufgrund der Affymetrix (Affymetrix Inc.) Daten beschlossen, die Fähigkeit zur Adhäsion von HSPC aus dem Knochenmark von MM-Patienten mit dem von gesunden Spendern zu vergleichen. Für diese Adhäsionsversuche wurden handelsübliche Objektträger in fest definierte Areale eingeteilt. Diese wurden anschließend entweder mit HA oder Fibronectin als Adhäsionsmediatoren beschichtet. Von jeder Subpopulation der Proben wurden 2500 Zellen sortiert und anschließend jede Subpopulation auf ein eigenes, beschichtetes Areal aufgebracht. Im Anschluss folgte eine 3 stündige Inkubation im Brutschrank gefolgt von einigen Waschungen der Areale zur Entfernung der nicht-adhären Zellen. Die adhären Zellen wurden im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt.

Zunächst wurden diese Versuche auf HA beschichteten Objektträgern durchgeführt, weil die differentielle Expression von CD44 in den HSPC von MM-Patienten funktionell überprüft werden sollte. Dabei zeigten sich signifikante, prozentuelle Reduktionen in der Adhäsionsfähigkeit der HSC-, CMP-, GMP-Fraktionen und der MEP-Fraktion (alle Signifikanzen sind $< 0,001$) der MM-Patienten. Lag die mediane, prozentuelle Adhäsion gesunder MEPs noch bei ca. 50 %, war sie im MM auf ca. 3,05 % gesunken. Weiterhin war zu beobachten, dass mit zunehmender Differenzierung von der HSC über die CMP zu GMP und MEP die Fähigkeit zu adhären abnahm (Abbildung 4.14).

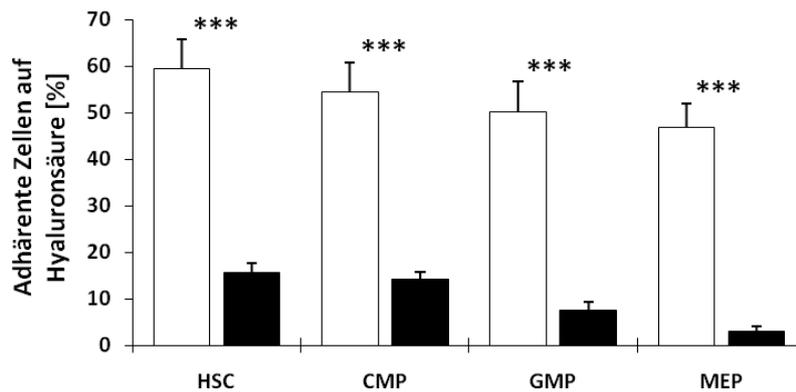


Abbildung 4.14: Prozentuale Fähigkeit zur Adhäsion auf HA beschichteten Objektträgern von HSPC aus dem Knochenmark von n=4 gesunden Spendern (weiß) im Vergleich mit HSPC von n=3 MM-Patienten (schwarz). Die Zellen wurden in einer 3 stündigen Inkubation adhären. Die adhären Zellen wurden im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und die resultierenden Daten prozentual in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl abgebildet. Signifikanzen: HSC $p = 8,4 \times 10^{-5}$; CMP $p = 1,2 \times 10^{-4}$; GMP $p = 1,1 \times 10^{-4}$; MEP $p = 3,4 \times 10^{-9}$

Im Median adhären 3073,8 HSC (Variationsbereich 2514-3227 Zellen), 2831,3 CMP (Variationsbereich 2268-2967 Zellen), 2518,8 GMP (Variationsbereich 2108-2897 Zellen) und 2448,8 MEP (Variationsbereich 1964-2502 Zellen) von eingesetzten 5000 Zellen der jeweiligen Subpopulationen aus gesundem Knochenmark. Im Gegensatz hierzu adhären nur 770 HSC (Variationsbereich 718-860 Zellen), 708,3 CMP (Variationsbereich 658-764 Zellen), 378 GMP (Variationsbereich 332-448 Zellen) und 152,8 MEP (Variationsbereich 131-190 Zellen) aus MM-Knochenmark.

Anhand dieser Daten wurden in der HSC- eine 3,99 fache, in der CMP- eine 3,99 fache, in der GMP- eine 6,82 fache und in den MEP-Population eine 16,11 fache Reduktionen im Adhäsionsvermögen auf HA beschichteten Objektträgern der Subpopulationen aus MM-Knochenmark ermittelt.

Zur Überprüfung, ob die generelle Fähigkeit zur Adhäsion im MM reduziert ist oder ob es sich um einen CD44-spezifischen Effekt handelt, wurden dieselben Versuche auch an Fibronectin beschichteten Objektträgern durchgeführt. Mit dem Ergebnis, dass auch auf Fibronectin in allen Subpopulationen die Fähigkeit zur Adhäsion signifikant, im Falle der MEP-Fraktion sogar signifikant, wenn auch nicht so drastisch wie auf HA beschichteten Objektträgern, gemindert ist im Knochenmark von MM-Patienten. Auch in diesen Versuchen war erneut zu beobachten, dass mit zunehmender Differenzierung von der HSC über die CMP zu GMP und MEP die

Fähigkeit zu adhären sowohl in gesundem als auch im Knochenmark von MM-Patienten abnimmt (Abbildung 4.15).

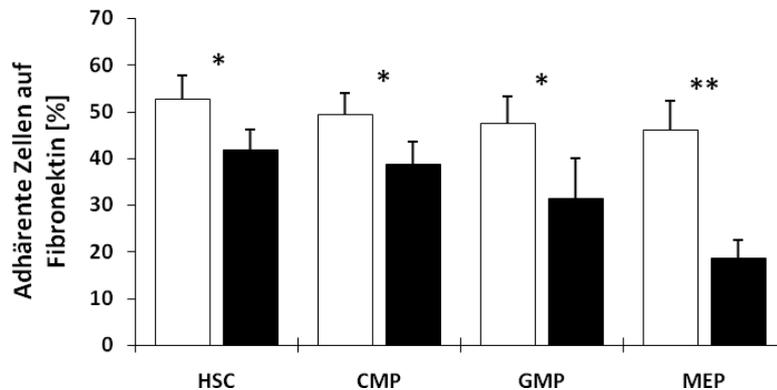


Abbildung 4.15: Fähigkeit zur Adhäsion [%] auf Fibronektin beschichteten Objektträgern von HSPC aus dem KM von n=3 gesunden Spendern (weiß) im Vergleich mit HSPC von n=3 MM-Patienten (schwarz). Adhärente Zellen wurden nach 3 stündiger Inkubation im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und die resultierenden Daten prozentuell in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl abgebildet. Signifikanzen: HSC p = 0,032; CMP p = 0,026; GMP p = 0,030; MEP p = 0,0011

Im Vergleich zu der Versuchsreihe mit HA beschichteten Objektträgern adhärten auf Fibronektin im Median 2751,2 HSC (Variationsbereich 2250-2787 Zellen), 2567,5 CMP (Variationsbereich 2146-2627 Zellen), 2491,3 GMP (Variationsbereich 1944-2560 Zellen) und 2442,5 MEP (Variationsbereich 1846-2487 Zellen) von eingesetzten 5000 Zellen der jeweiligen Subpopulationen aus gesundem Knochenmark. Im Gegensatz hierzu adhärten nur 2083,1 HSC (Variationsbereich 1872-2294 Zellen), 1918,7 CMP (Variationsbereich 1686-2151 Zellen), 1636,4 GMP (Variationsbereich 1226-2046 Zellen) und 1035,9 MEP (Variationsbereich 716-1084 Zellen) aus MM-Knochenmark.

Mittels dieser Daten wurden in der HSC- eine 1,32 fache, in der CMP- eine 1,33 fache, in der GMP- eine 1,52 fache und in der MEP-Population eine 2,36 fache Reduktion in der Adhärenz auf Fibronektin beschichteten Objektträgern der Subpopulationen aus MM-Knochenmark ermittelt.

4.2.6 Untersuchung zum Migrationsverhalten von HSCP aus dem Knochenmark von gesunden Spendern im Vergleich mit MM-Patienten

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens sortierter HSC- und HPC-Subpopulationen wurden die geringen Zellzahlen ($2,5 \times 10^3$) der einzelnen Subpopulationen in spezielle Transwell-Boyden-Kammern der Firma NeuroProbe Inc. eingebracht, in denen, im Gegensatz zu herkömmlichen Transwellkammern, sehr kleine Zellzahlen in geringeren Medienvolumina migrieren können. Detaillierte Erläuterungen zu diesem System sind im Abschnitt 3.2.11 des Material & Methoden Teils dargestellt.

In den Transwellmigrationsversuchen wurden aus jeder Probe je 2500 sortierte Zellen einer jeden HSPC-Subpopulation in einer 3 stündigen Inkubation gegen einen SDF1 α Gradienten migriert. SDF1 (*stromal cell-derived-factor-1*) gehört zur Familie der C-X-C-Motiv-Chemokine und wurde in diesen Versuchsreihen als Chemo-attraktanz verwendet. Im Vergleich der gesunden Proben (n=3) mit den HSPC-Subpopulationen der MM-Proben (n=3) zeigte sich, dass in jeder der Subpopulationen der MM eine reduzierte Migrationsfähigkeit vorlag. Diese war in der HSC-Fraktion signifikant, in den Fraktionen der CMPs und MEPs auch bereits signifikant und nur in der GMP-Fraktion nicht signifikant (Abbildung 4.16).

Die mediane Gesamtzahl migrierter HSC-Zellen aus MM-Knochenmark lag bei 31 Zellen (Variationsbereich 29-32), die der CMP bei 21 Zellen (Variationsbereich 19-23), die der GMP bei 15 Zellen (Variationsbereich 14-24) und die der MEP bei 7 Zellen (Variationsbereich 3-9). Im Vergleich zu den Subpopulationen aus gesundem Knochenmark mit HSC 48 Zellen (Variationsbereich 45-49), CMP 35 Zellen (Variationsbereich 30-38), GMP 35 Zellen (Variationsbereich 29-39) und MEP 19 Zellen (Variationsbereich 16-24).

Hieraus ergaben sich signifikante Verringerungen der Migrationsfähigkeit der HSC um den Faktor 1,23 ($p = 0,0050$), der CMP um 1,33 ($p = 0,039$) und der MEP um 2,14 ($p = 0,020$) im MM-Knochenmark. Die GMP-Subpopulation des MM lag auch um den Faktor 1,86 signifikant ($p = 0,03$) vermindert vor.

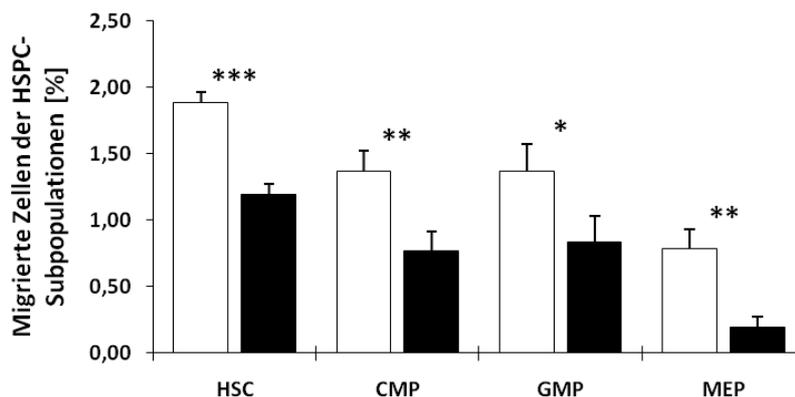


Abbildung 4.16: Prozentuale Fähigkeit zur Migration von HSPC-Subpopulationen aus dem Knochenmark von n=3 gesunden Spendern (weiß) im Vergleich zu HSPC von n=4 MM-Patienten (schwarz) in speziellen „96-Transwell-Boyden-Kammern“ gegen einen SDF1 α Gradienten. Die resultierenden Daten wurden prozentuell in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl abgebildet

4.2.7 Immunfluoreszenzanalysen an HSPC zur Stressbedingten F-Aktin Formierung und deren Einflüsse auf das Zytoskelett der Zellen und Erfassung der Oberflächenexpression von CD44, dem HA-Rezeptor

Die Erstellung transkriptioneller Profile von sowohl gesunden als auch von MM-HSPC-Subpopulationen führte zu der Erkenntnis, dass eine Vielzahl von Genen im MM dysreguliert vorliegen, die sowohl Einfluss auf das Migrations- und Adhäsions-potential der Zellen haben als auch auf die Organisation des zelleigenen Zytoskeletts. Die Motilität von Zellen ist im großen Maße abhängig von einem funktionellen Zusammenspiel von Adhäsion, Migration und Zytoskelett-Formierung. Die Formierung des Zytoskeletts nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein. Vorangehende Studien an gesunden HSPC demonstrierten, dass eine Migration gegen einen SDF1 Gradienten in Anwesenheit von Hyaluronsäure, ein *spreading* der Zellen und eine polare Morphologie mit erhöhter CD44 Konzentration an der sogenannten „*leading edge*“, einem der Wanderungsrichtung zugewandten Pseudopod, voraussetzt. Eine Exposition der Zellen mit anti-CD44-Antikörpern führt zu einer Behinderung dieser morphologischen Ausprägung und zu verminderten *homing*-Kapazitäten (Silvestris, F. *et al.*, 2001). CD44, der HA-Rezeptor, konnte mittels der transkriptionellen Profile im MM als stark vermindert exprimiert identifiziert werden.

Die Expression von CD44 und die Verknüpfung von F-Aktin sollten im Verlauf dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht werden. Hierfür wurden ein anti-human-CD44-Antikörper der Firma BD Biosciences in Verbindung mit einem Alexa Fluor[®]488 konjugiertem Sekundär-Antikörper der Firma Molecular Probes (Invitrogen) und Rhodamin konjugiertes Phalloidin (Sigma Aldrich) verwendet. Hoechst33342 wurde für die Kernfärbung der Zellen verwendet.

