Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg Essen

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin

Einfluss mesenchymaler Stromazellen aus dem Knochenmark von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf die Expansion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Friederike Albrecht
aus Herford
2019

DuEPublico
Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN
Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/71642
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20200504-093008-4

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. rer. nat. B. Giebel
2. Gutachter:	Herr Priv.-Doz. Dr. med. L.Sellmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2020

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis ... 3

1. Einleitung ... 5

1.1. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) ... 5

1.1.1. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen ... 5

1.1.2. Modellvorstellungen der humanen Hämatopoese ... 6

1.1.3. Die Stammzellnische ... 10

1.1.4. *In vitro* Kultivierung und Expansion von HSVZ für die klinische Anwendung 11

1.2. Akute myeloische Leukämie (AML) ... 12

1.2.1. Leukämische Stammzellen (LSZ) und ihre Nische ... 13

1.3. Zielsetzung ... 15

2. Material und Methoden ... 17

2.1. Materialien ... 17

2.1.1. Verbrauchsmaterialien ... 17

2.1.2. Geräte und zugehörige Software ... 17

2.1.3. Medien und Medienzusätze ... 17

2.1.4. Zellkulturmedien ... 19

2.1.5. Antikörper ... 20

2.1.6. Primärzellen ... 20

2.2. Methoden ... 21

2.2.1. Zellkultur ... 21

2.2.1.1. Kultivierung und Expansion von Zellen ... 21

2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen ... 21

2.2.1.3. Isolierung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurrestblut ... 21

2.2.1.4. Anreicherung humaner $CD34^+$ HSVZ / Magnetische Zellseparation ... 22

2.2.1.5. Anzucht von MSZ aus dem Knochenmark ... 23

2.2.2. Durchflusszytometrie ... 23

2.2.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie ... 23

2.2.2.2. Durchflusszytometrische Zellsortierung ... 24

2.2.3. *In vitro* Differenzierung von HSVZ ... 25

2.2.3.1. „Colony forming cell“ (CFC) Assay ... 25

2.2.4. *In vitro* Differenzierung von MSZ ... 25

2.2.4.1. Adipogene Differenzierung ... 26

2.2.4.2. Osteogene Differenzierung ... 26

2.2.5. Ko-Kultivierung von HSVZ mit MSZ ... 26
2.2.6. Statistische Analysen ... 27

3. Ergebnisse ... 28

3.1. Charakterisierung der Knochenmarkproben von gesunden Spendern und AML Patienten ... 28
3.1.1. Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben ... 30
3.1.2. Anzucht von MSZ aus dem Knochenmark von gesunden Kontrollpersonen und AML Patienten ... 34
3.1.3. Durchflusszytometrische Analyse der MSZ ... 35
3.1.4. Funktionelle Analyse phänotypischer MSZ ... 39
3.2. Ko-Kultivierung von HSVZ mit MSZ ... 40
3.2.1. Durchflusszytometrische Analyse der Expansion von HSVZ in Kokultur mit MSZ ... 41
3.2.2. Funktionelle Analyse $CD34^+$ HSVZ nach Kokultur mit MSZ ... 49
3.3. Korrelation ... 53

4. Diskussion ... 58

4.1. Patientenkohorte ... 58
4.2. *In vitro* Imitation der humanen hämatopoetischen Stammzellnische ... 60
4.3. Einfluss von AML MSZ auf HSVZ ... 62
4.4. Ausblick ... 65

5. Zusammenfassung ... 66

6. Summary ... 67

7. Literaturverzeichnis ... 68

8. Abbildungsverzeichnis ... 78

9. Tabellenverzeichnis ... 79

10. Abkürzungsverzeichnis ... 80

11. Danksagung ... 82

12. Lebenslauf ... 83

1. Einleitung

1.1. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ)

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) besitzen die Fähigkeit in alle Blutzelltypen, also Erythrozyten, Megakaryozyten, Lymphozyten (T Zellen, B Zellen, NK Zellen), Granulozyten (Neutrophile, Basophile, Eosinophile) und Monozyten/Makrophagen zu differenzieren. Sie können sich teilen bzw. selbst erneuern und so für eine konstante Anzahl an Stammzellen im Knochenmark sorgen (Jacobson et al. 1951). Hämatopoetische Vorläuferzellen gehen aus HSZ hervor. Je nach Reifegrad, besitzen sie ein auf bestimmte Blutzellen beschränktes Entwicklungspotential.

