



**Funktionale und molekulare Analysen von
Mesenchymalen Stromazellen und deren
Interaktionen mit CD34⁺ Stamm- und
Progenitorzellen bei Patienten mit
Myelodysplastischen Syndromen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stefanie Geyh
aus Berlin

Düsseldorf, November 2013

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

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

Referent: Univ. Prof. Dr. med. Rainer Haas
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2014

*„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt
unablässig dafür, daß dem forschenden Menschengest seine
beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von
neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“*
Max Planck (1858-1947), dt. Physiker

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Die Hämatopoiese	1
1.1.1 Die hämatopoietische Stamm- und Progenitorzelle (HSPZ)	1
1.1.2 Das Knochenmark-Mikromilieu	2
1.1.3 Das Nischen-Modell der Hämatopoiese	5
1.1.4 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ)	8
1.1.5 Definitionskriterien für MSPZ entsprechend der International Society for Cellular Therapies (ISCT)	10
1.2 Myelodysplastische Syndrome (MDS)	11
1.2.1 Definition	11
1.2.2 Epidemiologie	11
1.2.3 Symptomatik	12
1.2.4 Klassifikation	12
1.2.5 Prognose	14
1.2.6 Diagnostik	17
1.2.7 Therapie	17
1.2.8 Ätiologie und Pathogenese	19
1.3 Die Rolle von Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) in der MDS Pathogenese – Stand der Forschung	21
1.4 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Materialien und Chemikalien	24
2.1.2 Agarosegelelektrophorese	27
2.1.2.1 TBE-Puffer	27
2.1.2.2 Agarosegel und Elektrophorese	27
2.1.3 Primer	28
2.1.3.1 Onlineprogramme zur Primergestaltung	28
2.1.4 Antikörper	31
2.1.5 Zelllinien	32
2.1.6 Patientencharakteristika	32
2.1.7 Kultur- und Differenzierungsmedien	33
2.1.7.1 Proliferationsmedium für CD34 ⁺ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ)	33

2.1.7.2	LTB-MC (Long Term Bone Marrow Culture) Medium für Long Term Culture – Initiating Cell (LTC-IC) Versuch	33
2.1.7.3	Migrationsmedium für CD34 ⁺ HSPZ.....	33
2.1.7.4	Kulturmedium für MSPZ	33
2.1.7.5	Differenzierungsmedium zur chondrogenen Differenzierung von MSPZ	33
2.1.7.6	Differenzierungsmedium zur adipogenen Differenzierung von MSPZ	34
2.1.7.7	Differenzierungsmedium zur osteogenen Differenzierung von MSPZ	34
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Zellkultur	34
2.2.1.1	Dichtezentrifugation.....	34
2.2.1.2	Isolation von CD34 ⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) aus dem Knochenmark	35
2.2.1.3	Generierung von MSPZ aus dem Knochenmark	36
2.2.1.4	Bestimmung der Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) Aktivität in den MSPZ Kulturen	36
2.2.1.5	Passagieren und Kultivierung von MSPZ.....	37
2.2.1.6	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	37
2.2.1.7	Kryokonservierung von MSPZ	38
2.2.1.8	Auftauen von kryokonservierten MSPZ.....	38
2.2.2	Wachstumskinetik	38
2.2.3	Differenzierungen	39
2.2.3.1	Chondrogene Differenzierung von MSPZ.....	39
2.2.3.2	Nachweis von Proteoglykanen mittels Safranin O	39
2.2.3.3	Adipogene Differenzierung von MSPZ	40
2.2.3.4	Nachweis der Lipidvakuolen über Oil Red O	40
2.2.3.5	Osteogene Differenzierung von MSPZ	40
2.2.3.6	Nachweis der Kalzifizierung mittels Alizarin Red und van Kossa und Nachweis der Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP)	41
2.2.4	Zellzyklusanalyse von CD34 ⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ....	42
2.2.5	Long Term Culture – Initiating Cell (LTC-IC) Assay	42
2.2.6	Migration von CD34 ⁺ HSPZ	43
2.2.7	Seneszenz-Assay als Nachweis für alternde Zellen	44
2.2.8	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.8.1	DNA Extraktion	44
2.2.8.2	RNA Extraktion	44
2.2.8.2.1	RNA Extraktion von osteogen differenzierten MSPZ	45
2.2.8.3	Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem <i>Nanodrop</i> [®] ND-1000	46
2.2.8.4	cDNA Synthese (Reverse Transkription (RT))	46
2.2.8.4.1	cDNA Synthese von RNA aus osteogen differenzierten MSPZ	47

2.2.8.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.8.6	Gelelektrophorese	49
2.2.8.7	Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).....	49
2.2.9	Proteinanalysen	50
2.2.9.1	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting- FACS)	50
2.2.9.1.1	Extrazelluläre und intrazelluläre Färbungen	50
2.2.9.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	52
2.2.10	Serumanalysen-Osteocalcin ELISA	53
2.2.11	Statistische Auswertungen.....	53
3.	Ergebnisse	55
3.1	Charakterisierung von MSPZ.....	55
3.1.1	Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) Aktivität	55
3.1.2	Charakterisierung der MSPZ mittels Durchflusszytometrie	56
3.1.3	Phänotyp der MSPZ Kulturen	57
3.1.4	Wachstumskinetik	58
3.1.5	Replikative Seneszenz in MSPZ Populationen.....	60
3.1.6	DNA Methylierungsmuster in MSPZ	63
3.2	Differenzierungspotential von MSPZ Populationen	64
3.2.1	Chondrogenes Differenzierungspotential	64
3.2.2	Adipogenes Differenzierungspotential.....	65
3.2.3	Osteogenes Differenzierungspotential.....	67
3.2.3.1	Expression osteogener Marker in nativen und osteogen differenzierten MSPZ von MDS-Patienten	69
3.3	Expression von Dicer1 und des Shwachman Bodian Diamond Syndrome (SBDS) Gens in MSPZ.....	73
3.4	Interaktionsmöglichkeiten zwischen MSPZ und CD34 ⁺ HSPZ.....	75
3.4.1	Zytokin-Expression von MSPZ	75
3.4.2	Chemokin-Expression von MSPZ	78
3.4.3	Zytokin-Expression korrespondierender Rezeptormoleküle von CD34 ⁺ HSPZ	81
3.4.4	Chemokin-Expression des korrespondierenden Rezeptormoleküls CXCR4 in CD34 ⁺ HSPZ	83
3.5	Migrationsfähigkeit von CD34 ⁺ HSPZ	84
3.6	Long Term Culture- Initiating Cell (LTC-IC) Assay	85
3.7	Zellzyklusanalyse von CD34 ⁺ HSPZ nach Ko-Kultur auf MSPZ feeder layer	89
4.	Diskussion	94
4.1	MDS-MSPZ zeigen Wachstumsdefizite und eine erhöhte Seneszenz	95

4.2	MDS-MSPZ zeigen <i>in vitro</i> ein verringertes osteogenes Differenzierungspotential	96
4.3	Verändertes Expressionsmuster in MDS-MSPZ und CD34 ⁺ HSPZ führt zu einer fehlerhaften Interaktion	99
4.4	MDS-MSPZ zeigen eine gestörte Stromaunterstützung auf CD34 ⁺ HSPZ	101
5.	Zusammenfassung	105
5.1	Zusammenfassung in Deutsch.....	105
5.2	Zusammenfassung in Englisch.....	107
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	108
7.	Literaturverzeichnis	111
8.	Anhang	123
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	125
9.1	Abbildungen.....	125
9.1.2	Abbildungen im Anhang	126
9.2	Tabellen	127
10.	Eigene Referenzen	128
10.1	Publikationen	128
10.2	Vorträge.....	128
10.3	Poster auf wissenschaftlichen Kongressen.....	128
11.	Danksagung	129
12.	Erklärung	131

1. Einleitung

1.1 Die Hämatopoiese

Das menschliche Blut besteht zum einen aus nicht-zellulären Bestandteilen wie dem Serum, zum anderen aus den zellulären Bestandteilen, wie den Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen. Zu den wesentlichen Aufgaben des Blutes und somit dieser Zellen gehören die Infektabwehr, der Transport von Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Blutstillung. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer dieser reifen Blutzellen, die zwischen einigen Stunden und mehreren Wochen variieren kann, müssen täglich 2×10^{11} Erythrozyten, 10^{10} Leukozyten und 10^{11} Thrombozyten neu gebildet werden, um die Zahl der Blutzellen im menschlichen Körper konstant zu halten[1, 2].

1.1.1 Die hämatopoietische Stamm- und Progenitorzelle (HSPZ)

Dieser lebenslang ablaufende Prozess der Neubildung von Blutzellen wird Hämatopoiese (aus dem Griechischen, hämato: Blut; poiese: Bildung) genannt und findet beim Menschen vorwiegend im roten Knochenmark der platten Knochen des Skelettsystems statt. Dabei nimmt die Bildung der verschiedenen reifen Blutzellen ihren Ausgang von den sogenannten hämatopoietischen Stammzellen (HSZ, *engl.* HSC), die als pluripotente Stammzellen in der Lage sind, sich in alle hämatopoietischen Zelllinien zu differenzieren. Darüber hinaus verfügen die HSZ auch über die Fähigkeit der Selbsterneuerung, d. h. ihre eigene Anzahl konstant zu halten, um so die Blutbildung lebenslang zu gewährleisten[3, 4, 5]. Die Differenzierung der HSZ in die verschiedenen Blutzelllinien läuft über verschiedene Vorläuferstadien (Progenitoren) ab. Hierbei entwickeln sich aus der HSZ zunächst in einem ersten Differenzierungsschritt Vorläuferzellen, die sowohl noch den Weg der myeloischen als auch der lymphatischen Differenzierung einschlagen können und daher als Progenitoren multiplen Potentials (MPP) bezeichnet werden. Aus diesen MPP entwickeln sich im folgenden Differenzierungsschritt entweder die sogenannten 'common myeloid progenitors' (CMP) oder die 'common lymphoid progenitors' (CLP). Während die letztgenannten über weitere Entwicklungsschritte in die verschiedenen

reifen Zellen des lymphatischen Systems (B- und T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen) differenzieren können, entstehen aus den CMP in einem weiteren Teilungsschritt entweder die sogenannten 'megakaryocyte erythroid progenitors' (MEP) oder die 'granulocyte macrophage progenitors' (GMP). Die MEP bilden die Vorstufen für die hieraus sich entwickelnden Erythrozyten und Thrombozyten, die GMP für die Granulozyten und Makrophagen[6].

Dieses Wechselspiel zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung bedarf fein abgestimmter Regulationsprozesse, um die Bereitstellung reifer Effektorzellen den Bedürfnissen des Organismus angepasst lebenslang aufrecht zu halten. Zum einen erfolgt diese Steuerung durch ein intrinsisches Programm, d.h. in den HSZ determinierte genetische und epigenetische Mechanismen, welche Differenzierung, Proliferation und Selbsterneuerung steuern. Zum anderen nehmen auch extrinsische Signale Einfluss auf das intrinsische Programm der HSZ[7]. Diese extrinsischen Signale entstammen der direkten Umgebung der Blutstammzelle, dem sogenannten Knochenmark-Mikromilieu, und werden durch direkte Zell-Zellkontakte, durch Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen oder durch parakrin angebotene humorale Wachstumsfaktoren und Zytokinen vermittelt[8, 9].

Eine Übersicht über die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen HSZ und Bestandteilen des Knochenmark-Mikromilieus ist übersichtsartig in der Tabelle 1 dargestellt.

1.1.2 Das Knochenmark-Mikromilieu

Das Knochenmark-Mikromilieu besteht zum einem wesentlich aus zahlreichen verschiedenen Zelltypen, wie Osteoblasten, Osteoklasten, Adipozyten, Endothelzellen, perivaskulären Retikularzellen (auch CAR-Zellen genannt) und Makrophagen[8, 10, 11]. Eine weitere wichtige Zellart im Knochenmark-Mikromilieu, die einer essentiellen Rolle für die Steuerung der HSZ zukommt, sind die sogenannten mesenchymalen Stamm- und Stromazellen. Da diese im Mittelpunkt dieser Dissertation stehen, werden diese ausführlich im Kapitel 1.1.4 abgehandelt. Neben diesen zellulären Elementen spielen auch azelluläre Bestandteile des Knochenmark-Mikromilieus wie die extrazelluläre Matrix und das autonome

Nervensystem eine wichtige Rolle bei der Regulation der HSZ (Abbildung 1). Das autonome Nervensystem in Form von sympathischen Nervenfasern interagiert hierbei durch die Freisetzung des Neurotransmitters Noradrenalin mit Stromazellen und reguliert in diesen die Sekretion von CXCL12. Hierdurch bedingt kommt es zu einer zirkadianen Mobilisierung der HSZ aus dem Knochenmark ins periphere Blut[12]. Die sogenannte extrazelluläre Matrix des Knochenmarks wiederum besteht hauptsächlich aus Fibronectin, Hyaluronsäure, Kollagen Typ I und IV, Laminin, Glykosaminoglykanen und Heparinsulfat und stellt ein Reservoir für Wachstumsfaktoren, Zytokine und Metalloproteinasen dar. Über die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten für diese genannten löslichen Faktoren hinaus, kann die extrazelluläre Matrix auch das Wachstum, die Differenzierungsfähigkeit, Viabilität und Motilität der HSZ über Adhäsionsmoleküle modulieren (Tabelle 1).

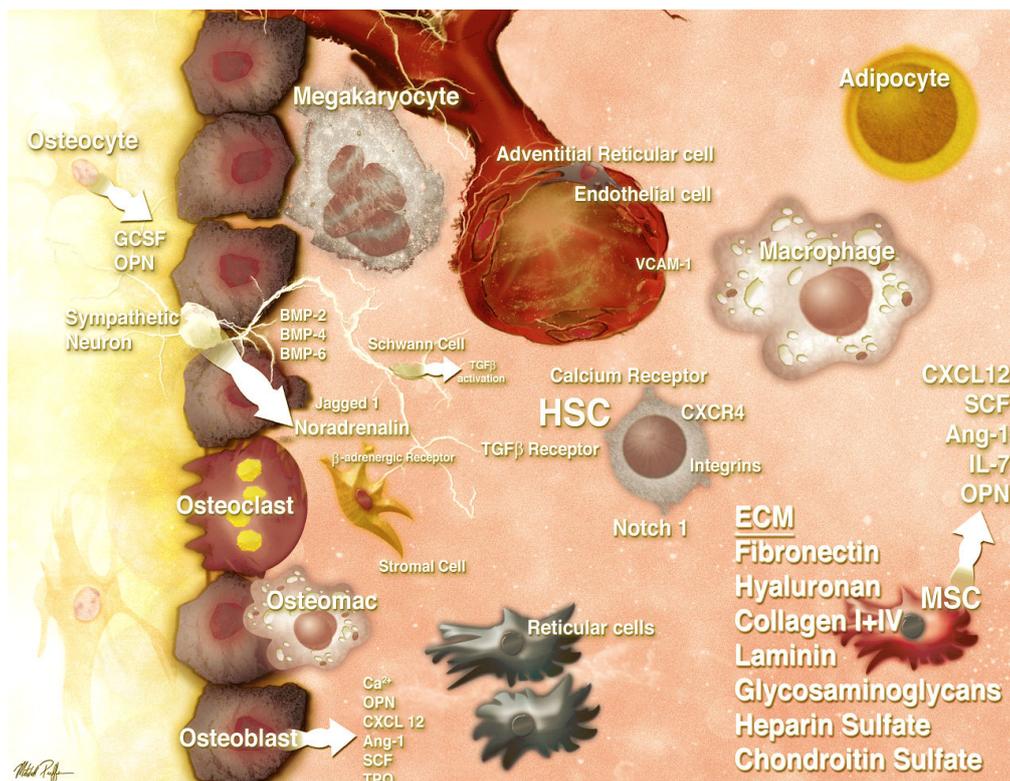


Abbildung 1: **Schematische Darstellung des Knochenmark-Mikromilieus** (modifiziert nach Krause et al.[13]). Die hämatopoietische Stammzellnische beherbergt eine Reihe verschiedener Zelltypen, die durch Expression und Sekretion verschiedener Signalmoleküle in Wechselbeziehung zueinander stehen und eine effiziente Hämatopoiese gewährleisten.

Tabelle 1: Interaktionsmöglichkeiten zwischen HSZ und Bestandteilen des Knochenmark-Mikromilieus

Molekül	Beschreibung	Expression	Wirkung
CXCR4 (CD184)	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4, Transmembran G Protein gekoppelter spezifischer Rezeptor für CXCL12[14]	Expression durch hämatopoietische und endotheliale Zellen[15].	Mobilisierung/Migration[16]
CXCL12 (SDF-1α)	CXC-Motiv-Chemokin 12 (spezifischer Ligand für CXCR4) [20]	Expression durch Osteoblasten und MSPZ[12, 21]	Aktivierung von Integrinen (VLA-4, VLA-5, LFA-1 oder CD44[17, 18] fördert Überleben (Anti-Apoptose) der HSZ <i>in vitro</i> [19]
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1[22]	Expression durch Leukozyten und hämatopoietischen Zellen, Marker für reife HSZ[23]	Adhäsion zwischen HSZ und Knochenmarkstroma und transendotheliale Migration[17, 24, 25]
ICAM1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1[22]	Expression in endothelialen Zellen[26]	
Tie-2	Tyrosinkinase, Zelloberflächen Rezeptor Aktivierung durch Angiopoietin [27, 28]	Expression durch HSZ[27]	Angiogenese, Hämatopoiese, Adhäsion und Selbsterneuerung der HSZ[29, 30].
Angpt-1	Angiopoietin-1, Ligand für Tie-2 [27, 28]	Expression durch Osteoblasten und Stromazellen[27, 31]	
c-Kit (CD117)	Tyrosinkinase Klasse III, spezifischer Rezeptor für Kitlg (SCF), Aktivierung durch Kitlg, Zellmembran gebundenes Protein[32, 33]	Expression durch HSZ[34]	Für Proliferation und Differenzierung von HSZ sowie Kontrolle der Motilität von proliferierenden HSZ[35-37]
Kitlg (SCF)	Stem Cell Factor, spezifischer Ligand für c-Kit[32, 33]	Expression durch endothelialen und perivaskulären Stromazellen[38, 39]	
Notch1	Rezeptor für Jagged1[40, 41]	unter anderem exprimiert durch HSZ[42]	Überleben, Entwicklung und Differenzierung verschiedener hämatopoietischer Linien[16, 40, 43, 44].
Jagged1 (CD339)	Ligand für Notch1[40, 41]	Expression durch Osteoblasten und MSPZ[45]	

1.1.3 Das Nischen-Modell der Hämatopoiese

Die oben aufgeführten Komponenten des Knochenmark-Mikromilieus liegen hierbei im Knochenmark nicht willkürlich vor. Sie bilden vielmehr durch eine wohlkomponierte Anordnung der einzelnen Bestandteile strukturelle und funktionelle Einheiten, in welche die HSZ und Progenitorzellen im dreidimensionalen Raum eingebettet liegen und durch verschiedene extrinsische Signale reguliert werden. Der Gedanke dieser strukturellen und funktionellen Einheiten, welche Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit, Lokalisation und Zellzyklus bzw. Proliferation der HSZ steuern, wurde erstmals im Jahre 1978 von Ray Schofield aufgegriffen[46] und ist grundsätzlich bis heute gültig. Die Entwicklung von technisch aufwendigen bildgebenden Methoden, wie die konfokale 2-Photonenmikroskopie oder das '*in-vivo* Imaging', hat das Wissen über die Nische jedoch entscheidend vorangebracht, indem die anatomischen Lagebeziehungen zwischen HSZ und den verschiedenen Strukturen des Knochenmark-Mikromilieus darstellbar wurden. Basierend auf diesen Erkenntnissen geht man heute von mindestens zwei hämatopoietischen Nischen aus, wobei diese nicht als getrennt betrachtet werden sollten. Vielmehr sollten sie als funktionell zusammenhängende Einheiten verstanden werden, die sich zwar hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung und ihrer Einflüsse auf die HSZ-Funktionen unterscheiden, zwischen welchen die HSZ jedoch hin und her wechseln können.

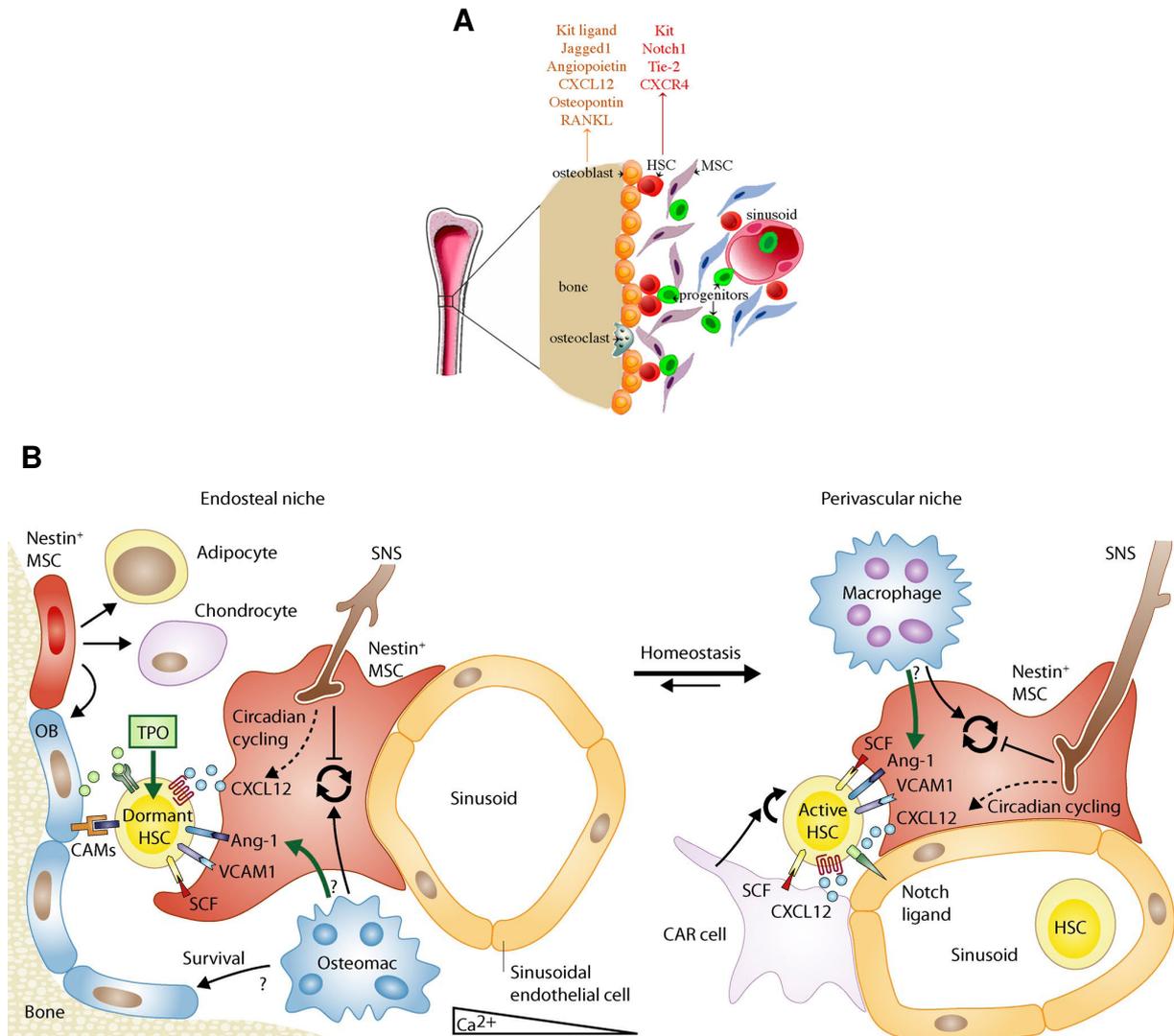


Abbildung 2: **Die endosteale und perivaskuläre Nische des Knochenmarks** **A** Schematische Darstellung der endostealen und perivaskulären Nische innerhalb des Knochenmarks in der Übersicht (aus Mitsiadis et al.[47]). **B** Detaillierte Darstellung des Aufbaus der endostealen und perivaskulären HSZ Nische während der Knochenmark Homeostase (aus Ehninger et al.[48]).

Die erste der beiden ist die sogenannte endosteale (osteoblastäre) Nische, in welcher die HSZ in unmittelbarer räumlicher und funktioneller Nähe mit den namensgebenden Osteoblasten lokalisiert sind. In dieser sauerstoffärmeren, Kalzium-angereicherten Umgebung befinden sich die HSZ vornehmlich im Ruhezustand, d.h. getriggert durch Signale der Osteoblasten (Tabelle 1) proliferieren sie kaum, sondern halten lediglich ihren Bestand kontinuierlich aufrecht. Dabei werden die HSZ solange in der endostealen Nische unter anderem durch den

Kalziumgradienten zurückgehalten, bis es durch einen endogenen (z.B. ein erhöhter Bedarf an Blutzellen) oder exogenen Stimulus (z.B. die Gabe von G-CSF) zu einer Migration der HSZ in die sauerstoffreichere perivaskuläre Nische kommt. Diese befindet sich dem Namen entsprechend in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den venösen Knochenmarksinusoiden (Abbildung 2). Daher lag nahe, dass Endothelzellen, ein wesentlicher Bestandteil der perivaskulären Nische sind, die nicht nur über verschiedene Adhäsionsmoleküle das Homing und die Mobilisation der HSZ maßgeblich modulieren, sondern auch über die Expression von z.B. SCF das Verhalten der HSZ beeinflussen[39]. Auf der abluminalen Seite der Sinusoide findet sich ferner eine Gruppe von Zellen mesenchymalen Ursprungs, die folgerichtig als perivaskuläre Zellen bezeichnet werden[49]. Als wesentliche Vertreter konnten bisher in Mausexperimenten Nestin-positive mesenchymale Stammzellen, 'CXCL12-abundant reticular' (CAR-) Zellen und Zellen identifiziert werden, die den Leptin-Rezeptor (LepR+) exprimieren[50]. Auch wenn Transplantations- sowie spezifische Knock-in- als auch Knock-out-Experimente klar belegen, dass diese Zellen die HSZ beeinflussen und Teil der vaskulären Nische sind, so sind die phänotypischen und funktionellen Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den drei Subtypen der perivaskulären Zellen noch unklar[7, 50, 51].

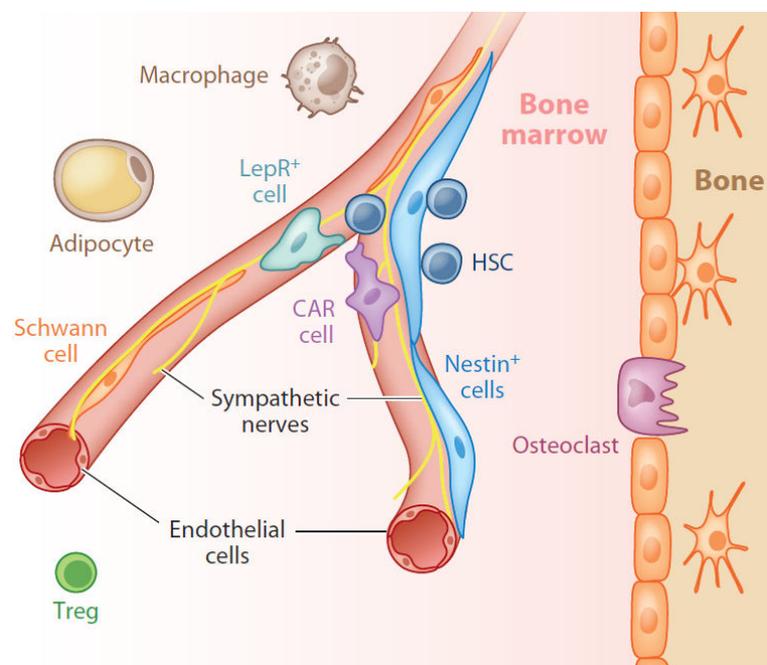


Abbildung 3: **Die hämatopoietische Nische und ihre unterschiedlichen Zelltypen**
Schematische Darstellung der hämatopoietischen Nische und deren dort befindlichen Zelltypen, dessen Sekretion löslicher Faktoren sowie direkte Zell-Zellkontakte, eine Stammzell-Selbsterneuerung fördern (aus Frenette et al. 2013[50]).

Gut hinterlegt jedoch ist, dass sympathische Nervenfasern ein weiterer Bestandteil der vaskulären Nische sind und HSZ-Funktionen wie zum Beispiel die Mobilisierung ins periphere Blut sowohl direkt als auch indirekt über die perivaskulären Zellen steuern können (Abbildung 3)[52]. Im Gegensatz zu der endostealen Nische sind die HSZ in der vaskulären Nische vermehrt teilungsaktiv und differenzieren vermehrt in die verschiedenen Progenitor- und Effektorzellen.

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des Knochenmark-Mikromilieus und somit auch der hämatopoietischen Nische sind die sogenannten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ). Da diese im Mittelpunkt dieser Dissertation stehen, werden sie im folgenden Kapitel gesondert beschrieben.

1.1.4 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ)

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) lassen sich aus einer Vielzahl von Geweben wie Fettgewebe, Nabelschnur- und peripherem Blut, der Dermis, der Leber, Milz und aus Bindegewebe gewinnen[53-55] und haben aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit in verschiedene mesodermale Gewebe insbesondere Interesse auf dem Gebiet der regenerativen Medizin geweckt[56-60]. Da diese Arbeit sich jedoch ausschließlich mit MSPZ aus dem Knochenmark und deren Bedeutung für die adulte Hämatopoiese befasst, werden auch nur diese im folgenden Kapitel näher betrachtet.

Die Existenz mesenchymaler Vorläuferzellen im Knochenmark wurde erstmals von Friedenstein et al.[61] beschrieben, welcher nach dem Ausplattieren von Knochenmarksuspensionen die Proliferation einer fibroblastenartigen, adhärent wachsenden Zellpopulation beobachtete.

Weiterführende Transplantationsexperimente zeigten, dass diese Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen[56-62]. Darüber hinaus konnten diese Zellen als Ausdruck ihrer Multipotenz in verschiedene Gewebe mesodermalen Ursprungs, nämlich in Knochen, Fett und Knorpel differenziert werden (Abbildung 4)[61, 63, 64].

Aufgrund dieser beiden für Stammzellen jeglicher Art charakteristischen Eigenschaften wurden diese Vorläuferzellen in Analogie zu embryonalen mesenchymalen Zellen zunächst als mesenchymale Stammzellen (MSZ) benannt[65]. Um jedoch die Definition einer Stammzelle vollständig zu erfüllen, müsste auf Einzelzellniveau für die durch das Ausplattieren des Knochenmarks generierten mesenchymalen Zellen jeweils der Nachweis der Selbsterneuerungsfähigkeit und der Multipotenz erfolgen [50]. Da dies jedoch in der Regel nicht erfolgt, dürften die durch Ausplattieren gewonnenen mesenchymalen Zellen keinen homogenen Zellverband darstellen, sondern vielmehr ein Gemisch von wirklichen MSZ und von bereits differenzierten mesenchymalen Progenitorzellen. Folglich dürfte auch der Begriff der mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) eher korrekt sein. Der Vollständigkeit wegen sollte jedoch noch der Begriff der Knochenmark-Stromazelle genannt werden, welche sich ebenfalls von den MSZ ableiten und als fibroblastenartige Zelle Teil des Knochenmark-Mikromilieus sind.

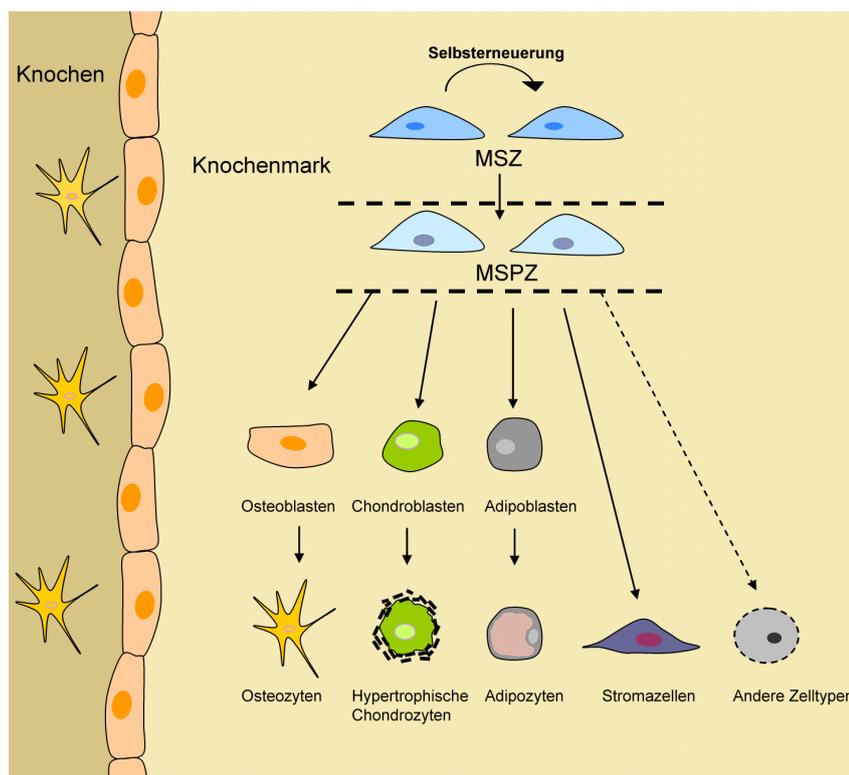


Abbildung 4: **Mesenchymale Stammzellen (MSZ) und ihr Potential** Schematische Darstellung der im Knochenmark lokalisierten MSZ mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und dem Hervorbringen von differenzierbaren Tochterzellen, den MSPZ (modifiziert nach Frenette et al.[50]).

Zusammengefasst dürfte sich also die Fähigkeit der MSPZ, die Hämatopoiese *in vivo* und *in vitro* zu regulieren, aus den Funktionen verschiedener Zellen ableiten. Dabei dürften die wirklichen MSZ, wie bereits beschrieben, am ehesten Teil der vaskulären Nische sein, während aus den MSPZ hervorgehende Osteoblasten eher Teil der endostealen Nische sind. Ob diese strikte Einteilung jedoch auch auf die *in vivo* Situation zutrifft, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Auch die Knochenmark-Stromazellen sind in der Lage, Wachstum und Proliferation von HSZ zu unterstützen[66]. Dies kann einerseits durch direkte Zell-Zell-Interaktionen erfolgen, andererseits aber auch indirekt durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Nicht zuletzt kann auch die vielfältige immunmodulierende Wirkung der MSPZ indirekt Einfluss auf die Hämatopoiese haben.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls das oben genannte Kultivierungsverfahren für die Generierung der mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark der MDS-Patienten verwendet, weshalb hier der Begriff der MSPZ verwendet wird.

1.1.5 Definitionskriterien für MSPZ entsprechend der International Society for Cellular Therapies (ISCT)

Um den oben aufgeführten Schwierigkeiten hinsichtlich Terminologie und Definitionen entgegenzutreten, hat die ISCT im Jahre 2007 einheitliche Definitionskriterien für MSPZ festgelegt. Diese beruhen neben dem Nachweis der Plastikadhärenz und der trilineären Differenzierungskapazität auf dem Expressionsprofil verschiedener Oberflächenantigene. So wird gefordert, dass die *in vitro* kultivierten MSPZ die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 (> 95% der Zellen) exprimieren, wohingegen keine Expression der hämatopoietischen Antigene CD34 und CD45 (< 2% der Zellen) vorliegen darf[67].

Die fein abgestimmten Wechselbeziehungen zwischen Blutstammzellen mit dem Knochenmark-Mikromilieu und somit auch den MSPZ geben vor, dass eine krankhafte Veränderungen in nur einer dieser Komponenten zur Störung dieses Gleichgewichtes führt. Hierdurch können Stammzellerkrankungen wie Leukämien oder myelodysplastische Syndrome (MDS) entstehen, welche im Mittelpunkt dieser

Arbeit stehen. Folgerichtig ist nicht verwunderlich, dass solche Stammzellerkrankungen mit Störungen der Blutbildung und somit mit einem Mangel an reifen Blutzellen einhergehen.

1.2 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

1.2.1 Definition

Myelodysplastische Syndrome sind eine heterogene Gruppe erworbener Knochenmarkserkrankungen, die mit einer ineffektiven Hämatopoiese und einem erhöhten Risiko zu einem Progress in eine akute myeloische Leukämie (AML) einhergehen[68, 69]. Als Ausdruck dieser ineffektiven Blutbildung findet sich in der Vielzahl der Fälle ein hyperzelluläres Knochenmark mit einer Vermehrung von hämatopoietischen Progenitorzellen, die in unterschiedlicher Ausprägung Dysplasiezeichen aufweisen. Im Gegensatz hierzu finden sich im peripheren Blut Zytopenien variablen Schweregrades, die nur eine, jedoch auch alle drei Blutzellreihen betreffen können.

1.2.2 Epidemiologie

Auch wenn myelodysplastische Syndrome in jedem Alter auftreten können[70], so korreliert die Inzidenz jedoch mit dem Lebensalter[71]. Während sie bezogen auf die Gesamtbevölkerung bei ca. 4 pro 100.000/Jahr liegt, so steigt sie ab einem Lebensalter von 70 Jahren rapide an. Das mittlere Erkrankungsalter liegt somit auch zwischen 60 und 70 Jahren. Die MDS gehören somit neben den Non-Hodgkin-Lymphomen inklusive der chronisch-lymphatischen Leukämie und dem multiplen Myelom zu den häufigsten hämatologischen Neoplasien, deren Häufigkeit aufgrund der steigenden Lebenserwartung wahrscheinlich noch zunehmen wird[72, 73].

1.2.3 Symptomatik

Die Diagnose eines MDS kann als reiner Zufallsbefund bei einer routinemäßigen Blutkontrolle bei einem sonst beschwerdefreien Patienten erfolgen. In der Regel ist das klinische Bild jedoch geprägt durch Beschwerden die Folge der variabel ausgeprägten Zytopenien sind. In den meisten Fällen liegt eine Anämie als führende Zytopenie vor, die zu Symptomen wie Luftnot, Abgeschlagenheit oder Schwindel führen kann[74]. Im Falle einer Thrombozytopenie können Blutungskomplikationen im Vordergrund stehen, die von milderen Haut- und Schleimhautblutungen bis hin zu letal verlaufenden Blutungen reichen können[75]. Ferner scheint auch die Thrombozytenfunktion aufgrund eines intrinsischen Defektes des Integrinsignalings bei einem erträglichen Anteil der MDS-Patienten gestört zu sein. In selten Fällen können auch plasmatische Gerinnungsstörungen hierzu beitragen. Der Mangel an Leukozyten, insbesondere an neutrophilen Granulozyten wiederum geht mit einer gesteigerten Infektanfälligkeit einher. Unabhängig von den Zytopenien können auch sogenannte B-Symptome wie Nachtschweiß, Fieber oder Gewichtsverlust eintreten. Bei Patienten, die eher an einem proliferativen Phänotyp des MDS leiden, können als Zeichen einer extramedullären Blutbildung eine Hepatosplenomegalie oder eine Hyperleukozytose vorliegen. Während erstgenannte mit Oberbauchschmerzen und Völlegefühl einhergehen können, kann die Hyperleukozytose zu einem Leukostase-Syndrom führen.