In diesen Versuchsreihen zeigte sich, dass nur noch ein geringer Anteil der CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark von MM Patienten den für gesunde Zellen typischen Aktin-Ring ausbilden können, exemplarisch dargestellt in Abbildung 4.17b. Bei dem überwiegenden Teil der MM Zellen hingegen zeigte sich, dass die verknüpften F-Aktine wie „verklumpt“ in der gesamten Zelle vorlagen (Abbildung 4.17f). Weiterhin konnte die transkriptionelle Reduktion von CD44 im MM auch auf Proteinexpressionsebene nachgewiesen werden, exemplarisch gezeigt in Abbildung 4.17g. Die gesunde Zelle exprimiert deutlich mehr CD44 auf der Zelloberfläche, ersichtlich aus Abbildung 4.17c. Die Abbildung 4.17d & h zeigen die mittels Hoechst33342 angefärbten Kerne der Zellen. In Abbildung 4.17a & e sind die Bilder der gesunden und MM Zellen in einer Überlagerung aller Farbkanäle des jeweiligen Bildes (*merge*) gezeigt.

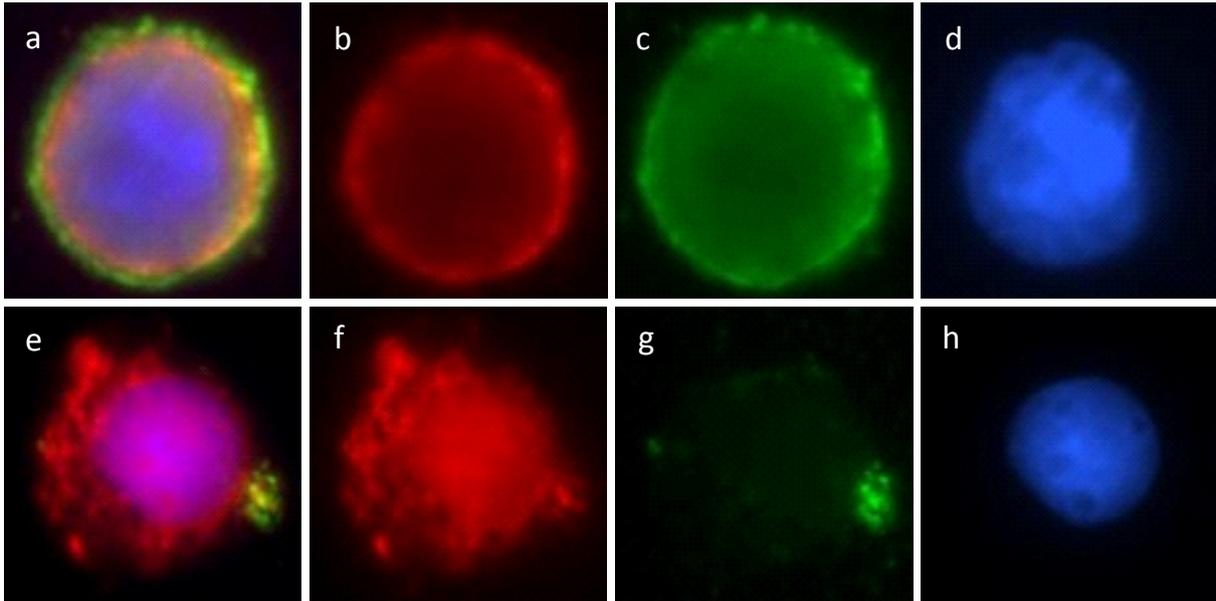


Abbildung 4.17a-h: Dargestellt sind exemplarisch in Abbildungsteil (a) eine gesunde, unpolare, CD34⁺-Zelle mit normaler CD44 Expression (grün), ausgeprägtem F-Aktin-Ring (rot) und Kernfärbung (blau) in einer überlagernden Darstellung aller Farbkanäle. In (b) die gesunde, unpolare, CD34⁺-Zelle mit ausgeprägtem F-Aktin-Ring (rot), in (c) die gesunde, unpolare, CD34⁺-Zelle mit normaler CD44 Expression (grün), in (d) die Kernfärbung der gesunden Zelle, in (e) eine unpolare, CD34⁺-MM-Zelle mit stark verminderter CD44 Expression (grün), „gestörter“ F-Aktin-Verknüpfung (rot) und Kernfärbung (blau) in einer überlagernden Darstellung aller Farbkanäle, in (f) die veränderte F-Aktin-Verknüpfung der MM-Zelle, in (g) die stark verminderte Expression von CD44 auf der Oberfläche der MM-Zelle und in (h) die Kernfärbung der MM-Zelle

Die Abbildung 4.18a zeigt die prozentualen Veränderungen der F-Aktin-Formierung im Vergleich von gesunden CD34⁺-Zellen versus CD34⁺-Zellen aus MM-Knochenmark. In Abbildung 4.18b ist die verminderte CD44 Expression dargestellt gemessen an der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity* [MFI]) der Zellen im Vergleich von gesund und MM.

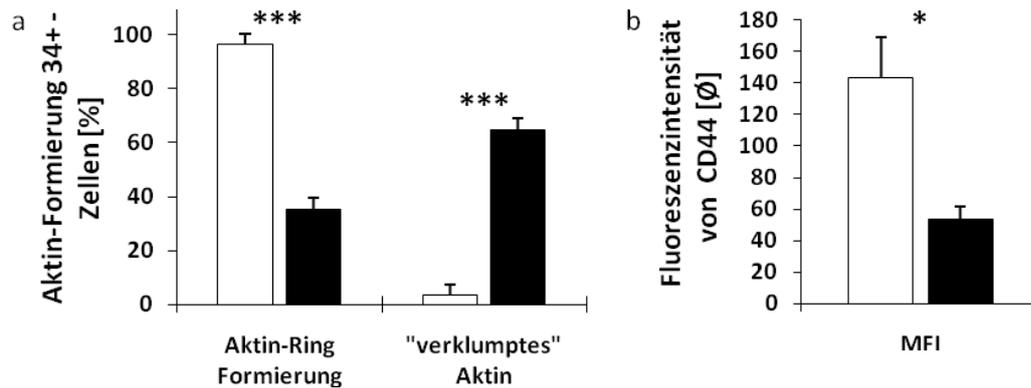


Abbildung 4.18a-b: Abbildungsteil (a) zeigt vergleichend zwischen gesund (weiß) und MM-HSPC (schwarz) die prozentualen Anteile an CD34⁺-Zellen, die eine „normale“ oder eine „abnorme“ Aktinformierung ausprägen. In (b) ist die Verminderung der CD44-Expression auf der Zelloberfläche von MM-HSPC (schwarz) im Vergleich mit gesunden HSPC (weiß) anhand der *mean fluorescence intensity* (MFI) extrazellulärer Fluorochrom-basierter Färbungen abgebildet

4.2.8 Immunhistochemische Analysen des Smad2 Phosphorylierungsgrades an Paraffin fixierten Knochenmarkstanzen von Patienten mit MM im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Die Identifikation der differentiellen Expression einer Vielzahl von Genen des TGFβ-Signalweges in den transkriptionellen Profilen des MM gab den Anlass zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Smad2, einem Schlüsselprotein des TGFβ-Signalweges. Diese vergleichenden Untersuchungen wurden an Paraffin-fixierten Knochenmarkbiopsien von MM-Patienten und gesunden Spendern durchgeführt. Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, die Dokumentation und die Computer-basierte Auswertung der gefärbten Schnitte sind eingehender im Abschnitt 3.2.13.1 des Material & Methoden Teils erläutert.

Die Abbildung 4.19 zeigt exemplarisch jeweils vier *hotspots* der immunhistochemischen pSmad2 Färbungen von jeweils 4 Knochenmark-biopsieschnitten von gesunden Spendern (oben) und 4 Patienten mit MM (unten). Von jeder Probe wurden jeweils drei *hotspots* ausgewertet und die Anzahl pSmad2 positiver Zellen als auch die Anzahl der Gesamtzellen der *hotspots* gemittelt. Als *hotspot* definiert ist ein Bereich mit überdurchschnittlich intensiver pSmad2 Färbung in einem Biopsieschnitt bei 200 facher mikroskopischer Vergrößerung. Die rot eingerahmten Bereiche der Einzelaufnahmen zeigen die Zellen in der 1000 fachen

mikroskopischen Vergrößerung, die für die morphologische Begutachtung der Zellen und ihre Zuordnung zu den jeweiligen myeloiden Zellreihen bzw. Zelltypen verwendet wurde.

Diese Untersuchung zeigte, dass neben Plasmazellen auch ein erhöhter Phosphorylierungsstatus von Smad2 in Zellen der myeloiden Zellreihen bei Patienten mit MM vorliegt. Die morphologische Begutachtung der Zellen ergab beispielsweise, dass die aus der MEP-Subpopulation hervorgehenden Megakaryozyten einen erhöhten pSmad2 Status im MM zeigen.

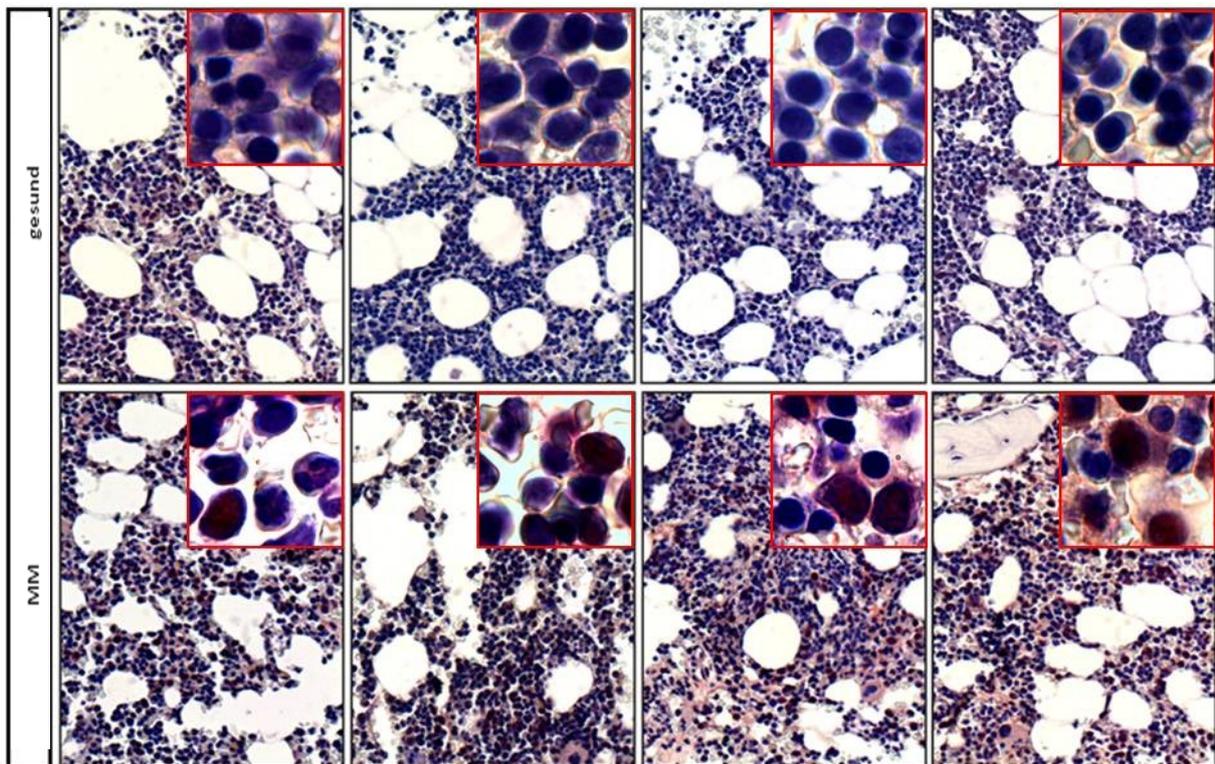


Abbildung 4.19: Exemplarische Darstellung von jeweils einem identifizierten *hotspot* je Probe der immunhistochemischen Statusbestimmung des pSmad2-Grades von Knochenmarkbiopsieschnitten von jeweils 4 gesunden Spendern (oben) und MM-Patienten (unten)

Der prozentuale Anteil pSmad2 positiver Zellen im Vergleich von gesundem Probenmaterial und dem von MM-Patienten ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Die Auswertung zeigte einen deutlich erhöhten Anteil pSmad2 positiver Zellen im MM. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test verifiziert.

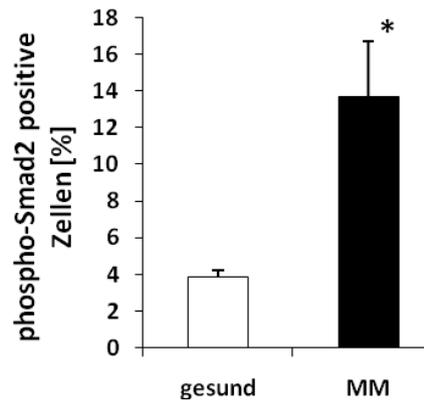


Abbildung 4.20: Vergleich der prozentualen Anteile von pSmad2 positiven Zellen im Knochenmark von gesunden Spendern (weiß) und Patienten mit MM (schwarz)

4.2.9 Immunodetektion von pSmad2 mittels Western blot Analyse an CD34⁺-Primärzelllysaten

Die morphologischen Untersuchungen der Knochenmarkbiopsieschnitte von MM-Patienten und gesunden Spendern zeigten, dass sowohl ein erhöhter Anteil pSmad2 positiver Plasmazellen als auch myeloider Zellen, wie zum Beispiel Megakaryozyten, im Knochenmark von MM-Patienten vorliegt. Da mit dieser Methode eine vollständige Unterscheidung aller Zellreihen nicht möglich ist, sollte sichergestellt werden, dass sich die Veränderungen im pSmad2-Status nicht allein auf die Plasmazellinvasion zurückführen lassen sondern sich auch in den CD34⁺-HSPC von MM-Patienten wiederfinden. Hierfür wurde das Gesamtprotein von immunomagnetisch angereicherten CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern und MM-Patienten mittels Trifast-Reagenz (Abschnitt 3.1.14) isoliert und in darauffolgenden Western blot Analysen verglichen. Die geringe Gesamtproteinkonzentration von CD34⁺-Zellen machte eine Vereinigung (*poolen*) von jeweils 5 Proben mit je 1×10^6 Zellen von gesunden Spender und MM-Patienten notwendig, um die Gesamtkonzentration von 30 μg zu erreichen, die in den Western blot Analysen detektierbare Signale lieferte. Verwendet wurde derselbe pSmad2-AK, der bereits in den immunhistochemischen Untersuchungen Anwendung fand. Im Western blot detektiert der Antikörper das nach Herstellerangaben 60 kDa große, phosphorylierte SMAD2.