1.1.1. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Reife Blutzellen unterscheiden sich von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) anhand der Expression linienspezifischer Oberflächenmarker. Humane T-Zellen exprimieren das Antigen CD3, B-Zellen CD19/CD20, NK-Zellen CD16/CD56 und myeloische Zellen CD14/CD15/CD16 (IUIS-WHO 1984). HSVZ exprimieren keine linienspezifischen Oberflächenantigene *(lineage negative: lin$^-$)* und können durch den Ausschluss von Linien-Marker positiven Zellen *(lineage positive: lin$^+$)* angereichert werden (Krause et al. 1996).

HSVZ können zudem immunphänotypisch anhand der Expression spezifischer bzw. der Kombination verschiedener Oberflächenantigene identifiziert und in funktionelle Subpopulationen unterteilt werden.

Das erste Oberflächenantigen, welches auf humanen HSVZ beschrieben und zur Anreicherung von HSVZ verwendet wurde, ist das Glykoprotein CD34 (Civin et al. 1984, Katz et al. 1985). CD34$^+$ HSVZ sind in sich sehr heterogen und enthalten neben primitiven hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) und multipotenten Progenitoren (MPP) auch lymphatisch und myeloisch spezifizierte Vorläuferzellen, welche durch weitere Oberflächenmarker wie CD38 (Terstappen et al. 1991), CD7 (Six et al. 2007), CD10 (Galy et al. 1995), CD45RA (Lansdorp et al. 1990), CD49f (Notta et al. 2011), CD90 (Majeti et al. 2007), CD123 (Manz et al. 2002), CD133 (Yin et al. 1997) sowie CD135 (Doulatov et al. 2010) in Subpopulationen unterteilt werden können.

Immunphänotypisch lässt sich aktuell die höchste Anreicherung multipotenter humaner HSVZ durch die Antigenkombination lin$^-$CD34$^+$CD38$^{low/-}$CD45RA$^-$

$CD90^{+}CD133^{+}CD135^{+}CD123^{+}CD7^{-}CD10^{-}CD49f^{+}$ erreichen (Galy et al. 1995, Yin et al. 1997, Manz et al. 2002, Majeti et al. 2007, Six et al. 2007, Doulatov et al. 2010, Notta et al. 2011, Görgens et al. 2013b).

Zusätzlich zur immunphänotyischen Analyse wird die Unterscheidung der verschiedenen HSVZ Subpopulationen durch den Nachweis ihres Differenzierungspotentials in funktionellen *in vitro* Nachweisverfahren unterstützt. Beispielhaft zu nennen ist hier der *Colony forming cell (CFC)* Ansatz, welcher bereits seit über 50 Jahren die klonale *in vitro* Quantifizierung koloniebildender Zellen mit erythrozytärem, myeloischem und erythro-myeloischem Differenzierungspotential ermöglicht (Bradley and Metcalf 1966, Worton et al. 1969). In einem semisoliden Medium, welches die Migration und das Auseinanderdriften der zu analysierenden Zellen verhindert, kommt es zu einer lokalen Koloniebildung, welche die Analyse des Differenzierunspotentials einzelner Zellen ermöglicht. Der CFC Ansatz wird seit langer Zeit im Rahmen der Qualitätskontrolle von Stammzellpräparaten und in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen auch in der klinischen Routine eingesetzt (Pike and Robinson 1970, Moore et al. 1973).

Des Weiteren existieren *in vitro* Nachweismethoden zur Detektion hämatopoetischer Zellen mit Stammzelleigenschaften (*Long-Term Culture-Initiating Cell* = LTC-IC) (Sutherland et al. 1989, Sutherland et al. 1991), sowie mit Erythrozyten (Dorn et al. 2008), Megakaryozyten (Boyer et al. 2008), NK-Zell (Miller et al. 1992), T-Zell (La Motte-Mohs et al. 2005), B-Zell (Sanchez-Dominguez et al. 2012) und dendritischem (Doulatov et al. 2010) Differenzierungspotential.

1.1.2. Modellvorstellungen der humanen Hämatopoese

Derzeitige Modelle und darin beschriebene hierarchische Linienverwandtschaften humaner hämatopoetischer Stamm und Vorläuferzellen basieren auf morphologischen sowie funktionellen Kriterien. Mittels Mikroskopie wurden verschiedene Zelltypen voneinander unterschieden und in Gruppen unterteilt (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten). In Kombination mit der Expression zuvor beschriebener Oberflächenmarker sowie funktioneller *in vitro* Tests wurde vor mehr als 20 Jahren das erste „klassische“ Modell der Hämatopoese postuliert (Galy et al. 1995, Manz et al. 2002).