1.2.4 Klassifikation

Diese Vielgestaltigkeit der klinischen Symptomatik spiegelt letztendlich die phänotypische Heterogenität der verschiedenen MDS-Subtypen wieder. Am besten zusammengefasst wird diese durch die aktuell gültige WHO-Klassifikation der Myelodysplastischen Syndrome[76]. Diese basiert im Wesentlichen auf der zuvor gültigen French-American-British (FAB) Einteilung (Tabelle 2)[77] und umfasst aktuell sieben verschiedene Subtypen. Diese werden anhand von Blastenzahl, Anzahl der betroffenen Zellreihen und zytogenetischen Befunden eingeteilt (Tabelle 3)[76, 78]. Darüber existieren auch Knochenmarkserkrankungen, die neben einem dysplastischen Anteil auch eine myeloproliferative Komponente aufweisen. Da diese

sich nicht eindeutig entweder den MDS oder den myeloproliferativen Syndromen zuordnen lassen, wurde in die WHO-Klassifikation eine eigene Kategorie 'Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms (MDS/MPN) aufgenommen (Tabelle 4)[76, 79, 80].

Tabelle 2: **FAB-Klassifikation (modifiziert nach Bennett et al.[77])**

Kategorie	Dysplasie	% KM Blasten	% PB Blasten
Refraktäre Anämie (RA)	Erythroid	<5	<1
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	Erythroid	<5	<1
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB)	2 oder mehrere Linien	5-20	0-4
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (RAEB-T)	Üblicherweise 2 oder mehrere Linien	21-30	≥5
Chronisch Myelomonozytäre Leukämie (CMML)	Variabel ≥1x10 ⁹ /L Monozyten	<20	

Tabelle 3: **WHO-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome und nach Merkmale im Blut und Knochenmark (modifiziert nach Vardiman et al. und Orazi et al.[76, 79])**

Subtyp	Merkmale im Blut	Merkmale im KM
Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD)	Unizytopenie oder Bizytopenie <1% Blasten	Unilineäre Dysplasien <5% Blasten 15% der erythroiden Vorläuferzellen sind Ringsideroblasten
a) Refraktäre Anämie (RA)	Unizytopenie oder Bizytopenie <1% Blasten	Dyserythropoiese <5% Blasten
b) Refraktäre Neutropenie (RN)	Unizytopenie oder Bizytopenie <1% Blasten	Dysmegakaryopoiese <5% Blasten
c) Refraktäre Thrombozytopenie (RT)	Unizytopenie oder Bizytopenie <1% Blasten	Dysgranulopoiese <5% Blasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	Anämie keine Blasten	≥ 15% der erythroiden Vorläuferzellen sind Ringsideroblasten Dyserythropoiese <5% Blasten
Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)	Bi- oder Panzytopenie <1%Blasten	Dysplasien in 2-3 Zelllinien <5% Blasten
Refraktäre Zytopenie mit Ringsideroblasten (RCMD-RS)	Bi- oder Panzytopenie <1%Blasten	Dysplasien in 2-3 Zelllinien <5% Blasten >15% Ringsideroblasten

Refraktäre Anämie mit Blastenexzess-1 (RAEB-1)	Uni-bis Panzytopenie <5% Blasten keine Auerstäbchen	Unilineäre oder multilineäre Dysplasie 5-9% Blasten keine Auerstäbchen
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess-2 (RAEB-2)	Uni-bis Panzytopenie Auerstäbchen ± 5-19% Blasten	Unilineäre oder multilineäre Dysplasie 10-19% Blasten Auerstäbchen
MDS, unklassifizierbar (MDS-U)	Zytopenie <1% Blasten	Dysplasien in <10% der Zellen in einer oder mehrerer Zellreihen mit zytogenetischen Abnormalitäten <5% Blasten
MDS assoziiert mit isoliertem del(5q)	Anämie Plättchen normal bis erhöht	Normal bis vermehrte Megakaryozyten <5% Blasten keine Auerstäbchen isoliertes del(5q)

Tabelle 4: **WHO-Klassifizierung der „Mixed Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasm“ (MDS/MPN) (aus Vardiman et al.[76])**

WHO Klassifizierung
Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML-1, CMML-2) Atypische Chronische Myeloide Leukämie Juvenile myelomonozytäre Leukämie Myelodysplastisch/Myeloproliferative Krankheit, Unklassifizierbar

1.2.5 Prognose

Ähnlich heterogen wie der Phänotyp gestaltet sich auch die Prognose der MDS-Patienten hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des Risikos in eine akute myeloische Leukämie überzugehen. Dabei kann das mediane Gesamtüberleben zwischen > 5 Jahren für Patienten mit einer RARS und weniger als einem Jahr für Patienten mit einer RAEB-II schwanken. Analog hierzu variiert das Risiko für den Übergang in eine akute myeloische Leukämie zwischen 3% und 65% nach 5 Jahren (Abbildung 5)[81]. Um eine Aussage hinsichtlich der Überlebensdauer und dem AML-Risiko für den individuellen Patienten zu ermöglichen, existieren verschiedene Prognosesysteme. Den akzeptierten Goldstandard und das somit am meisten genutzte Prognosesystem stellt das sogenannte 'International Prognostic Scoring System' (IPSS, Tabelle 5) dar[82]. Dieses zieht Parameter wie den Blastengehalt im Knochenmark, die Anzahl der Zytopenien und den Karyotyp hinzu [81, 83-85], um auf

der Basis dieser Befunde vier Risikogruppen niedrig (low), intermediär-1 (intermediate-1), intermediär-1 (intermediate-2) und hoch (high) zu unterscheiden.

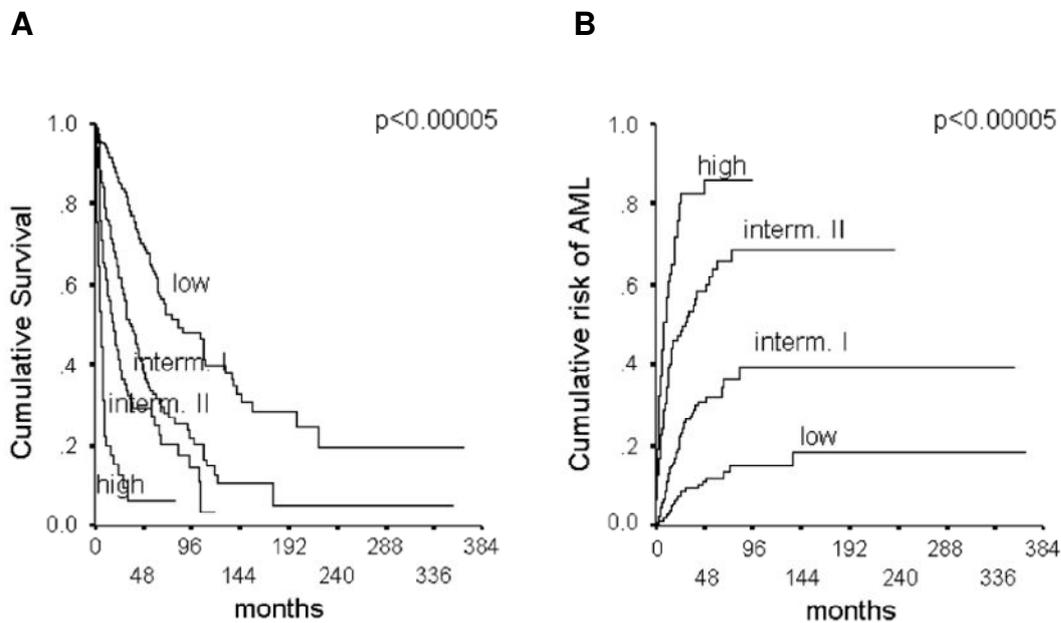


Abbildung 5: **Überleben und AML Risiko von MDS-Patienten nach IPSS** Graphische Darstellung des **A** Kumulativen Überlebens von 676 Patienten mit MDS gemäß des IPSS und des **B** Kumulativen Risikos eines Progress in eine AML von 676 Patienten mit MDS gemäß des IPSS (aus Germing et al.[81]).

Tabelle 5: **Tabellarische Darstellung der Kategorisierung von MDS-Patienten nach IPSS definierten Kriterien (adaptiert nach Greenberg et al.[84])**

Risikogruppe	Niedrigrisiko (Low)	Intermediär-I (0,5-1,0)	Intermediär-II (1,5-2,0)	Hochrisiko (High)		
Score	0	0,5	1,0	1,5	2,0	≥2,5
Prognostische Variablen						
KM-Blastenanteil [%]	<5	5-10	--	11-20	21-30	
Karyotyp	Gut	Intermediär	Schlecht			
Zytopenien	0/1	2/3				

Eine Weiterentwicklung stellt der IPSS-revised (IPSS-R) dar (Tabelle 6), der im vergangenen Jahr publiziert wurde[85]. Dieser erlaubt eine noch präzisere Prognosestellung für den individuellen MDS-Patienten, die nun in 5 verschiedene Risikogruppen (very low, low, intermediate, high, very high) aufgetrennt werden. Grundlage hierfür ist zum einen die Erkenntnis, dass der Zytogenetik eine größere

prognostische Bedeutung in Korrelation zum Blastengehalt zukommt[86]. Darüber hinaus werden die Patienten mit wenigen Blasten noch genauer aufgetrennt und auch die Zytopenien werden nun anhand ihrer Schwere gewichtet. Aktuell laufen Bestätigungsuntersuchungen, die aller Voraussicht nach dazu führen werden, dass der IPSS-revised in Kürze als neuer Standard im klinischen Alltag etabliert sein wird.

Tabelle 6: Definition des IPSS-R (adaptiert nach Greenberg et al.2012[85])

Chromosomale Kategorien							
Sehr Gut	del(11q), -Y						
Gut	Normal, del(5q), zweifache Aberration und del(5q), del(20p), del(20q)						
Intermediär	del(7q), i(17q), +19, andere, unabhängige Klone						
Schlecht	inv(3)/t(3q)/del(3q), -7, -7/7q, zweifache Aberration und -7/7q, komplexer Karyotyp mit 3 Anomalien						
Sehr schlecht	Komplexer Karyotyp mit >3 Anomalien						
Prognostische Variablen	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Zytogenetik	Sehr gut		Gut		Intermediär	Schlecht	Sehr schlecht
KM Blasten	≤2%		>2-<5%		5-10%	>10%	
Hämoglobin	≥10		8-<10	<8			
Plättchen	≥100	50-<100	<50				
ANC	≥0.8	<0.8					
Risikogruppe	Risiko System						
Sehr gering (very low)	≤1.5						
Gering (low)	>1.5-3						
Intermediär (intermediate)	>3-4.5						
Hoch (high)	>4.5-6						
Sehr hoch (very high)	>6						

Neben diesen beiden Scores existieren weitere Scores wie z.B. der WPSS (WHO-adaptiertes Prognostic Scoring System), der neben dem WHO-Subtyp auch die Transfusionspflichtigkeit mit aufnimmt[87] oder der CPSS (CMML-specific Prognostic Scoring System), der speziell auf die Subgruppe der CMML zugeschnitten ist[88]. Darüber hinaus haben auch andere Faktoren wie Alter, Serum Ferritin, LDH, β 2-Mikroglobulin oder der Fibrosegrad im Knochenmark Einfluss auf die Prognose[82, 85, 89]. Auch molekulare Veränderungen wie z.B. die ASXL1-Mutationen oder die Splicosom-Mutationen, die in den vergangenen Jahren neu entdeckt wurden, werden in Zukunft für die Prognosestellung hinzugezogen werden[87, 90, 91]. Neben diesen MDS-spezifischen Faktoren spielen auch etwaige Komorbiditäten eine Rolle für die

Prognose und schränken gegebenenfalls auch die therapeutischen Möglichkeiten für MDS-Patienten ein[92, 93].

1.2.6 Diagnostik

Um die Diagnose eines MDS stellen zu können, muss zum einen eine anhaltende Zytopenie vorliegen, die nicht auf eine andere Ursache zurückzuführen ist. Darüber hinaus sollte entweder eine Dysplasie in mindestens 10% der Knochenmarkzellen, eine Vermehrung von Blasten (5-19%) im Knochenmark vorliegen und/oder eine für das MDS typische Chromosomenaberration nachzuweisen sein. Hieraus und aus den oben genannten prognostischen Abschätzungen ergibt sich die Diagnostik. Hierzu gehören also neben einer Blutuntersuchung, welche ein Differentialblutbild und eine klinische Chemie beinhaltet, eine zytologische und/oder histologische Knochenmarkuntersuchung, welche gegebenenfalls noch durch eine durchflusszytometrische Untersuchung ergänzt werden kann. Ferner bedarf es einer zytogenetischen Untersuchung des Knochenmarkes, entweder als klassische Bänderungszytogenetik oder als FISH-Untersuchung, bei welcher spezifische Aberrationen gezielt gesucht werden[94]. In Zukunft werden aller Voraussicht nach molekulargenetische Untersuchungen Einzug finden in den diagnostischen Algorithmus. Diese werden zum Nachweis von diversen, vor kurzem entdeckten Mutationen wie ASXL1, TET2 oder Splicisom-Mutationen eingesetzt werden, welche Diagnostik, Risikostratifizierung und Therapieauswahl ergänzen werden[90].

1.2.7 Therapie

Anders als bei der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie, bei welcher mittlerweile in Form der Tyrosinkinaseinhibitoren eine zielgerichtete Behandlung möglich ist[95], gibt es für die MDS bisher keinen kausalen Therapieeinsatz. Bei der Mehrzahl der oft älteren Patienten steht im Mittelpunkt, die durch die Zytopenien hervorgerufenen Symptome zu lindern. Meist erfolgt dies durch die Transfusion von Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten. Alternativ können auch Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, G-CSF oder auch die in klinischen Studien

bereits verfügbaren Thrombopoietinanaloga zur Stimulation der Blutbildung eingesetzt werden. Ferner gehören auch die Prophylaxe und konsequente Behandlung von Infekten zum Behandlungskonzept der MDS. Im Falle einer endogenen oder einer durch die regelmäßige Zufuhr von Erythrozytenkonzentraten induzierten Eisenüberladung können Eisenchelatoren wie Deferasirox verwendet werden[96]. Bei einer Subgruppe von Patienten mit einem hypozellulären Knochenmark, bei denen wahrscheinlich ein autoimmunologisches Geschehen Auslöser des MDS ist, kann auch eine immunsuppressive Therapie mit Antithymozytenglobulin, Alemtuzumab und Ciclosporin zu einem Ansprechen führen[97, 98]. Als erste MDS-spezifische Therapie wurde im Jahre 2008 für Europa die Substanz 5-Azacidine für Patienten mit einem fortgeschrittenen MDS zugelassen. Pathophysiologischer Hintergrund war die in den MDS-Zellen beobachtete Hypermethylierung der DNA. 5-Azacidine ist ein DNA-Methyltransferaseinhibitor und so die Idee, sollte die pathologische Hypermethylierung von verschiedenen Genen aufheben[99]. Allerdings gibt es bis heute keine Untersuchung, welche einen Zusammenhang zwischen der demethylierenden Wirkung der Substanz und dem Ansprechen zeigen konnte. Als weitere MDS-spezifische Behandlung ist seit diesem Jahr die Substanz Lenalidomid für Patienten mit Niedrigrisiko-MDS und isolierter Deletion 5q zugelassen. Auch wenn der Wirkansatz auch hier ebenfalls bisher nicht verstanden ist, so führt diese Substanz dennoch bei etwa zwei Drittel der Patienten zu einer anhaltenden Transfusionsfreiheit[100, 101]. Als einziger kurativer Therapieansatz steht für MDS-Patienten jedoch nur die allogene Blutstammzelltransplantation zur Verfügung. Diese wird vor allem bei Patienten mit Hochrisiko-MDS, also Patienten mit einem intermediate-2 oder high-risk MDS nach IPSS oder bei Patienten mit ausgeprägten Zytopenien oder komplexen Karyotypveränderungen eingesetzt. Allerdings kann dieses Verfahren in der Regel nur bei jüngeren MDS-Patienten mit keinen oder wenigen Komorbiditäten eingesetzt werden.

Zusammengefasst gibt es bisher keinen zielgerichteten Ansatz für die Therapie der MDS, was zum einen wahrscheinlich an der Heterogenität der Erkrankung, zum anderen aber auch an der bisher nicht verstandenen Pathogenese der MDS liegt.

1.2.8 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MDS ist bisher nicht bekannt. Nur in einer Minderheit der MDS-Fälle kann ein Auslöser, wie zum Beispiel eine vorangegangene Strahlen- oder Chemotherapie oder auch eine immunsuppressive Therapie als kausaler Faktor identifiziert werden. Diese Fälle werden auch unter dem Begriff der therapieassoziierten MDS zusammengefasst[102]. In einzelnen Fällen kann auch eine berufliche oder akzidentelle Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder auch organischen Lösungsmitteln (z. B. Benzol) als ursächlich angesehen werden. In der Mehrzahl der Fälle lässt sich jedoch kein Auslöser finden. Angesichts der Altersverteilung der MDS werden altersabhängige Phänomene wie z.B. ein gesteigerter oxidativer Stress vermutet, ohne dass es hierfür bisher wissenschaftliche Belege gibt.

Auch mit Blick auf die Pathogenese gibt es keinen solitären Mechanismus, welcher die phänotypische Heterogenität erklären könnte. Vielmehr scheint sich die phänotypische Heterogenität in einer Vielzahl von pathogenetisch relevanten Mechanismen wiederzufinden. Generell akzeptiert ist, dass es sich bei den MDS um Erkrankungen der Blutstammzellen handelt. Dieser Nachweis konnte bei der AML bereits in den 90er Jahren mit Hilfe der seriellen Transplantation von aufgereinigten Stamm- und Progenitorkompartimenten erbracht werden und stellt die Grundlage für die sogenannte 'Leukemic stem cell'-Theorie dar[103, 104]. Da diese Form des Beweises bisher aufgrund schlechten Engraftments und generell kaum etablierten MDS-Mausmodellen schwer zu führen war[105], basiert die Theorie bezüglich des MDS vor allem auf dem Nachweis von klonalen zytogenetischen oder molekularen MDS-spezifischen Veränderungen [106-108] in der HSZ-Fraktion von Patienten mit MDS.

Mit Blick auf die zytogenetischen und molekularen Veränderungen hat es in den vergangenen 5 Jahren weitreichende Fortschritte gegeben. Seit längerem war mit Hilfe von klassischer Bänderungszytogenetik und FISH bekannt, dass etwa 50% der Patienten chromosomale Veränderungen aufweisen, wobei oftmals die Chromosomen 5 und 7 betroffen sind[109]. Aufgrund dessen, dass vor allem der Verlust von genetischem Material häufig zu finden ist, wurde rasch vermutet, dass die betroffenen Chromosomenregionen Gene tragen, die von pathogenetischer

Relevanz sind. Für das sogenannte 5q- Syndrom konnte dies bereits gezeigt werden. Hier kommt es durch eine interstitielle Deletion des kurzen Armes von Chromosom 5 zu einem Verlust unter anderem des Gens RPS14, welches im Mausmodell zu einem MDS-Phänotyp führt[110]. Allerdings liegt in der Regel, so die Resultate von hochauflösenden Sequenzierungsanalysen, keine Mutation auf dem zweiten Allel des Gens vor, sodass am ehesten eine sogenannte Haploinsuffizienz der betroffenen Gene als Mechanismus bestehen dürfte. Basierend auf den Fortschritten der modernen Sequenzierungsanalysen wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche neue Mutationen beim MDS entdeckt[90, 110]. Diese können bei bis zu 50% der Patienten vorliegen, oftmals auch bei solchen, die einen normalen Karyotyp haben. Diese umfassen unter anderem Gene, die an der DNA-Methylierung, an Histonmodifikationen oder am Splicisom beteiligt sind. Für einzelne dieser Gene konnte bereits eine funktionelle Verbindung zu einem phänotypischen Merkmal der MDS gezeigt werden, für andere steht dieser Nachweis noch aus. Neben ihrer Rolle für die Pathogenese der MDS wird aktuell auch versucht, die prognostische Relevanz und den Stellenwert für das Ansprechen auf eine spezifische Therapie zu eruieren. Neben diesen Mutationen konnte auch gezeigt werden, dass zahlreiche Gene bei Patienten mit MDS hypermethyliert sind [90]. Dies bildete die Rationale für die Therapie mit den demethylierenden Substanzen, ohne dass bisher eine Korrelation zwischen Methylierungsprofil und Ansprechen auf eine Therapie mit einem DNA-Methyltransferaseinhibitor gezeigt werden konnte. Neben diesen molekularen Veränderungen scheint bei einem gewissen Teil der MDS-Patienten auch ein autoimmunologisches Geschehen zugrunde zu liegen, was die Abgrenzung zu einer aplastischen Anämie oder einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie oftmals erschwert. Bei diesen Patienten liegt meist eine gesteigerte Apoptose im Knochenmark vor, die einerseits durch das Vorliegen zahlreicher proapoptotischer Zytokine, andererseits aber auch durch autoreaktive zytotoxische T-Zellen erklärbar ist. Dies scheint insbesondere auf Patienten mit einem frühen MDS zu zutreffen, während bei den fortgeschrittenen MDS eher ein Phänomen der Immun-Evasion vorliegt, indem der maligne Klon sich den regulatorischen Mechanismen des körpereigenen Immunsystems zu entziehen scheint.

1.3 Die Rolle von Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) in der MDS Pathogenese – Stand der Forschung

Bisher wurde die Rolle nicht-hämatopoietischer Komponenten, wie den MSPZ in der Pathogenese der MDS mit deutlich weniger Aufwand untersucht als die Rolle der HSPZ[111]. Dies ist zum einen darin begründet, dass MDS prinzipiell als klonale Erkrankungen von hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) angesehen werden. Zum anderen liegt es daran, dass das Wissen über das Knochenmark-Mikromilieu und im speziellen über MSPZ erst in den vergangenen Jahren vertieft wurde.

Bisher haben nur wenige Arbeiten die Rolle der MSPZ in der Pathogenese der MDS untersucht und ergeben somit kein klares Bild, sondern haben vielmehr kontroverse Resultate hervorgebracht[112-116].

Letztlich konnten in über einem viertel der MDS-Patienten genetische Veränderungen in MSPZ gefunden werden[114]. Zusätzlich wurden Veränderungen in der Expression auf transkriptionaler- oder Proteinebene von mehreren Adhäsionsmolekülen, Transkriptionsfaktoren und Zytokinen beschrieben, jedoch ist der konkrete Zusammenhang in der MDS Pathogenese schwer fassbar[111]. Darüber hinaus liegen gegensinnige Ergebnisse bezüglich der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit sowie der Fähigkeit der hämatopoietischen Unterstützung von MSPZ aus MDS-Patienten vor. Mögliche Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Gruppen könnte die begrenzte Zahl an untersuchten Proben sowie Unterschiede in der Untersuchungsmethodik sein. Zusammengefasst bleibt trotz aller beschriebenen Veränderungen in MDS-MSPZ die Frage bisher ungeklärt, ob diese beobachteten Veränderungen eine kausative Rolle darstellen oder ob es sich vielmehr um sekundäre Anpassungen an die infiltrierenden dysplastischen HSPZ handelt. Bei anderen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom (MM) oder der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) konnten ähnliche Veränderungen der MSPZ gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass die beim MDS beobachteten Veränderungen der MSPZ eher als reaktiv zu betrachten sind[117, 118]. Weiterhin wird diese Theorie der sekundären Adaptation an die infiltrierenden Zellen durch klinische Beobachtungen unterstützt, dass nach Eliminierung des malignen Klon durch eine Chemotherapie, demethylierende Stoffe

oder nach allogener Blutstammzelltransplantation das MDS Knochenmark-Mikromilieu seine hämatopoietische Unterstützungsfähigkeit wiedererlangt und es zu einer Wiederherstellung der Hämatopoiese kommt. Nichts desto trotz konnte die Gruppe um Raaijmakers et al. in einer Publikation von 2010 demonstrieren, dass durch genetische Störung bei mesenchymalen/osteogenen Progenitoren ein MDS ähnlicher Phänotyp, einhergehend mit peripheralen Zytopenien und der Neigung zu einer Entwicklung in eine AML mit zytogenetischen Anomalien in Mäusen induziert werden kann[119]. Dies warf erneut die Frage nach den MSPZ bei der MDS-Pathogenese, nach der sogenannten „Henne und Ei“ Problematik auf. Dies gilt es in umfangreichen, experimentellen Arbeiten zu adressieren.

1.4 Zielsetzung

MDS sind eine heterogene Gruppe von klonalen Knochenmarkserkrankungen, die nach dem aktuellen Stand der Forschung ihren Ursprung in den hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) nehmen. Auch wenn zahlreiche genetische und molekulare Veränderungen in den HSPZ bei MDS-Patienten beschrieben wurden, konnten bisher weder etwaige Auslöser, noch ein gesamtheitliches Verständnis in der MDS-Pathogenese erlangt werden. Charakteristisch für die MDS ist eine insuffiziente Hämatopoiese, welche die Ursache für die mehr oder weniger stark ausgeprägten Zytopenien ist. Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) sind ein wesentlicher Bestandteil des Knochenmark-Mikromilieus und stellen die Vorläufer für Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten dar. MSPZ stehen über verschiedene Rezeptoren und die Sekretion verschiedener Signalmoleküle in wechselseitiger Interaktion mit den HSPZ und beeinflussen deren Proliferation, Differenzierung, Adhäsion oder Migration. Im Wissen um ihre Rolle für die normale Hämatopoiese sind MSPZ auch im Kontext der MDS in einzelnen Untersuchungen betrachtet worden. Diese wenigen Arbeiten zeigten bereits morphologische Veränderungen sowie Veränderungen im Wachstumsverhalten, Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit von MSPZ in Patienten mit MDS. Allerdings ergab sich bisher kein schlüssiges Gesamtbild, da in den meisten Untersuchungen nur sehr wenige MSPZ Proben untersucht wurden und außerdem methodische Unterschiede einen Vergleich der einzelnen Arbeiten erschwerten.

In dieser Arbeit sollen MSPZ von Patienten mit allen gängigen MDS-Subtypen hinsichtlich ihres Wachstums-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten untersucht werden. Diese deskriptiven Analysen sollen die Grundlage für funktionelle Experimente bilden, in denen der direkte Einfluss der MSPZ auf die HSPZ selbst untersucht werden soll. Diese Untersuchungen sollen die Fragestellung dieser Arbeit beantworten, inwiefern und über welche Mechanismen MSPZ eine Rolle für die ineffektive Hämatopoiese bei den MDS spielen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien und Chemikalien

Tabelle 7: **Materialien und Chemikalien**

Produkt	Hersteller
5x First Strand Buffer	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
5x Phusion® HF Reaction Buffer (+7,5mM MgCl ₂)	Finnzymes/Thermo Scientific (Schwerte)
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
Ascorbinsäure	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Alizarin Rot (pH4,1-4,3)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Aqua dest. Spüllösung	Delta Select (Dreieich)
CD34 MicroBead Kit (human)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Chamber slides (Lab-Tek II Chamber Slide™ System)	Thermo Scientific (Schwerte)
Deckgläser (24x32mm)	Engelbrecht Medizin& Labortechnik GmbH (Edermünde)
Dexamethason	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
DMEM (low glucose 1g/L, high glucose 4,5g/L)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
DNA Probenpuffer (Blue/Orange 6x Loading Dye)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
DNase I, Amplification Grade	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
DNA Leiter (Quick Load 100bp DNA Ladder)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
dNTP Mix (10mM)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)

DTT (0,1M)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
EDTA (fest, für TBE-Puffer)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Erythropoietin	Roche (Mannheim)
Ethanol absolut zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one Cellstar (Frickenhausen)
Ethidimbromid (10mg/ml)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG (Berlin)
FBS (Langzeitzellkultur)	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
Flow-Count™ Fluorospheres	Beckman Coulter, Inc. (Krefeld)
Formaldehyd (4%)	Otto Fischer GmbH & Co KG (Saarbrücken)
Glycerol-2-Phosphat	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Horse Serum	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
HPGM (Hematopoietic Progenitor Growth Medium)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
IBMX (Isobutyl-Methylen-Xanthine)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
IMDM (Iscoe´s Modified Dulbecco´s Medium)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Insulin Solution from bovine pancreas (10mg/ml)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
ITS+1 (Insulin Transferyl 100X)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Kryoröhrchen (2ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin	SIGMA-Aldrich (Steinheim)

LSM 1077 Separationsmedium	PAA (Cölbe)
LS-Magnetsäule	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Lysepuffer	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
MidiMACS Magenetischer Zellseparator	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Methylzellulose (MethoCult H4534)	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck (Darmstadt)
Objektträger (Superfrost)	Thermo Scientific (Schwerte)
Oligo dT ₁₈₋₂₀ (50µM)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
Oil Red O	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
PBS (Phosphate buffered saline) pH7,3	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
PCR-Softstripes (0,2ml)	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Reaktionsplatte (96-well)	Applied Biosystems (Warrington, UK)
Pipettenspitzen	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems (Warrington, UK)
QIAShredder	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNase OUT (40U/µl)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Cellular Senescence Assay Kit	Cell Biolabs, INC. (Heidelberg)
Safranin O	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Stripetten	Corning Incorporated Costar (NY, USA)
Superscript II™ First Strand Synthesis System for RT PCR (200 U/µl)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)

Taq DNA Polymerase (F-530 Phusion®)	Finnzymes/Thermo Scientific (Schwerte)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Trypanblau (0,4%)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
Trypsin/EDTA (10x)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)
X-Gal ultra pure	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt)
Zellkulturflaschen (T25 cm ² , T75cm ²)	Corning Incorporated Costar (NY, USA)
Zellkulturplatten (96-well)	Greiner bio-one Cellstar (Frickenhausen)
Zellkulturplatten (6-, 24-well)	Corning Incorporated Costar (NY, USA)
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	SIGMA-Aldrich (Steinheim)

2.1.2 Agarosegelelektrophorese

2.1.2.1 TBE-Puffer

Tabelle 8: Zusammensetzung des TBE-Puffers

Puffer	Zusammensetzung
10x TBE-Puffer	53,9g Tris Base 4,63g EDTA 27,5g Borsäure Ad 1L Aqua dest.

2.1.2.2 Agarosegel und Elektrophorese

Tabelle 9: Zusammensetzung des Agarosegels

Agarosegel	Zusammensetzung
2%iges Agarosegel	Agarose 250ml TBE-Puffer 0,5% Etidiumbromid
DNA Probenpuffer	4µl
DNA-Leiter (100bp)	3µl

2.1.3 Primer

Für die PCR Analysen wurden einige der in Tabelle 10 aufgeführten Primer selbst, unter Zuhilfenahme der Plattformen NCBI, Primer Blast (NCBI- Blast- Tool), Ensembl Genome Browser und Oligo Analyzer-Integrated DNA Technologies gestaltet und bei der Firma Biolegio (Nijmegen, Niederlande) geordert.

Die in dieser Arbeit gestalteten Primer bestehen aus 17-22 Nukleotiden und haben eine für quantitative Realtime PCR (qRT-PCR) Analysen ideale Schmelztemperatur von ~60°C. Die Schmelztemperatur von Primern hängt von ihrer Länge und ihrem GC-Gehalt ab. Um die Spezifität der gestalteten Primer zu überprüfen, wurden die Sequenzen auf der NCBI Plattform *Primer-blast* überprüft.

2.1.3.1 Onlineprogramme zur Primergestaltung

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

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

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

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Primer

Primerpaar	NM Sequenz	Sequenzen 5' → 3'	Annealingtemperatur	Produktgröße [bp]
Gapdh	NM_002046.4	fwd: TGCACCACCAACTGCTTAGC rev: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG	60 °C	110
Angpt-1	NM_001146.3	fwd: CCGGTGAATATTGGCTGGGGA rev: CAGCACCGTGTAAGATCAGGC	60 °C	216
Kitlg	NM_000899.4	fwd: GGATCTGCAGGAATCGTGTGAC rev: ATCCCGGGGACATATTTGAGGG	60 °C	103
Jagged1	NM_000214.2	fwd: CGCCTGGCCGAGGTCTATAC rev: CTGCTTCAGCGTCTGCCACTG	60 °C	139
Dicer1	NM_001195573.1	fwd: GCTGGCGTGGGAGTCAGATCA rev: GGAGCTTACCAGGGGACTCGC	60 °C	262
Osterix	NM_001173467.1	fwd: CCCTGCTGGAGGAAGTTCAC rev: GAGTTGTTGAGTCCCGCAGAGG	60 °C	105
Osteocalcin	NM_199173.3	fwd: GAGCCCTCACACTCCTCGCC rev: AGCCAACTCGTCACAGTCCGG	60 °C	248
Osteopontin	NM_001040060.1	fwd: CGGACCTGCCAGCAACCGA rev: CTGTCCCAATCAGAAGGCGCG	60 °C	244
CXCL12	NM_001178134.1	fwd: GCCAGAGCCAACGTCAAGC rev: AGCTTCGGGTCAATGCACAC	60 °C	110
CXCR4	NM_003467.2	fwd: GCATGACGGACAAGTACAGGC rev: GACATGGACTGCCTTGATAGG	60 °C	131
Tie-2	NM_000459.3	fwd: CATCCTGGACCTGTGAGACG rev: CCACGTA CTGCTCCCTGGG	60 °C	254
c-Kit	NM_000222.2	fwd: GCTCCAATGTGTGGCAGCAG rev: ACATTCAACCGTGCCATTGTGC	60 °C	199
Notch1	NM_017617.3	fwd: GCTGACGGAGTACAAGTGCCG rev: GCCACACTCGTTGACATCCTGC	60 °C	187
CCL2	NM_002982.3	fwd: GGAAGATCTCAGTGCAGAGGC rev: CAGGTGGTCCATGGAATCCTG	60 °C	149
CCL7	NM_006273.2	fwd: CAACTACCTGCTGCTACAGAT rev : GGTCTTGAAGATTACAGCTTCC	60 °C	113
CCL23	NM_005064.3	fwd: CTTCTGGACATGCTCTGGAGGA rev: GAGTGAACACGGGATGCTTCG	60 °C	126
CCL26	NM_006072.4	fwd: CCTCCTGAGTCTCCACCTTGG rev: GGCTGTATTGGAAGCAGCAGG	60 °C	74
CXCL1	NM_001511.2	fwd: GCCAGTGCTTGACAGACCCT rev: GGATTGAGGCAAGCTTTCCGC	60 °C	136
CXCL7	NM_002704.3	fwd: CGAAAGGCAAAGAGGAAAGTC rev: TCTTGATTCTGGGAGCATCTG	60 °C	207
CXCL10	NM_001565.3	fwd: GTACGCTGTACCTGCATCAG rev: GGATTGAGACATCTTCTCACC	60 °C	149
CXCL14	NM_004887.4	fwd: GCTACAGCGACGTGAAGAAGCT rev: CCTGACCTCGGTACCTGGACA	60 °C	105
CX3CL1	NM_002996.3	fwd: CACGTGCAGCAAGATGACATCA rev: CCGCCATTTGAGTTAGGGC	60 °C	201

Midkine	NM_002391.3	fwd: GTGCCCTGCAACTGGAAG rev: CTTCTTCAGGGTGCCTTGG	60 °C	114
SBDS	NM_016038	Firma: Qiagen	60 °C	119
CCL3	NM_002983	Firma: Qiagen	60 °C	112
TBX15	NM_152380	Firma: Qiagen	60 °C	100
PITX2	NM_001204397 NM_001204398 NM_153426	Firma: Qiagen	60 °C	104
HOXB1	NM_002144	Firma: Qiagen	60 °C	124
p16 (CDKN2A)	NM_000077 NM_058195 NM_058196 NM_058197	Firma: Qiagen	60 °C	70
p21 (CDKN1A)	NM_000389 NM_001220777 NM_001220778 NM_07846	Firma: Qiagen	60 °C	79
p53 (TP53)	NM_000546 NM_001126112 NM_001126113 NM_001126114 NM_001126115 NM_001126116 NM_001126117 NM_001126118	Firma: Qiagen	60 °C	112

2.1.4 Antikörper

Tabelle 11: Auflistung verwendeter Antikörper

Name	Wirt	Spezifität	Typ	Klon	Firma	Markierung
Isotyp	Maus	Mensch	IgG ₁	X40	BD Biosciences	FITC/PE (Simultest)
Isotyp	Maus	Mensch	IgG ₁	MOPC-21	BD Biosciences	PerCP-Cy5.5
Isotyp	Maus	Mensch	IgG ₁	MOPC-21	BD Biosciences	APC
CD3	Maus	Mensch	IgG ₁	UCHT1	BD Biosciences	APC
CD4	Maus	Mensch	IgG ₁	SK3	BD Biosciences	PE
CD8	Maus	Mensch	IgG ₁	SK1	BD Biosciences	FITC
CD19	Maus	Mensch	IgG ₁	SJ25C1	BD Biosciences	PerCP-Cy5.5
CD34	Maus	Mensch	IgG ₁	8G12	BD Biosciences	FITC
CD34	Maus	Mensch	IgG ₁	8G12	BD Biosciences	PE
CD34	Maus	Mensch	IgG ₁	8G12	BD Biosciences	APC
CD44	Maus	Mensch	IgG ₁	G44-26	BD Biosciences	FITC
CD45	Maus	Mensch	IgG ₁	HI30	BD Biosciences	PE
CD49d	Maus	Mensch	IgG ₁	9F10	BD Biosciences	APC
CD73	Maus	Mensch	IgG ₁	AD2	BD Biosciences	PE
CD90	Maus	Mensch	IgG ₁	5E10	BD Biosciences	APC
CD105 (Endoglin)	Maus	Mensch	IgG ₁	266	BD Biosciences	PerCP-Cy5.5
CD117 (c-Kit)	Maus	Mensch	IgG ₁	104D2	BD Biosciences	PerCP-Cy5.5
CD184 (CXCR4)	Maus	Mensch	IgG ₁	12G5	BD Biosciences	PE
CD339 (Jagged1)	Maus	Mensch	IgG ₁	J1G53-3	Adipogen	FITC
Ki67	Maus	Mensch	IgG ₁	B56	BD Biosciences	FITC
Hoechst 33342 (DNA Marker)		Mensch			Invitrogen	

2.1.5 Zelllinien

Die adhärenente, humane embryonale Karzinomzelllinie (Teratocarcinoma) nTERA-2 wurde als Positivkontrolle für PCR Analysen bei MSPZ verwendet, während die Suspensionszelllinien HL-60 (Akute promyelozytische Leukämie) und THP-1 (AML Zelllinie) in Experimenten mit CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen eingesetzt wurden. Alle Zelllinien stammen vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2.1.6 Patientencharakteristika

Die in dieser Arbeit verwendeten MSPZ wurden aus dem Knochenmark von MDS-Patienten nach Erteilung des Einverständnisses durch den jeweiligen Patienten mit Hilfe der unten aufgeführten Kultivierungsverfahren (2.2.1.3) generiert. Als gesunde Kontrollen dienten MSPZ aus Knochengewebe von hämatologisch gesunden Patienten, die in der hiesigen Orthopädischen Klinik einen Hüftersatz erhielten.

Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten gesunden Probanden und MDS-Patienten zur Generierung von MSPZ und/oder CD34⁺ HSPZ

Probanden	Anzahl	Medianes Alter
Gesunde Probanden	67	63 (31-85)
Geschlecht		
Männlich	17	
Weiblich	50	
MDS-Patienten	121	66 (26-91)
Geschlecht		
Männlich	74	
Weiblich	47	
Diagnose		
RCMD	45	
RAEB	29	
MDS del5q	13	
CMML	4	
sAML	28	
MDS-U	2	

2.1.7 Kultur- und Differenzierungsmedien

2.1.7.1 Proliferationsmedium für CD34⁺ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ)

CD34⁺ HSPZ wurden in HPGM mit 20% FBS, 1% Penicillin/ Streptomycin/ L-Glutamin (PSG, 100U/ml) und den Wachstumsfaktoren IL3, IL6, FLT3 und SCF (10ng/ml) kultiviert.