Unter Verwendung der in den Abschnitten 3.1.17, 3.1.19 und 3.1.20 näher beschriebenen Methoden der SDS-PAGE und der anschließenden Western blot Analyse konnte eine erhöhte pSMAD2 Konzentration im Gesamtprotein von CD34⁺-Zellen aus MM-Knochenmark detektiert werden. Die Abbildung 4.21 zeigt exemplarisch eine vergleichende Western blot Analyse (von links nach rechts aufgetragen: Standardleiter, das pSMAD2-Signal der gesunden Kontrolle gefolgt vom MM-Signal).

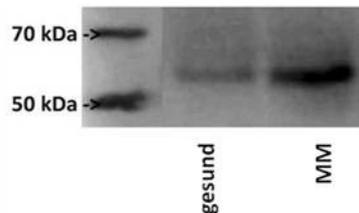


Abbildung 4.21: Exemplarische Abbildung einer pSMAD2-Western blot Analyse. Verglichen wurden die pSMAD2-Signale bei 60 kDa von 30 µg Gesamtprotein der gesunden Kontrolle (Mitte) und derselben Konzentration von MM-Gesamtprotein (Rechts). Die linke Spur des Western blot zeigt die relevanten Banden des Molekulargewichtsstandards im *overlay*

4.3 Funktionelle Analysen zum Einfluss von TGFβ auf HSPC aus dem Knochenmark von MM-Patienten und gesunden Spendern und Analysen zur Wirkung des TGFβ-Rezeptor-Antagonisten SD208

4.3.1 Analysen zum Einfluss von TGFβ und SD208 auf die Proliferation und das Überleben von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark

Die Daten der vergleichenden transkriptionellen Expressionsprofile von gesunden und MM-HSPC-Subpopulationen führten uns zu der Vermutung, dass der TGFβ-Signalweg im MM einer ständigen Aktivierung unterliegt. Zhou, L. *et al.*, konnten 2008 an hämatopoietischen Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) zeigen, dass eine erhöhte Aktivierung des TGFβ-Signalweges mit Veränderungen im Koloniebildungs- und Langzeit-Selbsterneuerungspotential sowie Verminderungen der Proliferation und der Zellzyklusaktivität *in vitro* einhergeht. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass mittels einer Vorstimulation mit SD208, einem selektiven TGFβ-Rezeptor I Kinase Inhibitor, die oben genannten Effekte zumindest teilweise aufgehoben werden können.

In dieser Versuchsreihe sollten sowohl der Einfluss einer TGF β -Langzeitstimulation (7 Tage) als auch ein eventuell protektiver Effekt von SD208 auf CD34⁺-HSPC von MM-Patienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe *in vitro* überprüft werden. Hierfür wurden CD34⁺ immunomagnetisch angereicherte Zellen (Abschnitt 3.2.4) in Flüssigkultur aufgenommen und entweder mit SD208 vor- oder mit TGF β direkt-stimuliert (Abschnitt 3.2.8). An den Tagen 0, 2, 3, 6 und 7 wurden sowohl die Gesamtzellzahl (inklusive toter Zellen), die Zahl vitaler Zellen als auch die Viabilität ermittelt.

Hierbei zeigte sich im Vergleich gesund versus MM an nicht-stimulierten Kontrollen (Abbildung 4.22a), dass die Zellen aus MM-Knochenmark kaum proliferieren, ihre Viabilität im Median der ersten zwei Tage abnimmt und erst ab Tag 3 ein leichter Anstieg in der Proliferationsrate zu verzeichnen ist. Auch die Proliferationsrate der gesunden Zellen stagnierte während der ersten drei Tage, gleicht im Median aber die versterbenden Zellen aus. Ab Tag 3 schien sich der Proliferationszyklus von gesunden CD34⁺-Zellen unter diesen *in vitro* Bedingungen normalisiert zu haben. An Tag 7 konnte im Median der Gesundkontrollen eine 4,5 fache Vermehrung der Zellen detektiert werden. Im MM wurde an Tag 7 im Median lediglich eine 1,5 fache Vermehrung der Zellen gemessen.

Unter den in Abschnitt 3.2.8 beschriebenen Stimulationsbedingungen zeigte sich für die DMSO-Kontrolle derselbe Effekt, der zuvor an den unstimulierten Proben gezeigt werden konnte. Die 7 tägige Stimulation mit SD208 hingegen führte zu einer erhöhten Proliferationsrate und besseren Viabilität, was sich in einer 2,5 fachen, medianen Vermehrung der Zellen zeigte. Auch die MM-Zellen, die nach einer Vorstimulation mit SD208 zusätzlich mit TGF β inkubiert wurden, zeigten an Tag 7 eine mediane 2,5 fache Vermehrung der Ausgangszellzahl. Hingegen zeigten MM-Zellen, die ausschließlich mit TGF β inkubiert wurden, eine Verringerung in ihrer Viabilität sowie eine verringerte Proliferationsrate, so dass an Tag 7 die mediane gemessene Lebendzellzahl zumeist den anfänglich eingesetzten viablen Zellen entsprach (Abbildung 4.22b).

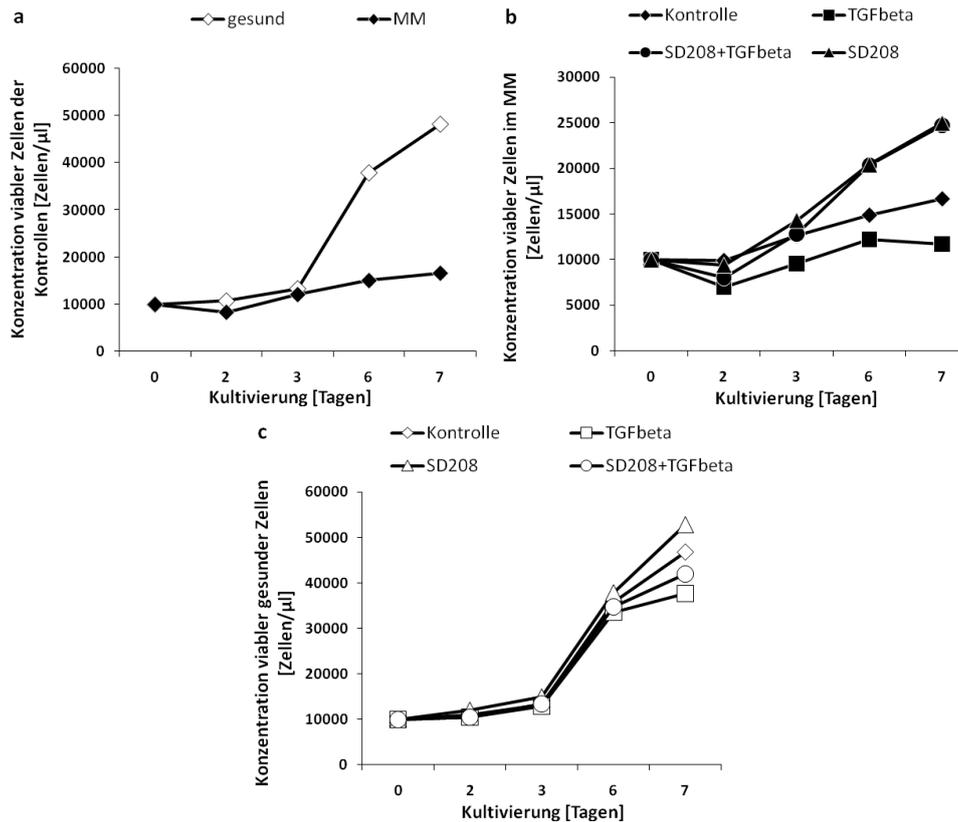


Abbildung 4.22a-c: (a) Vergleich der Proliferations-raten von $CD34^+$ -HSPC aus gesundem (weiß) und MM-Knochenmark (schwarz). (b) Proliferation von MM-HSPC unter Stimulation mit TGF β und/oder SD208. (c) Proliferation von gesunden HSPC unter Stimulation mit TGF β und/oder SD208

Der Vergleich mit gesunden Zellen (Abbildung 4.22c) ergab unter Betrachtung aller Stimulationsbedingungen keine signifikanten Veränderungen der regelrechten Proliferation. Auffällig allein waren die Messdaten von Tag 7, die tendenziell die höchste Proliferationsrate in den mit SD208 stimulierten Zellen zeigten, während die TGF β stimulierten Zellen die geringste Proliferation aufwiesen.

4.3.2 Retrospektive Untersuchungen zum Zellschicksal später myeloischer Progenitoren unter dem Einfluss von SD208 (CFC-Versuch)

Wie bereits in den retrospektiven Untersuchungen zum Zellschicksal später myeloischer Progenitoren durch Bestimmung der Koloniebildung im klonogenen *colony forming cell* (CFC)-Versuch (Abschnitt 4.2.1) gezeigt werden konnten, war die generelle CFC-Frequenz im

MM stark reduziert. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt, wirkt sich dieser Effekt am stärksten auf die Vorläufer der Erythropoese aus.

Zur Überprüfung der Einflüsse auf das Koloniebildungspotential und das Differenzierungsschicksal myeloischer Vorläufer durch den TGF β -Signalweg wurden CFC-Versuche, wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben, mit SD208 versetzt, inkubiert und im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen ausgewertet. Hierbei zeigte sich im Vergleich DMSO-Kontrolle versus SD208 im MM (Abbildung 4.23a) eine prozentual signifikante Verschiebung in der Koloniebildung zu Gunsten der Erythroidenvorläufer bei der SD208 Stimulation. Im Vergleich mit den Versuchen an gesunden Zellen, bei denen ein ähnlicher, jedoch nicht signifikanter, Effekt beobachtet wurde (Abbildung 4.23b), zeigte sich, dass SD208 stimulierte MM-Zellen prozentual mehr erythroide Vorläufer bilden als die gesunde Kontrolle. Einhergehend mit der signifikanten prozentualen Erhöhung des Koloniebildungspotentials erythroider Vorläufer im MM konnte weiterhin eine signifikante Abnahme des weißen Koloniebildungspotential beobachtet werden (Abbildung 4.23a).

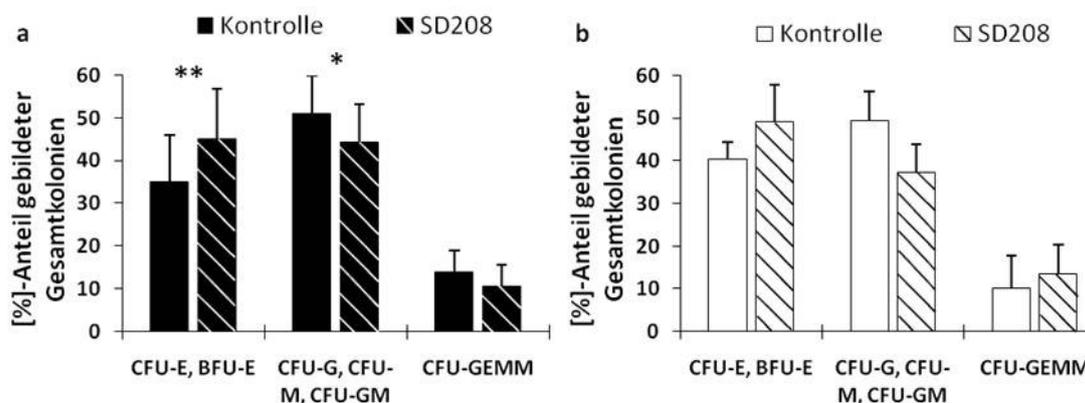


Abbildung 4.23a-b: Abbildungsteil (a) zeigt die prozentuale Verteilung der aus myeloiden Vorläufern gebildeten Kolonien unter SD208-Stimulationsbedingungen (schraffiert) im MM. Die Kontrolle (schwarz) enthält äquivalente Mengen DMSO. (b) zeigt die prozentuale Verteilung der aus myeloiden Vorläufern gebildeten Kolonien unter SD208-Stimulationsbedingungen (schraffiert) aus gesundem Knochenmark. Die Kontrolle (weiß) enthält äquivalente Mengen DMSO

4.3.3 Untersuchungen des Langzeitpotentials früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mittels der *long-term-colony-initiating-cell*-Methode (LTC-IC) unter dem Einfluss von SD208

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 in den vergleichenden Untersuchungen des Langzeitpotentials früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von gesunden Spendern und MM-Patienten mittels der *long-term-colony-initiating-cell* (LTC-IC)-Methode gezeigt werden konnte, ist das Langzeitkoloniebildungspotential früher Vorläufer im MM stark reduziert. Weiterhin wurde mittels CFC-Versuchen unter SD208 Stimulation (Abschnitt 4.3.2) nachgewiesen, dass die Beeinflussung des Koloniebildungspotentials später myeloider Vorläufer wahrscheinlich vom TGF β -Signalweg beeinträchtigt wird. Dies legte einen eventuellen Einfluss des TGF β -Signalweges auf das Koloniebildungspotential der frühen Vorläufer nahe.

Zur Untersuchung des vermuteten Einflusses des TGF β -Signalweges auf die frühen Vorläufer des MM wurden die Zellen in LTC-IC-Versuchen vergleichend entweder mit SD208 oder DMSO als Kontrolle versetzt. Die Auswertung dieser Versuchsreihe, dargestellt in Abbildung 4.24, ergab eine geringe, signifikante Erhöhung der LTC-IC-Frequenz unter SD208-Stimulationsbedingungen im Vergleich zur Kontrolle. Der beobachtete Effekt war jedoch nicht in der Lage, die Auswirkungen des MM hinsichtlich der Verminderung der LTC-IC-Frequenz, gezeigt in Abschnitt 4.2.2, Abbildung 4.11, vollständig aufzuheben.