2.1.7.2 LTB-MC (Long Term Bone Marrow Culture) Medium für Long Term Culture – Initiating Cell (LTC-IC) Versuch

Für den LTC-IC Versuch wurden die Zellen in IMDM mit 12,5% Horse Serum, 12,5% Langzeitzellkultur FBS und 1% PSG kultiviert.

2.1.7.3 Migrationsmedium für CD34⁺ HSPZ

Für den Migrationsversuch wurden CD34⁺ HSPZ in 250µl DMEM + 30% FBS + 1% PSG aufgenommen und in die obere Kammer einer Transwell-Platte mit einer Porengröße von 5µm pipettiert, während die untere Kammer mit 600µl DMEM + 30% FBS + 1% PSG + 10ng/ml SDF-1α befüllt wurde.

2.1.7.4 Kulturmedium für mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ)

Für die Kultivierung von MSPZ wurde DMEM (low glucose) mit 30% FBS und 1% PSG verwendet.

2.1.7.5 Differenzierungsmedium zur chondrogenen Differenzierung von MSPZ

Die chondrogene Differenzierung von MSPZ wurde mit DMEM (high glucose) + 1% Penicillin/ Streptomycin (PS) mit 1% ITS+1, 1µM Dexamethason, 40µg/ml L-Prolin,

50µg/ml Ascorbate-2-Phosphate und 10ng/ml TGF-β3 angereichert. Die Zellen wurden für 21 Tage induziert.

2.1.7.6 Differenzierungsmedium zur adipogenen Differenzierung von MSPZ

Das Basalmedium für die adipogene Differenzierung setzt sich aus DMEM (high glucose) + 10% FBS + 1% PSG zusammen. Induziert wurden die Zellen mit 0,1mg/ml Insulin, 10^{-6} Dexamethason, 1mM IBMX und 0,2mM Indomethacin (Induktionsmedium) und nach 2 Tagen gegen das Kultivierungsmedium, basierend auf dem Basalmedium, angereichert mit 0,01mg/Insulin ersetzt. Entsprechend wechselte das Medium alle 2 Tage alternierend zwischen dem Induktions- und Kultivierungsmedium für insgesamt 21 Tage.

2.1.7.7 Differenzierungsmedium zur osteogenen Differenzierung von MSPZ

Zur osteogenen Differenzierung von MSPZ wurde das Kulturmedium mit 50µg/ml Ascorbinsäure, 10mM β-Glycerolphosphat und 10^{-7} Dexamethason angereichert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen differenziert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeit wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C/21% O₂/ 5% CO₂ kultiviert.

2.2.1.1 Dichtezentrifugation

Für die Isolation der CD34⁺ HSPZ aus dem Knochenmark wurde als erster Schritt eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Volumen der Knochenmarkprobe bestimmt und anschließend auf 15ml Ficoll (LSM

1077) aufgeschichtet und ohne Bremse zentrifugiert (835 g/ 20 min/ 20°C), um die mononukleäre Zellfraktion (MNC) zu isolieren. Nach der Zentrifugation teilte sich das Knochenmark in verschiedene Phasen auf. Die mononukleäre Zellfraktion (MNC), die sich als weißer Ring (Interphase) unterhalb des Plasmas niedersetzt, wurde abgenommen und in ein neues 50ml Falcon überführt, die restlichen Bestandteile vom Knochenmark wurden verworfen. Die Interphase wurde zweimal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (300g/ 10 min/ 4°C). Der Überstand wurde verworfen und für die Hämolyse der Erythrozyten wurde das Pellet in 10ml Ammoniumchlorid-Lösung resuspendiert und für 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend zweimal mit MACS Puffer (500ml PBS + 1,5ml HSA (5%) + 1,5ml EDTA (0,5M)) gewaschen und zentrifugiert (300g/ 10 min/ 4°C). Das entstandene Pellet wurde erneut in 50ml MACS Puffer resuspendiert und die Zellzahl am CASY® Zellzähler TTC (Roche) bestimmt.

2.2.1.2 Isolation von CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) aus dem Knochenmark

Nach der in Schritt 2.2.1.1 beschriebenen Dichtezentrifugation wurden für die Isolation der CD34⁺ HSPZ die gezählte MNC Fraktion erneut zentrifugiert (300g/ 10 min/ 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Die CD34⁺ HSPZ wurden mittels magnetischer Zellseparation unter Verwendung der Midi MACS Technik (Miltenyi) nach dem Protokoll des Herstellers selektioniert und anschließend in die entsprechenden Versuche eingesetzt. Das Protokoll ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: **Protokoll zur Aufreinigung von CD34⁺ HSPZ aus dem Knochenmark**

Schritt	Durchführung
Färbung der MNC Fraktion	1x10 ⁸ MNC in 300µl MACS Puffer aufnehmen und mit 100µl Blocking Reagenz + 100µl <i>magneto bead</i> konjugierten Antikörper versetzen 30 min Inkubation bei 4 °C
Waschen der gefärbten MNC	ad 50ml MACS Puffer Zentrifugation (10min/ 300g/ 4 °C)
MACS Isolation	Äquilibration der LS-Säule (im Magnethalter), einmal mit 3ml MACS Puffer Aufnehmen der gefärbten MNC in 1-2ml MACS Puffer und Überführung auf die LS-Säule Nach dem Durchlaufen der Probe, Spülen der LS-Säule (im Magnethalter), zweimal mit 7ml MACS Puffer Entfernung der LS-Säule aus dem Magnethalter und Elution der Probe in 7ml MACS Puffer durch Einsatz des Druckkolbens eluierte HSPZ zentrifugieren (300g/ 10 min/ 4 °C)
Zellzahlbestimmung	Zellzählung per CASY

2.2.1.3 Generierung von MSPZ aus dem Knochenmark

Für die MSPZ Generierung wurde die in der 2.2.1.1 beschriebenen Dichtezentrifugation gewonnene MNC Fraktion pelletiert (300g/ 10 min/ 4 °C). Die MNC wurden in einer Zelldichte von 2x10⁷- 5x10⁷ auf eine T75cm² Zellkulturflasche in MSPZ Kulturmedium (siehe 2.1.7.4) ausplattiert (Primärkultur). Das Medium der Primärkulturen wurde wöchentlich gewechselt.

2.2.1.4 Bestimmung der Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) Aktivität in den MSPZ Kulturen

Probenabhängig konnte das Auftreten von Kolonien in den Primärkulturen der MSPZ Kulturen nach 14-21 Tagen beobachtet werden. Zellkolonien mit > 50 Zellen wurden

mikroskopisch ausgezählt und für eine einheitliche Bestimmung der CFU-F Aktivität auf 1×10^7 MNC normiert.

2.2.1.5 Passagieren und Kultivierung von MSPZ

Die MSPZ wurden über die Zeit in Kulturmedium (siehe 2.1.7.4) kultiviert, bis die Zellen eine Konfluenz von max. 70-80% erreichten und anschließend geerntet. Dafür wurde das Medium aufgefangen und die Zellen zunächst mit PBS gespült, erneut mit PBS bedeckt und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1xTrypsin in PBS überschichtet und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche wurde mikroskopisch kontrolliert und durch leichte Schläge gegen die Zellkulturflasche wurden die adhären Zellen abgelöst. Die Enzymreaktion des Trypsins wurde durch Zugabe des zu Beginn aufgefangenen, konditionierten Mediums abgesättigt. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert (397g/ 7 min/ 4°C) und das entstandene Pellet in neuem Kulturmedium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung, mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen, je nach Versuchsvorhaben erneut ausplattiert, kryokonserviert (siehe 2.2.1.7) oder als Pellet durch einen Waschschrift mit PBS (6000rpm/ 5 min/ 4°C) bei -80°C eingefroren.

2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Zellzahlbestimmung wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau (0,4%) vermischt. Tote Zellen sind durch die Einlagerung des Trypanblaus in die Zellmembran dunkelblau gefärbt. Dies vereinfacht die mikroskopische Auszählung lebender Zellen. Nach Auszählung der 4 Großquadrate wurde die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl} / 4 \times 2 \times 10000 \times \text{Volumen (ml)}$$

2.2.1.7 Kryokonservierung von MSPZ

Pro Kryoröhrchen wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen eingefroren. Hierfür wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (397g/ 7 min/ 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500µl 4°C kaltem 80% FBS in DMEM aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an 20% DMSO in DMEM wurden die Kryoröhrchen in -80°C überführt. Nach kurzer Lagerungszeit wurden die Kryovials in flüssigen Stickstoff (-196°C) für eine längere Lagerung überführt.

2.2.1.8 Auftauen von kryokonservierten MSPZ

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis ein kleiner Eiskristall vorhanden blieb. Die Zellsuspension wurde in 2 ml 50% FBS in DMEM aufgenommen, 30 sek inkubiert und mit 15% FBS in DMEM auf 15ml aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (397g/ 7 min/ 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und auf eine Kulturflasche ausplattiert.

2.2.2 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten der MSPZ zu analysieren, wurden die kumulativen Populationsverdopplungen (Cumulative Population Doublings, CPD) einer Zelllinie mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$PD = \frac{\log(n_1/n_0)}{\log 2}$$

PD= Population Doublings
(dt. Populationsverdopplungen)

n_0 = Anzahl ausplattierter Zellen

n_1 = Anzahl geernteter Zellen

$$CPD = \sum PD$$

Für eine konstante Berechnung der CPD wurde in jeder neuen Passage die gleiche Anzahl an Zellen wieder ausplattiert.

2.2.3 Differenzierungen

2.2.3.1 Chondrogene Differenzierung von MSPZ

Die chondrogene Differenzierung erfolgte in einem Zeitraum von 21 Tagen. Zur Differenzierung wurden die Zellen in Passage 3 in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt und zentrifugiert (397g/ 7 min/ 4°C). Das Zellpellet wurde mit chondrogenem Medium induziert (siehe 2.1.7.5) und zweimal wöchentlich gewechselt. Als Negativkontrollen wurden parallel Zellen der Probe mit gleicher Zellzahl in DMEM (low glucose) + 10% FBS + 1% PSG über den gleichen Zeitraum kultiviert.

2.2.3.2 Nachweis von Proteoglykanen mittels Safranin O

Die chondrogen differenzierten Pellets wurden zum Schneiden am Kryostat vorbereitet, indem diese in Einfriemedium eingebettet wurden. Sobald die Pellets bei -26°C eingebettet waren, konnten $6\mu\text{m}$ Schnitte angefertigt werden. Nach einem Tag Trocknen wurden die Schnitte mit Safranin O gefärbt. Die Färbung mit Safranin O und Fast Green (Lichtgrün) stellt den Proteoglykangehalt der chondrogen differenzierten Zellpellets dar, wobei die Farbgebung von rot einem normalen Proteoglykan entspricht, während blau fehlendes Proteoglykan entspricht. Für die Färbung wurden die Schnitte 10 min mit eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert und anschließend für 5 min in Aqua dest. gespült, bevor die Schnitte für 20 min mit der 0,3%igen Safranin O Arbeitslösung gefärbt wurden. Nach dem Färbeschritt wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült und für ca. 10 sek in 0,004% Fast Green eingetaucht. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurden die gefärbten Schnitte in 96% Ethanol und anschließend zweimal in Xylol eingetaucht, bevor sie mit Entellan eingedeckt wurden. Die Dokumentation erfolgte, wie bei den anderen Färbungen, am Axiovert 25 Mikroskop.

2.2.3.3 Adipogene Differenzierung von MSPZ

Die Zellen wurden ebenfalls in Passage 3 differenziert und in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ pro cm^2 in einer 24-well Platte ausplattiert und bei 50% Konfluenz mit dem Adipozyten-Induktionsmedium (siehe 2.1.7.6) induziert und über einen Zeitraum von 21 Tagen differenziert. Das Medium wurde alternierend jeden 2. Tag zwischen Induktions- und Kultivierungsmedium gewechselt. Als Negativkontrollen wurden Zellen der gleichen Probe in DMEM (low glucose) + 10% FBS + 1% PSG über den gleichen Zeitraum kultiviert.

2.2.3.4 Nachweis der Lipidvakuolen über Oil Red O

Für den Nachweis der sich bildenden Lipidvakuolen wurden die Zellen nach der Differenzierung mit einer Oil Red O Lösung gefärbt. Oil Red O ist ein roter Azofarbstoff und färbt Triglyceride an. Für eine gebrauchsfähige Lösung wurde die Stocklösung (0.3%) mit Aqua dest. auf eine Endkonzentration von 0,2% verdünnt. Diese Lösung ist 2 Stunden nach Verdünnung verwendbar. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 2 min mit 4% Formaldehyd bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 50%igen Ethanol gewaschen und für 20 min mit der 0,2%igen Oil Red O Lösung bei Raumtemperatur (RT) gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden anschließend mit 50%igen Ethanol von der überschüssigen Färbelösung frei gewaschen und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung mittels Axiovert 25 Mikroskop der Firma Zeiss.

2.2.3.5 Osteogene Differenzierung von MSPZ

Die Differenzierung der Zellen erfolgte in Passage 3. Hierfür wurden $5-8 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 in einer 6-well Platte ausplattiert und 1-2 Tage in Kulturmedium (siehe 2.1.7.4) kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 50% erreicht haben. Anschließend wurden sie mit Osteoblastendifferenzierungsmedium (siehe 2.1.7.7) induziert und über einen Zeitraum von 14 Tagen differenziert. Das Medium wurde zweimal

wöchentlich gewechselt. Zellen der gleichen Probe wurden parallel in DMEM (low glucose) + 10% FBS + 1% PSG über den gleichen Zeitraum kultiviert und dienten als Negativkontrollen.

2.2.3.6 Nachweis der Kalzifizierung mittels Alizarin Red und van Kossa und Nachweis der Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP)

Der Grad der Kalzifizierung nach der 14-tägigen Differenzierung wurde durch eine Färbung mit Alizarin Red nachgewiesen. Alizarin Red wird aus dem Färberkapp gewonnen und wird in die Mineralisierungsfront des Knochengewebes eingebaut. Zellen, die osteogen induziert werden können, bilden extrazelluläre Matrixproteine wie z.B. Osteocalcin, in die sich Kalziumphosphat einlagert, welche in dieser Färbung rot erscheinen. Die Alizarin Red Stocklösung ist 2%ig (pH4,1 - 4,3). Für die Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit eiskaltem 70%igen Ethanol bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen und für 10 min mit Alizarin Red gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut fünfmal mit Aqua dest. gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden mit PBS überschichtet und durch lichtmikroskopische Aufnahmen (Zeiss) dokumentiert.

Die van Kossa Färbung ist eine indirekte Färbemethode zum Nachweis von Kalzium in Karbonaten oder Phosphaten. Hierbei werden die Kalziumionen gegen Silberionen ausgetauscht und diese durch Licht zu metallischem Silber reduziert. Somit erscheinen kalkhaltige Substanzen braun/schwarz. Nach der 14-tägigen Induktion wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem 70%igen Ethanol für 10 min bei RT fixiert und mit Aqua dest. gespült. Nach einer 30-minütigen Färbung mit einer 1% Silbernitratlösung, wurden die Zellen für 1 min mit Natriumthiosulfat-Pentahydrat fixiert und nach einem Waschschrift mit Aqua dest. für 15 min mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat gegen gefärbt. Nach erneutem Waschen mit Aqua dest. wurden die Zellen mit PBS überschichtet und am Zeiss Mikroskop dokumentiert.

Die Alkalische Phosphatase (ALP) ist unter anderem in osteogen induzierten Zellen aktiv. Organische Phosphatverbindungen dienen als Substrat für die Enzymaktivität.

Die Phosphate werden von der ALP abgespalten und die freigesetzte Verbindung reagiert zu einem farbigen Endprodukt. In diesem Färbeprotokoll dient Naphtol-AS-Phosphat als Substrat und reagiert zu einem Azofarbstoff, der rötlich erscheint. Die Zellen wurden nach der Induktion zunächst mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 70%igen Ethanol für 10 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung erfolgte ein Waschschrift mit Aqua dest., bevor die Zellen für eine halbe Stunde bei 37°C mit der Arbeitslösung (100µl Naphtol-AS-Phosphat + 10ml Tris + 10ml Aqua dest. + 12mg Fast Red Violet LB Salt) inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit Aqua dest. für jeweils 2 min gewaschen, bevor diese mit PBS überschichtet und direkt am Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss) dokumentiert wurden.

2.2.4 Zellzyklusanalyse von CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ

MSPZ wurden in einer Konzentration von $1,6 \times 10^4$ pro cm^2 in einer 6-Well Platte als feeder layer (*dt.* Zellrasen) ausplattiert. Nach einem Tag in Kultur wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. 2×10^5 frisch isolierte CD34⁺ HSPZ wurden in Proliferationsmedium (2.1.7.1) aufgenommen und für 72 Stunden auf dem MSPZ feeder layer kultiviert. Anschließend wurden die CD34⁺ HSPZ durch Spülen des Wells mit PBS herausgelöst und mit Ki67-Hoechst 33342 gefärbt. Zur besseren Detektion einer möglichen Kontamination durch einzelne mit abgelöster MSPZ wurden die CD34⁺ HSPZ zusätzlich mit einem anti-CD34 Antikörper gefärbt und an einem Hochgeschwindigkeits-Zellsortierer MoFlo™ XDP (Beckman Coulter) ausgewertet.

2.2.5 Long Term Culture – Initiating Cell (LTC-IC) Assay

$1,2 \times 10^6$ MSPZ wurden in einer 96 Well-Platte ausplattiert und bei einer 80%igen Konfluenz mit 30Gy am Gulmay RS225 bestrahlt. 6×10^3 frisch isolierte CD34⁺ Zellen wurden in 5 ml LTB-MC Medium (siehe 2.1.7.2) aufgenommen und in absteigender Konzentration auf den MSPZ feeder layer ausplattiert und für 5 Wochen bei 37°C/ 21% O₂/ 5%CO₂ kultiviert. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt. Nach der 5-

wöchigen Kultivierung wurde das Medium vollständig entfernt und durch Methylcellulose, angereichert mit 10 IU/ml Erythropoietin ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 2 Wochen inkubiert und die herangewachsenen Kolonien unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Für die statistische Auswertung der LTC-IC Frequenz wurde das LDA-Statistics 1.0 (Beta 1) Programm verwendet.

2.2.6 Migration von CD34⁺ HSPZ

Im Knochenmark bewirkt die Sekretion von SDF-1 α (CXCL12) die Wanderung (Migration) von CD34⁺ HSPZ. Um die Migrationsfähigkeit von gesunden und MDS-Patienten zu untersuchen, wurde ein Migrationsversuch mittels Transwell-Platten gegen einen Konzentrationsgradienten durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^5 CD34⁺ HSPZ in 250 μ l Migrationsmedium (2.1.7.3) aufgenommen und in die obere Kammer einer Transwell-Platte (Porengröße 5 μ m) pipettiert. In der unteren Kammer wurden 600 μ l Migrationsmedium + 100ng/ml SDF-1 α gegeben, um so einen Konzentrationsgradienten herzustellen. Der Migrationsversuch wurde für 3 Stunden bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das Medium, welches migrierte Zellen beinhaltete, aus der unteren Kammer in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (300g/ 10 min/ 4°C). Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die CD34⁺ HSPZ mit anti-CD34 PE Antikörper für 30 min bei 4°C gefärbt und anschließend mit 0,1% Formaldehyd fixiert. Für die Auszählung migrierter Zellen wurden 10 μ l von Flow-CountTM Fluorospheres (9740 Beats/ μ l) mit der zu untersuchenden Probe vermischt und am FACSCalibur Gerät gemessen. Hierfür wurden 1250 Beats der Probe im FACS Gerät gezählt und somit ergibt sich ein prozentualer Anteil migrierter Zellen durch folgende Formel:

→ eingesetzte Flow-CountTM Fluorospheres (9740 Beats/ μ l) / gemessene Beats (1250) = 7,792 Faktor

→ gezählte Zellen am FACS x Faktor x 100 = Prozentualer Anteil migrierter Zellen

2.2.7 Seneszenz-Assay als Nachweis für alternde Zellen

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils alternder Zellen innerhalb einer Zellpopulation, wurde das *Cellular Senescence Assay Kit* (SA- β -gal Staining) von Cell Biolabs INC. verwendet. Dieser Assay beruht auf dem Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase. Das pH-Optimum der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase liegt bei pH6, die lysosomale β -Galaktosidase zeigt ein Optimum bei pH4. Für die Bestimmung seneszenten Zellen innerhalb einer MSPZ Population wurden 1×10^4 Zellen in Passage 3, pro Kammer (2-kämmrige *Chamber Slides*) ausplattiert. Nach 2-3 Tagen, innerhalb welcher die Zellen eine Konfluenz von 60-70% erreichten, wurden sie gefärbt. Die Seneszenz-Färbung erfolgte entsprechend der Anleitung des oben genannten Kits. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und mit der 1x *Fixing Solution* 5 min bei RT fixiert. Über Nacht wurden die Zellen mit 1 ml der nach dem Protokoll angesetzten Färbelösung bedeckt und bei 37°C inkubiert, bis die Färbung das Maximum einer dunklen Blaufärbung der Positivkontrolle erreicht hat. Für die Positivkontrolle wurde eine selbstangesetzte Färbelösung verwendet, die dem verwendeten Kit entsprach, wobei der pH-Wert bei pH4 lag. Insgesamt wurden 100 Zellen in verschiedenen Quadranten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und der prozentuale Anteil seneszenten Zellen berechnet.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 DNA Extraktion

Für die DNA Extraktion wurden Zellpellets von MSPZ in Passage 3 und CD34⁺ HSPZ nach der Aufreinigung in RLT-Puffer bei -80°C eingefroren. Die DNA Isolation erfolgte mit dem All Prep DNA/RNA Mini Kit, nach Anleitung des Herstellers Qiagen.

2.2.8.2 RNA Extraktion

Für die RNA-Isolation wurden Zellpellets von MSPZ in Passage 3 und CD34⁺ HSPZ nach der Aufreinigung in RLT-Puffer bei -80°C eingefroren. Die RNA Isolation

erfolgte mit dem RNeasy Mini oder Micro Kit, nach Anleitung des Herstellers Qiagen. Der optionale DNase Verdau wurde während den Waschschrinen eingebaut.

2.2.8.2.1 RNA Extraktion von osteogen differenzierten MSPZ

Für den osteogenen Zeitversuch wurden die MSPZ wie in 2.2.3.5 beschrieben induziert und an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 14 der Differenzierung für eine RNA Extraktion mittels TRI Reagent® (Trizol) lysiert, um die Expression verschiedener osteogener Marker in einer quantitativen Realtime PCR (qRT-PCR) zu untersuchen.

Tabelle 14: **Protokoll zur RNA Extraktion von osteogen differenzierten MSPZ mit TRI-Reagent®**

Schritt	Durchführung
Lyse	Zellen mit PBS waschen Zugabe von 500µl TRI Reagent®, gelöste Zellen in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführen Zugabe von 100µl Chloroform 2 min vortexen, bis die Probe milchig ist Zentrifugation (13000rpm/ 20 min/ 4°C) Auftrennung der Probe in RNA, DNA und Proteinphase
Fällung	Abnahme der oberen RNA Phase durch Pipettieren, Fällung durch Zugabe von 500µl Isopropanol, kurz invertieren und für mind. 1 Tag bei -20°C lagern
RNA Extraktion	Probe gut schütteln Zentrifugation (13000rpm/ 15 min/ 4°C) Überstand abnehmen, Zugabe von 500µl 70%igen Ethanol Zentrifugation (13000rpm/ 15 min/ 4°C) Überstand abnehmen, Zugabe von 500µl 100%igen Ethanol Zentrifugation (13000rpm/ 15 min/ 4°C) Überstand abnehmen, Pellet für 10 min bei RT trocknen lassen Elution der RNA durch Zugabe von 20-30µl DEPC treated Wasser Messung der RNA am <i>Nanodrop®</i> Lagerung bei -80°C (kurze Lagerung bei -20°C möglich)

2.2.8.3 Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem *Nanodrop*[®] ND-1000

Der *Nanodrop*[®] ist ein Spektralphotometer mit dessen Hilfe kleinste Mengen an Nukleinsäuren und Proteinen gemessen werden können. Zur Konzentrationsbestimmung wurden von jeder Probe 1,5µl eingesetzt und mit dem *Nanodrop*[®] spektrophotometrisch bestimmt.

2.2.8.4 cDNA Synthese (Reverse Transkription (RT))

Für die cDNA Synthese wurde Gesamt-RNA der MSPZ in Passage 3 und Gesamt-RNA aus CD34⁺ HSPZ umgeschrieben. Die isolierte RNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen mit der Superscript II Reverse Transcriptase und Oligo dT₁₂₋₁₈ Primer umgeschrieben. Die cDNA Synthese erfolgte an einem *Mastercycler Gradient* der Firma Eppendorf.

Für die cDNA Synthese wurde die RNA zunächst in einem Master Mix I mit dNTP Mix, Oligo dT₁₂₋₁₈ Primer und DEPC treated Wasser in einem Endvolumen von 20µl angesetzt und für 5 min bei 65°C denaturiert. Nach einer 1-minütigen Kühlung der Proben auf Eis wurde der Master Mix II zu den einzelnen Proben hinzugegeben und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach erfolgter Zugabe der Superscript II wurden die Proben weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion wurden die Proben für 15 min bei 70°C inkubiert und schließlich in die PCR Reaktion eingesetzt.

Tabelle 15: Master Mixe für die cDNA Synthese

Schritt	Materialien	Volumen
Master Mix I (Endvolumen 12µl)	RNA (mind. 200ng) dNTP Mix (10µM) Oligo dT ₁₂₋₁₈ Primer DEPC treated Wasser	xµl 1µl 1µl xµl
Master Mix II	5x First Strand Puffer DTT(0,1mM) RNase OUT (40U/ml)	4µl 2µl 1µl
Reverse Transcriptase	Superscript II	1µl

2.2.8.4.1 cDNA Synthese von RNA aus osteogen differenzierten MSPZ

Der Ansatz für die cDNA Synthese der aus den osteogen differenzierten MSPZ extrahierten RNA wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

Tabelle 16: Protokoll zur cDNA Synthese von RNA aus osteogen differenzierten MSPZ

Schritt	Materialien	Volumen
DNase Verdau (Endvolumen 10µl)	RNA DNase Puffer DNase I DEPC treated Wasser	xµl 1µl 1µl xµl
Inaktivierung der Reaktion	EDTA	1µl
Master Mix I	dNTPs (10mM) Oligo dT ₁₂₋₁₈ Primer	1µl 1µl
Master Mix II	5x First Strand Puffer DTT (0,1mM) RNase OUT (40U/ml)	4µl 2µl 1µl
Reverse Transkriptase (RT)	Superscript II	1µl

Die RNA der osteogen differenzierten MSPZ wurde in einem Master Mix zunächst mit DNase I für einen DNase Verdau für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1µl EDTA inaktiviert. Die Proben wurden bei 65°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von dNTPs und Oligo dT₁₂₋₁₈ Primer wurde der Ansatz weitere 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend 1 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe des Master Mix II wurde die Reaktion für 2 min bei 42°C inkubiert. Eine weitere Inkubation von 50 min bei 42°C erfolgte nach Zugabe der Superscript II. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte für 15 min bei 70°C.

2.2.8.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden zunächst in einer Endpunkt PCR getestet, um optimale Reaktionsbedingungen für eine quantitative Realtime-PCR

(qRT-PCR) zu ermöglichen. Die Endpunkt PCR bietet die Möglichkeit der Vervielfältigung einer Zielsequenz, sodass dieses Produkt mittels Gelelektrophorese als eine einzelne Bande unter dem UV Licht sichtbar gemacht werden kann. So kann zunächst die Qualität (Spezifität) der verwendeten Primer geprüft werden, etwa wie das Vorhandensein von Nebenprodukten oder Primerwolken.

Tabelle 17: Protokoll für das PCR Programm am *Mastercycler Gradient (Eppendorf)*

PCR	Temperatur in °C	Zeit	Zyklus
Denaturierung	98	2 min	1x
Denaturierung	98	30 sek	35x
Primerhybridisierung	60	30 sek	
Elongation	72	30 sek	
Elongation	72	10 min	1x

Für die PCR-Reaktion wurde ein Gesamtansatz von 25µl angesetzt. Der PCR Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion

PCR- Reaktionsansatz
5µl 5x Phusion® HF Reaction Buffer (+MgCl ₂)
1µl dNTP Mix (10mM)
1µl Forward Primer (10pM)
1µl Reverse Primer (10pM)
0,2µl DNA Taq Polymerase (F-530 Phusion®)
1µl cDNA
xµl Wasser
25µl Endvolumen

2.2.8.6 Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren (RNA und DNA) nach ihrer Größe in einer Gelmatrix durch Erzeugen eines elektrischen Feldes. Die negativ geladenen Nukleinsäuren werden so durch das Gel hin zum positiven Pol (Anode) gezogen und aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proben richtet sich nach ihrem Molekulargewicht, ihrer Größe, der Stärke des elektrischen Feldes und der Porengröße des Agarosegels. Je höher konzentriert das Gel ist, desto kleiner sind die Poren. Anhand von sogenannten DNA-Leitern kann die unter dem UV-Licht sichtbar gemachte, gewanderte RNA/DNA Bande ihrer Größe zugeordnet werden. Da die in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragmente relativ klein sind, wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet.

Die PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft, indem diese auf ein mit Ethidiumbromid (2,4µl/100ml) versetztes 2%iges Agarosegel aufgetragen und für 30 min bei 170V aufgetrennt wurden. Die Auswertung erfolgte unter dem UV-Licht. Ethidiumbromid (EtBr) interkaliert in die DNA, welche als Banden unter dem UV-Licht sichtbar wurden und mit Hilfe eines Größenstandards (100bp DNA Leiter) die entsprechenden PCR Produkte zugeordnet werden konnten.

2.2.8.7 Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR, basierend auf dem Prinzip der PCR, ermöglicht eine Quantifizierung der Produkte durch Fluoreszenz Messungen, die pro Zyklus in „Echtzeit“ (*engl.* Realtime) erstellt werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit dem vorhandenen PCR Produkt proportional zu. Die qRT-PCR wurde an einem Step One Plus Realtime Cycler durchgeführt. Es wurde der SYBR Green PCR Master Mix von Applied Biosystems verwendet und oligospezifische Primer zur Analyse von MSPZ und zur Charakterisierung der CD34⁺ HSPZ gestaltet oder von Firmen verwendet (Tabelle 10). Die PCR Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt. Das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) diente als Referenzkontrolle und die relativen Änderungen der Genexpression wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet.

2.2.9 Proteinanalysen

2.2.9.1 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode auf Einzelzellniveau, bei welcher in Suspension befindliche Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und spezifischen Färbung analysiert werden können. Dabei werden die Zellen in einer Flusskammer durch Laserstrahlen angeregt. Die hierdurch hervorgerufenen Lichtsignale werden über halbdurchlässige Spiegel an spezielle Detektoren geleitet und dort gemessen. So ermöglicht die Durchflusszytometrie beispielweise eine Einteilung von verschiedenen Zelltypen innerhalb einer Probe.

Zur Darstellung der zu untersuchenden Zellpopulationen wird zunächst mit Hilfe von Diagrammen (Dot Plots) am FACS Gerät und durch Setzen von sogenannten „Gates“ für die Größe und Granularität der Zellen angelegt. Zellen mit ähnlichen Größen- und Granularitätseigenschaften werden als wolkenähnliches Bild dargestellt.

Weiterhin kann die Expression von verschiedenen Oberflächenantigenen und intrazellulären Proteinen von Zellen mit gleichen Eigenschaften bestimmt werden. Dabei beruht das Prinzip auf der Emission der Fluoreszenz-gefärbten Zellen. Die dabei verwendeten Antikörper sind an verschiedene Fluorochrome gekoppelt. Jedes Fluorochrom hat ein anderes Emissionsspektrum, sodass sich die einzelnen zu untersuchenden Antigene innerhalb einer Analyse unterscheiden lassen.

2.2.9.1.1 Extrazelluläre und intrazelluläre Färbungen

Zur Charakterisierung von MSPZ wurde die Expression folgender extrazellulären Oberflächenepitope mittels Durchflusszytometrie an einem FACSCalibur gemessen und mittels FCS Express V3 (De Novo Software, LA, CA, USA) ausgewertet: anti CD34- und CD45-AK FITC, anti CD73-AK PE, anti CD90-AK APC, anti CD105-AK PerCP-Cy5.5, anti CD339-AK PE. Für den Nachweis von Jagged1 Expression auf MSPZ wurde folgendes Panel angesetzt: anti CD90-AK APC, anti CD105-AK PerCP-Cy5.5, anti CD45-AK PE und anti Jagged1-AK FITC. Zur weiteren Analyse von CD34⁺ HSPZ wurden folgende Antikörper verwendet: anti CD44-AK FITC, anti CD184-AK PE, anti CD49d-AK APC, anti CD45-AK PerCP-Cy5.5. Für die

Antikörperfärbungen an CD34⁺ HSPZ wurde zusätzlich die MNC Fraktion mit anti CD8-AK FITC, anti CD4-AK PE, anti CD19-AK APC und anti CD3-AK PerCP-Cy5.5 für die Kompensation gefärbt.

Tabelle 19: **Protokoll zur Durchführung von intra- und extrazellulären Färbungen an MSPZ und CD34⁺ HSPZ aus dem Knochenmark**

Zelltypen	Durchführung
MSPZ (in Passage 3)	<p>extrazellulär</p> <p>Passagierung wie 2.2.1.5 beschrieben</p> <p>2x10⁵ Zellen pro Färbung</p> <p>2x mit PBS waschen</p> <p>Antikörperzugabe (nach Hersteller), Inkubation für 30 min/ 4 °C</p> <p>Zellen fixieren mit 0,1% Formaldehyd</p> <p>Auswertung am FACS Gerät</p>
CD34 ⁺ HSPZ	<p>extrazellulär</p> <p>2x10⁵ Zellen pro Färbung</p> <p>2x mit PBS waschen</p> <p>Antikörperzugabe (nach Hersteller), Inkubation für 30 min/ 4 °C</p> <p>Zellen fixieren mit 0,1% Formaldehyd</p> <p>Auswertung am FACS Gerät</p> <p>intrazellulär</p> <p>(optional: vorherige extrazelluläre Färbung, anschließend Zellen in 2% Formaldehyd für 10 min/ RT/ Dunkel inkubieren)</p> <p>nach Zentrifugation (300g/ 10 min/ RT), Zellen in 0,1% Triton X100 aufnehmen und 30 min/ RT/ Dunkel inkubieren</p> <p>2x Waschschrift mit 0,01% Triton in PBS</p> <p>intrazelluläre Färbung (Antikörperzugabe nach Hersteller) für 30 min/ 4 °C</p> <p>Zellen fixieren mit 0,1% Formaldehyd</p> <p>Auswertung am FACS Gerät</p>

2.2.9.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Nachweisverfahren von Proteinen in z.B. Serumproben, Plasma oder auch Zellkulturüberständen.

In dieser Arbeit wurden ELISA, basierend auf der quantitativen Sandwich Enzym Immunoassay Technik verwendet. Dabei wird die Probe mit dem zu untersuchenden Antigen auf eine Mikrotiterplatte, welche mit einem primären, monoklonalem Antikörper spezifisch für das zu untersuchende Antigen beschichtet ist, gegeben. Bei Vorhandensein des Antigens in der Probe kommt es zu einer Bindung an den Antikörper. Nach dem Herauswaschen ungebundener Substanzen wird ein Enzymgekoppelter sekundärer Antikörper (Sandwich: Antikörper-Antigen-Antikörper Verbindung) gegeben. Durch Zugabe einer Substratlösung ist das Enzym aktiv und es kommt zu einer Farbreaktion.

Die Konzentration von Angiopoietin-1 (Angpt-1) Level und stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 α , CXCL12) Level wurden in den Überständen von MSPZ unter Verwendung des Angpt-1 ELISA und des SDF-1 α Quantikine ELISA Kit von R&D untersucht. Nach 7 tägiger Kultivierung, mit gleicher Ausgangszellzahl, wurden die Überstände kultivierter MSPZ von gesunden und MDS-Patienten in Passage 3 abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Durchführung der ELISA Assays erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Auswertung erfolgte mit dem Perkin Elmer Wallac Victor² 1420 Microplate Reader.

Tabelle 20: **Anleitung für die Durchführung der ELISA**

Schritt	Durchführung
Vorbereiten der Überstände	Überstände auftauen Zentrifugation (10 min/ 10.000 rpm) Verdünnung der Proben 1:10 nach Hersteller Vorbereitung benötigter Reagenzien (vom Hersteller)
1. Inkubation	Probe oder Standard pro Well für 2 Stunden auf eine mit spezifischem Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte bei RT inkubieren
Waschschritt	4x Waschen der Well Platte
2. Inkubation	Zugabe des Konjugat für 2 Stunden bei RT
Waschschritt	4x Waschen der Well Platte
Substrat	Zugabe des Substrates, Inkubation für 30 min/ RT/ Dunkel
Auswertung	Farbreaktion, Auswertung am Perkin Elmer Wallac Victor2 1420 Microplate Reader bei 450nm

2.2.10 Serumanalysen-Osteocalcin ELISA

Die Konzentration von Osteocalcin wurde im Serum gesunder Probanden und MDS-Patienten unter Verwendung des Elecsys® N-MID Osteocalcin Immunoassays nach Anleitung des Herstellers untersucht und an einem Modular Analytics® E 170 Analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ausgewertet.

2.2.11 Statistische Auswertungen

Die in dieser Arbeit berechneten Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen sowie die graphischen Darstellungen der Ergebnisse in Form von Diagrammen, wurden unter Zuhilfenahme der Programme Excel 2003 (Microsoft) und Prism 5.01 (GraphPad Software Inc.) erstellt. Die Berechnungen für Signifikanzen anhand des ungepaarten oder zweiseitig gepaarten studentischen t-Tests und den Wilcoxon matched paired test in den Versuchsansätzen wurden

ebenfalls mit diesen Programmen ermittelt. Der Signifikanzwert bzw. der Wahrscheinlichkeitswert (p-Wert) ist im Text als Zahl angegeben und in den Abbildungen mit Sternen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von MSPZ

3.1.1 Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) Aktivität

Für die Generierung von MSPZ wurden zwischen 2×10^7 - 5×10^7 MNC auf eine T75cm² Zellkulturflasche ausplattiert. Insgesamt wurden 58 altersgepaarte gesunde Probanden und 68 MDS-Patienten (29 RCUD/RCMD, 15 RAEB, 10 sAML, 11 MDS del5q, 3 CMML) untersucht. Für eine einheitliche Berechnung der CFU-F wurden die ermittelten Kolonien der einzelnen Proben auf 1×10^7 MNC normiert.

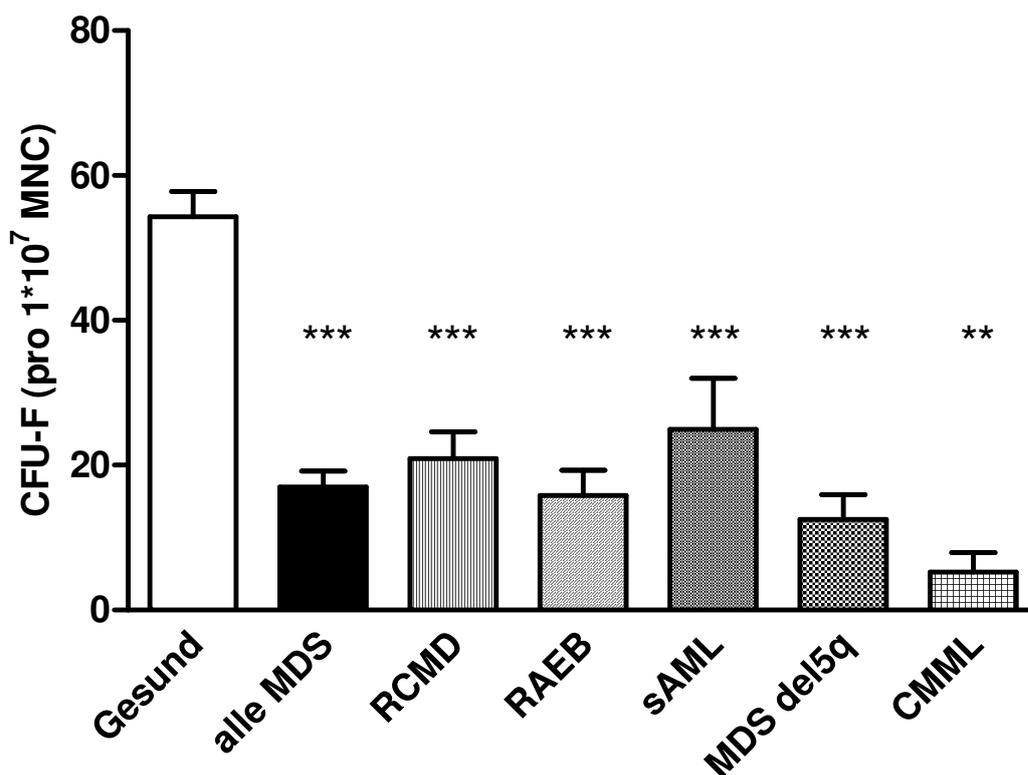


Abbildung 6: **CFU-F Aktivität von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten**
Graphische Darstellung der Colony Forming Unit-Fibroblast Aktivität (CFU-F) der MSPZ gesunder Probanden und MDS-Subtypen, normiert auf 1×10^7 MNC.

MSPZ aller MDS-Subtypen zeigten eine signifikant verringerte CFU-F Aktivität (alle MDS: 16,9 Kolonien; 0,3-54) im Vergleich zu MSPZ gesunder Probanden (54,3

Kolonien; 8-146 Kolonien; $p < 0,0001$). Die gemessene CFU-F Aktivität der einzelnen MDS-Subtypen zeigte, dass weder MDS-MSPZ eines frühen MDS ($< 5\%$ Blasten) wie RCMD MW: 20,9 Kolonien, $p < 0,0001$, MDS del5q MW: 12 Kolonien, $p < 0,0001$ sowie eines fortgeschrittenen MDS ($> 5\%$ Blasten) wie RAEB MW: 15,8 Kolonien, $p = 0,007$, oder auch aus einer sAML MW: 24,9 Kolonien, $p = 0,01$, CMML MW: 5 Kolonien, $p = 0,02$) (Abbildung 6) in der Lage waren, eine ähnliche CFU-F Aktivität wie die MSPZ von gesunden Probanden zu entwickeln.

3.1.2 Charakterisierung der MSPZ mittels Durchflusszytometrie

Dominici et al. veröffentlichte Kriterien zur Charakterisierung von MSPZ *in vitro*, die neben dem Nachweis der Multipotenz und der Plastik-Adhärenz, ein spezifisches Oberflächenprofil beinhalten. Hiernach müssen mindestens $> 95\%$ der Zellen positiv für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 sein, während $< 2\%$ der Zellen positiv für die hämatopoietischen Marker CD34 und CD45 sein dürfen[67]. Die unter 2.2.1.3 beschriebenen generierten MSPZ von gesunden Probanden und MDS-Patienten wurden mittels Durchflusszytometrie daraufhin untersucht. In dieser Arbeit wurden insgesamt MSPZ von 34 gesunden Probanden und von 27 MDS-Patienten (13 RCUD/RCMD, 3 RAEB, 7 sAML, 4 MDS del5q) auf diese Marker mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht.

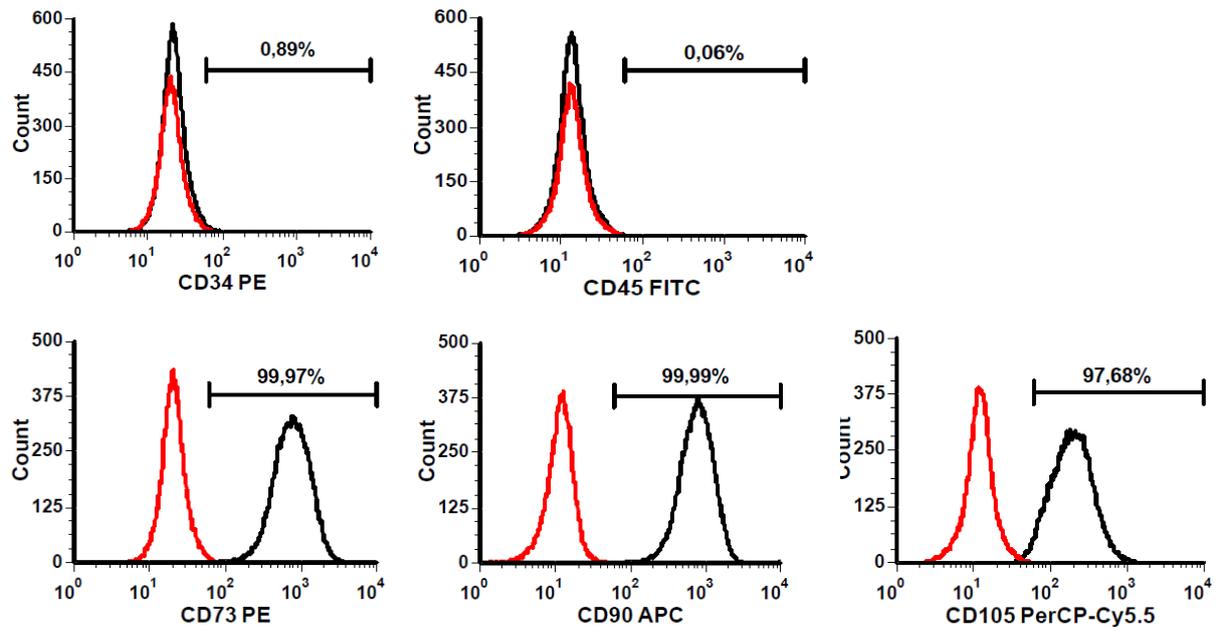


Abbildung 7: **Verteilung der Oberflächenantigene CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105 bei MSPZ mittels durchflusszytometrischer Analysen** Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer MSPZ Linie von einem MDS-Patienten in Passage 3 auf die hämatopoietischen Antigene CD34 und CD45 sowie die nicht-hämatopoietischen Antigene CD73, CD90 und CD105 (schwarz) gegen die entsprechende Isotypkontrolle (rot).

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen von MSPZ eines MDS-Patienten. Es konnten keine Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Oberflächenantigene in den Auswertungen beobachtet werden, da keine der untersuchten MSPZ Populationen, weder von gesunden Probanden, noch von MDS-Patienten, mehr als 1% der Zellen positiv für die hämatopoietischen Marker, aber mindestens 95% positiv für CD73, CD90 und CD105 waren.

3.1.3 Phänotyp der MSPZ Kulturen

Über die Zeit in Kultur wachsen die MSPZ Kulturen physiologischerweise als adhärenter, parallel aneinander geordneter „Zellrasen“ (*engl.* feeder layer).

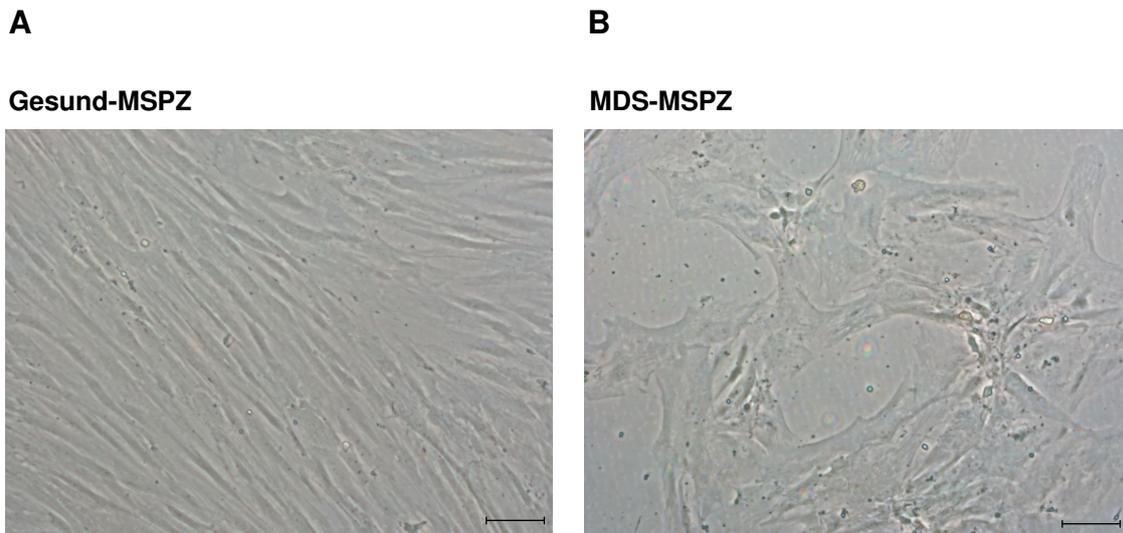


Abbildung 8: **Phänotyp kultivierter MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten**
 Exemplarische Darstellung einer lichtmikroskopischen Aufnahme von **A** MSPZ gesunder Probanden und **B** MSPZ von MDS-Patienten in Passage 3 im Vergleich (Zeiss CP-Achromat 5x Ph0, der Größenmaßstab entspricht 100 μ m).

Der charakteristische Phänotyp mit spindelförmiger Morphologie von MSPZ gesunder Probanden (Abbildung 8A) konnte über mehrere Passagen in Kultur beobachtet werden, während der Phänotyp von MSPZ aller MDS-Subtypen mit einer erhöhten Granularität und einer sehr breiten und abgeflachten Zellstruktur (Abbildung 8B) stark alteriert erschien. Die typisch parallele Anordnung der Zellen wich einem zerrissenem, sternenförmig ausgebildetem Muster.

3.1.4 Wachstumskinetik

Im nächsten Schritt wurde die Wachstumskinetik von MSPZ gesunder Probanden im Vergleich zu MSPZ von MDS-Patienten über mehrere Passagen hinweg untersucht. Dies erfolgte anhand der Berechnung der kumulativen Populationsverdopplungen (*engl.* Cumulative Population Doublings, CPD) und der maximal erreichbaren Anzahl an Passagen.

Die MSPZ Kulturen von gesunden Probanden und MDS-Patienten wurden über mehrere Wochen kultiviert und die Zellen wurden, je nach Wachstum mindestens einmal pro Woche geerntet und neu ausplattiert. Für eine einheitliche Berechnung der CPD wurden in jeder Passage 0,5x10⁶ Zellen erneut ausplattiert.

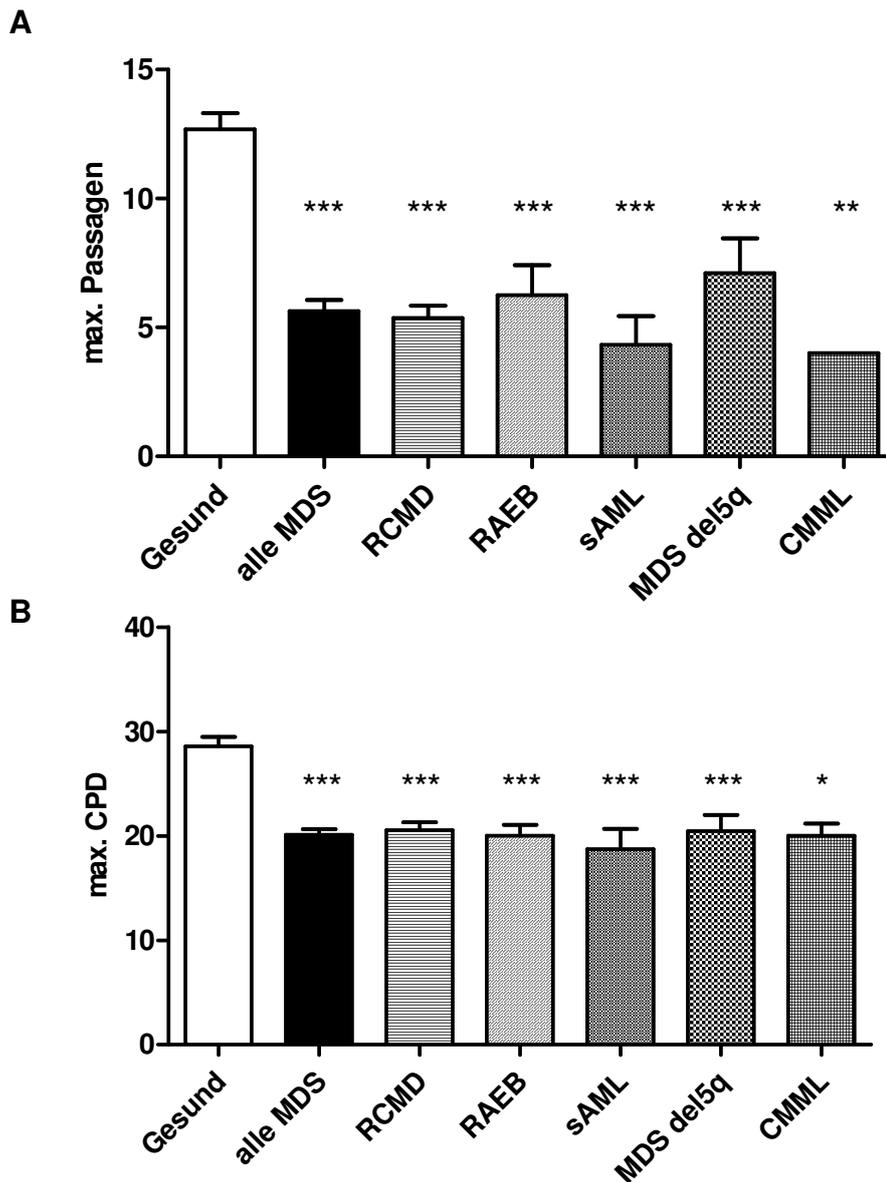


Abbildung 9: **Wachstumskinetik von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten**
 Graphische Darstellung der Wachstumskinetik von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten im Vergleich. **A** die maximal erreichten Passagen von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten über die Zeit in Kultur und **B** die dabei maximal erreichten CPDs.

MSPZ gesunder Probanden konnten insgesamt über einen längeren Zeitraum kultiviert werden und erreichten zudem mehr CPD im Vergleich zu allen MDS-Subtypen. Verteilt über die verschiedenen MDS-Subtypen, unabhängig der Einstufung über ihre Blastenzahl, in ein frühes und fortgeschrittenes MDS, zeigten die daraus generierten MSPZ ein deutlich geringeres Expansionspotential.

MSPZ von 38 gesunden Probanden konnten durchschnittlich über Passage 12 kultiviert werden, während MSPZ aus 54 MDS-Patienten nur max. 5 Passagen (Abbildung 9A) erreichten. Nach 94 Tagen in Kultur erreichten MSPZ gesunder Probanden durchschnittlich max. 28,6 CPD, während MSPZ aus MDS-Patienten eine deutlich geringere Zeit in Kultur gehalten werden konnten (49 Tage) und dabei nur max. 20,0 CPD erreichten (Abbildung 9B).

Über die Dauer der Kultivierung der MSPZ Linien von gesunden Probanden und MDS-Patienten konnten Wachstumskurven angefertigt werden. Dabei wurden die Cumulativen Population Doublings (CPD) gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Exemplarisch sind in Abbildung 10 MSPZ eines gesunden Probanden sowie MSPZ verschiedener MDS-Subtypen dargestellt.

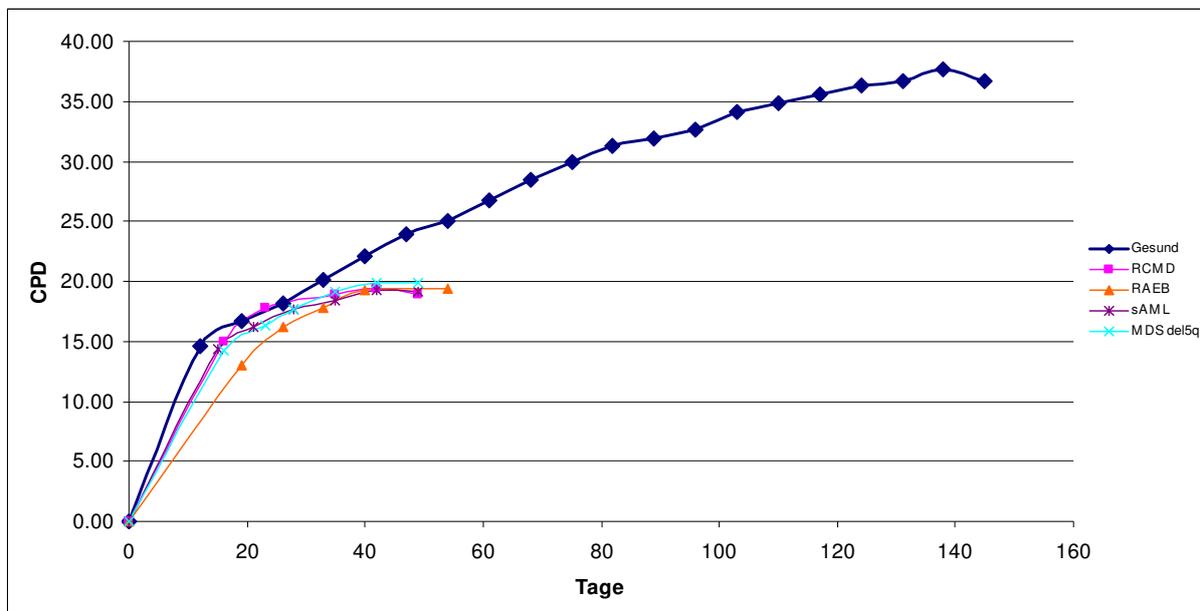


Abbildung 10: **Expansionspotential (Wachstumskurve) von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Exemplarische Darstellung des Expansionspotentials von MSPZ eines gesunden Probanden im Vergleich zu verschiedenen MDS-Subtypen. Aufgetragen sind die Tage in Kultur und die dabei erreichten Cumulativen Population Doublings (CPD).

3.1.5 Replikative Seneszenz in MSPZ Populationen

Die Replikative Seneszenz beschreibt den Prozess des Wachstumsarrests, in dem keine Zellteilung erfolgt. Eine Möglichkeit der Messung stellt der Nachweis der β -

Galaktosidase dar, welche seneszent gewordene Zellen vermehrt exprimieren. Der Nachweis beruht in dem verwendeten Assay auf der Hydrolyse von x-Gal zu einem blauen Indigokomplex durch das Enzym β -Galaktosidase, bei einem pH-Wert von 6. Seneszente Zellen, die dieses Enzym exprimieren erscheinen hierbei unter dem Lichtmikroskop blau.

Insgesamt wurden MSPZ von 12 gesunden Probanden und MSPZ aus 12 MDS-Patienten untersucht.

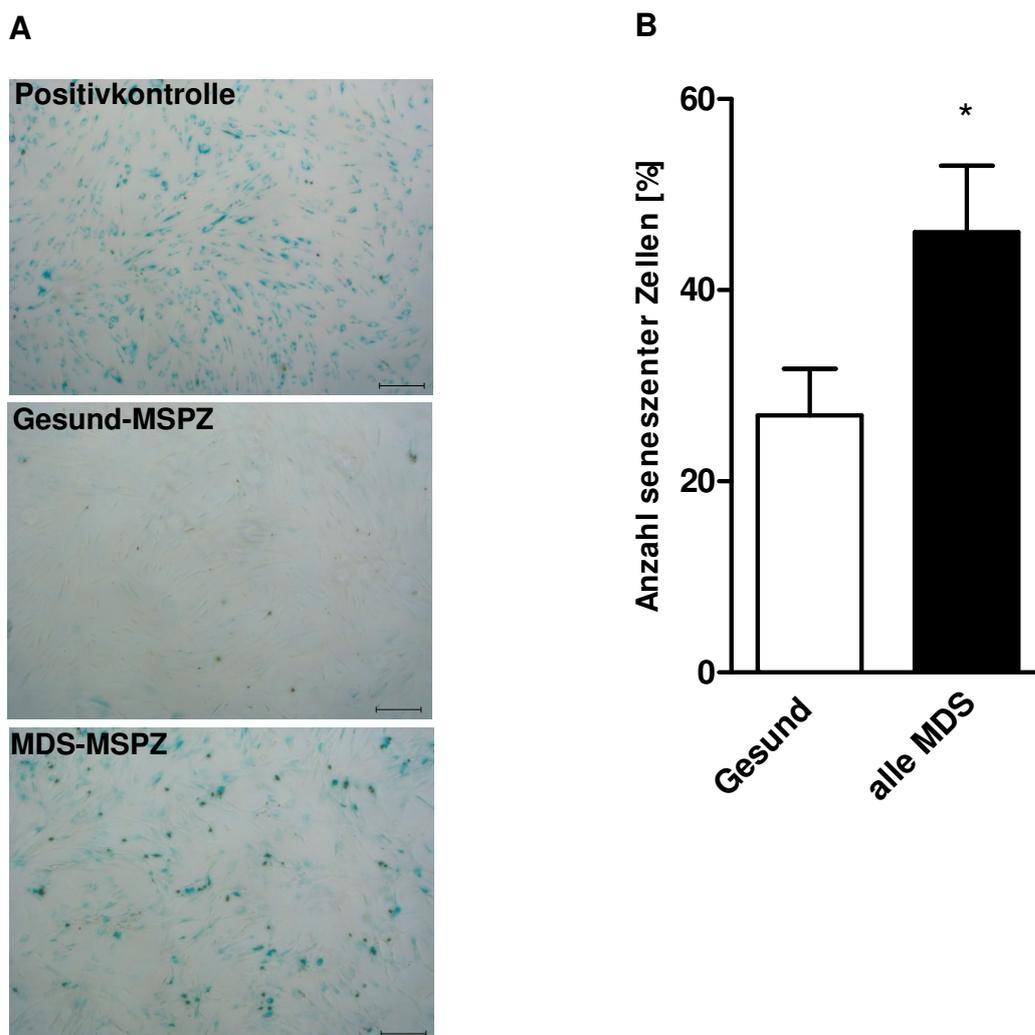


Abbildung 11: **Seneszenz in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten**
Exemplarische Darstellung der lichtmikroskopischen Aufnahme (Zeiss CP-Achromat 5x Ph0, der Größenmaßstab entspricht 100 μ m) von **A** MSPZ eines gesunden Probanden und eines MDS-Patienten sowie der Positivkontrolle und **B** graphische Darstellung des prozentual berechneten Anteils seneszenter Zellen von MSPZ gesunder Probanden im Vergleich zu MSPZ von MDS-Patienten in Passage 3.

Die lichtmikroskopische Auswertung der Populationen zeigte eine größere Zahl an blaufärbten, seneszenten Zellen in MDS-MSPZ Populationen im Vergleich zu den MSPZ gesunder Probanden (Abbildung 11A). Berechnungen des prozentualen Anteils seneszenten Zellen (Abbildung 11B) von 100 ausgezählten Zellen innerhalb einer Zellpopulation, bestätigten die lichtmikroskopischen Beobachtungen. MSPZ von MDS-Patienten (46%) zeigten einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil seneszenten Zellen im Vergleich zu MSPZ gesunder Probanden (26,9%) in der gleichen Passage ($p=0,039$).

Die replikative Seneszenz kann mit einer Erhöhung von Seneszenz assoziierten Genen wie p16, p21 und p53 einhergehen. Hierfür wurde vorhandenes RNA Material von MSPZ 7 gesunder Probanden und von 7 MDS-Patienten verwendet, die bereits im Seneszenz Versuch untersucht wurden (siehe 3.1.5), um die Expression der Seneszenz assoziierten Gene auf mRNA Ebene mittels quantitativer Realtime PCR (qRT-PCR) zu untersuchen.

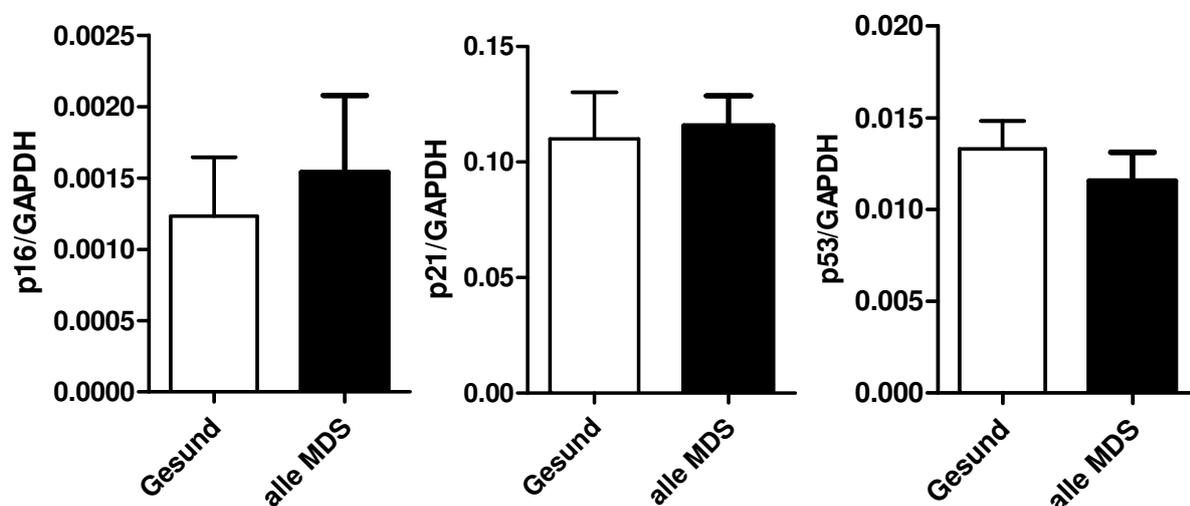


Abbildung 12: **Expression der Gene p16, p21 und p53 in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Graphische Auftragung der relativen Genexpression der Gene p16, p21 und p53, quantifiziert mittels qRT-PCR Analyse, in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten in Passage 3. GAPDH wurde als Haushaltsgen verwendet.

In Korrelation zu der bereits durch die lichtmikroskopische Auswertung beobachtete, erhöhte Seneszenz in MSPZ von MDS-Patienten, zeigte sich eine leicht erhöhte Expression von p16 und p21, während die Expression von p53 in MSPZ von MDS-Patienten geringfügig vermindert war (Abbildung 12).

3.1.6 DNA Methylierungsmuster in MSPZ

Um zu untersuchen, ob die morphologischen Veränderungen und die erhöhte Seneszenz mit einer Veränderung in der DNA Methylierung korreliert sind, wurden in dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lyko (DKFZ, Heidelberg) das Methylierungsmuster von 450,000 CpG Dinukleotiden von 4 gesunden, 4 RCMD und 4 RAEB MSPZ unter Verwendung des Infinum 450K Arrays untersucht. Hierfür wurden die Proben zunächst vorbereitet, in dem aus diesen Zellen die DNA isoliert wurde. Die Auswertung der daran erfolgten Analysen (durch Herrn Prof. Lyko) zeigte eine klare Trennung zwischen gesunden Probanden und MDS-Patienten anhand des Methylierungsmusters und zudem konnten 252 differentiell methylierte CpGs identifiziert werden. Anschließende Analysen offenbarten 65 differentiell methylierte Gene, wobei die drei Gene HOXB1, TBX15 und PITX2 auffällig stark hypermethyliert waren. Unter Verwendung der 454 Bisulfite Sequenzierung wurden die Ergebnisse validiert. Weitere 4 gesunde MSPZ und 6 MDS-Patienten (4 RCMD, 2 RAEB) wurden auf das Methylierungsmuster von HOXB1, TBX15 und PITX2 mittels 454 Bisulfite Sequenzierung untersucht. Auch hierbei zeigte sich erneut eine Hypermethylierung der drei untersuchten Gene (Abbildung II, siehe Anhang). Methylierungen können auf RNA Ebene mit einer veränderten Genexpression einhergehen, sodass diese Gene der gleichen Proben auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR untersucht wurden. Hierbei zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von HOXB1 ($p=0,048$) und TBX15 ($p=0,0038$) (Abbildung 13A und B), während PITX2 signifikant ($p=0,0097$) überexprimiert war (Abbildung 13C).

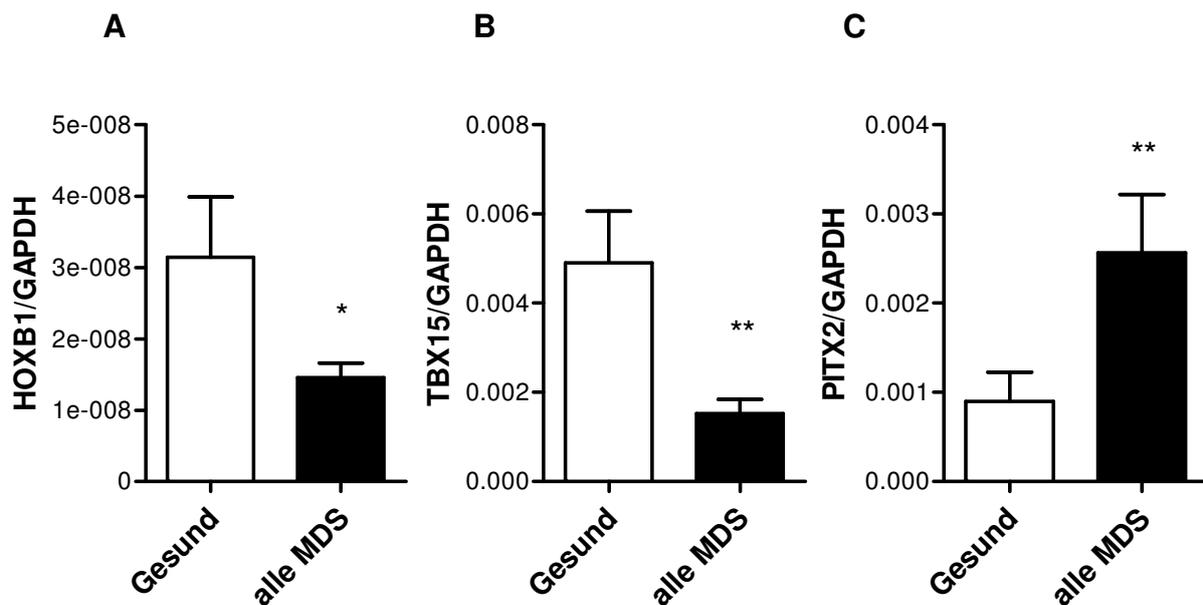


Abbildung 13: **Expression der Gene HOXB1, TBX15 und PITX2 in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Graphische Darstellung der Genexpressionsverteilung von **A** HOXB1, **B** TBX15 und **C** PITX2, quantifiziert mittels qRT-PCR Analyse, in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten. GAPDH diente hierbei als Haushaltsgen.

3.2 Differenzierungspotential von MSPZ Populationen

3.2.1 Chondrogenes Differenzierungspotential

MSPZ sind weiterhin charakterisiert durch ihr *in vitro* Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten. Um das chondrogene Differenzierungsverhalten zu überprüfen, wurden MSPZ von 4 gesunden Probanden und von 6 MDS-Patienten über einen Zeitraum von 21 Tagen in die chondrogene Richtung induziert, die Zellpellets an einem Kryostat in 6µm große Schnitte vorbereitet, um anschließend die dabei gebildete Proteoglykanschicht mit Safranin O zu färben. In Abbildung 14 ist exemplarisch die chondrogene Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und verschiedener MDS-Patienten im Vergleich dargestellt. Zusätzlich wurde die nicht induzierte Kontrolle dargestellt.

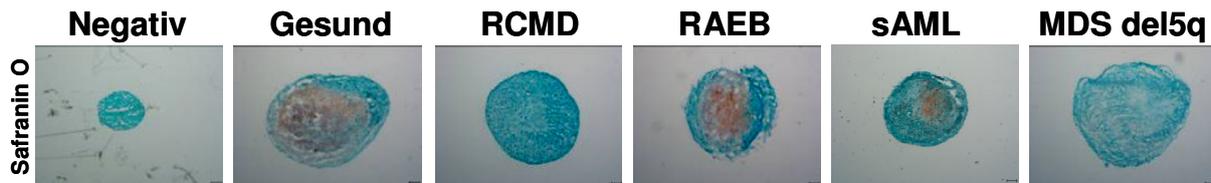


Abbildung 14: **Nachweis der chondrogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Safranin O** Mikroskopische Aufnahme (Zeiss EC Plan-Neofluar 2.5x/0.075, der Größenmaßstab entspricht 100µm) der chondrogen induzierten MSPZ, exemplarisch dargestellt von einem gesunden Probanden und MDS-Patienten in Passage 3. Die Schnitte wurden mit Safranin O gefärbt und die gebildete Proteoglykanschicht als Nachweis der Chondrogenese erscheint orange.

Das chondrogene Differenzierungspotential der MSPZ von MDS-Patienten war verglichen mit den MSPZ gesunder Probanden vermindert, zeigte jedoch Subtypenspezifische Unterschiede. Während die MSPZ Linien gesunder Probanden eine stark ausgeprägte Proteoglykanschicht ausgebildet hatten und damit nachweislich in Richtung Chondrogenese induziert werden konnten, war die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der MSPZ Linien bei MDS-Patienten mit weniger als 5% Blasten, also RCMD und MDS del5q Patienten, kaum nachweisbar. Bei den fortgeschrittenen MDS mit einem erhöhten Blastenanteil ließ sich eine chondrogene Differenzierung, wenn auch im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ebenfalls vermindert, beobachten.

3.2.2 Adipogenes Differenzierungspotential

In dieser Arbeit wurden MSPZ von 15 gesunden Probanden und von 15 MDS-Patienten (4 RCMD, 4 RAEB, 5 sAML, 2 MDS del5q) auf ihr adipogenes Differenzierungspotential hin untersucht. Die Zellen wurden bis zur Induktion im Kultivierungsmedium kultiviert und in Passage 3 für 21 Tage differenziert. Die während der Differenzierung gebildeten Fettvakuolen wurden an Tag 21 mit Oil Red O angefärbt und mikroskopisch dokumentiert.

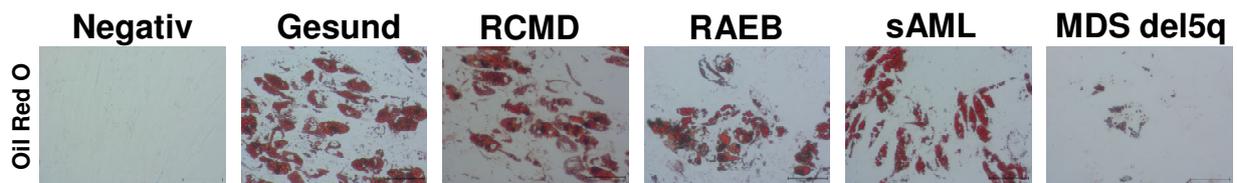


Abbildung 15: **Nachweis der adipogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Oil Red O** Mikroskopische Aufnahme (Zeiss CP-Achromat 10x Ph1, der Größenmaßstab entspricht 100µm) adipogen differenzierter MSPZ, exemplarisch dargestellt von einem gesunden Probanden und MDS-Patienten in Passage 3 nach 21 Tage Induktion. Die Fettvakuolen wurden mit Oil Red O angefärbt und erscheinen unter dem Lichtmikroskop rot.

Gesunde MSPZ zeigen *in vitro* ein starkes adipogenes Differenzierungspotential. Die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Subtypen sind in Abbildung 15 exemplarisch dargestellt. Dabei konnte insgesamt kein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung zwischen MSPZ von gesunden Probanden und MDS-Patienten beobachtet werden. Lediglich MSPZ der Gruppe MDS del5q zeigten ein vermindertes adipogenes Differenzierungspotential, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Zur Quantifizierung des adipogenen Differenzierungspotentials wurde ein Punktesystem erstellt und die Färbungsintensitäten durch eine Punktwertung vergeben (3 sehr stark differenziert, 2 mittelstark differenziert, 1 schwach differenziert, 0,5 sehr schwach differenziert, 0 nicht differenziert). Die einzelnen Gruppen wurden zu einem Mittelwert zusammengetragen und als Balkendiagramm in Abbildung 16 dargestellt.

Adipogene Differenzierung

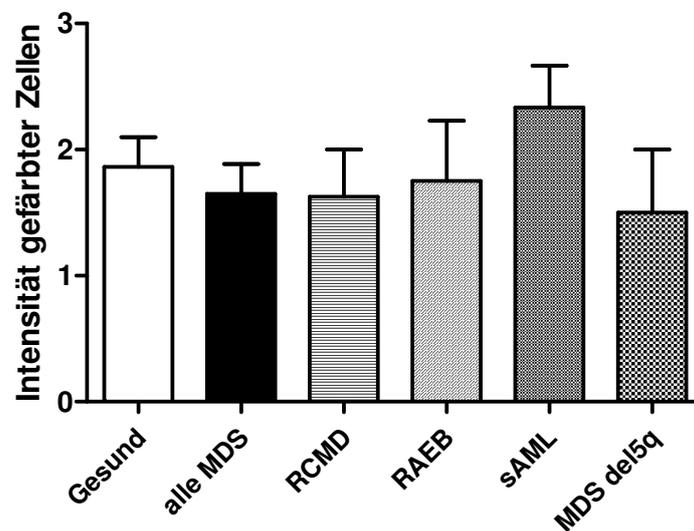


Abbildung 16: **Quantitative Auswertung der adipogenen Differenzierung** Graphische Auftragung der mikroskopisch bestimmten Intensität gefärbter Fettvakuolen nach 21 Tagen adipogener Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten.

Die quantitative Auswertung (Abbildung 16) der Intensität mit Oil Red O gefärbten Fettvakuolen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des adipogenen Differenzierungspotentials zwischen MSPZ von gesunden Probanden und MDS-Patienten.

3.2.3 Osteogenes Differenzierungspotential

Für die osteogene Differenzierung wurden insgesamt MSPZ von 15 gesunden Probanden und MSPZ von 15 MDS-Patienten (4 RCMD, 4 RAEB, 5 sAML, 2 MDS del5q) untersucht. Die Zellen wurden für 14 Tage induziert und die Kalzifizierung bzw. die osteogene Differenzierungsfähigkeit durch Alizarin Red und van Kossa Färbung sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) nachgewiesen.