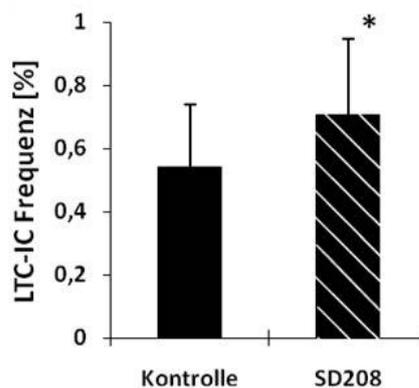


Abbildung 4.24: LTC-IC-Frequenz unter SD208 Stimulationsbedingungen (schraffiert). Die Kontrolle (schwarz) enthält äquivalente Mengen DMSO

4.3.4 Analysen zum Einfluss des TGF β -Signalweges auf den Zellzyklus von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark und Auswirkungen einer Stimulation mit SD208 mittels BrdU und 7AAD

Sowohl die Ergebnisse der quantitativen durchflusszytometrischen Untersuchung der Subpopulationen (Abschnitt 4.1.2) als auch die klonogenen Langzeitkulturversuche (Abschnitt 4.2.1) spiegelten ein Problem der Selbsterneuerungskapazität myeloider HSPC im Knochenmark von MM-Patienten wieder. Für genauere Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen wurden die Zellzyklusphasen der Subpopulationen aus gesundem und MM-Knochenmark durchflusszytometrisch mittels Ki67-AK und Hoechst33342 bestimmt. Hierbei konnte im Vergleich eine signifikante Verschiebung von der G₁ in die G₀-Phase der MEP-Fraktion des MM (Abbildung 4.13) gezeigt werden. Dieser Übergang der MEP-Fraktion in einen G₀-Zellarrest kann einer der Gründe für den in den vorangegangenen Versuchen beobachteten Rückgang der MEP-Fraktion bzw. seiner resultierenden reifen Zellkolonien sein. Da das vermutete Differenzierungsproblem im MM jedoch nicht die allgemeine Verminderung aller HSPC-Vorläufer sowohl in den quantitativen durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abschnitt 4.1.2) als auch die Verminderung aller Koloniezahlen der klonogenen Langzeitkulturversuche (Abschnitt 4.2.1) erklärt, wurden weiterführende Studien zum Zellzyklus an CD34⁺-Zellen aus gesundem und MM-Knochenmark unter Verwendung von BrdU und 7AAD durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Zellzyklus-Untersuchungen zeigten im Vergleich gesund versus MM eine signifikante Verminderung der S-Phase im MM einhergehend mit einer signifikanten Erhöhung der G₀/G₁-Phasen (Abbildung 4.25). Diese Daten bekräftigen die Vermutung eines Proliferationsdefektes im MM, der in der Versuchsreihe zur Proliferation von CD34⁺-Zellen (Abschnitt 4.3.1) beobachtet wurde.

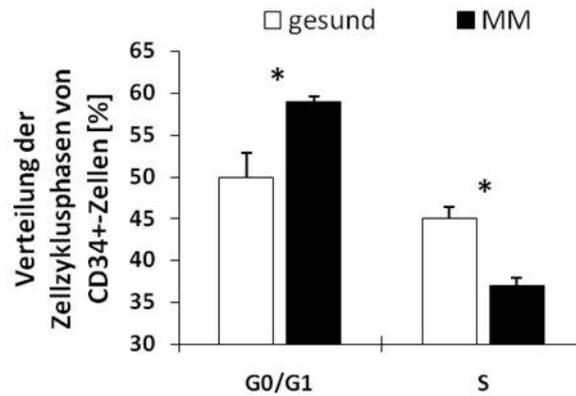


Abbildung 4.25: Prozentuale Verteilung CD34⁺-Zellen in den Zellzyklusphasen. Verglichen wurden Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern (weiß) und MM-Patienten (schwarz). Abgebildet ist die signifikante Erhöhung der in der G₀/G₁-Phasen befindlichen Zellen bei gleichzeitiger, signifikanter Abnahme der in der S-Phase befindlichen Zellen im MM

In der Versuchsreihe zur Proliferation von CD34⁺-Zellen wurde weiterhin gezeigt, dass eine Stimulation mit SD208 den Proliferationsdefekt im MM zumindest teilweise aufheben konnte. Zur Überprüfung, ob der beobachtete Proliferationsdefekt zellzyklus-abhängig ist, wurden Zellen, wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben, mit SD208 oder DMSO als Kontrolle für 7 Tage kultiviert, bevor die Zellzyklusphasen mittels BrdU und 7AAD untersucht wurden. Hierbei ergab sich im MM unter Stimulation mit SD208 eine leichte, jedoch signifikante, Verschiebung der Zellzyklusphasen zugunsten der S-Phase, was auf eine erhöhte Proliferation hindeutet, siehe Abbildung 4.26.

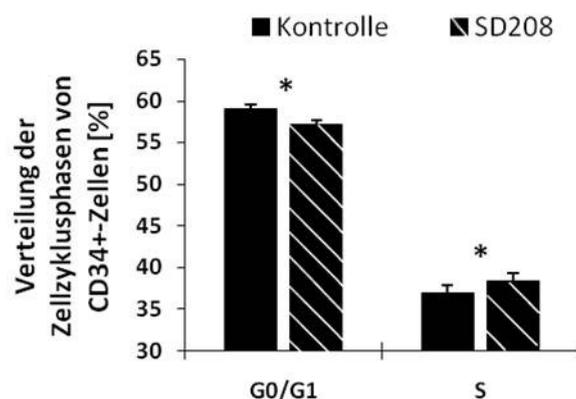


Abbildung 4.26: Prozentuale Verteilung CD34⁺-Zellen in den Zellzyklusphasen. Verglichen wurden Zellen aus Knochenmark von MM-Patienten unstimuliert (schwarz) mit SD208 stimulierten (schraffiert) Zellen. Abgebildet ist die geringe, signifikante Abnahme der in der G₀/G₁-Phasen befindlichen Zellen unter SD208 Stimulation bei gleichzeitiger, signifikanter Erhöhung der in der S-Phase befindlichen Zellen im MM

4.4 Univariate- & multivariate-Analysen

Die Multivariat Analysen dieser Arbeit zeigten eine inverse Korrelation zwischen Leukozyten-, Hämoglobin- und Plättchenkonzentration auf der einen Seite und dem Grad der Knochenmarkinfiltration im MM auf der anderen Seite. Abbildung 4.27a-c zeigt Mittelwerte dargestellt in Box-Plots.

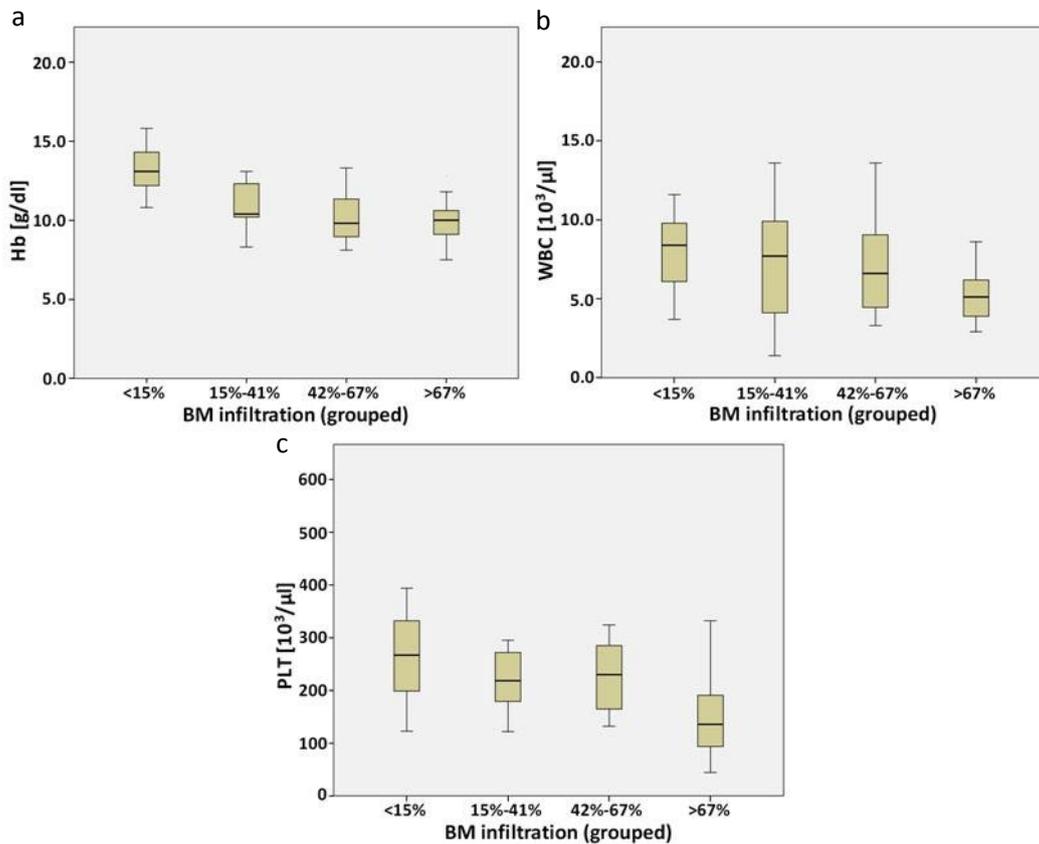


Abbildung 4.27a-c: Dargestellt sind Box-Plots des Hämoglobinspiegels (Hb) in Abbildung (a), der Zellzahl weißer Blutzellen (WBC) in Abbildungsteil (b) und der Blutplättchenzahl (c) in Abhängigkeit vom Knochenmarkinfiltrationsgrad der MM-Patienten (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)

Die Univariate- und Multivariateanalysen dieser Arbeit beruhen auf den in den Tabellen 3.7 und 3.8 dargestellten Patientencharakteristika und wurden wie in Abschnitt 3.3 beschrieben durchgeführt. Die Signifikanzniveaus sind den Tabellen 0.3 und 0.4 im Anhang zu entnehmen.

5. Diskussion

Das MM ist eine Knochenmarkerkrankung, die durch eine Infiltration des Knochenmarks durch eine maligne Population klonaler Plasmazellen charakterisiert ist. Als Ausdruck der malignen Plasmazellen findet sich im Blut eine sogenannte „monoklonale Gammopathie“, d.h. eine Vermehrung eines funktionell unbrauchbaren kompletten Immunglobulins oder dessen Leichtketten. Durch die Infiltration des Knochenmarks kommt es im Verlauf der Erkrankung auch zu einem vermehrten Knochenabbau und der Ausbildung von umschriebenen Osteolysen.

Klinische Beobachtungen zeigen, dass MM-Patienten häufig bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose an einer Anämie, seltener einer Leukopenie oder Thrombopenie leiden (Zhang, L. *et al.*, 2010; Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V., 2008; Li, J. *et al.*, 2008; Kyle, R. A. *et al.*, 2003). Derzeit wird vermutet, dass die Anämie mechanistisch auf einer Verdrängung der normalen Hämatopoiese durch die malignen Plasmazellen beruht. Ein anderer Erklärungsansatz postuliert einen relativen Erythropoetinmangel (EPO-Mangel) basierend auf einem gestörten Eisenhaushalt, der zu einer HIF-1 α (Hypoxie-induzierender-Faktor-1 α) Dysregulation und reduzierter EPO-Produktion führt (Spivak, J. L., Gascón, P. & Ludwig, H., 2009). Eine weitere Theorie im MM stellt die *Anemia of Inflammation* (AoI) dar. Hierbei entwickelt sich ein dysregulierter Eisenhaushalt durch den Einfluss extrazellulärer Zytokine wie IL-6 (Interleukin-6), TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) und diverser BMPs (*bone-morphogenic-proteins*) im Mikromilieu des Knochenmarks. Die AoI entsteht unter dem Einfluss von IL-6 und einzelner BMPs durch eine Stimulation des Hecpidin-Promotors und der Erhöhung des Hecpidinspiegels im Serum von MM-Patienten. Hecpidin ist ein wichtiges Hormon der Eisenregulation. Seine intrazelluläre Produktion reguliert die Aktivität des Hecpidin-Promotors, dem der BMP-Rezeptor (BMPR) abhängige TGF β -Signalweg vorgeschaltet ist. Die Signalübermittlung des TGF β -Signalwegs wird unter anderem über die Phosphorylierung diverser SMAD Mediatoren verwirklicht (He, W. *et al.*, 2006; Larsson, J. & Karlsson, S., 2005), die im Verlauf dieser Arbeit in MM-HSPC als differentiell exprimiert identifiziert werden konnten. Für das MM ist weiterhin bekannt, dass sowohl die malignen Myelom-Zellen als auch die Stromazellen des KM vermehrt TGF β sezernieren, dies korreliert mit erhöhten IL-6 und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Sekretionen der Stromazellen (Dong, M. & Blobe, G. C., 2006). Maes, K. *et al.* zeigten 2010, dass der Einfluss von IL-6 und BMPs auf den Hecpidin-Promotor mit einem erhöhten Hecpidinspiegel im Serum

von MM-Patienten durch die gezielte Mutagenese der STAT3-Bindestelle (*signal transducer and activator of transcription*) aufgehoben werden kann. Interessanterweise wurden in dieser Arbeit auch STAT1 und STAT3 in den transkriptionellen Profilen der HSPC-Subpopulationen von MM-Patienten als differentiell exprimiert identifiziert. Weiterhin konnten Maes, K. *et al.* (2010) in einer Studie die inverse Korrelation zwischen Heparin und Hämoglobinspiegel in MM-Patienten nachweisen. Multivariate Analysen dieser Arbeit zeigten eine inverse Korrelation zwischen Leukozyten-, Hämoglobin- und Plättchenkonzentration auf der einen Seite und dem Grad der Knochenmarkinfiltration im MM auf der anderen Seite (Tabelle 0.3; Abbildung 4.27a-c). Die Suppression der regelrechten Hämatopoiese kann nicht ausschließlich auf eine maligne Knochenmarkinfiltration zurückgeführt werden, da besonders in Fällen mit moderatem Ausmaß der malignen Infiltration die Beeinträchtigung der Hämatopoiese nicht allein durch die eher geringen Verdrängungseffekte erklärt werden kann. Dies belegt eine Studie von Colmone, A. *et al.* aus dem Jahr 2008 am Beispiel von AML/ALL Patienten. Im Verlauf der unterschiedlichen Analysen konnte eine verminderte Menge an CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellsubpopulationen (HSPC) dies bestätigen, diese war allerdings unabhängig vom Grad der Knochenmarkinfiltration. Bis dato sind nicht alle Einflüsse des MM auf die HSPC-Subpopulationen im Knochenmark bekannt, obwohl die MM bedingten Veränderungen der Knochenmarkhomöostase weitgehend untersucht sind (Podar, K., Chauhan, D. & Anderson, K. C., 2009; Ramakrishnan, A. & Deeg, H. J., 2009) und eine Beteiligung der HSPC-Subpopulationen nahe legen. Bei vergleichenden quantitativen Untersuchungen der HSPC-Subpopulationen (Bruns, I., Buest, S. *et al.*, 2009; Manz, M. G. *et al.*, 2002) von MM Patienten und gesunden Spendern fanden wir eine Verringerung aller Subpopulationen im MM. Die Verringerung der MEP-Subpopulation war proportional am stärksten ausgeprägt, was einhergehend mit der häufigsten klinischen Beobachtung, der Anämie, eine Beeinflussung der Hämatopoiese durch das MM bereits auf Stamm- und Vorläuferzellebene nahe legt. Weiterführende Untersuchungen anhand von Methylzellosemedium basierten Versuchen und Stromazell basierten Langzeitkultur Versuchen zeigten weiterhin, dass sowohl das Koloniebildungspotential als auch das Langzeit-Selbsterneuerungspotential der Stamm- und Vorläuferzellen im MM erheblich eingeschränkt sind. Zur Identifikation der molekularen Auslöser dieser Veränderungen im MM wurden auf der Affymetrix™ Genechip Technologie (Affymetrix Inc.) basierende, vergleichend transkriptionelle Profile von HSPC-Subpopulationen aus dem Knochenmark von MM-Patienten und gesunden Spendern erstellt. Vorhergehende Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass mittels transkriptioneller Profile von