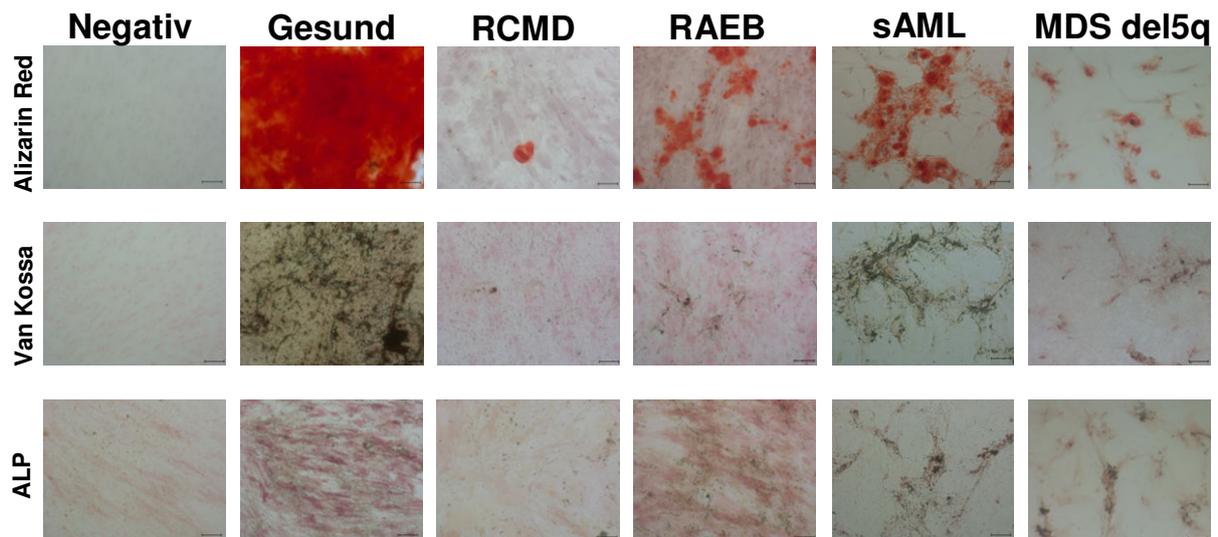


Abbildung 17: **Nachweis der osteogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Alizarin Red, van Kossa und Nachweis der ALP**
 Mikroskopische Aufnahme (Zeiss CP-Achromat 5x Ph0, der Größenmaßstab entspricht 100µm) des Nachweis kalzifizierter Zellen nach 14 Tagen osteogenen Differenzierung durch Alizarin Red und van Kossa sowie Nachweis der ALP Aktivität, exemplarisch dargestellt von MSPZ aus gesunden Probanden und MDS-Patienten in Passage 3.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der einzelnen Färbungen sind in Abbildung 17 dargestellt und zeigen einen makroskopisch sichtbaren Unterschied der Intensität gefärbter Areale zwischen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten. Zur genaueren Analyse der makroskopischen Beobachtungen wurde hierfür auch eine Quantifizierung mittels des für die Auswertung der adipogenen Differenzierung verwendeten Punktwertesystems durchgeführt. Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. Hierbei zeigte sich, dass die osteogene Differenzierungskapazität über alle MDS-Subtypen hinweg signifikant vermindert war.

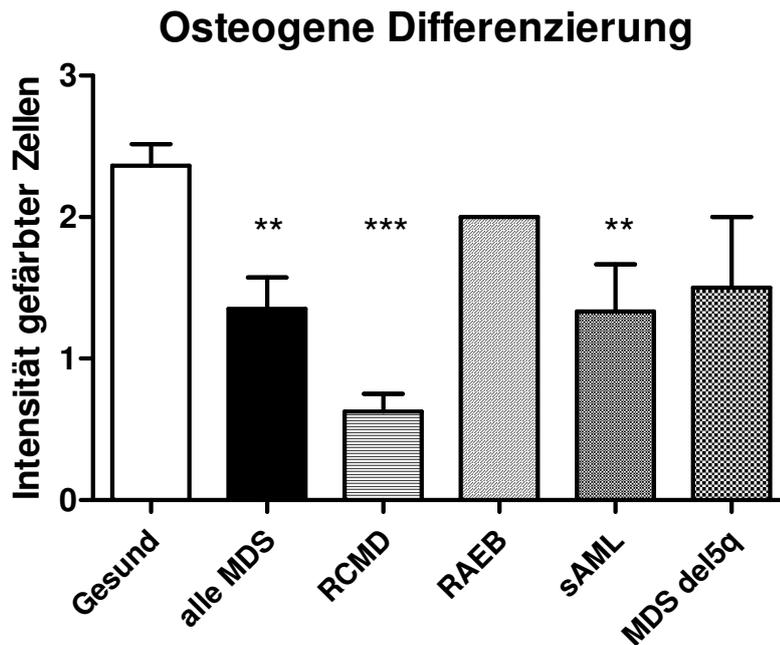


Abbildung 18: **Quantitative Auswertung der osteogenen Differenzierung** Graphische Auftragung des osteogenen Differenzierungspotentials von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten durch die Intensität gefärbter Zellen unter Verwendung des unter 3.2.2 beschriebenen Punktwertsystems als Säulendiagramm.

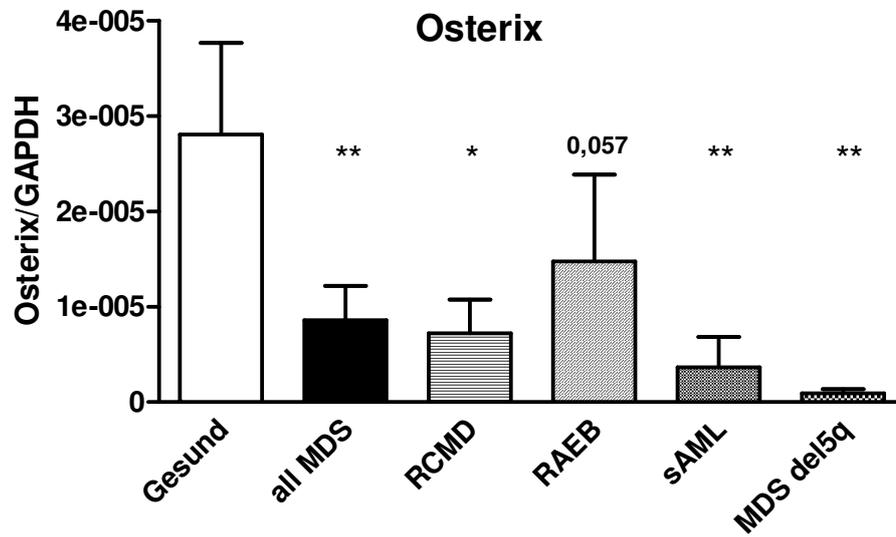
3.2.3.1 Expression osteogener Marker in nativen und osteogen differenzierten MSPZ von MDS-Patienten

Aufgrund der beobachteten verminderten osteogenen Differenzierungsfähigkeit der MSPZ von MDS-Patienten wurde im nächsten Schritt Osterix als Marker für die zeitlich betrachtet frühe Osteogenese (für die Differenzierung in einen frühen Osteoblasten) und Osteocalcin als Marker für die Osteoblasten-Funktion oder spätere Osteogenese mittels qRT-PCR und auf Proteinebene untersucht.

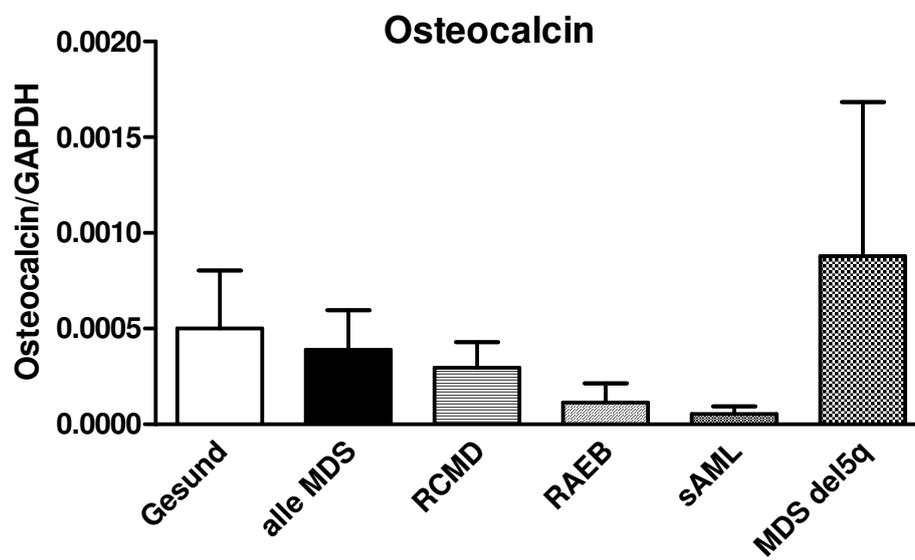
Dies erfolgte einerseits an nativen, also nicht osteogen induzierten MSPZ (MSPZ von 12 gesunden Probanden und 25 MDS-Patienten: 9 RCMD, 7 RAEB, 5 sAML, 4 MDS del5q), andererseits auch an MSPZ während der osteogenen Differenzierung über einen Zeitraum von 14 Tagen an unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten in verschiedenen MDS-Subtypen (MSPZ von 6 gesunden Probanden, 9 MDS-Patienten). Die Abbildung 19 zeigt die unterschiedliche Verteilung der osteogenen Marker auf mRNA Ebene in den nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-

Patienten sowie die Osteocalcinkonzentration im Serum einer unabhängigen Gruppe von gesunden Probanden und MDS-Patienten.

A



B



C

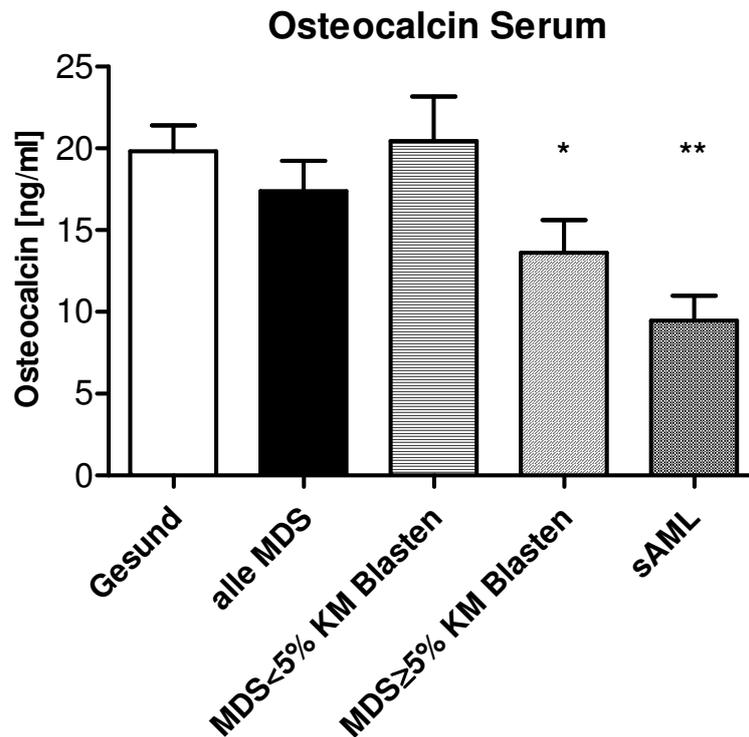


Abbildung 19: **Expression der osteogenen Marker Osterix, Osteocalcin in nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Graphische Darstellung der relativen Genexpression **A** des frühen osteogenen Markers Osterix und **B** den für die Osteogenese späteren Marker Osteocalcin in Relation zu dem Haushaltsgen GAPDH, quantifiziert durch qRT-PCR, in nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten in Passage 3. **C** Messung der Osteocalcinkonzentration im Serum von gesunden Probanden und MDS-Patienten mittels einem Osteocalcin ELISA.

Osterix war korrelierend zu dem unter Abbildung 17 und 18 verminderten osteogenen Differenzierungspotentials in nativen MSPZ aus MDS-Patienten über die Subtypen hinweg stark vermindert (Abbildung 19A).

Die Expression von Osteocalcin war in nativen MSPZ bei MDS-Patienten mit einem zunehmenden Blastenanteil, im Trend bereits erniedrigt. Interessanterweise zeigten MSPZ aus MDS del5q Patienten eine stark erhöhte Expression von Osteocalcin gegenüber den MSPZ von gesunden Probanden (Abbildung 19B). Die Messung der Osteocalcinkonzentration im Serum (Abbildung 19C) zeigte im Vergleich zu den 8 untersuchten gesunden Probanden eine signifikante Erniedrigung im Serum der MDS-Patienten mit >5% KM Blasten und von Patienten mit einer sAML (alle MDS: 20, MDS <5% KM Blasten: 11, MDS >5% KM Blasten: 9, sAML:5), korrelierend zu

dem im Trend beobachteten, verminderten Expression von Osteocalcin auf mRNA Ebene (Abbildung 19B).

Korrelierend zu den Ergebnissen durch Färbungsnachweise nach der 14-tägigen osteogenen Induktion zeigten die MSPZ von MDS-Patienten ein deutlich geringeres Level von Osterix über alle Zeitpunkte während der Differenzierung gegenüber den MSPZ von gesunden Probanden (Abbildung 20A). Ebenso die Expression von Osteocalcin war an einzelnen Zeitpunkten während der Differenzierung signifikant verringert in MSPZ von MDS-Patienten (Abbildung 20B).

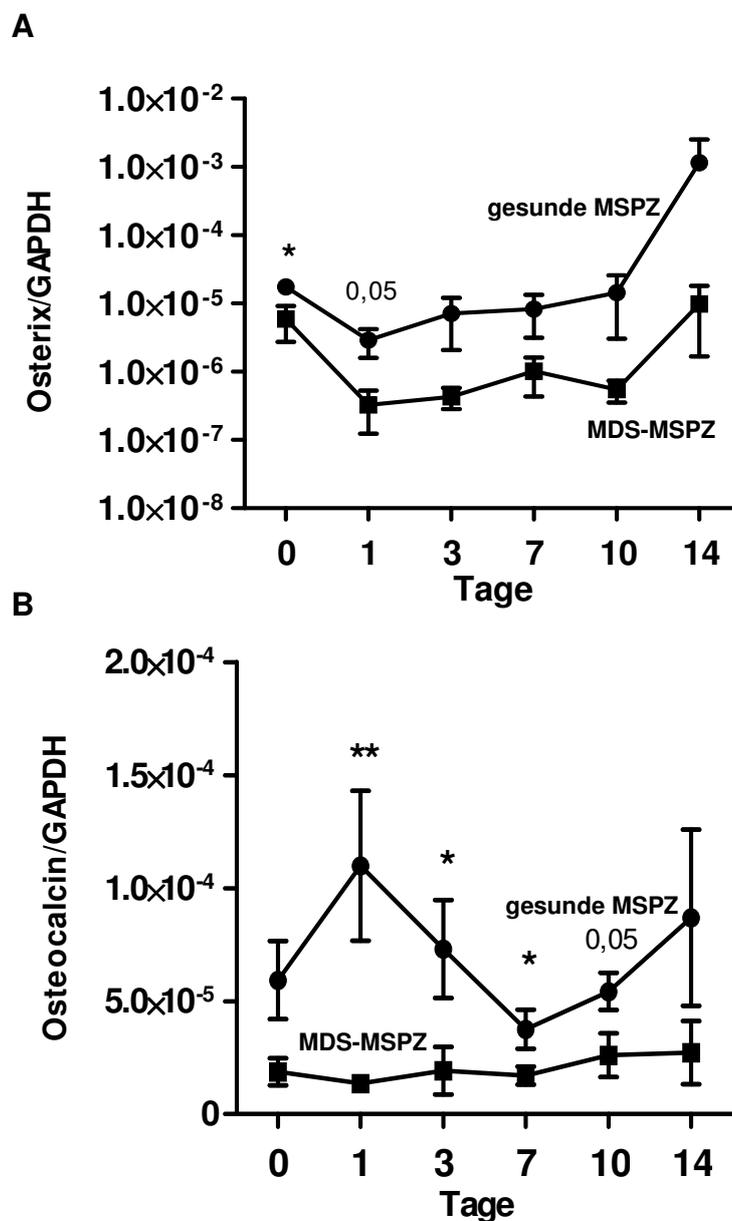


Abbildung 20: **Expression der osteogenen Marker Osterix und Osteocalcin während der osteogenen Differenzierung** Graphische Auftragung der Expressionslevel von **A** Osterix und **B** Osteocalcin, durch qRT-PCR quantifiziert, während der osteogenen Differenzierung

von MSPZ aus gesunden Probanden und MDS-Patienten in Passage 3 über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Expression der Marker wurde mittels qRT-PCR nach Tag 0, 1, 3, 7, 10 und 14 untersucht. GAPDH diente als Referenzkontrolle.

3.3 Expression von Dicer1 und des Shwachman Bodian Diamond Syndrome (SBDS) Gens in MSPZ

Die Gruppen um Santamaria et al. und Raaijmakers et al. beschrieben in ihren *in vitro* und *in vivo* Experimenten sowohl im Mausmodell als auch bei MDS-Patienten den Einfluss der erniedrigten Dicer1 Expression in osteogenen MSPZ Vorläuferzellen und die damit einhergehende Erniedrigung des SBDS Gens mit dem Resultat einer Verminderung der Zahl und Größe der Osteoblasten sowie eine verringerte Mineralisierungsfähigkeit. Die unter 3.2.3 beschriebenen Ergebnisse zeigten eine verminderte osteogene Differenzierungsfähigkeit der MDS-MSPZ und die damit einhergehende verringerte Expression osteogener Marker während der Induktion. Daher wurde die Expression von Dicer1 und des SBDS Gens in nativen MSPZ aus gesunden Probanden und von MDS-Patienten untersucht. Insgesamt wurden MSPZ von 15 gesunden Probanden und von 18 MDS-Patienten (10 RCMD, 4 RAEB, 3 sAML, 1 MDS del5q) auf die Expression von Dicer1 und des SBDS Gens durch qRT-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in der Abbildung 21 als Säulendiagramme zusammengefasst.

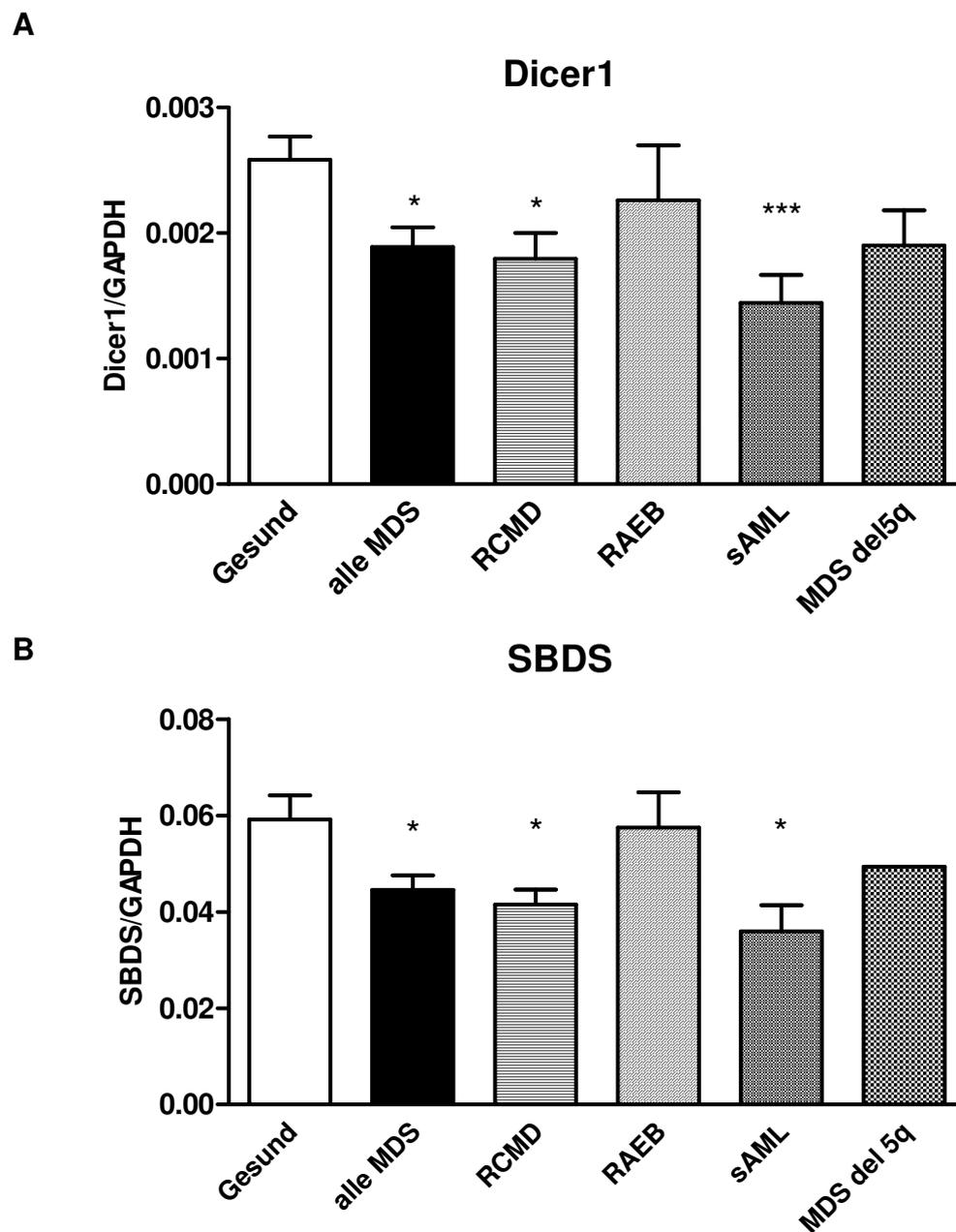


Abbildung 21: **Expression von Dicer1 und des SBDS Gens in nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Relative Genexpression von **A** Dicer1 und **B** des SBDS Gens, durch qRT-PCR quantifiziert, bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH in MSPZ von gesunden Probanden und MDS-Patienten in Passage 3 im Vergleich.

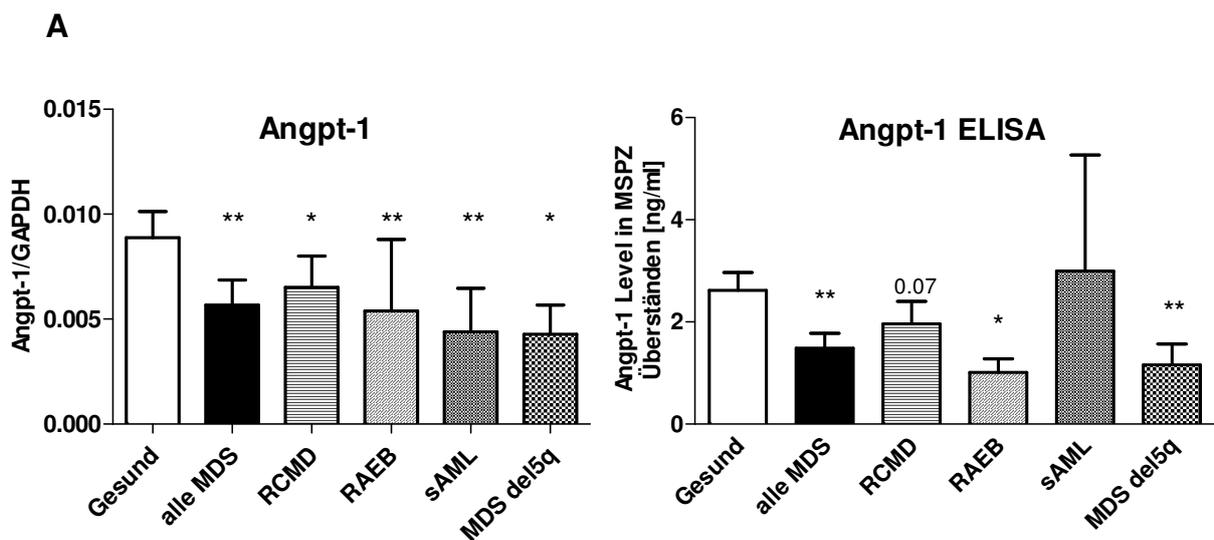
Die Expression von Dicer1 (Abbildung 21A) war über die einzelnen MDS-Subtypen hinweg verringert. Für MSPZ der Subtypen RCMD und sAML war dies sogar statistisch signifikant. Parallel zu den Ergebnissen bezüglich der Dicer1 Expression,

zeigte sich in den gleichen MDS-Subtypen ebenso eine signifikante Expression des SBDS Gens (Abbildung 21B).

3.4 Interaktionsmöglichkeiten zwischen MSPZ und CD34⁺ HSPZ

3.4.1 Zytokin-Expression von MSPZ

MSPZ und CD34⁺ HSPZ stehen in direkter Interaktion durch Ligand-Rezeptor Bindungen. Diese Interaktionen sind für die Regulation der CD34⁺ HSPZ hinsichtlich Selbsterneuerung, Differenzierung, Proliferation und Migration von entscheidender Bedeutung. Die MSPZ bieten für diese Interaktion verschiedene Liganden an, welche mittels qRT-PCR in MSPZ von gesunden Probanden im Vergleich zu MSPZ aus MDS-Patienten untersucht wurden.



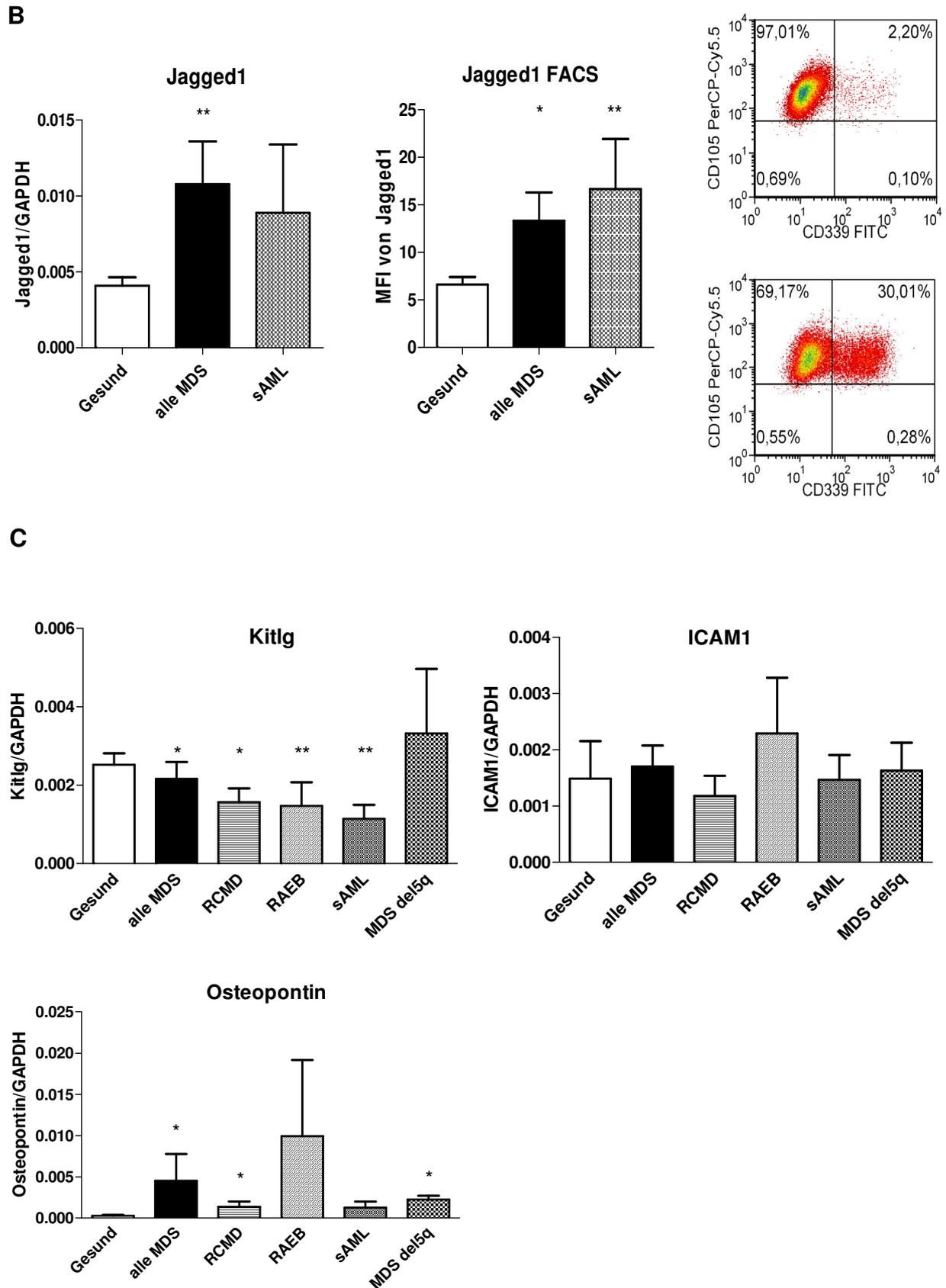


Abbildung 22: Expression von Signalmolekülen/ Zytokinen in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten A Graphische Auftragung des Expressionslevel von Angpt-1 auf mRNA Ebene, durch qRT-PCR quantifiziert (21 Gesund MSPZ, 26 MDS-MSPZ) sowie

die Validierung der PCR Ergebnisse auf Proteinebene mittels einem Angpt-1 ELISA von MSPZ Überständen gesunder Probanden und MDS-Patienten. **B** Relative Genexpression von Jagged1 auf mRNA Ebene (23 Gesund MSPZ, 22 MDS-MSPZ) und die Messung von Jagged1 als Oberflächenantigen mittels durchflusszytometrischer Analysen von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten (29 Gesund MSPZ, 23 MDS-MSPZ). **C** Relative Genexpression von Kitlg (21 Gesund MSPZ, 27 MDS-MSPZ), ICAM und Osteopontin in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten. GAPDH diente bei den qRT-PCR Analysen als Referenzgen. Für die qRT-PCR, ELISA und FACS Analysen wurden MSPZ in Passage 3 untersucht.

In den Untersuchungen auf mRNA Ebene wurde ein über die MDS-Subtypen hinweg signifikant erniedrigtes Expressionsniveau von Angpt-1 beobachtet (Abbildung 22A). Ebenso war Kitlg, auch bekannt als Stem Cell Factor (SCF), im Vergleich zu MSPZ aus gesunden Probanden bei MSPZ von MDS-Patienten signifikant erniedrigt (Abbildung 22C).

Weiterhin war die Expression von Osteopontin über die MDS-Subtypen hinweg, zum Teil signifikant erhöht (Abbildung 22C). Ebenso war die Expression von Jagged1 über die MDS-Subtypen hinweg signifikant erhöht (Abbildung 22B). Bei der Untersuchung von ICAM konnten keine Unterschiede zwischen MSPZ von gesunden Probanden und MSPZ von MDS-Patienten beobachtet werden (Abbildung 22C)

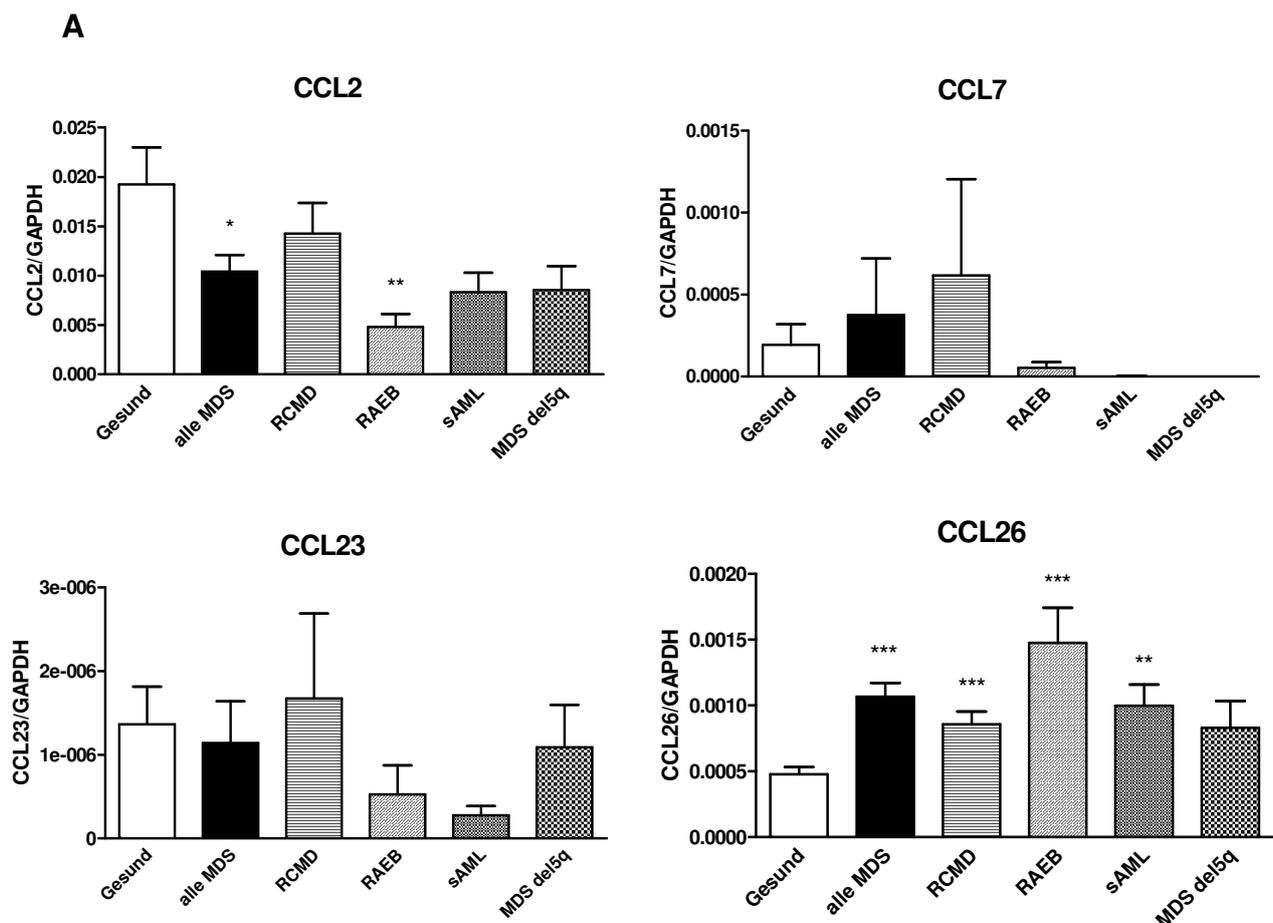
Zur Bestätigung der PCR-Daten wurde als nächstes Angpt-1 in den Überständen von MSPZ auf Proteinebene mittels ELISA untersucht. Insgesamt wurden MSPZ von 9 gesunden Probanden und von 18 MDS-Patienten (7 RCMD, 6 RAEB, 2 sAML, 3 MDS del5q) untersucht. Hierbei fand sich eine signifikant erniedrigte Angpt-1 Konzentration in den MSPZ Überständen der MDS-Patienten wie in Abbildung 22A dargestellt. Bei der Interpretation der Konzentration und der dazugehörigen Standardabweichung bei den sAML Proben ist die geringe Probenanzahl von 2 zu berücksichtigen.

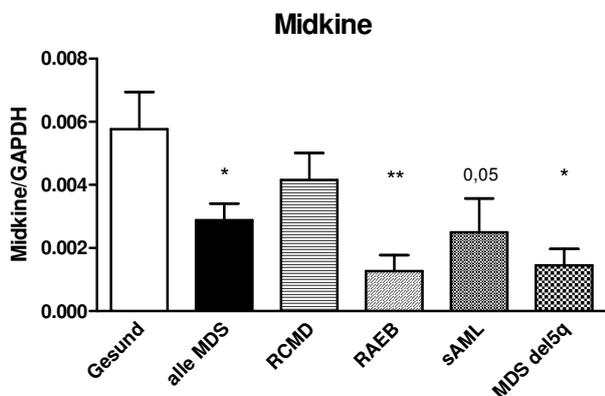
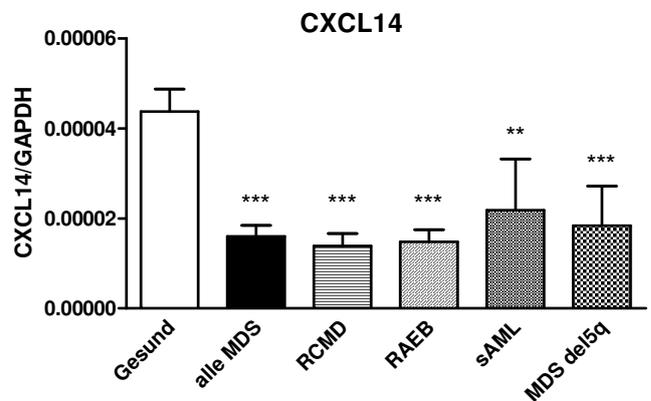
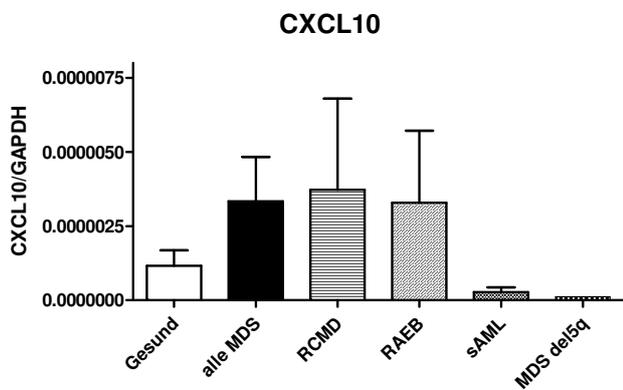
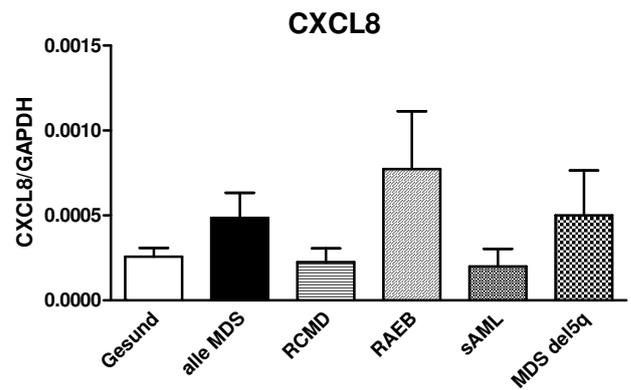
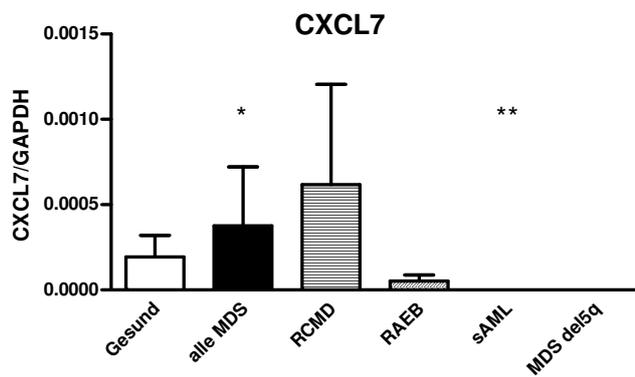
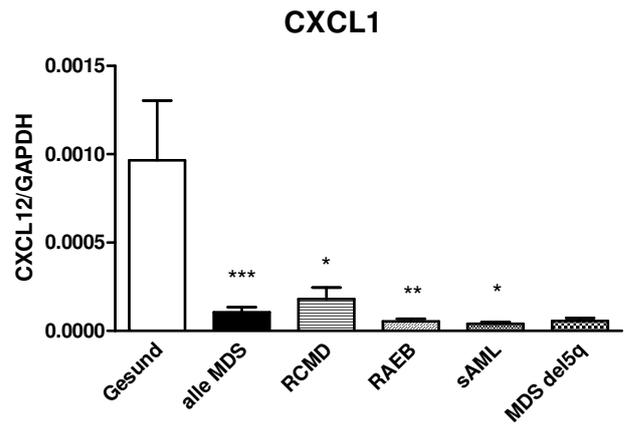
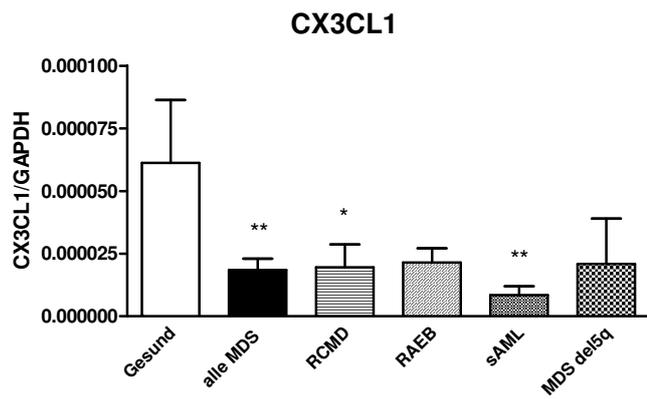
3.4.2 Chemokin-Expression von MSPZ

MSPZ exprimieren eine Reihe verschiedener Chemokine, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung zu hämatopoietischen Stammzellen für Migration und Adhäsion spielen.

Zunächst wurde mittels eines Proteome Profilers (R & D Systems) ein Screening auf verschiedene Chemokine durchgeführt (Abbildung I, siehe Anhang). Darauf folgend wurde auf mRNA Ebene die Expression von weiteren Chemokinen in MSPZ von gesunden Probanden im Vergleich zu MDS-Patienten untersucht.

Folgende Chemokine wurden auf mRNA Ebene in MSPZ von 26 gesunden Probanden und von 36 MDS-Patienten untersucht: CCL2, CCL7, CCL23, CCL26, CX3CL1, CXCL1, CXCL7, CXCL8, CXCL10, CXCL14, Midkine und CXCL12.





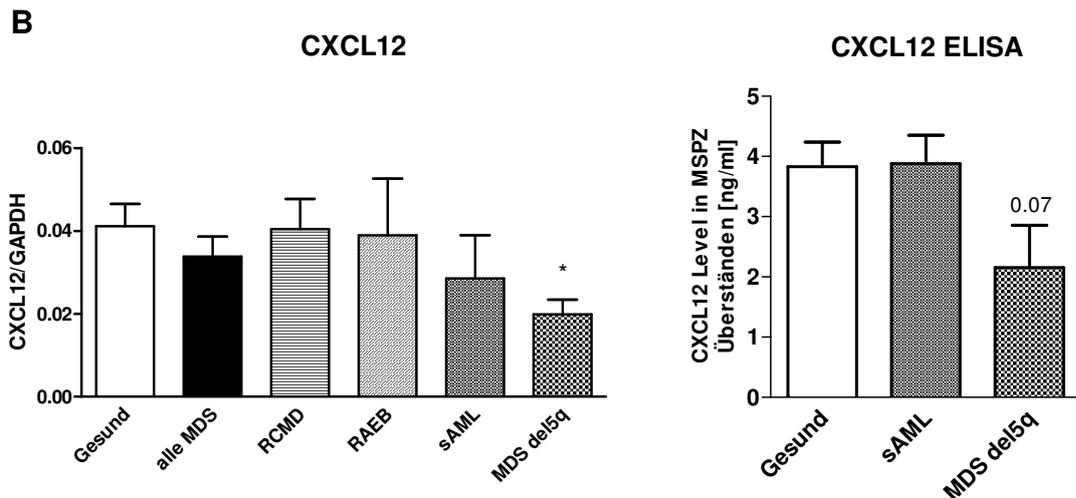


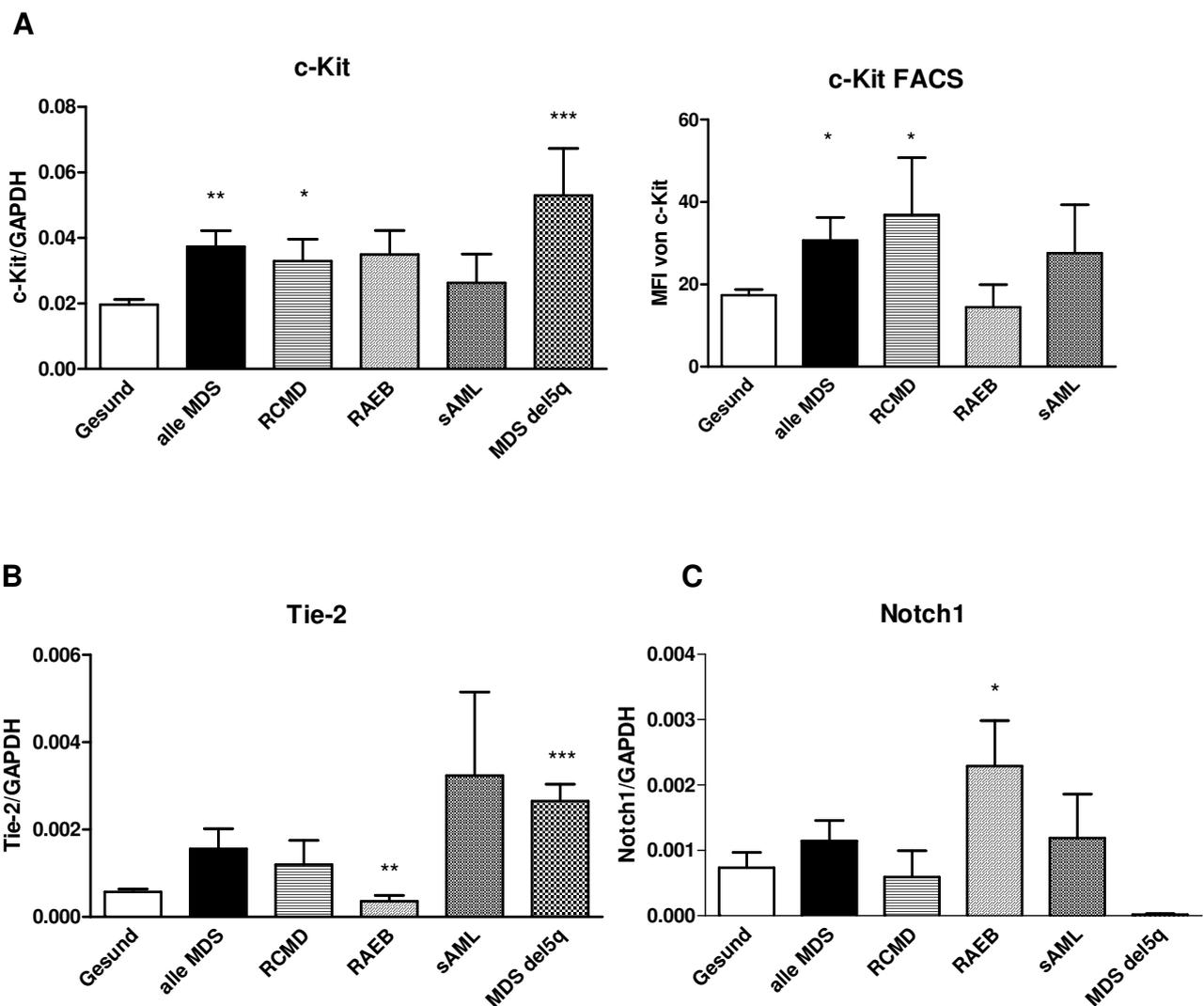
Abbildung 23: **Expression von Chemokinen in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** **A** Graphische Auftragung des Expressionslevel auf mRNA Ebene, durch qRT-PCR quantifiziert von CCL2, CCL7, CCL23, CCL26, CX3CL1, CXCL1, CXCL7, CXCL8, CXCL10, CXCL14 und Midkine bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH, bestimmt in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten in Passage 3 **B** Graphische Auftragung des Expressionslevel von CXCL12 auf mRNA Ebene, durch qRT-PCR quantifiziert sowie die Validierung der PCR Ergebnisse auf Proteinebene mittels einem CXCL12 ELISA von MSPZ Überständen von 19 gesunden Probanden und von 5 MDS del 5q Patienten und von 10 sAML Patienten in Passage 3.

In den qRT-PCR Untersuchungen zeigte sich eine starke Verschiebung des Chemokin Expressionsprofil in der Gesamtheit der MDS-MSPZ sowie bei der Betrachtung der einzelnen Subtypen im Vergleich zu MSPZ gesunder Probanden. Die Expression von 5 Chemokinen in MDS-MSPZ war zum Teil hoch signifikant vermindert (CCL2, CX3CL1, CXCL1, CXCL14, Midkine), während die Expression von CCL26 und CXCL7 in MDS-MSPZ signifikant erhöht war (Abbildung 23). Für CXCL8 und CXCL10 zeigten sich in diesen Analysen keine signifikanten Unterschiede zwischen MSPZ aus gesunden Probanden und MDS-Patienten. Die signifikant erniedrigte Expression von CXCL12 in den MSPZ von Patienten mit einem MDS mit isoliertem del5q in der qRT-PCR, spiegelte sich im Trend auch in der im ELISA gemessenen erniedrigten CXCL12 Konzentration in MSPZ Überständen wieder (Abbildung 23B).

3.4.3 Zytokin-Expression korrespondierender Rezeptormoleküle von CD34⁺ HSPZ

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, exprimieren MSPZ eine Reihe verschiedener Liganden für die wechselseitige Beziehung zu den HSPZ. Korrelierend dazu exprimieren die CD34⁺ HSPZ die entsprechenden Rezeptormoleküle. Einige, ausgewählte Rezeptormoleküle wurden im Folgenden auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR untersucht.

Insgesamt wurden CD34⁺ HSPZ von 22 gesunden Probanden und CD34⁺ HSPZ von 23 MDS-Patienten auf die Expression der Rezeptormoleküle c-Kit, Tie-2, Notch1 und LFA-1 auf mRNA in der qRT-PCR untersucht.



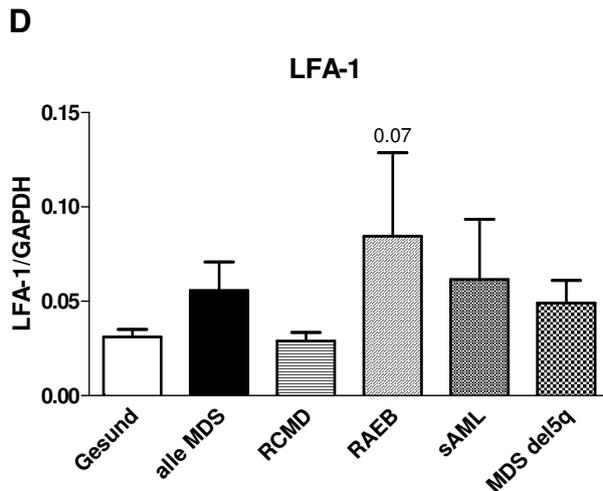


Abbildung 24: **Expression von korrespondierenden Rezeptorsignalmolekülen/ -zytokinen in CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** **A** Graphische Auftragung des Expressionslevel von c-Kit auf mRNA Ebene, durch qRT-PCR quantifiziert sowie die Validierung der PCR Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie sowie das Expressionslevel von **B** Tie-2, **C** Notch1 und **D** LFA-1 auf mRNA Ebene, durch qRT-PCR quantifiziert in CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten. GAPDH diente als Referenzgen.

Vergleichend zu den in Abbildung 22 dargestellten PCR Ergebnissen auf MSPZ konnte hier beobachtet werden, dass parallel zu der erniedrigten Expression von Angpt-1 in MDS-MSPZ die Expression des Rezeptor Tie-2 auf den CD34⁺ HSPZ der MDS-Patienten teilweise stark erhöht war (Abbildung 24**B**). Vergleichbare Ergebnisse konnten bei dem Rezeptorpartner für Kitlg, c-Kit (Abbildung 24**A**) beobachtet werden. Bei beiden fand sich eine erhöhte Expression in CD34⁺ HSPZ bei MDS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden. Die erhöhte c-Kit Expression in RCMD Patienten konnte durch FACS Analysen bestätigt werden (Abbildung 24**A**). Bei der Untersuchung von Notch1, dem Rezeptor für Jagged1, zeigte sich ein gleiches Expressionsmuster wie bei der Ligandexpression auf der MSPZ Seite (Abbildung 24**C**). Die Expressionsverteilung von ICAM1 und dem Rezeptor LFA-1 zeigte weder in MDS-MSPZ, noch in MDS CD34⁺ HSPZ relevante Unterschiede zu den gesunden Probanden (Abbildung 24**D**).

3.4.4 Chemokin-Expression des korrespondierenden Rezeptormoleküls CXCR4 in CD34⁺ HSPZ

Die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 ist in der Literatur weitestgehend beschrieben als eine bedeutende Achse in der Knochenmarknische für Adhäsion, Migration und Selbsterneuerung von CD34⁺ HSPZ. Dabei exprimieren die CD34⁺ HSPZ den Rezeptor CXCR4. Insgesamt wurden CD34⁺ HSPZ von 22 gesunden Probanden und von 34 MDS-Patienten (11 RCMD, 12 RAEB, 6 sAML, 5 MDS del5q) mit Hilfe von qRT-PCR und/oder durchflusszytometrischen Analysen auf die Expression von CXCR4 untersucht.

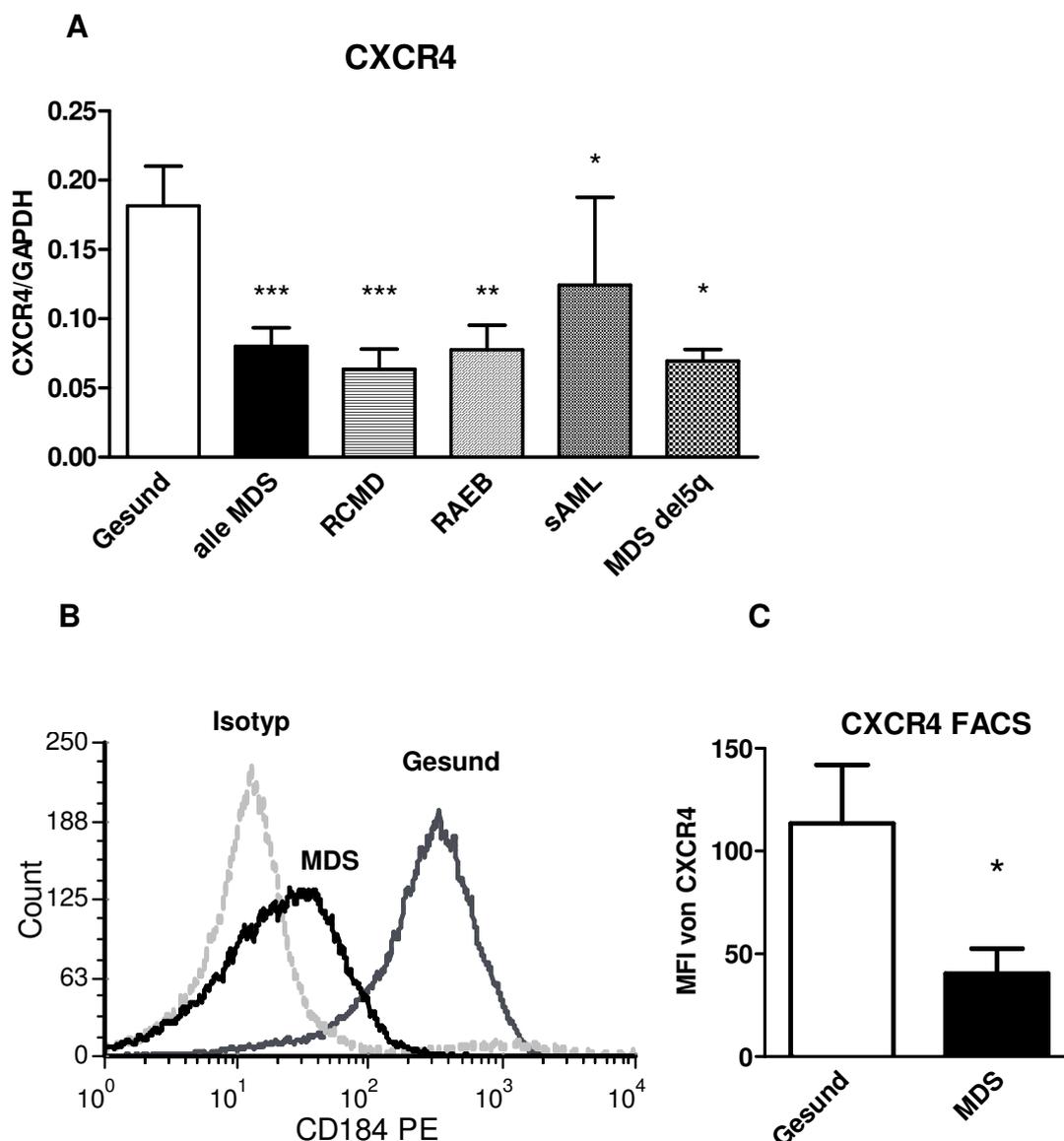


Abbildung 25: Expression des korrespondierenden Rezeptor-Chemokin CXCR4 in CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten A Darstellung der relativen Genexpression von CXCR4 (CD184) von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-

Patienten bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH. **B** Beispielhafte Darstellung der im FACS ermittelten MFI von CD34⁺ HSPZ von einem gesunden Probanden und einem MDS-Patienten und **C** die graphische Auftragung der im FACS ermittelten MFI aller untersuchten CD34⁺ HSPZ von gesunden und MDS-Patienten.

Bei den Untersuchungen der Expression von CXCR4 in der qRT-PCR konnte ein signifikant erniedrigtes CXCR4 Level in allen MDS-Subtypen beobachtet werden (Abbildung 25A). Um die PCR Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Verteilung von CXCR4 in CD34⁺ HSPZ in FACS Analysen untersucht. In Abbildung 25B ist die Verteilung von CXCR4 beispielhaft von einem gesunden Probanden und einem MDS-Patienten dargestellt. Die dabei ermittelte MFI (Mean Fluorescence Intensity), war bei den MDS-Patienten signifikant verringert ($p=0,03$, Abbildung 25C).

3.5 Migrationsfähigkeit von CD34⁺ HSPZ

Infolge des erniedrigten Levels von CXCR4 durch qRT-PCR und FACS Analysen (unter 3.4.4 beschrieben), wurde ein Migrationsversuch durchgeführt. Dafür wurden CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden und MDS-Patienten in einem Transwell-System für 3 Stunden inkubiert, wobei sich in der unteren Kammer ein SDF-1 α Gradient befand. Anschließend wurde die Anzahl an migrierten Zellen im FACS ausgezählt. Für den Migrationsversuch wurden CD34⁺ HSPZ von 4 gesunden Probanden und von 6 MDS-Patienten eingesetzt.

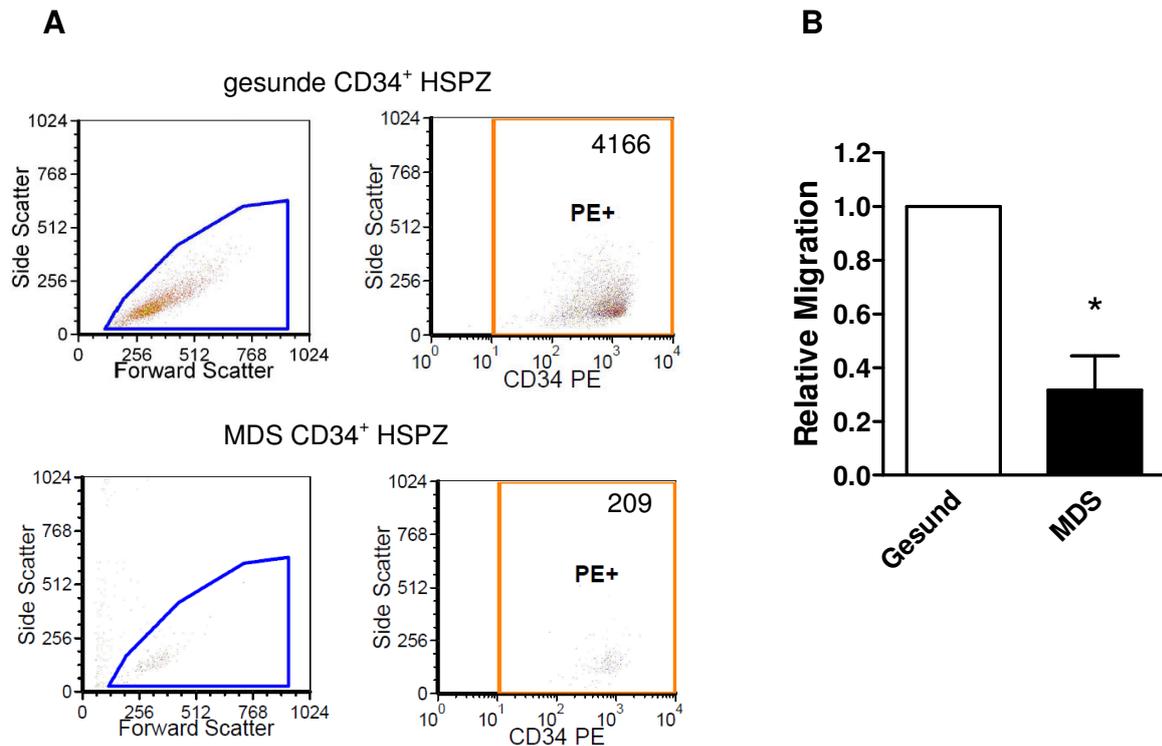


Abbildung 26: **Migrationsfähigkeit von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** **A** Exemplarische Darstellung der im FACS gezählten migrierten CD34⁺ HSPZ von einem gesunden Probanden und einem MDS-Patienten und **B** Graphische Darstellung des prozentualen Anteils migrierter CD34⁺ HSPZ der untersuchten gesunden Probanden und MDS-Patienten.

Die durchflusszytometrische Auswertung migrierter CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden und von MDS-Patienten nach 3 Stunden gegen SDF-1 α zeigte eine wie exemplarisch in Abbildung 26A dargestellt, verminderte Migrationsfähigkeit bei den MDS-Patienten (209 migrierte Zellen) im Vergleich zu gesunden Probanden (4166 migrierte Zellen) und konnte als signifikant vermindert ($p=0,01$) durch die graphische Auftragung des prozentualen Anteils migrierter Zellen von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden im Vergleich zu MDS-Patienten als Balkendiagramm illustriert werden (Abbildung 26B).

3.6 Long Term Culture- Initiating Cell (LTC-IC) Assay

Um den Einfluss der MSPZ als feeder layer auf CD34⁺ HSPZ *in vitro* zu untersuchen, wurde ein LTC-IC Assay durchgeführt. Der LTC-IC Assay ermöglicht *in vitro* die Rekonstitution der „long-term multilineage“ Hämatopoiese auf mit γ Strahlen

behandelten feeder layer. Dabei wird die Entwicklungsfähigkeit zur Koloniebildung von myeloischen und lymphatischen Effektorzellen untersucht. Dieser Assay verläuft über einen Zeitraum von insgesamt 7 Wochen, wobei hämatopoietische Progenitoren sich dadurch charakterisieren, dass sie die Fähigkeit haben, aus den primären Kolonien innerhalb dieses Zeitraumes sekundäre Kolonien hervorzubringen. Determinierte Vorläuferzellen werden mit Hilfe dieses Versuchs hervorgebracht, etwa wie die frühen myeloischen Progenitoren. In diesem Rahmen wurden verschiedene Fragestellungen untersucht. Zum einen wurden gesunde $CD34^+$ HSPZ auf MDS-MSPZ feeder layer kultiviert, als Kontrolle dienten hierbei gesunde $CD34^+$ HSPZ auf gesundem MSPZ feeder layer. Hiermit sollte die primäre Stammzellunterstützung durch die MDS-MSPZ untersucht werden. Zum Anderen wurde untersucht, inwiefern der Kontakt mit gesunden MSPZ die ineffektive Hämatopoiese der MDS $CD34^+$ HSPZ wieder aufheben kann (Abbildung 27).

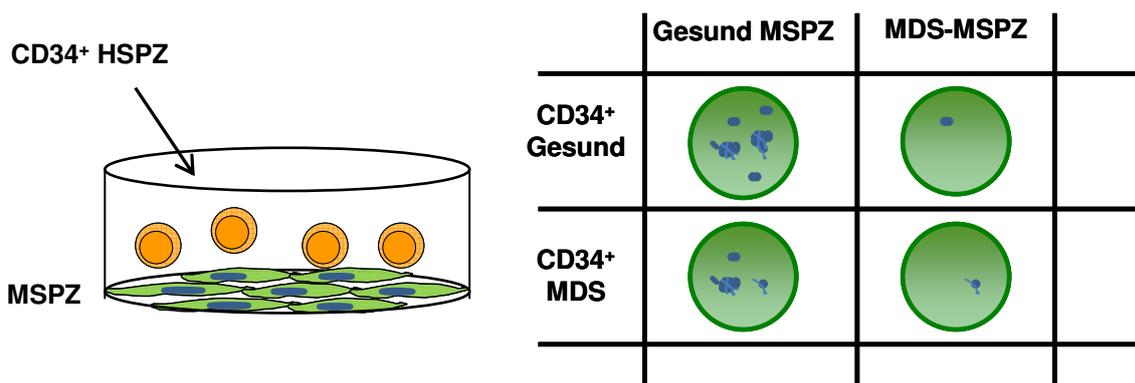


Abbildung 27: **LTC-IC Versuchsaufbau** Schematische Darstellung des LTC-IC Versuchsaufbaus. Gesunde $CD34^+$ HSPZ wurden auf gesunden und parallel auf MDS-MSPZ feeder layer kultiviert. Weiterhin wurden MDS $CD34^+$ HSPZ auf gesunden und MDS-MSPZ feeder layer kultiviert. Für den LTC-IC Ansatz wurden MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten in Passage 3 verwendet.

Für den LTC-IC Ansatz wurden $CD34^+$ HSPZ von 11 gesunden Probanden auf MSPZ feeder layer von 5 gesunden Probanden und parallel auf MSPZ feeder layer von 19 MDS-Patienten kultiviert (Abbildung 28A).

Umgekehrt wurden $CD34^+$ HSPZ von 6 MDS-Patienten paarweise auf MSPZ feeder layer 9 gesunder Probanden und von 9 MDS-Patienten kultiviert und die LTC-IC Frequenz ermittelt, um die Fähigkeit der Stromaaunterstützung (*engl.* Stromasupport)

für die Hämatopoiese von gesundem und MDS-MSPZ feeder layer auf MDS CD34⁺ Stammzellen zu untersuchen (Abbildung 28B).

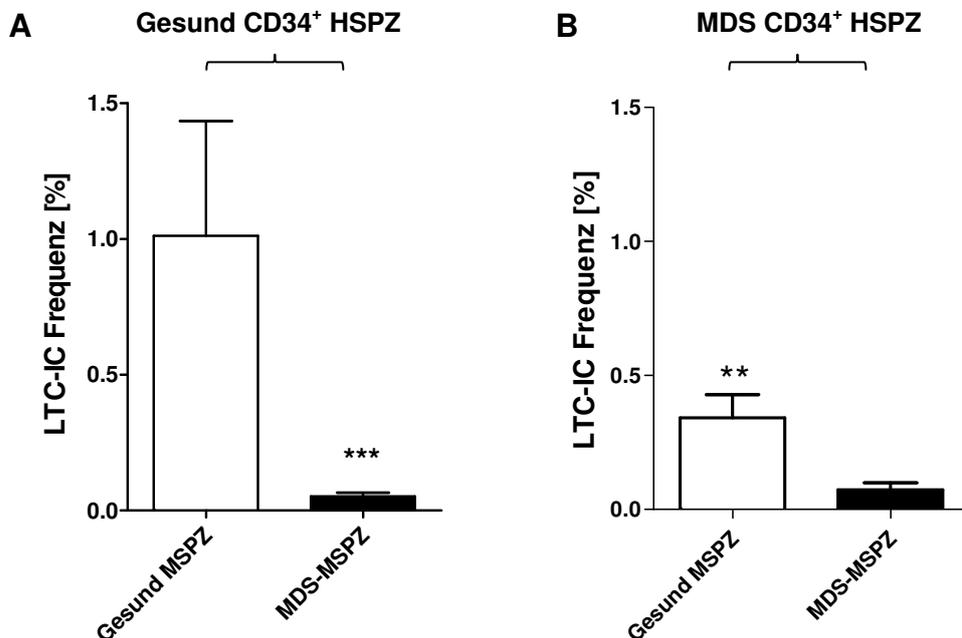


Abbildung 28: **Stammzellunterstützung - LTC-IC Frequenz** Graphische Auftragung der LTC-IC Frequenz von **A** gesunden CD34⁺ HSPZ auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden und MDS-Patienten sowie **B** MDS CD34⁺ HSPZ auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden und MDS-Patienten nach 7 Wochen Ko-Kultur entsprechend des in Abbildung 27 gezeigten Versuchsaufbau.

Abbildung 28 zeigt ein signifikant verminderten Stromasupport von MDS-MSPZ auf gesunde CD34⁺ HSPZ nach 7 Wochen der Ko-Kultivierung (LTC-IC Frequenz: 0,05%) im Vergleich zu auf gesunden MSPZ (LTC-IC Frequenz: 1%, $p=0,0001$) feeder layer kultivierte gesunde CD34⁺ HSPZ (Abbildung 28A).

Bei einer Ko-Kultivierung von MDS CD34⁺ HSPZ auf MDS-MSPZ feeder layer (Abbildung 28B), zeigte sich auch hierbei eine deutlich verminderte Unterstützung auf die CD34⁺ HSPZ, vergleichbar mit dem Stromasupport für gesunde CD34⁺ HSPZ (siehe Abbildung 28A). Die Kultivierung der gleichen MDS CD34⁺ HSPZ auf gesunden MSPZ feeder layer zeigte eine Erholung der LTC-IC Frequenz auf 0,34% (entspricht 21,3%) (Abbildung 28B). Auch wenn dies nur eine partielle Wiederherstellung der LTC-IC Frequenz darstellt, deutet es doch darauf hin, dass das Stroma substantiell zur insuffizienten Hämatopoiese beim MDS beiträgt.

Zusätzlich wurde die stromale Unterstützung von MDS-Patienten vor allogener Stammzelltransplantation (allo-SZT) und MDS-Patienten, die sich nach einer allo-SZT in einem Zustand der vollständigen Remission befanden auf gesunde CD34⁺ HSPZ untersucht. Hierfür wurden unbehandelte MDS-MSPZ von 19 MDS-Patienten vor allo-SZT und MDS-MSPZ von 5 MDS-Patienten nach allo-SZT verglichen.

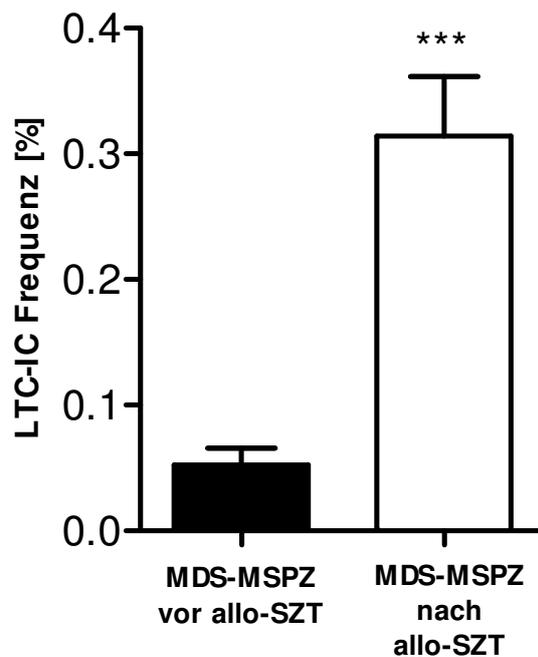


Abbildung 29: **Stammzellunterstützung - LTC-IC Frequenz der Ko-Kultur von gesunden CD34⁺ HSPZ mit MSPZ von MDS-Patienten vor und nach allo-SZT** Graphische Darstellung der LTC-IC Frequenz von gesunden CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ aus unbehandelten MDS-Patienten (vor allo-SZT) im Vergleich zu der LTC-IC Frequenz von MSPZ von MDS-Patienten nach allo-SZT, die sich in einer vollständigen Remission befanden nach 7 Wochen Ko-Kultur.

Eine signifikant erhöhte unterstützende Fähigkeit für gesunde CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur auf MSPZ feeder layer von MDS-Patienten nach allo-SZT konnte im Vergleich zu aus unbehandelten MDS-Patienten generierten MSPZ nachgewiesen werden (Abbildung 29). Im Gegensatz zu der schon bereits in Abbildung 28A dargestellten signifikant erniedrigten LTC-IC Frequenz bei der Ko-Kultur mit unbehandelten MDS MSPZ (0,05%), zeigte sich bei der Ko-Kultur mit MSPZ von MDS-Patienten nach allo-SZT im Vergleich eine LTC-IC Frequenz von 0,31% (5,9fach erhöht, $p < 0,0001$). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es zu einer partiell wiedererlangten

Unterstützung auf gesunde $CD34^+$ HSPZ durch MSPZ aus MDS-Patienten kommt, die sich nach allo-SZT in vollständiger Remission befinden. Das deutet daraufhin, dass die Präsenz klonaler MDS Zellen möglicherweise einen supprimierenden Effekt auf die MSPZ haben könnte.

3.7 Zellzyklusanalyse von $CD34^+$ HSPZ nach Ko-Kultur auf MSPZ feeder layer

In Analogie zur Fähigkeit, die $CD34^+$ HSPZ hinsichtlich Ihrer LTC-IC Fähigkeit zu unterstützen, wurde das Stroma von MDS-Patienten auch daraufhin untersucht, welchen Einfluss es auf das Zellzyklusverhalten der $CD34^+$ HSPZ hat. In diesem Kontext sollte die Fragestellung geklärt werden, in wieweit MSPZ als feeder layer dieses proliferative Verhalten der $CD34^+$ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten beeinflussen (Abbildung 30).

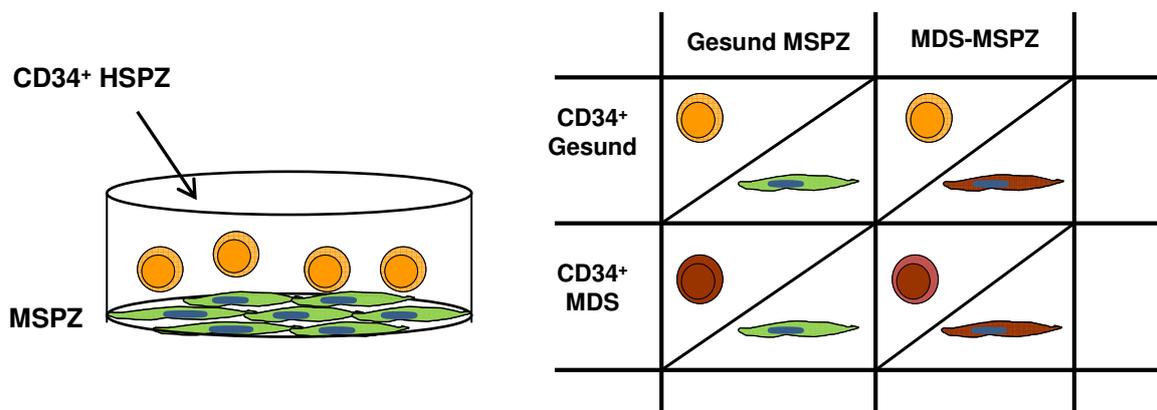


Abbildung 30: **Versuchsaufbau für die Zellzyklusanalyse von $CD34^+$ HSPZ**

$CD34^+$ HSPZ gesunder Probanden wurden auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden und MDS-Patienten kultiviert. MDS $CD34^+$ HSPZ wurden ebenfalls parallel auf MSPZ feeder layer von gesunden Probanden und MDS-Patienten kultiviert. Für die Zellzyklusanalyse wurden MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten in Passage 3 verwendet. Die Ko-Kultur erfolgte über einen Zeitraum von 72 Stunden.

Für diesen Versuchansatz wurden $CD34^+$ HSPZ von 26 gesunden Probanden ohne feeder layer (Kontrollgruppe), auf MSPZ feeder layer von 14 gesunden Probanden und von 26 MDS-Patienten und ebenso wurden $CD34^+$ HSPZ von 26 MDS-Patienten ohne feeder layer, auf MSPZ von 26 gesunden Probanden und von 21 MDS-

Patienten für 72 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden mit Ki67/Hoechst 33343/CD34-AK APC gefärbt und an dem Hochgeschwindigkeits-Zellsortierer MoFlo™ XDP der prozentuale Anteil nicht proliferierender (G0 Phase), leicht proliferierender (G1 Phase) und stark proliferierender Zellen (G2/S/M Phase) bestimmt.

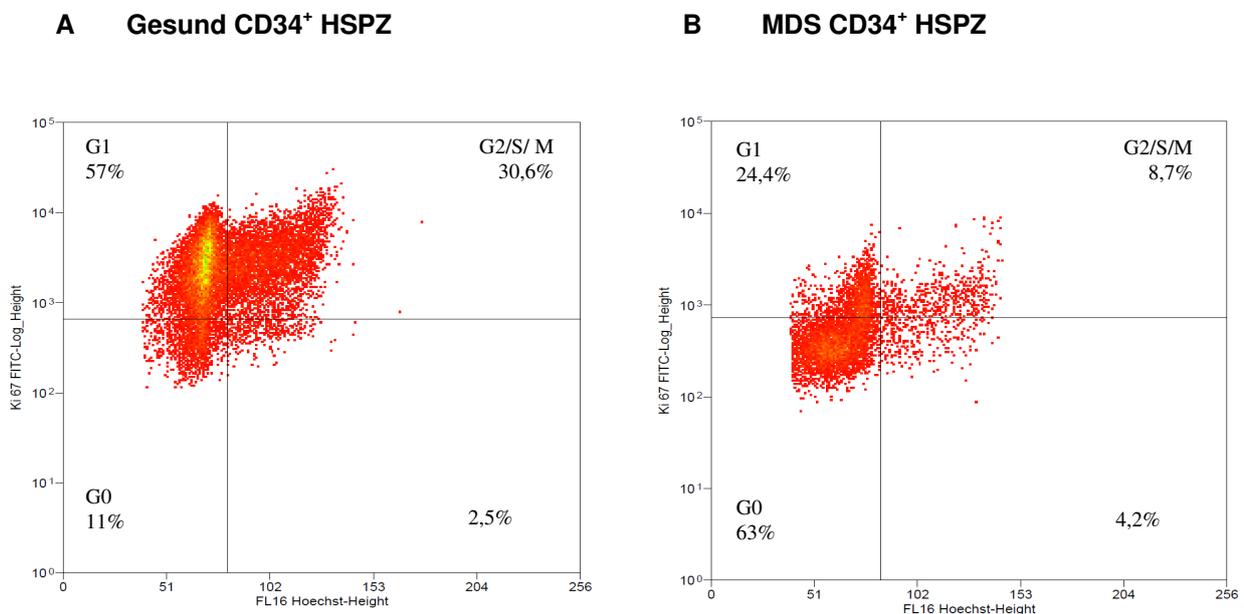


Abbildung 31: **Repräsentative Verteilung der Zellzyklusphasen von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Darstellung der FACS Plots mit prozentualem Anteil von den in unterschiedlichen Proliferationsphasen befindlichen CD34⁺ HSPZ **A** Exemplarische Darstellung der Zellzyklusverteilung (G0/ G1/ G2/S/M-Phase) von CD34⁺ HSPZ eines gesunden Probanden **B** Exemplarische Darstellung der Zellzyklusverteilung (G0/ G1/ G2/S/M-Phase) von CD34⁺ HSPZ eines MDS-Patienten nach 72 Stunden in Kultur ohne feeder layer (Kontrollgruppen).