HSPC-Subpopulationen unter Verwendung der euklidischen Distanzanalyse Veränderungen in der hierarchischen Entwicklung der HSPC-Subpopulationen identifiziert werden können (Bruns, I., Buest, S. *et al.*, 2009). Leider war es mit dieser Methode nicht möglich, die Reihenfolge von Ereignissen, die Voraussetzung für die HSPC-Differenzierung sind, aufzudecken. Aus diesem Grund wurde ein neuer Modell Algorithmus *in silico* etabliert, um die hierarchische Entwicklung der HSPC-Subpopulationen identifizieren zu können. Dieser neue Algorithmus zeigt die Entwicklung der HSPC-Subpopulationen aus gesundem Knochenmark basierend auf bedingten Veränderungen in ausgewählten Gengruppen ausgehend von dem heutigen Verständnis der Entwicklung von HSPC-Subpopulationen nach Manz, M. G. *et al.* (2002) fortlaufend aus der HSC als Ursprungspopulation. Vergleichend mit der Entwicklung von HSPC-Subpopulationen aus dem Knochenmark von gesunden Spendern deutet dies darauf hin, dass das intrinsische Differenzierungsprogramm der HSPC-Subpopulationen in MM Patienten nicht verändert ist. Genauere vergleichende Untersuchungen der transkriptionellen Profile der einzelnen HSPC-Subpopulation offenbarten mannigfaltige Veränderungen der Regulation verschiedenster Gene, die Signalwegen zugeordnet werden, die maßgeblich mit der Zell-Motilität, der -Adhäsionsfähigkeit, der Zell-Zell-Interaktion, der p85 regulierten Aktin-Zytoskelett-Organisation, der Zell-Migration und dem Integrin Signalweg verbunden sind. Auch konnten transkriptionelle Einflüsse identifiziert werden, die mit Veränderungen im Zellzyklus sowohl Zyklin induzierender Art als auch den G1/S Kontrollpunkt betreffend einhergehen. Weiterhin wurden verändernde Einflüsse auf die NF κ B-, IL-6-, VEGF-, p38 MAPKinase und TGF β -Signalwege identifiziert. Anbei bemerkt sei, dass diese Signalwege wichtige Einflüsse auf die MM eigene Pathogenese haben und relativ konstant in allen HSPC-Subpopulationen vorgefunden wurden. Ein wichtiger Einfluss des NF κ B-Signalwegs im MM ist die Aktivierung der Produktion von IL-6 in diversen Zelltypen mit stromalem Ursprung (Tai, Y. T. *et al.*, 2006; Chauhan, D. *et al.*, 1996). IL-6 wiederum gilt als einer der Schlüsselfaktoren des Zellwachstums und des Überlebens. IL-6 wird vorrangig von Knochenmarkstromazellen und Osteoblasten produziert und sezerniert (Klein, B. *et al.*, 1995; Kawano, M. *et al.*, 1988). Weiterhin ist IL-6 dafür bekannt, die MEK/MAPKinase-, JAK/STAT3- und PI3K/AKT-Signalwege zu aktivieren (Hideshima, T. *et al.*, 2007; Podar, K. & Anderson, K. C., 2005). Ähnlich der IL-6-Signalkaskade kann auch der VEGF-Signalweg mit MEK und/oder der PI3Kinase interagieren. VEGF kann über eine Caveolin-1/PI3K/PKC α abhängige Signalkaskade Zellmigration auf Fibronectin induzieren, einflussnehmend auf den MEK/ERK-Signalweg die Proliferation von MM-Zellen induzieren und steigert deren Überleben durch die Heraufregulation von Mcl-1 und Survivin (Jakob, C. *et al.*, 2006; Podar, K. &

Anderson, K. C., 2005). Der Ras/MEK/MAPKinase-Signalweg kann induziert durch IL-6, IGF-1, VEGF oder Integrin vermittelten Zell-Zell-Kontakt die Proliferation, das Überleben und die Ausprägung von Arzneimittelresistenzen der MM-Zellen beeinflussen (Podar, K., Chauhan, D. & Anderson, K. C., 2009). Dies unterstreicht die Annahme, dass der Ursprung der identifizierten molekularen Veränderungen der HSPC-Subpopulationen in den extrinsischen Einwirkungen des MM begründet liegt. Für die Beurteilung der Einflüsse des MM auf die oben genannten Signalwege und zur Identifikation potentieller sowohl molekularer Veränderungen als auch Veränderungen in Reaktionsnetzwerken wurden alle den Signalwegen zugeordneten Gene kartiert und anhand ihrer relativen Expression kategorisiert. Hierbei wurden transkriptionelle Aktivierungen im TGF β - und im p38 MAPKinase-Signalweg in den HSPC-Subpopulationen aus dem Knochenmark von MM-Patienten entdeckt. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten einen Anstieg im Phosphorylierungsstatus von Smad2, einem wichtigen *downstream target* von TBRI, einem Partner des TGF β -Rezeptorkomplexes, in hämatopoietischen Zellen aller Zellreihen in Paraffin-fixierten Knochenmarkbiopsien. Zusätzlich wurde der erhöhte Phosphorylierungsstatus von Smad2 an CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark mittels Western blot Analyse bestätigt. Der TGF β -Signalweg ist für seine stark ausgeprägte antiproliferative Wirkung auf normale HSPC-Subpopulationen bekannt. Dies zeigt sich besonders deutlich durch die Inhibition des Koloniebildungspotentials und der Langzeit Selbsterneuerungskapazität (Larsson, J. & Karlsson, S., 2005; Fortunel, N. O., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J. A., 2000). Weiterhin wird vermutet, dass der TGF β -Signalweg ein „Schlüssel“-Regulator der Erythropoese und ein Inhibitor des Zellzyklus von erythroiden Vorläuferzellen darstellt (Ruscetti, F. W., Akel, S. & Bartelmez, S. H., 2005; Fortunel, N. O., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J. A., 2000). Einhergehend mit diesen Vermutungen wurde in dieser Arbeit eine verminderte Proliferation und Zellzyklus Aktivität in HSPC-Subpopulationen aus Knochenmark von MM-Patienten mit besonders starker Ausprägung in der MEP-Subpopulation gefunden. Die in dieser Arbeit identifizierten Einflüsse des MM auf den TGF β -Signalweg legen eine konstitutive Aktivierung nahe. Die vermutete konstitutive Aktivierung des TGF β -Signalweges sollte durch die Inhibierung des TGF β -Rezeptor I mittels SD208 nachgewiesen werden. In den Versuchen zeigte sich, dass SD208 ein selektiver 2,4-disubstituierter Pteridin abstammender TGF β -Rezeptor I Kinase Inhibitor mit hoher Spezifität, in der Lage ist, zumindest teilweise, das veränderte Koloniebildungs- und Langzeit Selbsterneuerungspotential sowie die Verminderungen der Proliferation und der Zellzyklus Aktivität in HSPC-Subpopulationen aus MM-Knochenmark aufzuheben. Dieselben Erkenntnisse konnten bereits

im Vorfeld von Zhou, L. *et al.*, 2008 an hämatopoietischen Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) nachgewiesen werden. In derselben Studie wurde weiterhin gezeigt, dass die Suppression des TGF β -Signalweges die Ausprägung einer Anämie abschwächt und die Hämatopoese stimuliert. Studien zur Untersuchung der hämatopoietischen Insuffizienz von MM-Patienten (Silvestris, F. *et al.*, 2002, 2001) identifizierten bezüglich der Anämie einen direkten zytotoxischen Effekt bei der Expression des *Fas*-Liganden und TRAIL in unreifen Erythroblasten mit einhergehender hydrolytischer Spaltung von GATA1. Weiterhin konnten im Verlauf der Profiluntersuchungen von HSPC-Subpopulationen in dieser Arbeit eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren differentielle Expressionsniveaus Einflüsse nahe legen, die eine Störung in der Aktin Organisation, der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit zur Folge haben können. Diese Gene waren den Signalwegen „Rolle von p85 in der Regulation der Aktin Organisation und Zellmigration“, „Integrin Signalweg“ und „Zell-Zell-Adhäsions Signalweg“ zugeordnet. Die Funktionen der Aktin Organisation, Adhäsion und Migration sind sehr nah miteinander verbunden und bedingen sich zumeist gegenseitig. Hierbei nimmt die Organisation und Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts eine zentrale Rolle ein, die für jede Form der Zellmotilität Voraussetzung ist. Immunfluoreszenzfärbungen mit Rhodamin konjugiertem Phalloidin zeigten eine Dysfunktion in der Ausbildung eines „normalen“ Aktin-Zytoskeletts im MM und ein vermehrtes, ungerichtetes Vernetzen der F-Aktine in der gesamten Zelle der HSPC-Subpopulationen *in vitro*. Mittels funktioneller Analysen konnten auch die daraus resultierenden negativen Einflüsse auf die Adhäsions- und Migrations-Fähigkeiten des MM *in vitro* nachgewiesen werden. Sowohl die Adhäsionsfähigkeit auf Fibronectin- als auch HA-beschichteten Objektträgern und die Migrationsfähigkeit, ermittelt in Boyden-Kammer Versuchen gegen einen SDF1 α -Gradienten, zeigten in allen HSPC-Subpopulationen eine verminderte Aktivität. Die Identifikation der verminderten Expression von CDC42 in den transkriptionellen Profilen der HSPC-Subpopulationen legt darüberhinaus eine Störung in der zielgerichteten Migration nahe sowie die oben erwähnte Beeinflussung der Aktin-Formierung (Hu, Y. *et al.*, 2008). Der größte Einfluss auf sowohl Adhäsion als auch Migration zeigte sich in der MEP-Subpopulation. Einhergehend mit der am stärksten ausgeprägten Verminderung der Adhäsionsfähigkeit der MM-HSPC-Subpopulationen auf HA beschichteten Objektträgern konnte in den transkriptionellen Profilen eine ebenfalls stark verminderte Expression von CD44, dem HA-Rezeptor, identifiziert werden. Daher wurden die oben genannten Immunfluoreszenzfärbungen mittels Rhodamin konjugiertem Phalloidin mit einer weiteren Färbung kombiniert, die mit einem Alexa Fluor[®]488 konjugiertem Antikörper gegen CD44 die verminderte Expression von CD44 auf

den Zelloberflächen darstellen konnte. Für eine gleichzeitige Kernfärbung wurde Höchst33342 verwendet. Vorangehende Studien an gesunden HSPC deklarieren CD44 als das wichtigste Adhäsionsmolekül im MM (Katz, B. Z., 2010), das verantwortlich ist für die transendotheliale Migration und die Verankerung der HSC in der Stammzellnische. Hierbei wurde demonstriert, dass eine Migration gegen einen SDF1-Gradienten in Anwesenheit von HA ein *spreading* der Zellen und eine polare Morphologie mit erhöhter CD44 Konzentration an der sogenannten *leading edge*, einem der Wanderungsrichtung zugewandten Pseudopod, voraussetzt. Eine Exposition der Zellen mit anti-CD44-Antikörpern führte zu einer Behinderung dieser morphologischen Ausprägung und zu verminderten *homing*-Kapazitäten (Avigdor, A. *et al.*, 2004). Wird im Verlauf einer MM-Erkrankung mit einer Stammzelltransplantation therapiert, zeigen sich häufig ein verringertes Stammzell-Mobilisierungspotential und eine stark beeinflusste *engraftment*-Kapazität der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellsubpopulationen.

Auf der Grundlage dieser Arbeit konnten drei Einflussgrößen identifiziert werden, die bei der Suppression der HSPC von Patienten mit MM eine pathophysiologische Rolle spielen. Hierbei handelte es sich zum Ersten um eine starke Hemmung der HSPC-Proliferation und eine geringere Selbsterneuerungskapazität der HSC, zum Zweiten um die Hemmung der frühen Erythropoese und zum Dritten um eine Verringerung des Adhäsions- und Migrationspotentials der HSPC-Subpopulationen, die eventuell durch eine gestörte Aktin-Zytoskelett Formierung bedingt wird. Daraus folgernd konnte das erste Mal gezeigt werden, dass eine hämatopoietische Insuffizienz beim MM alle HSPC-Subpopulationen betrifft. Neben anderen Signalwegen wurde eine konstitutive Überaktivierung im TGF β -Signalweg der MM-HSPC gezeigt, die maßgeblich zur hämatopoietischen Suppression vor allem über den Einfluss auf die Proliferation, das Zellzyklus abhängige Koloniebildungspotential und die Selbsterneuerungskapazität von HSPC-Subpopulationen beiträgt.

Die Aufklärung solcher aberranter Signalwege bietet im Sinne einer translationalen Forschung auch die Möglichkeit, in Zukunft durch die Entwicklung von „*small molecules*“ gezielte Therapien zum Einsatz zu bringen.

6. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine klonale Plasmazellerkrankung, die häufig bereits bei Erst-diagnose mit hämatopoietischen Veränderungen wie Anämie, Leukopenie oder Thrombozytopenie einhergeht. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass hämatopoietische Stamm- und Progenitorsubpopulationen (HSPC-Subpopulationen) im Knochenmark (KM) von MM-Patienten verringert sind und dabei auch ein vermindertes Langzeitselbsterneuerungs- und klonogenes Koloniebildungspotential aufweisen. Mittels vergleichender Genexpressionsprofile von HSPC-Subpopulationen, die aus dem KM von gesunden Spendern und Patienten mit MM gewonnen wurden, konnten einige Dysregulationen von Signalwegen, wie dem intrazellulären TGF β - und p38-MAPKinase-Signalweg, beim MM identifiziert werden. Weiterhin ließen sich Veränderungen in Signalwegen nachweisen, die an der Zytoskelett-Organisation, der Migration und Adhäsion sowie der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnten wir eine Überaktivierung von SMAD2, einem *downstream* Mediator der TGF-Rezeptor-I-Kinase (TBRI) Aktivierung, im MM feststellen. Der vermehrte Aktivierungsgrad von SMAD2, die veränderte Aktin-Formierung und die verringerte Expression des Adhäsion-vermittelnden Hyaluronsäurerezeptors (CD44) in MM-HSPC spiegeln sich funktionell in einem Proliferations- und Zellzyklusarrest sowie in veränderten Adhäsions- und Migrationsfähigkeiten wider. Mittels der Inhibition des TGF β -Signalweges in MM-HSPC durch SD208, einem selektiven, 2,4-disubstituierten von Pteridin abstammenden TGF β -Rezeptor I Kinase-Inhibitor mit hoher Spezifität, ließ sich die normale Proliferation und der Zellzyklus wiederherstellen sowie das Langzeitselbsterneuerungs- und klonogene Koloniebildungspotential signifikant steigern. Die von uns erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hämatopoietische Insuffizienz beim MM auf einer Suppression aller HSPC-Subpopulationen beruht, die durch MM-bedingte spezifische Veränderungen des Knochenmarkmikromilieus ausgelöst werden.

6.1 *Summary*

Multiple myeloma (MM) is a clonal plasma cell disorder frequently accompanied by hematopoietic impairment including anemia, as well as leukopenia or thrombocytopenia. In this study we showed for the first time that hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) are diminished in the bone marrow (BM) of MM patients and have impaired long-term self-renewal and clonogenic potential. Genomic profiling of distinct HSPC subsets from healthy donors- and MM-patients-BM revealed a consistent deregulation of intracellular signaling pathways such as TGF β - and p38-MAPKinase-signaling pathways. Furthermore, deregulated pathways were identified, which are involved in cytoskeletal organization, migration, adhesion and cell cycle regulation. Along this line, we found a constitutive activation of smad2, a downstream mediator of transforming growth factor (TGF)-receptor I kinase (TBRI) activation in MM-HSPC. This constitutive activation of smad2, a defective actin assembly and downregulation of the adhesion mediating hyaluronic acid receptor (CD44) was functionally reflected by arrested proliferation and cell cycling and impaired adhesion- and migration-capacity. SD208 is a selective, 2,4-disubstituted, Pteridin arising TGF β -receptor I kinase inhibitor with high specificity. Inhibition of TGF beta signaling in MM-HSPC restored proliferation and cell cycling of HSPC and enhanced their long-term self renewal and clonogenic capacity. These data suggest that hematopoietic suppression in MM involves all HSPC subsets and results from MM-related changes of the entire BM microenvironment.

7. Literaturverzeichnis

Alexanian, R., Barlogie, B. & Dixon, D., *Ann Intern Med*, 1986; 105:8-11.

High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma.

Avigdor, A. *et al.*, *Blood*, 2004; 103:2981-2989.

CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow.

Bence Jones, H., *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Biology)*, 1848; S. 55-62

On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium.

Bergsagel, L.P. & Kuehl, M.W., *Oncogene*, 2001; 5611-5622.

Chromosome translocations in multiple myeloma.

Birnboim, H.C. & Doly, J., *Nucl. Acid. Res.*, 1979; 7:1513-1519.

Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse.

Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976; 72:248-254.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Bradley, T.R. & Hodgson, G.S., *Blood*, 1989; 54:1446-1450.

Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow.

Breitling, R. *et al.*, *FEBS Lett*, 2004; 573:83-92.

Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments.

Bruns, I., Buest, S. *et al.*, *Leukemia*, 2009; 23:892-899.

The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence.

Capra, J.D. & Kunkel, H.G., *J Clin Invest.*, 1970; 49(3):610-621.

Aggregation of gamma-G3 proteins: relevance to the hyperviscosity syndrome.

Chauhan, D. *et al.*, *Blood*, 1996; 87:1104-1112.

Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B.

Cohen, G., Canellos, G. & Greenberger, J., *Transplantation held in Keystone, Colorado*, R. Gale, and C. Fox, eds. (New York:Academic Press), 1980; pp. 491-506.

In vitro quantitation of engraftment between purified population of bone marrow hematopoietic stem cell and stromal cell, In *Biology of Bone Marrow Transplantation: proceedings of the 1980 ICN-UCLA Symposia on Biology of Bone Marrow*

Colmone, A. *et al.*, Science, 2008; 322:1861-1865.

Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells.

Dember, L.M., Clin J Am Soc Nephrol., 2006; 1:1320-1321.

Light Chains, Casts, Sheets and Fibrils: Monoclonal Immunoglobulin Diseases and Immunotactoid / Fibrillary Glomerulopathy.

Dimopoulos, M.D. *et al.*, N Engl J Med., 2007; 357:2123-2132.

Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma.

Dong, M. & Blobe, G.C., Blood, 2006; 107:4589-4596.

Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies.

Durie, B.G. & Salmon, S.E., Cancer, 1975; 36(3):842-54.

A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.

Esteve, F.R. & Roodman, G.D., Best Pract Res, 2007; 20:613-624.

Pathophysiology of myeloma bone disease.

Fortunel, N.O., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J.A., Blood, 2000; 96:2022-2036.

Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis.

Goeman, J.J. *et al.*, Bioinformatics, 2004; 20:93-99.

A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome.

Gordon, M.Y. *et al.*, Br J Haematol, 1985; 60:129-136.

Colony formation by primitive haemopoietic progenitors in cocultures of bone marrow cells and stromal cells.

Greipp, P.R. *et al.*, J of Clinical Oncology, 2005; 23:3412-3420.

International Staging System for Multiple Myeloma.

Hahn, H. *et al.*, Springer, 2008; S.40, ISBN 3-540-46359-3.

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.

Hao, Q.L. *et al.*, Blood, 1995; 86:3745-3753.

A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow.

Hao, Q.L. *et al.*, Blood, 1996; 88:3306-3313.

Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population.

Harousseau, J.L. & Moreau, P., NEJM, 2009; 360(25):2645-2654.

Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma.

Hayashi, T. *et al.*, Clin Cancer Res, 2004; 10:7540-7546.

Transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment.

He, W. *et al.*, Massague, J., Cell, 2006; 125:929-941.

Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway.

Hideshima, T. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2007; 7:585-598.

Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets.

Hu, Y. *et al.*, J Immunol, 2008; 180:8057-8065.

IFN- γ and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways.

Huber, W. *et al.*, Bioinformatics, 2002; 18(Suppl1):96-104.

Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression.

IMWG International Myeloma Working Group, Br J Haematol, 2003; 121:749-757.

Criteria for the classification of monoclonal gammopathies multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group.

Jakob, C. *et al.*, Eur J Cancer, 2006; 42:1581-1590.

Angiogenesis in multiple myeloma.

Juárez, P. & Guise, T.A., Bone, 2010 Aug 10 [Epub ahead of print].

TGF-beta in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases.

Kahler, O., Wiener Med. Wochenblatt, 1888; p. 67

Multiples Myelom.

Katodritou, E. *et al.*, Am J Hematol., 2009; 84:524-526.

Sequential evaluation of serum hepcidin in anemic myeloma patients: study of correlations with myeloma treatment, disease variables, and anemia response.

Katz, B.Z., Semin Cancer Biol, 2010 Jun; 20:186-195.

Adhesion molecules - The lifelines of multiple myeloma cells.

Kawano, M. *et al.*, Nature, 1988; 332:83-85.

Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas.

Klein, B. *et al.*, Blood, 1995; 85:863-872.

Interleukin-6 in human multiple myeloma.

Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V., *Leukemia*, 2009; 23:3-9.

Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma.

Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V., *Blood*, 2008; 111:2962-2972.

Multiple myeloma.

Kyle, R.A. *et al.*, *Mayo Clin Proc.*, 2003; 78:21-33.

Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma.

Kyle, R.A. *et al.*, *NEJM*, 2002; 346:564–569.

A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undertermined significance.

Kröpil, P. *et al.*, *Eur Radiol*, 2008; 18(1):51-58.

Comparrison of whole-body 64-slice multidetector computed thomography and conventional radiography in staging of multiple myeloma.

Laemmli, U.K., *Nature*, 1970; 227(5259):680-685.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Lam, B.S. & Adams, G.B., *Int J Lab Hematol*, 2010; doi:10.1111/j.1751-553X.2010.01250.x. [Epub ahead of print]

Hematopoietic stem cell lodgement in the adult bone marrow stem cell niche.

Landgren, O. & Kyle, R.A., *Br J Haematol*, 2007; 139(5):717-723.

Multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia and associated precursor diseases.

Larsson, J. & Karlsson, S., *Oncogene*, 2005; 24:5676-5692.

The role of Smad signaling in hematopoiesis.

Leary, A.G. *et al.*, *J Clin Invest*, 1984; 74:2193-2197.

Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes.

Li, J. *et al.*, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008; 88:2140-2143.

The clinical features, chemotherapy responses and survival of 223 patients with newly diagnosed multiple myeloma.

Lodish, H.F., *New York: W.H. Freeman and Co.*, 2003; 973 s. b ill. ISBN 0-7167-4366-3.

Molecular cell biology, 5. ed.

Macintyre, W., *Medical and Chirurgical Transactions of London*, 1850; 33:211-232.

Case of mollities and fragilitas ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter.

Maes, K. *et al.*, Blood, 2010; 116:3635-3644.

In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2.

Manz, M.G. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:11872-11877.

Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors.

Marieke, A.G. *et al.*, Nature, 2009; 458:904-908.

IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo.

Merril, C.R., Guide to Protein Purification (M.P. Deutscher, Ed.), 1990; pp. 441–459. Academic Press, San Diego, CA.

Gel staining techniques.

Moore, K.A., Ema, H. & Lemischka, I.R., Blood, 1997a; 89:4337-4347.

In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells.

Moore, K.A. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 1997b; 94:4011-4016.

Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs.

Mosteller, F. & Tukey, J.W., Addison-Wesley, Reading, MA, 1977;

Data Analysis and Regression - a second course in statistics.

Nakahata, T. & Ogawa, M., J Clin Invest, 1982; 70:1324-1328.

Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors.

Peterson, G.L., Anal. Biochem., 1977; 83:346-356.

A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable.

Podar, K., Chauhan, D. & Anderson, K.C., Leukemia, 2009; 23:10-24.

Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy.

Podar, K. & Anderson, K.C., Blood, 2005; 105:1383-1395.

The pathophysiological role of VEGF in hematological malignancies: therapeutic implications.

Punzel, M. *et al.*, Leukemia, 1999a; 13:1079–1084

Factor(s) secreted by AFT024 fetal liver cells following stimulation with human cytokines are important for human LTC-IC growth.

Punzel, M. *et al.*, Blood, 1999b; 93:3750-3756.

The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro.

Qiang, Y.W. *et al.*, *Blood*, 2008; 112:196-207.

Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma.

Ramakrishnan, A. & Deeg, H.J., *Expert Opin Biol Ther*, 2009; 9:21-28.

A novel role for the marrow microenvironment in initiating and sustaining hematopoietic disease.

Ruscetti, F.W., Akel, S. & Bartelmez, S.H., *Oncogene*, 2005; 24:5751-5763.

Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context.

Saiki, R.K. *et al.*, *N Engl J Med.*, 1988(Sep1); 319(9):537-541.

Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes.

Saeyns, Y., Inza, I. & Larranaga, P., *Bioinformatics*, 2007; 23:2507-2517.

A review of feature selection techniques in bioinformatics.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., N.Y., *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989; 1659 p.

Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed.

Seita, J. & Weissman, I.L., *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, 2010; 2(6):640-653.

Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation.

Silvestris, F. *et al.*, *Blood*, 2002; 99:1305-1313.

Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma.

Silvestris, F. *et al.*, *Blood*, 2001; 97:1155-1164.

Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression.

Spivak, J.L., Gascón, P. & Ludwig, H., *The Oncologist*, 2009; 14(suppl1):43-56.

Anemia management in oncology and hematology.

Staal, F.J., *et al.*, *Leukemia*, 2006; 20:1385-1392.

Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks.

Steidl, U., *et al.*, *Blood*, 2002; 99:2037-2044.

Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells.

Streuer, M. *et al.*, *Onkologie*, 2004; 27:150-154.

Low-Dose Thalidomide for Multiple Myeloma: Interim Analysis of a Compassionate Use Program.

Sutherland, H.J. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87:3584-3588.

Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers.

Tai, Y.T. *et al.*, Cancer Res, 2006; 66:6675-6682.

Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth in human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment.

Uhl, M. *et al.*, Cancer Res, 2004; 64:7954-7961.

SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo.

Yuen, S.W. *et al.*, Biotechniques, 1989; 7(1):74-82.

Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins.

Zhang, L. *et al.*, Clin Lymphoma Myeloma Leuk., 2010; 10:197-204.

Comparison among immunologically different subtypes of 595 untreated multiple myeloma patients in northern China.

Zhou, L. *et al.*, Blood, 2008; 112:3434-3443.

Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS.

8. Tabellenverzeichnis

TABELLEN: EINLEITUNG

Tabelle 1.1: Diagnostische Kriterien zur Kategorisierung des Malignitätsgrades des MM.....	5
Tabelle 1.2: Einteilung der Stadien des multiplen Myeloms nach Durie, B. G. & Salmon, S. E. (1975).....	5
Tabelle 1.3: Einteilung der Stadien des multiplen Myeloms nach ISS (Greipp, P. R. <i>et al.</i> , 2005)	5

TABELLEN: MATERIAL & METHODEN

Tabelle 3.1: Konzentrationen der Reaktionskomponenten einer Standard-PCR.....	20
Tabelle 3.2: Standard PCR-Programm	20
Tabelle 3.3: rT-Mastermix.....	22
Tabelle 3.4: Standard RT-PCR-Programm.....	23
Tabelle 3.5: Standard Hybridisierungsmix.....	26
Tabelle 3.6: Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamidgelen (PA-Gel) (die Mengenangaben gelten für zwei Gele mit den Maßen 7 cm [Länge] × 8 cm [Breite])	31
Tabelle 3.7: Patientencharakteristika für die Einteilung des MM-Stadiums nach DS.....	35
Tabelle 3.8: Klassifizierung der MM-Stadien und Zuordnung der Patientenproben zu den jeweiligen Versuchsreihen	36
Tabelle 3.9: Erläuterung der in Tabelle 3.8 verwendeten Kürzel und Zuordnung zu den jeweiligen Abschnitten der Versuchsreihen.	37
Tabelle 3.10: Verwendete Antikörper, Herkunft, Klon-Nummer und Konzentration	53

TABELLEN: ERGEBNISSE

Tabelle 4.1: „Top 10“ differentiell exprimierter Gene der HSC und CMP Populationen (aus Bruns, I., Buest, S. <i>et al.</i> , eingereicht zur Publikation bei Blood 2010).....	65
Tabelle 4.2: „Top 10“ differentiell exprimierter Gene der MEP und GMP Populationen (aus Bruns, I., Buest, S. <i>et al.</i> , eingereicht zur Publikation bei Blood 2010).....	66
Tabelle 4.3: Auswahl regulierter Signalwege in HSC, CMP, MEP und GMP (aus Bruns, I., Buest, S. <i>et al.</i> , eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)	67

TABELLEN: ANHANG

Tabelle 0.1: Dargestellt sind alle differentiell exprimierten Gene des MM, die ausgehend von der HSC in mindestens einer weiteren Subpopulation verändert sind. Die <i>foldchange</i> -Änderungen sind farbig kodiert.....	121
Tabelle 0.2: Dargestellt sind betroffene Einzelgene ausgewählter, dysregulierter Signalwege des MM.....	122
Tabelle 0.3: Statistische Signifikanzen der Univariateanalyse	123
Tabelle 0.4: Statistische Signifikanzen der Multivariateanalyse.....	123

9. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNGEN: EINLEITUNG

- Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese..... **2**
- Abbildung 1.2a-b: Röntgendiagnostische Darstellung von Osteolysen. Die Röntgenaufnahme aus Abbildung (a) zeigt multiple Osteolysen in den Unterarmknochen eines MM-Patienten. In Abbildung (b) sind multiple Osteolysen im Schädelknochen eines Patienten dargestellt, hier ein so genannter „Schrotschuss“-Schädel .. **7**

ABBILDUNGEN: MATERIAL & METHODEN

- Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des „*semi dry*“-Blotmoduls für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-PA-Gel auf eine PVDF-Membran **33**
- Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Gewinnung von HSPC Subpopulationen aus Blut und/oder Knochenmark. Auflistung der Oberflächenmarker zugeordnet zu den einzelnen Sub-populationen. Beispielhafte Darstellung einer an die durchflusszytometrie angeschlossene Verwendung der Subpopulationen **57**
- Abbildung 3.3: Repräsentative Darstellung der „gating“-Strategie zur Analyse des Zellzyklus von myeloiden HSPC aus gesundem Knochenmark im Vergleich zu Knochenmark von MM-Patienten. Abgebildet sind die Zellzyklusphasen, die mittels Ki67- und Hoechst 33342-Färbung auf-geschlüsselt werden können, rechts im Bild. HSC und HPC-Subpopulationen wurden wie folgt aufgetrennt: HSC (Lin⁻, CD34⁺, CD38^{lo}); CMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁻); GMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁺); MEP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁻, CD45RA⁻). Die Antikörper waren wie folgt Fluorochrom-konjugiert: Ki67-FITC; Lin-PE; CD34-APC; CD38-APC-Cy7; CD123-PE-Cy5.5; CD45RA-ECD. Hoechst 33342 diente als DNA-Marker (Anregungswellenlänge 350 nm; Emmissionsmaximum 461 nm). **59**

ABBILDUNGEN: ERGEBNISSE

- Abbildung 4.1a-b: Differentiell exprimierte Gene im TGFβ-Signalweg (a) und im p38-MAPKinase Signalweg (b) (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010) **68**
- Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der mittels Modell Algorithmus, *in silico*, bestimmten Differenzierungskaskade humaner HSPC (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010) **69**
- Abbildung 4.3: Vergleichendes *cluster* Dendrogramm einer euklidischen Distanzanalyse der Gen-expressionsdaten von HSPC aus gesundem und MM-Knochenmark (aus Bruns, I., Buest, S. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010) **70**
- Abbildung 4.4: Vergleichende Analyse der *relative message entropy* von HSPC-Subpopulationen aus gesundem und MM-Knochenmark (aus Bruns, I., Buest, s. *et al.*, eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)..... **70**
- Abbildung 4.5: Dargestellt ist exemplarisch die durchflusszytometrische Strategie zur Auftrennung der HSC und HPC-Subpopulationen [HSC (Lin⁻, CD34⁺, CD38^{lo}); CMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁻); GMP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁺, CD45RA⁺); MEP (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁺, CD123⁻, CD45RA⁻)] erstellt aus einer Messung von gesundem Knochenmark **71**

- Abbildung 4.6: Prozentuelle Verteilung von HSC und HPC-Subpopulationen im Knochenmark. Verglichen wird Knochenmark von gesunden Spendern (grün) mit dem von MM-Patienten (orange). Die Kreise repräsentieren die einzelnen Subpopulationen. Ihre Größe ist auf die gesunde HSC als Wert 1 normiert und sie stehen diesbezüglich in ihrer Größe in Relation. Signifikante Veränderungen sind mit einem Sternchen markiert ($p < 0,05$) **72**
- Abbildung 4.7: Verteilung von HSC und HPC-Subpopulationen im Knochenmark von gesunden Spendern (grün) und von MM-Patienten (orange) als Zellzahlen pro μl Knochenmark. Die Kalkulation basiert auf der Ausgangsmenge Knochenmark, der Anzahl $\text{CD}34^+$ -Zellen und dem durchflusszytometrisch bestimmten prozentualen Anteil der einzelnen Subpopulationen. Die gezeigten Kreise repräsentieren die einzelnen Subpopulationen, sind auf die gesunde HSC als Wert 1 normiert und stehen diesbezüglich in ihrer Größe in Relation. Signifikante Veränderungen sind mit Sternchen markiert ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).. **73**
- Abbildung 4.8a-d: Überblick über ein Well (Vertiefung) einer 24-Well-Zellkulturplatte eines CFC-Versuches (a). Je ein typischer Vertreter der roten Kolonien BFU-E in (b), der weißen Kolonien CFU-GM in (c) und der Mix-Kolonien CFU-GEMM (d). **74**
- Abbildung 4.9: CFU-Frequenz [%] im Vergleich von gesundem und MM-Knochenmark. In die Versuche wurden je 2000 $\text{CD}34^+$ -Zellen eingesetzt. Bestimmt wurde retrospektiv die prozentuelle Frequenz der Koloniebildenden Zellen in Relation zur Gesamtkolonienzahl. Im Median bildeten sich 269 Kolonien aus $\text{CD}34^+$ -Zellen des gesunden Knochenmarks ($n=4$) und lediglich 108 Kolonien aus dem MM ($n=8$) **75**
- Abbildung 4.10: Vergleichend dargestellt ist der prozentuale Mittelwert gebildeter roter Kolonien aufgeschlüsselt in CFU-E und BFU-E, weißer Kolonien (CFU-G; CFU-M; CFU-GM) und gemischter Kolonien in Bezug auf den Mittelwert der Gesamtanzahl gebildeter Kolonien, die sich aus je 2000 $\text{CD}34^+$ -Zellen aus gesundem Knochenmark (weiß [$n=4$]) oder aus MM-Patienten (schwarz [$n=9$]) gebildet haben. **76**
- Abbildung 4.11: LTC-IC-Frequenz von ($n=4$) gesundem Knochenmark und ($n=9$) Knochenmark von MM-Patienten. Die Frequenzen wurden mittels der Software L-Calc (Version 1.1) der Firma StemSoft Inc. errechnet. Gezeigt ist ein signifikanter Rückgang der LTC-IC-Frequenz im MM. **78**
- Abbildung 4.12: Repräsentative Darstellung der *gating*-Strategie zur Analyse des Zellzyklus von myeloiden HSPC aus gesundem Knochenmark im Vergleich zu Knochenmark von MM-Patienten. Abgebildet sind die Zellzyklusphasen, die mittels Ki67- und Hoechst 33342-Färbung auf-geschlüsselt werden konnten, rechts im Bild. HSC und HPC-Subpopulationen wurden wie folgt aufgetrennt: HSC (Lin^- , $\text{CD}34^+$, $\text{CD}38^{\text{lo}}$); CMP (Lin^- , $\text{CD}34^+$, $\text{CD}38^+$, $\text{CD}123^+$, $\text{CD}45\text{RA}^-$); GMP (Lin^- , $\text{CD}34^+$, $\text{CD}38^+$, $\text{CD}123^+$, $\text{CD}45\text{RA}^+$); MEP (Lin^- , $\text{CD}34^+$, $\text{CD}38^+$, $\text{CD}123^-$, $\text{CD}45\text{RA}^-$). Die Antikörper waren wie folgt Fluorochrom-konjugiert: Ki67-FITC; Lin-PE; $\text{CD}34$ -APC; $\text{CD}38$ -APC-Cy7; $\text{CD}123$ -PE-Cy5.5; $\text{CD}45\text{RA}$ -ECD. Hoechst 33342 diente als DNA-Marker (Anregungswellenlänge 350 nm; Emissionsmaximum 461 nm) **81**
- Abbildung 4.13: Prozentuale Verteilung der MEP-Fraktionen in den Zellzyklusphasen. Verglichen wurden MEP aus Knochenmark von $n = 6$ gesunden Spendern (weiß) und $n = 4$ MM-Patienten (schwarz). Abgebildet ist die signifikante Erhöhung der in der G_0 -Phase befindlichen Zellen bei gleichzeitiger, signifikanter Abnahme der in der G_1 -Phase befindlichen Zellen im MM **81**
- Abbildung 4.14: Prozentuale Fähigkeit zur Adhäsion auf HA beschichteten Objektträgern von HSPC aus dem Knochenmark von $n=4$ gesunden Spendern (weiß) im Vergleich mit HSPC von $n=3$ MM-Patienten (schwarz). Die Zellen wurden in einer 3 stündigen Inkubation adhären. Die adhären Zellen wurden im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und die resultierenden Daten prozentual in Bezug auf die eingesetzte

- Zellzahl abgebildet. Signifikanzen: HSC $p = 8,4 \times 10^{-5}$; CMP $p = 1,2 \times 10^{-4}$; GMP $p = 1,1 \times 10^{-4}$; MEP $p = 3,4 \times 10^{-9}$ **83**
- Abbildung 4.15: Fähigkeit zur Adhäsion [%] auf Fibronektin beschichteten Objektträgern von HSPC aus dem KM von n=3 gesunden Spendern (weiß) im Vergleich mit HSPC von n=3 MM-Patienten (schwarz). Adhärente Zellen wurden nach 3 stündiger Inkubation im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und die resultierenden Daten prozentuell in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl abgebildet. Signifikanzen: HSC $p = 0,032$; CMP $p = 0,026$; GMP $p = 0,030$; MEP $p = 0,0011$ **84**
- Abbildung 4.16: Prozentuale Fähigkeit zur Migration von HSPC-Subpopulationen aus dem Knochenmark von n=3 gesunden Spendern (weiß) im Vergleich zu HSPC von n=4 MM-Patienten (schwarz) in speziellen „96-Transwell-Boyden-Kammern“ gegen einen SDF1 α Gradienten. Die resultierenden Daten wurden prozentuell in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl abgebildet **86**
- Abbildung 4.17a-h: Dargestellt sind exemplarisch in Abbildungsteil (a) eine gesunde, unpolare, CD34⁺-Zelle mit normaler CD44 Expression (grün), ausgeprägtem F-Aktin-Ring (rot) und Kernfärbung (blau) in einer überlagernden Darstellung aller Farbkanäle. In (b) die gesunde, unpolare, CD34⁺-Zelle mit ausgeprägtem F-Aktin-Ring (rot), in (c) die gesunde, unpolare, CD34⁺-Zelle mit normaler CD44 Expression (grün), in (d) die Kernfärbung der gesunden Zelle, in (e) eine unpolare, CD34⁺-MM-Zelle mit stark verminderter CD44 Expression (grün), „gestörter“ F-Aktin-Verknüpfung (rot) und Kernfärbung (blau) in einer überlagernden Darstellung aller Farbkanäle, in (f) die veränderte F-Aktin-Verknüpfung der MM-Zelle, in (g) die stark verminderte Expression von CD44 auf der Oberfläche der MM-Zelle und in (h) die Kernfärbung der MM-Zelle **88**
- Abbildung 4.18a-b: Abbildungsteil (a) zeigt vergleichend zwischen gesund (weiß) und MM-HSPC (schwarz) die prozentualen Anteile an CD34⁺-Zellen, die eine „normale“ oder eine „abnorme“ Aktinformierung ausprägen. In (b) ist die Verminderung der CD44-Expression auf der Zelloberfläche von MM-HSPC (schwarz) im Vergleich mit gesunden HSPC (weiß) anhand der *mean fluorescence intensity* (MFI) extrazellulärer Fluorochrom-basierter Färbungen abgebildet **89**
- Abbildung 4.19: Exemplarische Darstellung von jeweils einem identifizierten *hotspot* je Probe der immunhistochemischen Statusbestimmung des pSmad2-Grades von Knochenmarkbiopsie-schnitten von jeweils 4 gesunden Spendern (oben) und MM-Patienten (unten) **90**
- Abbildung 4.20: Vergleich der prozentualen Anteile von pSmad2 positiven Zellen im Knochenmark von gesunden Spendern (weiß) und Patienten mit MM (schwarz) **91**
- Abbildung 4.21: Exemplarische Abbildung einer pSMAD2-Western blot Analyse. Verglichen wurden die pSMAD2-Signale bei 60 kDa von 30 μ g Gesamtprotein der gesunden Kontrolle (Mitte) und derselben Konzentration von MM-Gesamtprotein (Rechts). Die linke Spur des Western blot zeigt die relevanten Banden des Molekulargewichtsstandards im *overlay* **92**
- Abbildung 4.22a-c: (a) Vergleich der Proliferations-raten von CD34⁺-HSPC aus gesundem (weiß) und MM-Knochenmark (schwarz). (b) Proliferation von MM-HSPC unter Stimulation mit TGF β und/oder SD208. (c) Proliferation von gesunden HSPC unter Stimulation mit TGF β und/oder SD208 **94**
- Abbildung 4.23a-b: Abbildungsteil (a) zeigt die prozentuale Verteilung der aus myeloiden Vorläufern gebildeten Kolonien unter SD208-Stimulationsbedingungen (schraffiert) im MM. Die Kontrolle (schwarz) enthält äquivalente Mengen DMSO. (b) zeigt die prozentuale Verteilung der aus myeloiden Vorläufern gebildeten Kolonien unter SD208-Stimulationsbedingungen (schraffiert) aus gesundem Knochenmark. Die Kontrolle (weiß) enthält äquivalente Mengen DMSO **95**