Die Auswertung des Proliferationsverhalten von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten *in vitro* nach 3 Tagen in Kultur (exemplarisch in Abbildung 31) zeigte eine deutliche Verschiebung des prozentualen Anteil proliferierender Zellen zwischen den gesunden Probanden und MDS-Patienten bereits ohne Stromasupport (Abbildung 31A und B). Während ein geringer prozentualer Anteil CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden nicht proliferativ war, jedoch ein hoher Anteil proliferativ, kam es bei den CD34⁺ HSPZ der MDS-Patienten zu einer Verschiebung der Zellzyklusverteilung mit einer Zunahme des prozentualen Anteils nicht proliferierender Zellen in der G0-Phase (G0-Phase: 32% vs. 61%, p=0,028) und einer Abnahme proliferierender Zellen in der G1-Phase und G2/S/M-Phase (G1-Phase: 46% vs. 25%, p=0,026/ G2/S/M-Phase: 17% vs. 10%, p=0,11) im Vergleich zu den

CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden (Abbildung 32 und 33 Kontrollgruppen ohne feeder layer).

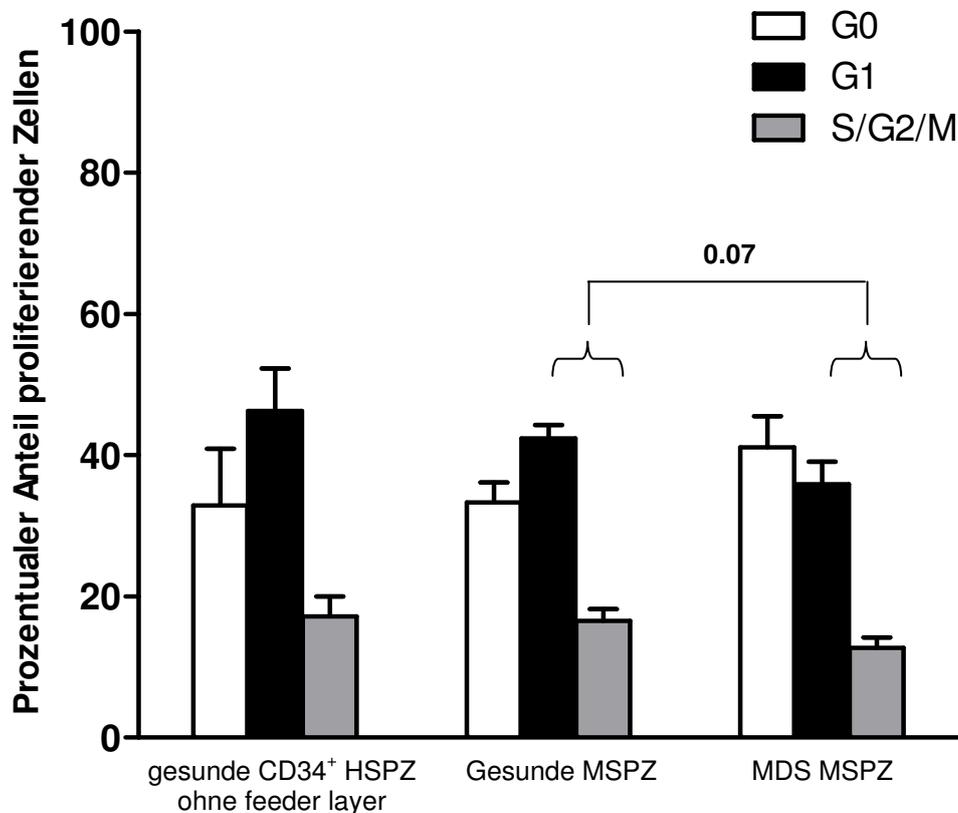


Abbildung 32: **Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Graphische Auftragung des prozentual ermittelten Anteils der Verteilung proliferierender und nicht proliferierender CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden ohne feeder layer (Kontrollgruppe) im direkten Vergleich zu auf kultiviertem MSPZ feeder layer von gesunden Probanden und MDS-Patienten nach 3 Tagen in Kultur.

In Abbildung 32 ist die Zellzyklusverteilung von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden ohne feeder layer, auf MSPZ feeder layer von gesunden Probanden und MDS-Patienten dargestellt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, den CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden ohne feeder layer, konnte keine Veränderung in der proliferativen Aktivität beobachtet werden, wenn diese auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden kultiviert wurden. Andererseits zeigte sich eine Verschiebung der Zellzyklusphasen der CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden, die auf MDS-MSPZ feeder layer kultiviert wurden, hin zu einem erhöhten Anteil an nicht proliferierenden Zellen und eine Abnahme der proliferativen Zellen.

Umgekehrt hierzu wurde der Einfluss von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten auf MDS CD34⁺ HSPZ über einen Zeitraum von 72 Stunden untersucht. Der Versuchsansatz wurde identisch zum Vorherigen angesetzt und das Proliferationsverhalten der MDS CD34⁺ HSPZ mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

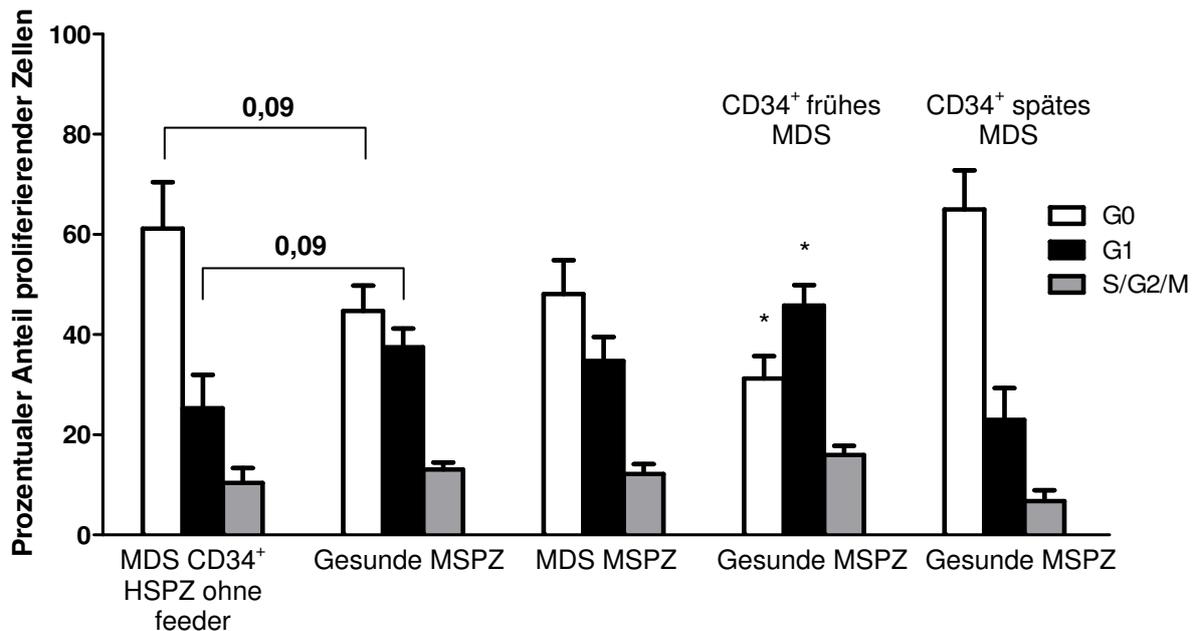


Abbildung 33: **Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** Graphische Darstellung der Zellzyklusphasen von MDS CD34⁺ HSPZ ohne MSPZ feeder layer (Kontrollgruppe) und nach Ko-Kultur mit MSPZ feeder layer von gesunden Probanden und MDS-Patienten sowie die Ko-Kultivierung von MDS CD34⁺ HSPZ nach Einteilung in frühes und spätes MDS auf MSPZ gesunder Probanden nach 72 Stunden Kultur.

Die Ko-Kultur von MDS CD34⁺ HSPZ auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden, zeigte im Vergleich zu den ohne feeder layer kultivierten MDS CD34⁺ HSPZ (G0:61%/ G1:25%/ G2/S/M:10%) eine Verschiebung in Richtung zu mehr proliferativen CD34⁺ HSPZ und einer Abnahme der in der G0-Phase befindlichen Zellen (G0:44,7%/ G1:37,5%/ G2/S/M:13,0%) (Abbildung 33).

Im Gegensatz dazu zeigte die Ko-Kultivierung gleicher MDS CD34⁺ auf MSPZ feeder layer von MDS-Patienten eine Aufhebung des Effekts, der bei der Ko-Kultivierung mit MSPZ von gesunden Probanden beobachtet wurde und eine ähnliche Verteilung von

wenig proliferierenden und ein hoher Anteil an nicht proliferierender MDS CD34⁺ HSPZ wie die Kontrollgruppe in diesem Versuch (G0:48,0/ G1:34,7/ G2/S/M:12,2, Abbildung 33).

Nach einer Einteilung der MDS CD34⁺ HSPZ, in frühes MDS (<5% Blasten) und spätes MDS (>5% Blasten), zeigte sich, dass die MSPZ feeder layer von gesunden Probanden in der Lage waren, die Proliferation von CD34⁺ HSPZ aus frühem MDS zu unterstützen, diese Fähigkeit bei den aus spätem MDS gewonnenen CD34⁺ HSPZ jedoch nicht mehr zu beobachten war (Abbildung 33).

Die Verteilung der G0-, G1-, G2/S/M-Phase bei den aus frühem MDS gewonnenen CD34⁺ HSPZ (G0:31,2/ G1:45,8/ G2/S/M:15,9), die auf MSPZ feeder layer von gesunden Probanden kultiviert wurden, war ähnlich zu der Kontrollgruppe CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden ohne und auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden kultivierten. Bei den aus fortgeschrittenem MDS gewonnenen CD34⁺ HSPZ, die auf MSPZ feeder layer von gesunden Probanden kultiviert wurden, zeigte sich eine ähnliche Zellzyklusverteilung (G0:65/ G1:23/ G2/S/M:6,7) wie bei der Kontrollgruppe MDS CD34⁺ HSPZ ohne feeder layer.

4. Diskussion

MDS sind eine heterogene Gruppe erworbener Knochenmarkserkrankungen, deren Hauptmerkmal über alle Subtypen hinweg eine ineffektive Hämatopoiese ist. Infolge dessen leiden die Patienten an unterschiedlich stark ausgeprägten Zytopenien, die mit einer gesteigerten Mortalität und Morbidität einhergehen[68, 69]. Basierend auf der generell akzeptierten Theorie, dass es sich bei den MDS um Erkrankungen der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzelle (HSPZ) handelt, hat sich der Großteil der bisherigen Forschung auf diese Zellen konzentriert.

Im Wissen um die physiologische Bedeutung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) für die Hämatopoiese[7, 120], wurde sich in dieser translationalen Arbeit der Fragestellung genähert, inwiefern MSPZ für die ineffektive Hämatopoiese bei den MDS eine Rolle spielen. Aus der bis dato verfügbaren Literatur hatte sich kein eindeutiges Bild ergeben, da in den jeweiligen Arbeiten nur sehr wenige MDS-Patienten untersucht wurden und die Interpretation der Ergebnisse durch ein oftmals heterogenes Verhalten der MSPZ *in vitro* und auch die phänotypische Heterogenität der MDS zusätzlich erschwert wurde.

Um diesen Limitierungen entgegen zu treten wurden in dieser Arbeit MSPZ der bisher größten Gruppe mit insgesamt 121 MDS-Patienten untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass MSPZ von Patienten mit MDS über alle Subtypen hinweg ein vermindertes Expansionspotential und eine verminderte Fähigkeit, in Richtung Osteogenese zu differenzieren, aufwiesen. Einhergehend hiermit fanden sich spezifische Veränderungen des Methylierungsprofils in den MDS-MSPZ, die nicht nur die klare Trennung zwischen gesunden und kranken MSPZ zuließen, sondern auch Rückschlüsse auf pathogenetisch relevante Kandidatengene ermöglichten. Darüber hinaus war es hier möglich zu zeigen, dass zahlreiche Liganden-Rezeptor-Paarungen auf Seiten der MSPZ aber auch auf Seiten der CD34⁺ HSPZ bei Patienten mit MDS verändert sind. Die im Anschluss hieran durchgeführten funktionellen Analysen zeigten, dass die MSPZ von Patienten mit MDS in ihrer wesentlichen Aufgabe, nämlich die Blutstammzellen bei Selbsterneuerung und Differenzierung zu unterstützen, stark eingeschränkt ist.

4.1 MDS-MSPZ zeigen Wachstumsdefizite und eine erhöhte Seneszenz

Als erstes konnte hier gezeigt werden, dass die MSPZ der MDS-Patienten über alle Subtypen im Vergleich zu denen von gesunden Probanden eine verminderte CFU-F Aktivität aufwiesen. In Einklang hiermit konnten die MSPZ von MDS-Patienten über signifikant weniger Passagen kultiviert werden als MSPZ gesunder Probanden und erreichten auch zudem weniger CPD. Infolge ihres Wachstumsdefizites zeigten die MSPZ der MDS-Patienten eine abgeflachte, granuläre Morphologie, der sich stark von dem physiologischerweise vorkommenden spindelförmigen MSPZ-Phänotyp unterschied[63, 67]. Darüber hinaus waren die MSPZ der MDS-Patienten auch nicht in der Lage, einen für gesunde MSPZ typischen konfluierenden Zellverband auszubilden.

Die bisherigen Studien, die das Wachstumsverhalten von MDS-MPSZ untersuchten, haben bisher keine eindeutigen Ergebnisse zugelassen. Einzelne Studien an kleinen Patientenkollektiven legten bereits ein Wachstumsdefizit nahe[112, 113, 115, 116, 121], wohingegen die Arbeiten von 2 weiteren Gruppen gegensinnige Ergebnisse hervorbrachten, indem sie keine relevanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Proliferationskapazität und Morphologie zwischen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten fanden[69, 122]. Am wahrscheinlichsten ist, dass diese kontroversen Ergebnisse durch die geringe Anzahl der untersuchten Patienten sowie durch unterschiedliche Kulturbedingungen der MSPZ in den einzelnen Arbeiten bedingt sind. Darüber hinaus wurde in den zitierten Arbeiten meist nur eine Methode wie die Bestimmung der CFU-F Aktivität eingesetzt, um das Expansionspotential der MSPZ zu quantifizieren. Im Gegensatz hierzu wurde in dieser Arbeit neben der CFU-F Aktivität die Anzahl der möglichen Passagierungen sowie die Berechnung der CPDs verwendet, um das Wachstumsverhalten der MSPZ zu analysieren. Zusammen mit der Größe der hier untersuchten Patientengruppe sowie der homogenen Ergebnisse über alle MDS-Subgruppen hinweg spricht dies dafür, dass die MSPZ von MDS-Patienten über eine eingeschränkte Wachstumskapazität verfügen.

Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich als nächstes die Frage nach einem dem Wachstumsdefizit zugrunde liegenden Pathomechanismus.

Vorangegangene Untersuchungen der Gruppe von Lopez-Villar et al. hatten bereits gezeigt, dass weder eine signifikant gesteigerte Apoptoseneigung, noch signifikante Unterschiede in der Zellzyklusverteilung bei den MDS-MSPZ vorlagen[115]. Daher lag die Konzentration in diesen Analysen auf der sogenannten replikativen Seneszenz, also jenen Zustand im dem eine Zelle ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren hat[123]. In der Tat zeigte die Analyse mittels Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität eine gesteigerte Seneszenz der MSPZ von MDS-Patienten, welche das eingeschränkte Wachstumsverhalten sowie die morphologischen Veränderungen der MDS-MSPZ erklären könnte. Interessanterweise bestätigen die Daten einer parallel zu dieser Arbeit erschienenen Publikation die hier beschriebenen Ergebnisse[124]. Da die Gene p16, p21 und p53 wesentliche 'Schaltstellen' für den Vorgang der Seneszenz sind[123, 125, 126], wurden diese Gene mittels qRT-PCR auch in den MDS-MSPZ untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Expression von p16, während die Unterschiede der Genexpression für p21 und p53 geringer ausfielen und möglicherweise auf die geringe Zahl der untersuchten Proben zurückzuführen sind.

4.2 MDS-MSPZ zeigen *in vitro* ein verringertes osteogenes Differenzierungspotential

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von MSPZ ist ihre trilineäre Differenzierungsfähigkeit in Chondroblasten, Adipozyten und Osteoblasten[63].

Insbesondere letztere sind ein wesentlicher Bestandteil der hämatopoietischen Nische und somit ebenso wie die MSPZ selber an der Regulation der Blutbildung direkt beteiligt[7, 45, 63, 65, 127-130]. Während die adipogene und chondrogene Differenzierungsfähigkeit analog zu früheren Arbeiten[115] nicht wesentlich verändert erschien, zeigte sich bereits anhand der in dieser Arbeit eingesetzten drei Färbemethoden ein vermindertes osteogenes Differenzierungspotential der MDS-MSPZ. Der hier daraufhin entwickelte Score zur Quantifizierung ließ auch eine statistische Berechnung der Unterschiede zu und bestätigte diese. Dies wurde ebenso belegt durch die verminderte mRNA-Expression der für die Osteogenese charakteristischen Marker Osterix und Osteocalcin[131] in nativen, als auch in

osteogen induzierten MSPZ an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Einhergehend mit der auf mRNA verminderten Expression von Osteocalcin konnte auch im Serum einer unabhängigen Gruppe von MDS-Patienten nachgewiesen werden, dass Osteocalcin vermindert vorhanden war.

Im Gegensatz zu den früheren Arbeiten, die jeweils nur die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung, nicht jedoch deren Ausmaß untersucht hatten[115, 116], konnte in dieser Arbeit erstmals demonstriert werden, dass das osteogene Differenzierungspotential von MDS-MSPZ sowohl qualitativ als auch quantitativ vermindert ist. In diesem Zusammenhang von Interesse ist auch die Tatsache, dass bereits Mellibovsky et al. im Jahre 1996 eine verminderte ossäre Kalzifikation bei MDS-Patienten beschrieben hat[132]. Darüber hinaus konnte die Gruppe um Raaijmakers et al. zeigen, dass das Ausschalten der RNase III Endonuclease Dicer1, welche eine wichtige Rolle in der Micro RNA Biogenese[133-137] und RNA Prozessierung[138] spielt, zu einer verminderten osteogenen Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Vorläuferzellen führt. Darüber hinaus entwickelte ein Teil der Mäuse in diesem experimentellen Modell einen MDS-artigen Phänotyp mit Zytopenien, Dysplasiezeichen und myeloischen Tumoren im Sinne von Chloromen. Auch in menschlichen MSPZ von MDS-Patienten ist die Expression von Dicer1 vermindert[139]. Neben dem Enzym Dicer1 waren in dem Mausmodell von Raaijmakers et al. zahlreiche andere Gene verändert. Ein weiteres, welches mit Blick auf die Hämatopoiese von Bedeutung sein könnte, war das SBDS (Shwachman Bodian Diamond Syndrome) Gen[119], welches ebenfalls vermindert exprimiert wurde. Auch hier fand die Arbeitsgruppe von Santamaria vergleichbare Ergebnisse in MSPZ von MDS-Patienten. Dies könnte mit Blick auf die MDS von pathogenetischer Bedeutung sein, da das SBDS ähnlich wie die MDS ein Knochenmarkdefektsyndrom, wenn auch ein autosomal-rezessiv vererbtes ist, welches neben einer hämatopoietischen Insuffizienz ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung einer akuten Leukämie einhergeht[140]. Da die Publikation von Santamaria die einzige bisher war, die beide Gene als vermindert exprimiert beschrieben hatte, wurde in dieser Arbeit die Expression von Dicer1 und des SBDS Gens in nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten im Sinne eines Bestätigungsexperimentes erneut untersucht. Dicer1 war in allen MDS, RCMD und sAML MSPZ signifikant vermindert und korrelierend zu diesen Ergebnissen konnte in

den gleichen MDS-Subtypen eine signifikant verminderte Expression des SBDS Gens beobachtet werden. Dies scheint das Resultat von Santamaria et al. generell zu bestätigen. Zusammengefasst erscheint die osteogene Differenzierungskapazität der MDS-MSPZ stark vermindert zu sein, wobei zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Bedeutung der beiden ebenfalls untersuchten Gene offen bleibt.

Eine mögliche molekulare Verbindung zwischen den phänotypischen Veränderungen und auch der erhöhten Seneszenz der MSPZ von MDS-Patienten könnten die Ergebnisse bezüglich der Methylierungssignatur darstellen[141]. Diese Untersuchungen wurden erstmalig an MDS-MSPZ in einer engen Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Lyko vom DKFZ durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen ließ nicht nur eine klare Trennung zwischen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten anhand des Methylierungsmuster zu, sondern es konnten 252 differentiell methylierte CpGs in MDS-MSPZ identifiziert werden. Basierend auf sogenannten Pathway-Analysen ergab sich bereits der Hinweis, dass zahlreiche Pathways die für Zellwachstum und Differenzierung wichtig sind, differentiell methyliert sind. Die 252 CpG Inseln (*engl.* Islands) entsprachen insgesamt 65 Einzelgenen, von denen die meisten nur an einer CpG Island verändert erschienen. Drei Gene hingegen waren auffällig stark hypermethyliert in den MDS-MSPZ, nämlich HOXB1, TBX15 und PITX2. Da die Methylierung von Genen deren Genexpression reguliert, wurde als nächstes die mRNA Expression der 3 Gene untersucht und für TBX15 und HOXB1 zeigte sich eine verminderte Expression, während PITX2 signifikant hochreguliert war. Dieser Unterschied basiert auf dem Ort innerhalb des Genes, an welchen die veränderte Methylierung vorliegt. Während die Hypermethylierung von HOXB1 und TBX15 in der Promotorregion des jeweiligen Gens lokalisiert war und die Herunterregulierung der mRNA Expression zur Folge hatte[142], zeigte die Sequenzierung von PITX2 eine Hypermethylierung im Genkörper, sodass dies eine Überexpression der mRNA Expression in MDS-Patienten induzierte[142, 143].

Mit Blick auf die hier beschriebenen phänotypischen Veränderungen der MDS-MSPZ könnte insbesondere TBX15 von kausaler Relevanz sein. TBX15 wird von mesenchymalen Vorläuferzellen exprimiert und ist von wichtiger Bedeutung in zumindest der murinen Knochenentwicklung. Der Knockdown von TBX15 in Mäusen

fürte zu einer verminderten Knochengröße und Knochenstruktur[144]. Die durch die Hypermethylierung induzierte verminderte Expression von TBX15 auf mRNA Ebene könnte eine mögliche Ursache für die zuvor beschriebene, verminderte osteogene Differenzierungsfähigkeit in MSPZ von MDS-Patienten sein.

4.3 Verändertes Expressionsmuster in MDS-MSPZ und CD34⁺ HSPZ führt zu einer fehlerhaften Interaktion

Als wesentlicher Bestandteil der hämatopoietischen Nische interagieren MSPZ mit den CD34⁺ HSPZ über Zell-Zell-Kontakt sowie über lösliche Liganden und ihre korrespondierenden Rezeptoren[145-148].

In dieser Arbeit wurden verschiedene dieser Interaktionsmöglichkeiten mittels qRT-PCR und auf Proteinebene untersucht.

Als erster Vertreter sei hier Angpt-1 genannt, welches von Osteoblasten und MSPZ exprimiert wird. Durch die Interaktion mit seinem korrespondierenden Rezeptor Tie-2 auf den HSPZ, fördert es das Verbleiben der Tie-2⁺ HSPZ in der endostealen Nische, wo sich die HSPZ vornehmlich im Ruhezustand befinden[27]. Bisher sind in der Literatur keine Ergebnisse bezüglich einer veränderten Angpt-1 Expression in MDS-MSPZ beschrieben und konnte erstmals in einem großen Patientenkollektiv in dieser Arbeit untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Angpt-1 in allen MSPZ aus MDS-Patienten signifikant erniedrigt war. Im Vergleich dazu ist das Expressionslevel von Tie-2 auf den HSPZ inverse korrelierend zu dem auf MSPZ Seite exprimierten Liganden Angpt-1, überexprimiert. Letztlich scheint die Angpt-1/Tie-2 Achse in MDS-Patienten verändert zu sein.

Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner ist Kitlg (SCF; Stem Cell Factor), ein Protein, welches von Osteoblasten und osteogen differenzierten MSPZ exprimiert wird.

Der spezifische Rezeptor c-Kit (Tyrosinkinase Klasse III) wird von HSPZ exprimiert und wird durch Kitlg aktiviert. Diese Interaktion ist wichtig für die Proliferation und Differenzierung der hämatopoietischen Stammzellen[35-37]. Bei der Untersuchung der Kitlg/c-Kit Achse zeigte sich in den MSPZ der MDS-Patienten ein hochsignifikant

erniedrigtes Kitlg Level in MSPZ über alle MDS-Subtypen hinweg. Interessanterweise konnte bereits vor einigen Jahren die Gruppe von Cortelezzi verminderte Spiegel von Kitlg im Knochenmark Plasma bei MDS-Patienten nachweisen[149]. In Mausmodellen, aus denen isolierte Knochenmark Stromazellen ebenfalls eine verminderte Expression von Kitlg aufwiesen, zeigten eine makrozytäre Anämie, welches eine typische Laborveränderung bei Patienten mit MDS ist[150]. Kontrovers sind dagegen die Ergebnisse der Untersuchung von Kitlg auf dem Proteinlevel in konditionierten Medium von unbehandelten MSPZ von MDS-Patienten nach 48 Stunden in Kultur von Flores- Figueroa et al., die ein leicht erhöhtes Level von Kitlg in den Überständen beobachteten[151]. Der Rezeptor c-Kit (CD117), exprimiert von HSPZ, war mit Ausnahme der MDS del5q Gruppe, in allen MDS-Subtypen überexprimiert, was bereits durch eine Arbeit von De Smet et al. gezeigt werden konnte[152]. Auch hier könnte die Überexpression von c-Kit auf der HSPZ eine Kompensation auf die verminderte Expression zu dem Liganden Kitlg auf den MSPZ sein.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Notch1-Jagged1 Signalweg untersucht[153, 154]. In diesem wird Jagged1 als Ligand für Notch1 von MSPZ und Osteoblasten exprimiert[45] und ist essentiell für Überleben, Proliferation und Differenzierung von HSPZ[16, 40, 43, 44]. Die Expression von Jagged1 zeigte sich in den MSPZ über alle MDS-Subtypen hinweg gegenüber den MSPZ gesunder Probanden stark überexprimiert. Auch Notch1 als korrespondierender Rezeptor war auf Seiten der CD34⁺ HPSZ von MDS-Patienten stark überexprimiert und deutet auf eine gesteigerte Aktivität beim MDS hin. Eine Publikation von Varga et al. zeigte eine verminderte Anzahl an Kopfsteinpflaster (Cobblestone)-formenden Zellen in MDS stromalen Ko-Kulturen, wenn Jagged1 überexprimiert war[112]. Rupec et al. zeigten in Mausexperimenten, bei einer Deletion von I kappa B alpha (I κ B α) in nicht-hämatopoietischen Zellen eine signifikant erhöhte Expression von Jagged1[155]. Parallel zeigten die Mäuse einen MDS Phänotyp, so dass vermutet werden kann, dass der hier als verändert beschriebene Notch1-Jagged1 Signalweg auch beim menschlichen MDS eine Rolle spielen könnte.

Chemokine, von denen in der Literatur mittlerweile mehr als 40 bekannt sind, spielen in der Immunabwehr sowie bei der Aktivierung der HSPZ in der Knochenmarknische

eine entscheidende Rolle[156, 157] und sind bisher in dem Kontext der Rolle in der MDS Pathogenese nicht beschrieben.

Aufgrund ihrer Rolle im physiologischen Knochenmark-Mikromilieu wurden in dieser Arbeit einige Chemokine in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten untersucht. Dabei war die Expression einiger Chemokine (CXCL1, CXCL14, CX3CL1, CCL2 und Midkine signifikant vermindert exprimiert, CXCL7 und CCL26 signifikant überexprimiert) in den MDS-Subtypen verändert. Bisher ist keines dieser Chemokine im Kontext der MDS Pathogenese erwähnt worden. Allerdings haben Zhao et al. eine veränderte immunregulatorische Fähigkeit von MSPZ von MDS-Patienten beschrieben[69]. Denkbar ist daher, dass die hier beobachteten, veränderten Chemokinlevels in MSPZ von MDS-Patienten zur einer fehlgesteuerten Immunantwort führen könnten. Letzteres ist typisch für Patienten mit hypoplastischem MDS, wo die Ursache für die hämatopoietische Insuffizienz in einer fehlgeleiteten Immunantwort vermutet wird.

4.4 MDS-MSPZ zeigen eine gestörte Stromaunterstützung auf CD34⁺ HSPZ

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die MSPZ von MDS-Patienten phänotypisch und molekular in vielfacher Hinsicht verändert waren, stellte sich die Frage, ob sie dennoch ihre eigentliche Funktion, nämlich die Unterstützung (*engl.* Support) der Hämatopoiese, noch wahrnehmen können. Hierfür wurden zunächst LTC-IC Experimente durchgeführt, wobei CD34⁺ HSPZ auf einer MSPZ als feeder layer kultiviert wurden. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant verminderte LTC-IC Frequenz, wenn CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden auf MSPZ feeder layer von MDS-Patienten kultiviert wurden, im Vergleich zu der Ko-Kultur auf MSPZ feeder layer gesunder Probanden. Scheinbar waren MSPZ der verschiedenen MDS-Subtypen nicht in der Lage, gesunde CD34⁺ HSPZ zu unterstützen. Publikationen anderer Gruppen, die die LTC-IC Frequenz von CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ von MDS-Patienten untersucht haben, zeigten kontroverse Ergebnisse zu denen in dieser Arbeit gezeigten Daten. Diese Gruppen verwendeten jedoch abweichende Medien sowie die für die Experimente eingesetzten HSPZ aus anderen Quellen. So wurden in den bisherigen Studien sowohl mit Zytokinen stimulierte HSPZ

aus dem Nabelschnurblut als auch mononukleäre Zellen (MNC) verwendet. Eine der Arbeiten beschreibt auch die Verwendung einer murinen Zelllinie als feeder layer, die als Kontrollgruppe gegenüber den MDS MSPZ fungierte[151, 158-161]. Dies dürfte die Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Arbeit erklären.

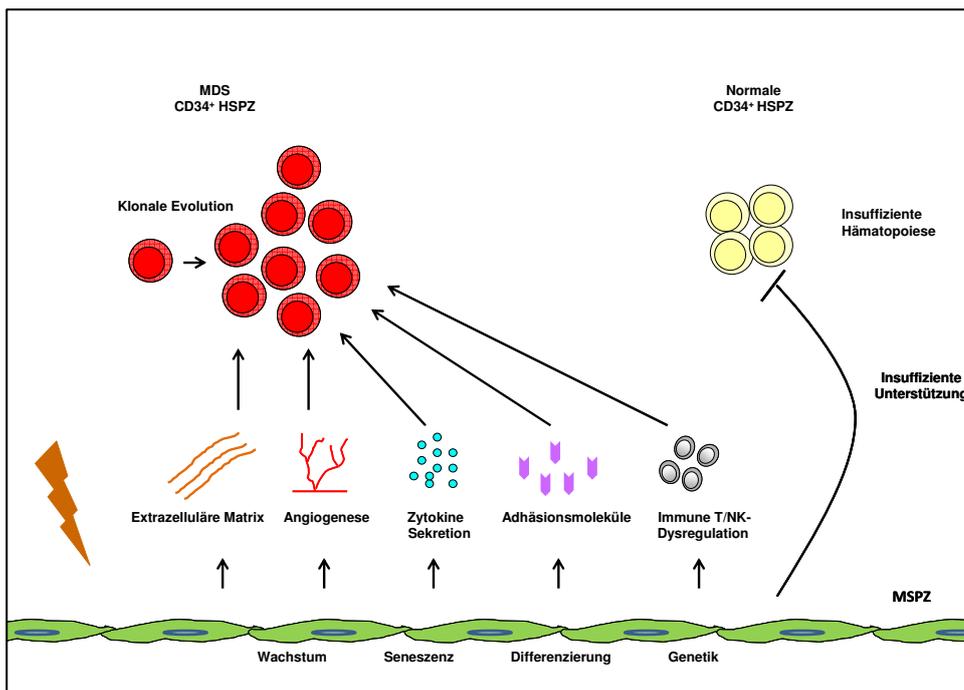
Ein weiteres Experiment zur Untersuchung der stromalen Unterstützung auf die CD34⁺ HSPZ waren Zellzyklusanalysen von CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ. Dabei zeigte sich eine signifikant verminderte Zellzyklusaktivität von gesunden CD34⁺ HSPZ, wenn diese auf MDS MSPZ feeder layer kultiviert wurden im Vergleich zu den ohne feeder layer und auf gesunden MSPZ feeder layer kultivierten CD34⁺ HSPZ. Letztlich bestärken die Ergebnisse der verminderten stromalen Unterstützung für CD34⁺ HSPZ nochmals die Schlussfolgerung, dass MSPZ in der MDS Pathogenese einen entscheidenden Beitrag zu einer insuffizienten Hämatopoiese beitragen könnten.

Auch wenn diese Arbeit einwandfrei darstellen konnte, dass MSPZ von Patienten mit MDS strukturell, molekular und funktionell verändert sind, erlauben die hier gezeigten Resultate keinen Rückschluss, ob es sich hierbei um primäre, intrinsische Defekte der MSPZ handelt oder ob diese sekundär entstanden sind infolge der klonalen Expansion der hämatopoietischen Progenitoren. Zwar konnte auch hier nachgewiesen werden, dass Dicer1 in den MSPZ der MDS-Patienten signifikant vermindert ist, in Analogie mit den Daten von Raaijmakers et al. im Mausmodell und man daher schlussfolgern könnte, dass es sich um primäre Defekte der MSPZ handelt (Abbildung 34A). Dennoch erscheint diese Theorie angesichts verschiedener Argumente eher unwahrscheinlich. Die Arbeit von Raaijmakers et al. konnte sicherlich im Mausmodell einzelne MDS-Charakteristika erzeugen, es erscheint aber unwahrscheinlich, dass ein einzelner Stromadefekt für das heterogene klinische Bild der MDS allein verantwortlich sein soll. Vom klinischen Aspekt gilt ebenso zu bedenken, dass bei einem primären Stromadefekt das Prinzip der allogenen Blutstammzelltransplantation nicht funktionieren dürfte, da die MSPZ nach dieser weiterhin vom Empfänger stammen. Daher ist eine andere Theorie, basierend auf folgenden Überlegungen die favorisierte: Am Anfang der MDS Pathogenese dürfte weiterhin die Entwicklung eines hämatopoietischen MDS Klon stehen, der in der Folgezeit im Knochenmark expandiert. Im Anschluss daran induziert diese durch die

Freisetzung von Mediatoren wie auch durch direkten Zellkontakt eine Suppression der MSPZ. Diese können nicht mehr entsprechend proliferieren und differenzieren. Am Ende dieses Prozesses vermindert sich die Fähigkeit der MSPZ die gesunden HSPZ im Knochenmark funktionell zu unterstützen, sodass es zu der beim MDS charakteristischerweise vorliegenden hämatopoietischen Insuffizienz kommt (Abbildung 34B). Diese Theorie wird durch Untersuchungen bei anderen Entitäten unterstützt. In einem Mausmodell für die akute myeloische Leukämie konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen leukämischen Zellen und Osteoblasten zu einer funktionellen Hemmung der Osteoblasten führt[118]. Ähnliches konnte unsere Gruppe bereits beim Multiplen Myelom zeigen. Hier hemmten die malignen Plasmazellen unter anderem durch die Sekretion von TGF-beta (TGF- β) das Wachstum und die Differenzierung der MSPZ. Infolge dessen war die Fähigkeit der MSPZ die Hämatopoiese zu unterstützen signifikant eingeschränkt, konnte jedoch durch Blockade von TGF- β wiederhergestellt werden[117].

Auch wenn diese Argumente für die zweite Theorie sprechen, wird es zahlreicher Experimente bedürfen, um dieser Hypothese in der Zukunft nachzugehen.

A



B

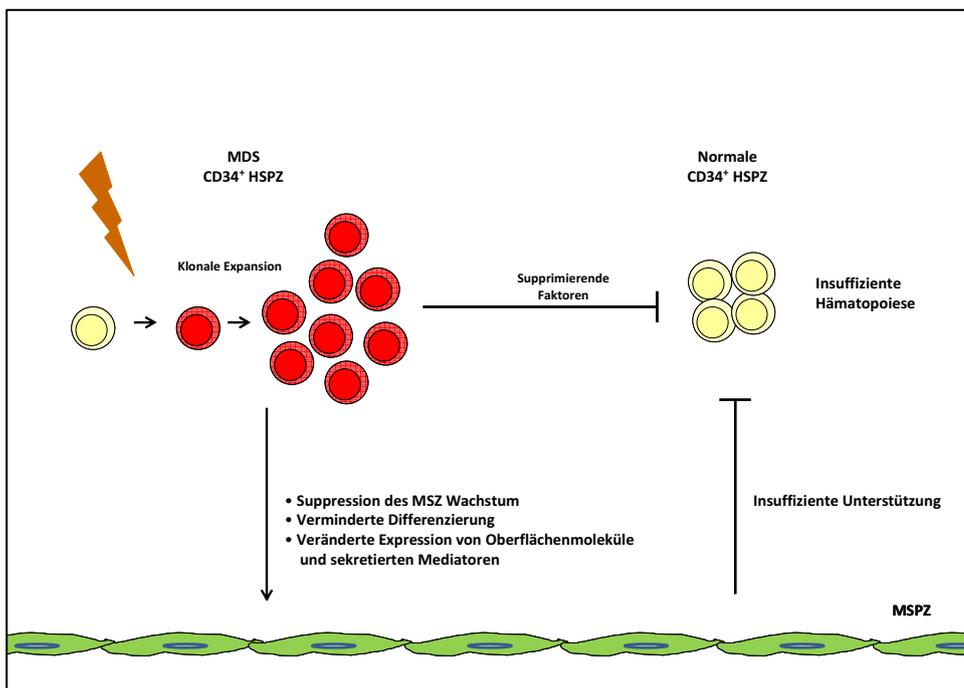


Abbildung 34: **Theoretische Modelle über die Rolle der MSPZ in MDS** **A** Primäre Defekte in den MSPZ fördern die Expansion des MDS Klons, inhibieren gleichzeitig die normale HSPZ und führt zu einer ineffektiven Hämatopoese **B** Die Expansion des MDS Klons induziert eine Suppression der MSPZ. Dies führt zu einer verminderten Fähigkeit der MSPZ die HSPZ zu unterstützen und führt letztlich zu einer ineffektiven Hämatopoese.

5. Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung in Deutsch

MDS sind eine heterogene Gruppe von Knochenmarkserkrankungen, deren gemeinsames Charakteristikum eine ineffektive Blutbildung ist. Gemäß dem aktuellen Stand der Forschung entstehen die MDS infolge genetischer Veränderungen hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ). Im Gegensatz zu den Untersuchungen der HSPZ haben sich in der Vergangenheit nur wenige Untersuchungen mit der Rolle der sogenannten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) in der Pathogenese der MDS beschäftigt. Die hieraus entstandenen Publikationen ließen aufgrund von Unterschieden der verwendeten Methoden und der geringen Zahl der untersuchten Patientenproben keine eindeutigen Rückschlüsse zu. In den vergangenen Jahren konnte jedoch in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass MSPZ durch räumliche und funktionelle Interaktionen mit den HSPZ eine wesentliche Rolle für die Hämatopoiese spielen. Unter der Annahme, dass die MSPZ eine Rolle für die ineffektive Hämatopoiese beim MDS spielen könnten, wurden in dieser Arbeit MSPZ aus dem Knochenmark von 121 Patienten der häufigsten MDS-Subtypen gewonnen und hinsichtlich ihrer strukturellen, molekularen und funktionellen Eigenschaften untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die MSPZ von Patienten mit MDS über alle Subtypen hinweg eine eingeschränkte Wachstumskapazität aufwiesen. Dies spiegelte sich nicht nur in einer zerrissen wirkenden Morphologie der Primärkolonien wieder, sondern ließ sich auch anhand der CFU-F Frequenz, der CPDs sowie der Anzahl der möglichen Passagierungen quantifizieren. Als einen möglicherweise zugrunde liegenden Pathomechanismus konnte eine gesteigerte replikative Seneszenz der MDS-MSPZ nachgewiesen werden. Anhand verschiedener Färbemethoden konnte hier darüber hinaus gezeigt werden, dass MDS-MSPZ über eine verminderte osteogene Differenzierungsfähigkeit verfügen. In Analogie zeigte sich auf mRNA Niveau und auf Proteinniveau eine verminderte Expression der beiden osteogenen Marker Osterix und Osteocalcin. Sowohl der gesteigerten Seneszenz als auch dem alterierten Differenzierungsverhalten könnte eine veränderte Signatur des Methyloms zugrunde liegen, welche in Kooperation mit Herrn Prof. Lyko aus dem DKFZ Heidelberg in den MDS-MSPZ nachgewiesen werden konnte. Neben dem

charakteristischen Methylierungsprofil der MDS-MSPZ konnten hier auch einzelne Kandidatengene wie TBX15 als hypermethyliert identifiziert werden, die zum Beispiel die verminderte osteogene Differenzierungskapazität der MDS-MSPZ erklären könnten. Mit Hilfe von qRT-PCR Analysen, Durchflusszytometrie sowie ELISA konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass zahlreiche Signalmoleküle, welche die Interaktion zwischen MSPZ und HSPZ vermitteln, beim MDS verändert waren. So waren Angiopoietin-1 und Kit-Ligand in den MDS-MSPZ signifikant herunterreguliert, während Jagged1 und Osteopontin überexprimiert waren. Darüber hinaus zeigten sich zahlreiche Chemokine differentiell exprimiert. In Ko-Kulturexperimenten konnte anschließend nachgewiesen werden, dass diese strukturellen und molekularen Veränderungen zu einer verminderten Fähigkeit der MDS-MSPZ führt, gesunde wie auch MDS-HSPZ zu unterstützen. Ohne die Ursache für diese Veränderungen identifiziert zu haben, legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass MSPZ zu der Entstehung der ineffektiven Hämatopoiese einen wesentlichen Beitrag leisten.

5.2 Zusammenfassung in Englisch

Ineffective hematopoiesis is a hallmark of MDS, which are a heterogeneous group of bone marrow diseases. Based on the current knowledge MDS are considered to be clonal stem cell disorders arising from genetic alterations of hematopoietic stem- and progenitor cells (HSPC). Physiologically, mesenchymal stem- and progenitor cells (MSPC) play an indispensable role for hematopoiesis by regulating and supporting HSPC. Albeit MSPC have been considered to contribute to the pathogenesis of MDS, but due to a low number of investigations and different methods their role remains elusive so far. In this study a detailed analysis of molecular and functional properties of MSPC derived from 121 patients with all common MDS subtypes was performed. It was able to demonstrate that MSPC from MDS patients were significantly impaired with regard to their growth and proliferative capacities accompanied with an increased cellular senescence. Osteogenic differentiation was also reduced as indicated by the respective cytochemical stainings and reduced mRNA expression of osterix and osteocalcin. A possible explanation for the increased senescence and the impaired osteogenic differentiation potential could be an altered signature in the methylome. In cooperation with Prof. Lyko from Heidelberg we detected a specific methylation pattern in MDS-derived MSPC that clearly separated MDS-MSPC from healthy MSPC and identified potential candidate genes. In detail, TBX15 was hypermethylated in MDS-derived MSPC resulting in decreased mRNA expression, which might reflect a direct link between the altered phenotype and the methylation profile. In addition, using qRT-PCR analysis, flow cytometry and ELISA an altered expression of several key molecules involved in the interaction with HSPC was detected. While Jagged1 and Osteopontin were significantly upregulated in MDS-MSPC, Angiopoietin-1 and Kit-ligand were diminished. Along with this a disturbed expression of several chemokines were observed, a finding which has not been reported so far. Functionally, the altered phenotype of MDS-MSPC translated into a significantly diminished capacity to support HSPC in coculture experiments. In summary, this comprehensive analysis shows that MDS-MSPC are structurally and functionally altered leading to an impaired stromal support for hematopoiesis.

6. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
allo-SZT	allogene Stammzelltransplantation
Angpt-1	Angiopoietin-1
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblast
CO ₂	Kohlendioxid
CPD	Cumulative Population Doublings
DEPC	Diethyldicarbonat, Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (<i>dt.</i> Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLT-3 Ligand	FMS-related tyrosine kinase 3 Ligand
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
Gy	Gray
H ₂ O	Wasser
HPGM	Hematopoietic Progenitor Growth Medium
HSA	Human Albumin Serum
HSPC	Hematopoietic Stem- and Progenitor Cells

HSPZ	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzelle
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxantin
IL3	Interleukin 3
IL6	Interleukin 6
IMDM	Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium
ITS+1	Insulin-transferrin-sodium selenite+1
kbp	Kilobasenpaar
Kitlg	Kit-Ligand
KM	Knochenmark
LTC-IC	Long Term Culture- Initiating Cell
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
max.	maximal
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MW	Mittelwert
MNC	Mononuclear Cells
MSPC	Mesenchymal Stem- and Progenitor Cells
MSPZ	Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
ng	Nanogramm
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein- Cyanine 5.5
PFA	Paraformaldehyd
pM	Pikomol
PSG	Penicillin/ Streptomycin/ L-Glutamin

qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RAEB	Refractory anemia with excess blasts
RCMD	Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia
RNA	Ribonucleic acid (<i>dt.</i> Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1 α	stromal cell-derived factor-1 alpha
sek	Sekunde(n)
sAML	sekundäre Akute Myeloische Leukämie
TBE	Trisbase Borsäure EDTA
TGF- β	Transforming growth factor -beta
Tie-2 (TEK)	Tyrosinkinase mit Immunglobulin und EGF homologen Domänen-2
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm

7. Literaturverzeichnis

1. Bryder, D., D.J. Rossi, and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(2): p. 338-46.
2. Kaushansky, K., *Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 981-6.
3. Morrison, S.J., et al., *Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors*. *Development*, 1997. **124**(10): p. 1929-39.
4. Hall, P.A. and F.M. Watt, *Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity*. *Development*, 1989. **106**(4): p. 619-33.
5. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 287-98.
6. Terskikh, A.V., et al., *Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors*. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 94-101.
7. Suda, T., F. Arai, and A. Hirao, *Hematopoietic stem cells and their niche*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(8): p. 426-33.
8. Ikuta, K., et al., *Lymphocyte development from stem cells*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 759-83.
9. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. *Science*, 2006. **311**(5769): p. 1880-5.
10. Isern, J. and S. Mendez-Ferrer, *Stem cell interactions in a bone marrow niche*. *Curr Osteoporos Rep*, 2010. **9**(4): p. 210-8.
11. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
12. Mendez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. *Nature*, 2008. **452**(7186): p. 442-7.
13. Krause, D.S., D.T. Scadden, and F.I. Preffer, *The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe?* *Cytometry B Clin Cytom*. **84**(1): p. 7-20.
14. Federspiel, B., et al., *Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen*. *Genomics*, 1993. **16**(3): p. 707-12.
15. Petit, I., D. Jin, and S. Rafii, *The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(7): p. 299-307.

16. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood.* J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
17. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice.* Blood, 2000. **95**(11): p. 3289-96.
18. Avigdor, A., et al., *CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow.* Blood, 2004. **103**(8): p. 2981-9.
19. Broxmeyer, H.E., et al., *Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in vitro in response to growth factor withdrawal and enhances myelopoiesis in vivo.* J Immunol, 2003. **170**(1): p. 421-9.
20. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.* Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.
21. Bakondi, B., et al., *SDF-1alpha secreted by human CD133-derived multipotent stromal cells promotes neural progenitor cell survival through CXCR7.* Stem Cells Dev, 2011. **20**(6): p. 1021-9.
22. Bella, J., et al., *The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4140-5.
23. Torensma, R., et al., *Induction of LFA-1 on pluripotent CD34+ bone marrow cells does not affect lineage commitment.* Blood, 1996. **87**(10): p. 4120-8.
24. Imai, K., et al., *Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells.* Blood, 1999. **93**(1): p. 149-56.
25. Voermans, C., et al., *Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells.* Stem Cells, 2000. **18**(6): p. 435-43.
26. Osborn, L., *Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation.* Cell, 1990. **62**(1): p. 3-6.
27. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche.* Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
28. Davis, S., et al., *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning.* Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-9.

29. Puri, M.C. and A. Bernstein, *Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12753-8.
30. Takakura, N., et al., *Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 677-86.
31. Wu, Y., et al., *Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2648-59.
32. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
33. Kent, D., et al., *Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(7): p. 1926-30.
34. Ikuta, K. and I.L. Weissman, *Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1502-6.
35. Kimura, Y., et al., *c-Kit-mediated functional positioning of stem cells to their niches is essential for maintenance and regeneration of adult hematopoiesis*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26918.
36. Thoren, L.A., et al., *Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2045-53.
37. Kapur, R. and L. Zhang, *A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1099-106.
38. Broudy, V.C., *Stem cell factor and hematopoiesis*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1345-64.
39. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 457-62.
40. Lai, E.C., *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. Development, 2004. **131**(5): p. 965-73.
41. Oldershaw, R.A. and T.E. Hardingham, *Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells*. Bone, 2010. **46**(2): p. 286-93.
42. Milner, L.A., et al., *A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2057-62.
43. Jones, P., et al., *Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1998. **92**(5): p. 1505-11.

44. Karanu, F.N., et al., *The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1365-72.
45. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
46. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
47. Mitsiadis, T.A., et al., *Stem cell niches in mammals*. Exp Cell Res, 2007. **313**(16): p. 3377-85.
48. Ehninger, A. and A. Trumpp, *The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in*. J Exp Med. **208**(3): p. 421-8.
49. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
50. Frenette, P.S., et al., *Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 285-316.
51. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
52. Katayama, Y., et al., *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. Cell, 2006. **124**(2): p. 407-21.
53. Miao, Z., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells*. Cell Biol Int, 2006. **30**(9): p. 681-7.
54. de Mattos Carvalho, A., et al., *Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue*. Vet Immunol Immunopathol, 2009.
55. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
56. Bianco, P. and P. Gehron Robey, *Marrow stromal stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1663-8.
57. Toma, C., et al., *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*. Circulation, 2002. **105**(1): p. 93-8.

58. Anjos-Afonso, F., E.K. Siapati, and D. Bonnet, *In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 23): p. 5655-64.
59. Chen, Y., et al., *Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(5): p. 815-20.
60. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(10): p. 2566-73.
61. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
62. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol, 1976. **4**(5): p. 267-74.
63. Pittenger, M., et al., *Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**(4): p. 309-20.
64. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
65. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
66. Dexter, T.M., et al., *Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures*. Biomedicine, 1977. **27**(9-10): p. 344-9.
67. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
68. Bernell, P., et al., *Clonal cell lineage involvement in myelodysplastic syndromes studied by fluorescence in situ hybridization and morphology*. Leukemia, 1996. **10**(4): p. 662-8.
69. Zhao, Z., et al., *The different immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in patients with low-risk or high-risk myelodysplastic syndromes*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45675.
70. Kuendgen, A., et al., *Myelodysplastic syndromes in patients younger than age 50*. J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5358-65.
71. Neukirchen, J., et al., *Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry*. Leuk Res, 2011. **35**(12): p. 1591-6.

72. Aul, C., et al., *Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system*. *Leukemia*, 1992. **6**(1): p. 52-9.
73. Aul, C., N. Gattermann, and W. Schneider, *Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*, 1992. **82**(2): p. 358-67.
74. Nachtkamp, K., et al., *Impact on survival of different treatments for myelodysplastic syndromes (MDS)*. *Leuk Res*, 2009. **33**(8): p. 1024-8.
75. Neukirchen, J., et al., *Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes*. *Eur J Haematol*, 2009. **83**(5): p. 477-82.
76. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
77. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*, 1982. **51**(2): p. 189-99.
78. Harris, N.L., et al., *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(12): p. 3835-49.
79. Orazi, A. and U. Germing, *The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features*. *Leukemia*, 2008. **22**(7): p. 1308-19.
80. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
81. Germing, U., et al., *Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes*. *Ann Hematol*, 2008. **87**(9): p. 691-9.
82. Buesche, G., et al., *Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2008. **22**(2): p. 313-22.
83. Germing, U. and A. Kundgen, *Prognostic scoring systems in MDS*. *Leuk Res*, 2012. **36**(12): p. 1463-9.
84. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 1997. **89**(6): p. 2079-88.
85. Greenberg, P.L., et al., *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2454-65.
86. Schanz, J., et al., *Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cyto-*

- netics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system.* J Clin Oncol, 2011. **29**(15): p. 1963-70.
87. Malcovati, L., et al., *Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes.* J Clin Oncol, 2007. **25**(23): p. 3503-10.
88. Such, E., et al., *Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia.* Blood, 2013. **121**(15): p. 3005-15.
89. Neumann, F., et al., *Levels of beta 2 microglobulin have a prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome with regard to survival and the risk of transformation into acute myelogenous leukemia.* Leuk Res, 2009. **33**(2): p. 232-6.
90. Bejar, R., R. Levine, and B.L. Ebert, *Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes.* J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 504-15.
91. Thol, F., et al., *Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes.* J Clin Oncol, 2011. **29**(18): p. 2499-506.
92. Della Porta, M.G., et al., *Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome.* Haematologica. **96**(3): p. 441-9.
93. Zipperer, E., et al., *The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome.* Haematologica, 2009. **94**(5): p. 729-32.
94. Valent, P., et al., *Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference.* Leuk Res, 2007. **31**(6): p. 727-36.
95. Baccarani, M., et al., *Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet.* J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 6041-51.
96. Neukirchen, J., et al., *Improved survival in MDS patients receiving iron chelation therapy - a matched pair analysis of 188 patients from the Dusseldorf MDS registry.* Leuk Res, 2012. **36**(8): p. 1067-70.
97. Sloand, E.M., et al., *Alemtuzumab treatment of intermediate-1 myelodysplasia patients is associated with sustained improvement in blood counts and cytogenetic remissions.* J Clin Oncol, 2010. **28**(35): p. 5166-73.
98. Stadler, M., et al., *A prospective, randomised, phase II study of horse antithymocyte globulin vs rabbit antithymocyte globulin as immune-modulating therapy in patients with low-risk myelodysplastic syndromes.* Leukemia, 2004. **18**(3): p. 460-5.

99. Fenaux, P., et al., *Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study*. Lancet Oncol, 2009. **10**(3): p. 223-32.
100. Fenaux, P. and L. Ades, *How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes*. Blood, 2013. **121**(21): p. 4280-6.
101. List, A., et al., *Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion*. N Engl J Med, 2006. **355**(14): p. 1456-65.
102. Stauder, R., et al., *[Individualized management and therapy of myelodysplastic syndromes]*. Wien Klin Wochenschr, 2008. **120**(17-18): p. 523-37.
103. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
104. Bonnet, D., et al., *CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8639-44.
105. Thanopoulou, E., et al., *Engraftment of NOD/SCID-beta2 microglobulin null mice with multilineage neoplastic cells from patients with myelodysplastic syndrome*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4285-93.
106. Tehranchi, R., et al., *Persistent malignant stem cells in del(5q) myelodysplasia in remission*. N Engl J Med, 2010. **363**(11): p. 1025-37.
107. Larsson, C.A., G. Cote, and A. Quintas-Cardama, *The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(8): p. 815-27.
108. Larsson, J., *Interfering with histone demethylases in HSCs*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1533-4.
109. Haase, D., et al., *New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4385-95.
110. Ebert, B.L., *Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer*. Leukemia, 2009. **23**(7): p. 1252-6.
111. Raaijmakers, M.H., *Myelodysplastic syndromes: revisiting the role of the bone marrow microenvironment in disease pathogenesis*. Int J Hematol, 2012. **95**(1): p. 17-25.
112. Varga, G., et al., *Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes*. Pathol Oncol Res, 2007. **13**(4): p. 311-9.
113. Aanei, C.M., et al., *Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(10): p. 1604-15.

114. Blau, O., et al., *Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia*. Exp Hematol, 2007. **35**(2): p. 221-9.
115. Lopez-Villar, O., et al., *Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome*. Leukemia, 2009. **23**(4): p. 664-72.
116. Klaus, M., et al., *Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(7): p. 1043-54.
117. Bruns, I., et al., *Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2012. **120**(13): p. 2620-30.
118. Frisch, B.J., et al., *Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(2): p. 540-50.
119. Raaijmakers, M.H., et al., *Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 852-7.
120. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
121. Prata Kde, L., et al., *Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients*. Exp Hematol, 2010. **38**(4): p. 292-300 e4.
122. Flores-Figueroa, E., et al., *Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization*. Leuk Res, 2005. **29**(2): p. 215-24.
123. Cheng, H., et al., *Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(8): p. 5161-8.
124. Ferrer, R.A., et al., *Mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndromes display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide*. Haematologica, 2013.
125. Sanders, Y.Y., et al., *Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 8-16.
126. Wawryk-Gawda, E., et al., *P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells*. Protoplasma, 2013.
127. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.

128. Taichman, R.S., M.J. Reilly, and S.G. Emerson, *Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures*. *Blood*, 1996. **87**(2): p. 518-24.
129. Beresford, J.N., *Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow*. *Clin Orthop Relat Res*, 1989(240): p. 270-80.
130. Chan, C.K., et al., *Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation*. *Nature*, 2009. **457**(7228): p. 490-4.
131. Nakashima, K., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. *Cell*, 2002. **108**(1): p. 17-29.
132. Mellibovsky, L., et al., *Bone remodeling alterations in myelodysplastic syndrome*. *Bone*, 1996. **19**(4): p. 401-5.
133. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(7): p. 522-31.
134. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
135. Chen, J.F., et al., *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation*. *Nat Genet*, 2006. **38**(2): p. 228-33.
136. Murchison, E.P., et al., *Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12135-40.
137. Oskowitz, A.Z., et al., *Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(47): p. 18372-7.
138. Krol, J., et al., *Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets*. *Mol Cell*, 2007. **25**(4): p. 575-86.
139. Santamaria, C., et al., *Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients*. *Haematologica*, 2012. **97**(8): p. 1218-24.
140. Ginzberg, H., et al., *Segregation analysis in Shwachman-Diamond syndrome: evidence for recessive inheritance*. *Am J Hum Genet*, 2000. **66**(4): p. 1413-6.
141. Teschendorff, A.E., et al., *Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer*. *Genome Res*. **20**(4): p. 440-6.
142. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(7): p. 484-92.
143. Hellman, A. and A. Chess, *Gene body-specific methylation on the active X chromosome*. *Science*, 2007. **315**(5815): p. 1141-3.

144. Singh, M.K., et al., *The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development*. Mech Dev, 2005. **122**(2): p. 131-44.
145. Dazzi, F., et al., *The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis*. Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 161-71.
146. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha*. J Cell Physiol, 1996. **166**(3): p. 585-92.
147. Majumdar, M.K., et al., *Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages*. J Hematother Stem Cell Res, 2000. **9**(6): p. 841-8.
148. Majumdar, M.K., et al., *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 57-66.
149. Cortelezzi, A., et al., *Low plasma stem cell factor levels correlate with in vitro leukemic growth in myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 1999. **23**(3): p. 271-5.
150. Munugalavadla, V. and R. Kapur, *Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **54**(1): p. 63-75.
151. Flores-Figueroa, E., et al., *Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells*. Leuk Res, 2008. **32**(9): p. 1407-16.
152. De Smet, D., et al., *Diagnostic Potential of CD34+ Cell Antigen Expression in Myelodysplastic Syndromes*. Am J Clin Pathol, 2012. **138**(5): p. 732-43.
153. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
154. Stier, S., et al., *Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2369-78.
155. Rupec, R.A., et al., *Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 479-91.
156. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-99.
157. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
158. Alvi, S., et al., *Successful establishment of long-term bone marrow cultures in 103 patients with myelodysplastic syndromes*. Leuk Res, 2001. **25**(11): p. 941-54.

159. Deeg, H.J., et al., *Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome*. Leuk Lymphoma, 2000. **37**(3-4): p. 405-14.
160. Soenen-Cornu, V., et al., *Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal clonal markers and support short- and long-term hematopoiesis in vitro*. Oncogene, 2005. **24**(15): p. 2441-8.
161. Tennant, G.B., et al., *Abnormalities of adherent layers grown from bone marrow of patients with myelodysplasia*. Br J Haematol, 2000. **111**(3): p. 853-62.

8. Anhang

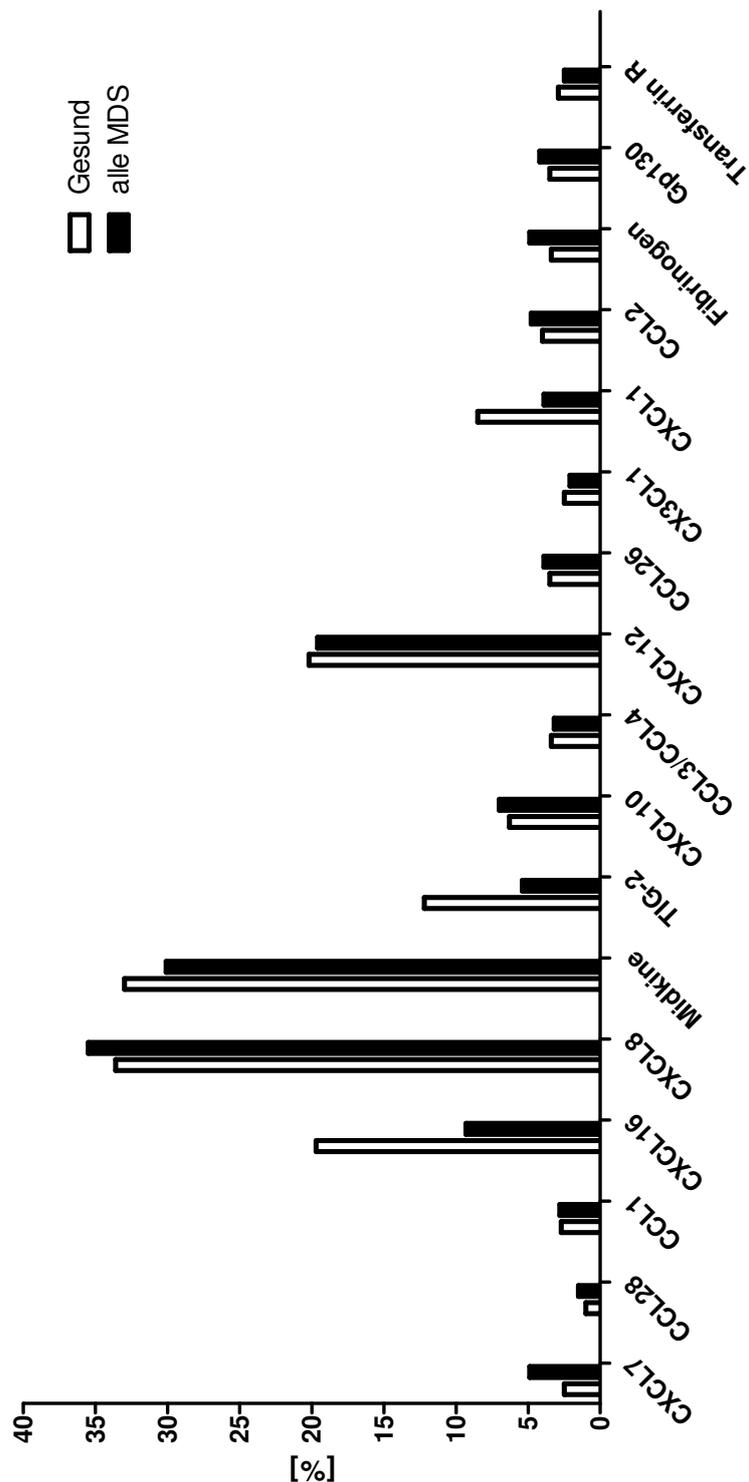


Abbildung I: **Chemokin Screening an MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Proteome Profiler** Graphische Darstellung der Proteinlevel [%] gemessener Chemokine in konditionierten Überständen von MSPZ 3 gesunder Probanden und 9 MDS-Patienten (3 RCMD, 3 RAEB, 3 MDS del5q) in Passage 3.

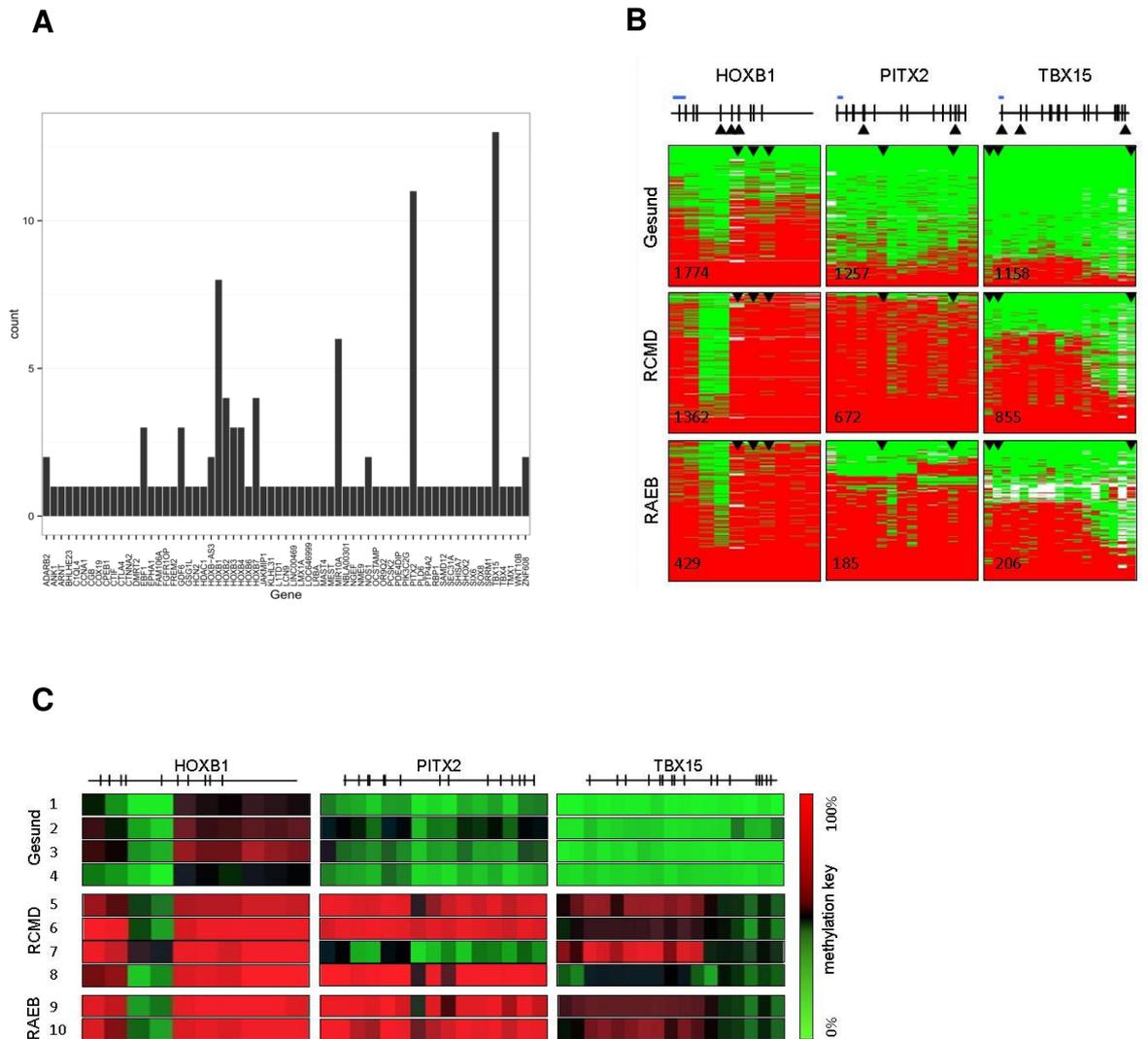


Abbildung II: **Methylierungsanalysen von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten** (Analysen durchgeführt in Kooperation mit Prof. Lyko am DKFZ, Heidelberg) **A** Bar Plots der Zählungen der differentiell methylierten CpGs für jedes der insgesamt 65 identifizierten Gene in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten. **B** Validierung der Methylierungsunterschiede durch 454 Bisulfite-Sequenzierung von gepoolten MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten. Methylierte CpGs sind in rot dargestellt, unmethylierte CpGs sind in grün dargestellt. **C** 454 Bisulfite-Sequenzierung von weiteren unabhängigen 4 gesunden Probanden, 4 RCMD und 2 RAEB MSPZ als reproduzierbare Kontrolle.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knochenmark-Mikromilieus	3
Abbildung 2: Die endosteale und perivaskuläre Nische des Knochenmarks.	6
Abbildung 3: Die hämatopoietische Nische und ihre unterschiedlichen Zelltypen.....	7
Abbildung 4: Mesenchymale Stammzellen (MSZ) und ihr Potential	9
Abbildung 5: Überleben und AML Risiko von MDS-Patienten nach IPSS	15
Abbildung 6: CFU-F Aktivität von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten.	55
Abbildung 7: Verteilung der Oberflächenantigene CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105 bei MSPZ mittels durchflusszytometrischer Analysen	57
Abbildung 8: Phänotyp kultivierter MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten.....	58
Abbildung 9: Wachstumskinetik von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten .	59
Abbildung 10: Expansionspotential (Wachstumskurve) von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	60
Abbildung 11: Seneszenz in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten.....	61
Abbildung 12: Expression der Gene p16, p21 und p53 in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten.....	62
Abbildung 13: Expression der Gene HOXB1, TBX15 und PITX2 in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	64
Abbildung 14: Nachweis der chondrogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Safranin O	65
Abbildung 15: Nachweis der adipogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Oil Red O	66
Abbildung 16: Quantitative Auswertung der adipogenen Differenzierung.....	67
Abbildung 17: Nachweis der osteogenen Differenzierung von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Alizarin Red, van Kossa und Nachweis der ALP	68
Abbildung 18: Quantitative Auswertung der osteogenen Differenzierung.....	69
Abbildung 19: Expression der osteogenen Marker Osterix, Osteocalcin in nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten.....	71
Abbildung 20: Expression der osteogenen Marker Osterix und Osteocalcin während der osteogenen Differenzierung.....	72

Abbildung 21: Expression von Dicer1 und des SBDS Gens in nativen MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	74
Abbildung 22: Expression von Signalmolekülen/ Zytokinen in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	76
Abbildung 23: Expression von Chemokinen in MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	80
Abbildung 24: Expression von korrespondierenden Rezeptorsignalmolekülen/ -zytokinen in CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	82
Abbildung 25: Expression des korrespondierenden Rezeptor-Chemokin CXCR4 in CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	83
Abbildung 26: Migrationsfähigkeit von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	85
Abbildung 27: LTC-IC Versuchsaufbau	86
Abbildung 28: Stammzellunterstützung - LTC-IC Frequenz	87
Abbildung 29: Stammzellunterstützung - LTC-IC Frequenz der Ko-Kultur von gesunden CD34⁺ HSPZ mit MSPZ von MDS-Patienten vor und nach allo-SZT	88
Abbildung 30: Versuchsaufbau für die Zellzyklusanalyse von CD34⁺ HSPZ	89
Abbildung 31: Repräsentative Verteilung der Zellzyklusphasen von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	90
Abbildung 32: Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von CD34⁺ HSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	91
Abbildung 33: Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von CD34⁺ HSPZ nach Ko-Kultur mit MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	92
Abbildung 34: Theoretische Modelle über die Rolle der MSPZ in MDS	104

9.1.2 Abbildungen im Anhang

Abbildung I: Chemokin Screening an MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten mittels Proteome Profiler	129
Abbildung II: Methylierungsanalysen von MSPZ gesunder Probanden und MDS-Patienten	129

9.2 Tabellen

Tabelle 1:	Interaktionsmöglichkeiten zwischen HSZ und Bestandteilen des Knochenmark-Mikromilieus.....	4
Tabelle 2:	FAB-Klassifikation (modifiziert nach Bennett et al.[77]).....	13
Tabelle 3:	WHO-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome und nach Merkmale im Blut und Knochenmark (modifiziert nach Vardiman et al. und Orazi et al.[76, 79]).....	13
Tabelle 4:	WHO-Klassifizierung der „Mixed Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasm“ (MDS/MPN) (aus Vardiman et al.[76]).....	14
Tabelle 5:	Tabellarische Darstellung der Kategorisierung von MDS-Patienten nach IPSS definierten Kriterien (adaptiert nach Greenberg et al.[84])... 	15
Tabelle 6:	Definition des IPSS-R (adaptiert nach Germing et al.2012[83]).....	16
Tabelle 7:	Materialien und Chemikalien.....	24
Tabelle 8:	Zusammensetzung des TBE-Puffers.....	27
Tabelle 9:	Zusammensetzung des Agarosegels.....	27
Tabelle 10:	Auflistung verwendeter Primer.....	29
Tabelle 11:	Auflistung verwendeter Antikörper.....	31
Tabelle 12:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten gesunden Probanden und MDS-Patienten zur Generierung von MSPZ und/oder CD34⁺ HSPZ.....	32
Tabelle 13:	Protokoll zur Aufreinigung von CD34⁺ HSPZ aus dem Knochenmark.....	36
Tabelle 14:	Protokoll zur RNA Extraktion von osteogen differenzierten MSPZ mit TRI-Reagent®.....	45
Tabelle 15:	Master Mixe für die cDNA Synthese.....	46
Tabelle 16:	Protokoll zur cDNA Synthese von RNA aus osteogen differenzierten MSPZ.....	47
Tabelle 17:	Protokoll für das PCR Programm am <i>Mastercycler Gradient</i> (Eppendorf).....	48
Tabelle 18:	Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion.....	49
Tabelle 19:	Protokoll zur Durchführung von intra- und extrazellulären Färbungen an MSPZ und CD34⁺ HSPZ aus dem Knochenmark.....	52
Tabelle 20:	Anleitung für die Durchführung der ELISA.....	54

10. Eigene Referenzen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

10.1 Publikationen

Geyh, S., Öz, S., Cadeddu, R. P., Fröbel, J., Brückner, B., Kündgen, A., Fenk, R., Bruns, I., Zilkens, C., Hermsen, D., Gattermann, N., Kobbe, G., Germing, U., Lyko, F., Haas, R., Schroeder, T. ***Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells.*** Leukemia. 2013 Sep;27(9):1841-51

10.2 Vorträge

Geyh, S ***Mesenchymal stromal cells in patients with MDS*** Wissenschaftliche Sitzung des Arbeitskreises „Stammzellbiologie und -therapie“ im Rahmen der DGHO Jahrestagung in Wien, Österreich (18 Oktober, 2013)

Geyh, S ***Veränderungen des Knochenmarkstromas bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen.*** Universitätstumorzentrum Uniklinik Düsseldorf (18 März, 2013)

10.3 Poster auf wissenschaftlichen Kongressen

Stefanie Geyh, Ron-Patrick Cadeddu, Julia Fröbel, Ali-Nuri Huenerlituerkoglu, Andrea Kündgen, Derik Hermsen, Christoph Zilkens, Roland Fenk, Guido Kobbe, Ulrich Germing, Rainer Haas and Thomas Schroeder ***MDS-derived mesenchymal stromal cells are phenotypically, structurally and epigenetically altered resulting in insufficient stromal support for CD34+ HSPC.*** 12th International Symposium of Myelodysplastic Syndromes in Berlin, Deutschland (8-11 Mai, 2013)

Stefanie Geyh, Ron Patrick Cadeddu, Julia Fröbel, Ingmar Bruns, MD, Fabian Zohren, Ali-Nuri Hünerlitürkoglu, Guido Kobbe, MD, Norbert Gattermann, MD, Ulrich Germing, MD, Rainer Haas and Thomas Schroeder, MD ***Analysis of Mesenchymal Stromal Cells (MSC) and Their Interactions with CD34 Stem and Progenitor Cells in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS).*** 53rd ASH Annual Meeting and Exposition in San Diego, USA (10-13 Dezember, 2011)

11. Danksagung

Mit der Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit gilt der größte Dank an dieser Stelle meinem Doktorvater Herrn Univ. Prof. Dr. med. R. Haas, der mich während meiner spannenden Promotionsphase begleitet hat. Herr Univ. Prof. Dr. med. R. Haas stand mir jederzeit mit wertvollen, inspirierenden und konstruktiven Fachdiskussionen zur Seite. Sein unerschöpflicher Ideenreichtum und sein Enthusiasmus waren eine Bereicherung und Inspiration für den Fortgang meines Dissertationsprojektes. Für die vielfältigen Möglichkeiten meiner beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung sowie für das von Ihnen entgegengebrachte Vertrauen, möchte ich mich herzlichst bedanken.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. William Martin.

Herrn Prof. Dr. med. Germing und Prof. Dr. med. Gattermann danke ich für die stets wohlwollende Begleitung und thematischen Ratschläge und Ideen sowie die immer offen stehende Tür. Vielen Dank.

Im Rahmen dieser Arbeit stand Herr Dr. med. Thomas Schroeder als mein direkter Betreuer im Labor an meiner Seite, der mich uneingeschränkt unterstützte und förderte. Vielen Dank Thomas, für Deine Loyalität, Deine Ehrlichkeit, Deine Hilfe und Deine Hingabe für dieses Projekt. Ich danke Dir für die ausgesprochen angenehme und kollegiale Atmosphäre.

Weiterhin sei an dieser Stelle ein wunderbares Laborteam genannt, in dem ich ein Teil sein durfte. Patrick, Anne, Jamina und Caro, ich danke Euch für diese wunderbare Zeit. Danke für die tollen Stunden und wertvollen Diskussionen. Ihr seid ein tolles Team und jeder Tag mit Euch war eine Bereicherung. Sabrina und Anke, danke Euch beiden für die gelegentliche Unterstützung bei der Aufarbeitung von Proben und angenehme Atmosphäre.

Weiterhin möchte ich mich bei Katharina Raba und Dr.med. J. Fischer aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika für die Core Flow Cytometry Facility bedanken.

Herrn Prof. Lyko und seinem Team aus Heidelberg danke ich für die fruchtbare und tolle Kooperation im Rahmen dieses Projektes.

Meinen Eltern gilt an dieser Stelle der größte Dank. Ihr seid die wunderbarsten Eltern, die ich mir vorstellen kann. Danke, dass es Euch gibt, dass ihr, egal in welcher Lebenslage immer für mich da seid. Ihr habt mich während meiner Zeit im Studium, als auch während meiner Zeit der Promotion in Allem unterstützt und mit Rat und Tat beiseite gestanden. Ihr hattet immer eine Schulter, immer ein offenes Ohr, immer gute Ratschläge und liebevolle Worte. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

12. Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 29.11.2013

(Stefanie Geyh)