Abbildung 4.24: LTC-IC-Frequenz unter SD208 Stimulationsbedingungen (schraffiert). Die Kontrolle (schwarz) enthält äquivalente Mengen DMSO	96
Abbildung 4.25: Prozentuale Verteilung CD34 ⁺ -Zellen in den Zellzyklusphasen. Verglichen wurden Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern (weiß) und MM-Patienten (schwarz). Abgebildet ist die signifikante Erhöhung der in der G ₀ /G ₁ -Phasen befindlichen Zellen bei gleichzeitiger, signifikanter Abnahme der in der S-Phase befindlichen Zellen im MM	98
Abbildung 4.26: Prozentuale Verteilung CD34 ⁺ -Zellen in den Zellzyklusphasen. Verglichen wurden Zellen aus Knochenmark von MM-Patienten unstimuliert (schwarz) mit SD208 stimulierten (schraffiert) Zellen. Abgebildet ist die geringe, signifikante Abnahme der in der G ₀ /G ₁ -Phasen befindlichen Zellen unter SD208 Stimulation bei gleichzeitiger, signifikanter Erhöhung der in der S-Phase befindlichen Zellen im MM	98
Abbildung 4.27a-c: Dargestellt sind Box-Plots der Multivariatanalyse. Analysiert werden der Hämoglobinspiegel (Hb) in Abbildung (a), die Zellzahl weißer Blutzellen (WBC) in Abbildungsteil (b) und die Blutplättchenzahl (c) in Abhängigkeit zum Knochenmarkinfiltrationsgrad der MM-Patienten (aus Bruns, I., Buest, S. <i>et al.</i> , eingereicht zur Publikation bei Blood 2010)	99

Anhang

Regulation ausgehend von der HSC					
Gen Symbol	Beschreibung	HSC	CMP	GMP	MEP
VWF	von Willebrand factor	2,70			3,64
CLU	Clusterin	2,29	1,52	2,25	1,84
FLOT2	flotillin 2	2,28	1,85	2,07	2,20
NBL1	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	2,21		2,54	
MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	2,18	2,48		
NDUFB7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa	1,98	1,54		
PIM1	pim-1 oncogene	1,94			2,08
HIST1H1E	histone cluster 1, H1e	1,91			1,91
HIST1H4C	histone cluster 1, H4c	1,90			1,86
OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	1,87			2,37
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	1,82	1,63	2,74	
SLC48A1	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1	1,78	1,71		2,21
ATP5G2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C2 (subunit 9)	1,78	1,49		
NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	1,75			1,90
DCAKD	dephospho-CoA kinase domain containing	1,75	1,55		2,51
RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	1,74			2,11
KCNK5	potassium channel, subfamily K, member 5	1,74		3,26	
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	1,74			2,15
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	1,73	1,83		
GCNT4	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2 (beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase)	1,70	1,63		
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	1,69	1,57	2,39	
NAP1L4	nucleosome assembly protein 1-like 4	1,68			1,84
ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	1,68			1,99
AP2M1	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	1,65		2,15	
SNX17	sorting nexin 17	1,65			2,06
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	1,65		2,00	
GLG1	golgi apparatus protein 1	1,64			1,98
COMT	catechol-O-methyltransferase	1,62	1,40		
CSDA	cold shock domain protein A	1,61			1,81
NCKAP1	NCK-associated protein 1	1,58			2,28
HDLBP	high density lipoprotein binding protein	1,57			2,01
FTL	ferritin, light polypeptide	1,55	1,49		
PMPCA	peptidase (mitochondrial processing) alpha	1,53		1,58	
STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1	1,52		1,69	
TBC1D13	TBC1 domain family, member 13	1,52		1,61	
S100A6	S100 calcium binding protein A6	1,51			1,99
RPA1	replication protein A1, 70kDa	1,49			1,82
VCP	valosin-containing protein	1,48	1,43	1,91	
GTF3C5	general transcription factor IIIC, polypeptide 5, 63kDa	1,46		1,78	
LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	1,45		1,36	
UBA7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	1,43	1,63		
NUCB1	nucleobindin 1	1,42	1,42		
SKIL	SKI-like oncogene	-8,13	-2,80		-2,63
LOC100188945	cell division cycle associated 4 pseudogene	-3,34		-2,76	
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	-3,30		-2,59	-3,85
PSPH	phosphoserine phosphatase	-3,09	-2,77		
SMEK2	SMEK homolog 2, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	-2,78	-2,05		
KIAA0754	hypothetical LOC643314	-2,75			-2,89
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	-2,71	-3,02		-4,09
PGAP1	post-GPI attachment to proteins 1	-2,59			-2,58

MTMR6	myotubularin related protein 6	-2,59	-2,26	-3,68	-2,51	
S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	-2,56	-3,29			
RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	-2,49		-3,22	-2,44	
HNRNPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	-2,40			-2,69	
NUP160	nucleoporin 160kDa	-2,30			-2,23	
CCDC49	coiled-coil domain containing 49	-2,29	-1,89		-2,52	
HBP1	HMG-box transcription factor 1	-2,25		-2,47		
DST	Dystonin	-2,23			-3,19	
KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)	-2,15	-2,52			
DUSP10	dual specificity phosphatase 10	-2,15	-2,26	-2,88	-3,36	
SP2	Sp2 transcription factor	-2,12	-1,84			
ATP6V1D	ATPase, H+ transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D	-2,07		-2,51		
JMJD1C	jumonji domain containing 1C	-1,98	-1,69	-2,79	-2,22	
SMEK1	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	-1,95			-2,60	
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	-1,95	-1,95		-2,25	
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	-1,95	-2,62			
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	-1,90			-2,04	
YTHDC1	YTH domain containing 1	-1,90	-1,85	-2,80		
HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	-1,88	-1,72	-2,37		
USP3	ubiquitin specific peptidase 3	-1,82		-1,98	-2,03	
PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-1,81	-1,99			
IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	-1,73			-2,04	
MEX3C	mex-3 homolog C (C. elegans)	-1,72	-1,74	-1,90		
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	-1,69			-2,50	
MTMR10	myotubularin related protein 10	-1,68			-3,19	
TMF1	TATA element modulatory factor 1	-1,68	-1,71	-2,43		
ZNF350	zinc finger protein 350	-1,67	-2,15	-2,34	-2,60	
CSGALNACT2	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	-1,66	-1,68	-2,06		
EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5	-1,65			-2,06	
RBM15	RNA binding motif protein 15	-1,64	-1,64	-1,66	-1,74	
COX4I1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	-1,62			-2,01	
ATP2B1	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	-1,61			-2,59	
RB1CC1	RB1-inducible coiled-coil 1	-1,60			-1,91	
ORC6L	origin recognition complex, subunit 6 like (yeast)	-1,59			-1,68	
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	-1,59	-1,73			
IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	-1,59		-1,78		
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	-1,57	-1,44			
FUSIP1	FUS interacting protein (serine/arginine-rich) 1	-1,54		-1,62		
MAR7	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7	-1,52	-1,47			
TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)	-1,52	-1,68	-2,28	-1,93	
SEC24B	SEC24 family, member B (S. cerevisiae)	-1,51		-2,43		
SCML2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	-1,51		-1,96		
NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	-1,50	-1,65			
SNX2	sorting nexin 2	-1,50	-1,48	-1,67		
ZNF675	zinc finger protein 675	-1,49	-1,55	-1,88		
BTBD7	BTB (POZ) domain containing 7	-1,48		-1,62		
MEF2A	myocyte enhancer factor 2A	-1,47	-2,33			
HSF2	heat shock transcription factor 2	-1,46		-1,80	-1,95	
IRGQ	immunity-related GTPase family, Q	-1,44			-2,41	
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	-1,41	-1,43	-1,46	-1,63	
Legende	<-3	<-2	<-1	>1	>2	>3

Tabelle 0.1: Dargestellt sind alle differentiell exprimierten Gene des MM, die ausgehend von der HSC in mindestens einer weiteren Subpopulation verändert sind. Die *foldchange*-Änderungen sind farbig kodiert.

Signalweg	Anzahl differenziell exprimierter Gene	herauf regulierte Gene	herunter regulierte Gene
MAPKinase signaling pathway	12	MAP2K4; MAPKAPK3; DAXX; MAPKAP; STAT1; RAPGEF2	MAP3K4; MAP2K5; MAPK8; MEF2A; MAX; BRAF
Cell Cycle: G1/S Check Point	5	SMAD3; CDK2	SMAD4; CDKN1A; RB1
Fas signaling pathway	5	MAP2K4; PTPN13; CFLAR	PRKDC; MAPK8
NFkB activation by nontypeable hemophilus influenzae	5	SMAD3; IL1B	SMAD4; TLR2; IL8
T-cell receptor signaling pathway	5	MAP2K4; PTPN7	PRKCB; MAPK8; RASA1
VEGF, Hypoxia, and Angiogenesis	5	VEGFA; EIF1	PI3K; PRKCB; HIF1A
Apoptotic signaling in response to DNA damage	4	STAT1; BCL2L1; BAX	PRKCB
EGF signaling pathway	4	MAP2K4; STAT1	MAPK8; RASA1
mTOR signaling pathway	4	EBP; EIF4A1	EIF4G3; EIF4G2
p53 signaling pathway	4	CDK2; BAX	BCL2; CDKN1A
Rac1 cell motility signaling pathway	4	CDK5	CDC42; PI3K; CDKN1A
Regulation of eIF2	4	PPP1CA	EIF5; EIF2AK1; EIF2AK3
Regulation of eIF4a and p70 S6 kinase	4	EBP; EIF4A1	EIF4G3; EIF4G2
Signaling of Hepatocyte growth factor receptor	4	STAT3	GAB1; MAPK8; RASA1
TNFR1 signaling pathway	4	MAP2K4; ARP1	PRKDC; MAPK8
Toll-like signaling pathway	4	MAP2K4; TLR3	MAPK8; TLR2
ADP-ribosylation factor	3	ARF1	ARFGEF1; LTB
Role of Mitochondria in apoptotic signaling	3	BAX; BCL2L1	BCL2
TPO signaling pathway	3	STAT1; STAT3	RASA1
AKT signaling pathway	2	X	BCL2; PI3K
Cell Cycle: G2/M Checkpoint	2	X	PRKDC; CDKN1A
CXCR4 signaling pathway	2	X	PRKCB; PI3KR1

Tabelle 0.2: Dargestellt sind betroffene Einzelgene ausgewählter, dysregulierter Signalwege des MM.

Univariatanalyse					
Faktor	Hb p-Wert	WBC p-Wert	PLT p-Wert	CD34/ μ l p-Wert	CD34/MNC p-Wert
Alter	n.s.	0.076	0.022	n.s.	n.s.
Geschlecht	0.02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ISS	0.001	n.s.	0.02	n.s.	n.s.
DS	n.s.	n.s.	n.s.	0.012	n.s.
KM Infiltration	0.032	0.085	0.04	n.s.	n.s.
Osteolysen	n.s.	n.s.	n.s.	0.16	n.s.
LDH	0.102	0.026	0.02	0.134	0.15
EW Urin (log)	0.059	n.s.	0.044	0.176	0.112
Crea (log)	n.s.	0.171	0.003	n.s.	n.s.
Zusatz A vs. B	n.s.	n.s.	0.03	n.s.	n.s.

Tabelle 0.3: Statistische Signifikanzen der Univariatanalyse. Mit n.s. gekennzeichnete Felder deuten auf nicht signifikante Ergebnisse hin.

Multivariatanalyse					
Faktor	Hb p-Wert	WBC p-Wert	PLT p-Wert	CD34/ μ l p-Wert	CD34/MNC p-Wert
Alter	0.50650	0.12521	0.07370	0.87055	0.70040
Geschlecht	0.06098	0.93952	0.55579	0.30075	0.80394
ISS	0.04104	0.95191	0.88873	0.39840	0.27734
DS	0.75797	0.40967	0.62144	0.18939	0.80508
KM Infiltration	0.03282	0.03877	0.08753	0.74630	0.86053
Osteolysen	0.99431	0.59481	0.98526	0.97703	0.84055
LDH	0.58514	0.11198	0.42351	0.09467	0.10802
EW Urin (log)	0.72795	0.73864	0.73221	0.09521	0.15932
Crea (log)	0.82089	0.32236	0.03663	0.71721	0.38598
Zusatz A vs. B	0.78143	0.39226	0.31464	0.71920	0.43858

Tabelle 0.4: Statistische Signifikanzen der Multivariatanalyse

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. R. Haas für die Anregung, dieses interessante und klinisch relevante Thema zu bearbeiten sowie seine fortwährende Unterstützung.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. W. Martin als Vertreter der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für die freundliche Unterstützung als Mentor und die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. med. I. Bruns danke ich für die engagierte Betreuung, die zahlreichen anregenden Gespräche und für die Unterstützung bei allen Aspekten dieser Arbeit. Derselbe Dank gilt Herrn Dr. med. A. Czibere und Herrn Dr. med. T. Schröder für Hilfestellungen und anregende Diskussionen.

Meinen besonderen Dank möchte ich an Herrn Dr. med. A.-N. Hünerlitürkoglu und alle weiteren Ärzte richten, die mir bei der Probenakquise geholfen haben. Sowie Herrn Dr. med. J. Fischer, dessen Hilfe und Kenntnisse der Durchflusszytometrie einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, insbesondere den Kolleginnen und Kollegen des Forschungslabors, für das freundschaftliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Großer Dank gilt Herrn Dipl. Biol. Ron-Patrick Cadeddu und Frau Dipl. Biotechnol. Julia Fröbel für den häufigen wissenschaftlichen Austausch und das gute Arbeitsklima im Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie. Frau Annemarie Koch danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Angelika und Hans-Wilhelm Büst, sowie meiner Frau, Dr. rer. nat. Dunja Baston-Büst, und meinen Schwiegereltern, Frau Ingrid Baston und Herrn Prof. Dr. Ing. Alfred Baston, die während meiner gesamten Studienzeit und darüber hinaus an mich geglaubt und mich immer unterstützt haben.

Danke!

Eidesstattliche Versicherung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Sebastian Büst