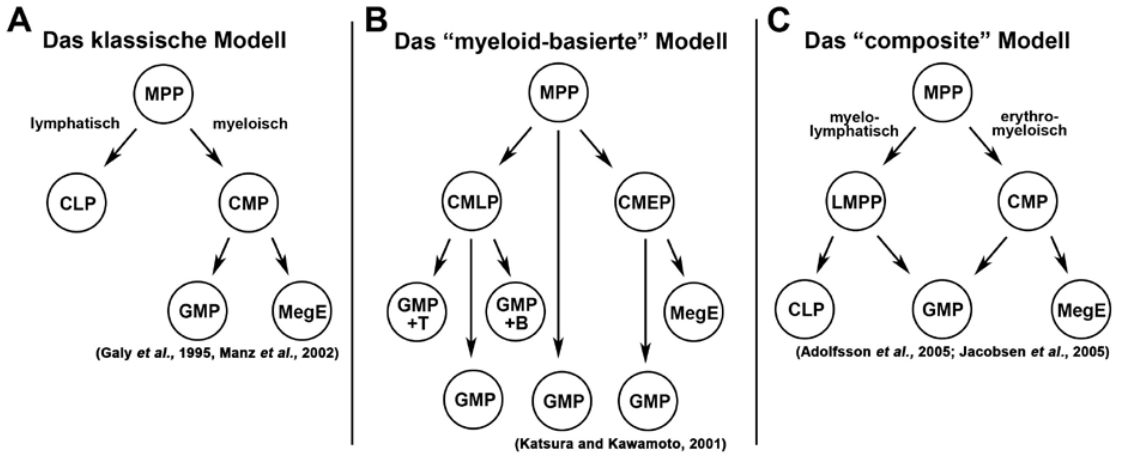


Abbildung 1 Modellvorstellungen der humanen Hämatopoese
Abbildung modifiziert nach Radtke 2014. (A) Das klassische Modell der Hämatopoese postuliert die dichotome Aufspaltung in einen lymphatischen (common lymphoid progenitor: CLP) und einen myeloischen (common myeloid progenitor: CMP) Zweig (Galy et al. 1995, Manz et al. 2002). (B) Das „myeloid-basierte" Modell beschreibt ebenfalls eine Auftrennung in einen lymphatischen (common myeloid-lymphoid progenitor: CMLP) und einen myeloischen (common myeloid-erythroid progenitor: CMEP) Zweig, wobei alle Progenitoren das Potential besitzen, Granulozyten und Makrophagen hervorzubringen (Katsura and Kawamoto 2001). (C) Das „composite" Modell geht ebenfalls von einer dichotomen Aufspaltung in einen lymphatischen (lymphoid-primed multipotent progenitor: LMPP) und einen myeloischen (common myeloid progenitor: CMP) Zweig aus, wobei aus beiden Progenitoren GMP (granulocyte macrophage progenitor) hervorgehen können (Adolfsson et al. 2005).

Das klassische Modell der humanen Hämatopoese postuliert ausgehend von multipotenten HSZ und MPP eine dichotome Aufspaltung in einen lymphatischen und einen myeloischen Zweig. Aus einer myeloischen Vorläuferzelle (*common myeloid progenitor;* kurz CMP) entstehen demnach über weitere Zwischenstufen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Megakaryozyten und Erythrozyten, wohingegen aus der lymphatischen Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor;* kurz CLP) T-, B- und NK-Zellen entstehen. Darüber hinaus können aus beiden Vorläufern dendritische Zellen entstehen.

CLP wurden zunächst als $lin^-CD38^+CD34^+CD45RA^+CD10^+$ Zellen beschrieben, welche nach Transplantation in den Thymus von Mäusen sowohl B-, NK- als auch T-Zell Differenzierungspotential aufweisen ohne im CFC Ansatz eryhro-myeloisches Koloniebildungspotential zu zeigen (Galy et al. 1995). CMP werden als $lin^-CD38^+CD34^+CD45RA^-CD123^+$ Zellen postuliert, welche im CFC Ansatz erythro-myeloisches Koloniebildungspotential besitzen und myeloisches Langzeitpotential (LTC-IC) aufweisen (Manz et al. 2002).

Durch die Entdeckung weiterer Oberflächenmarker und Etablierung neuer *in vitro* und *in vivo* Ansätze wurden im Laufe der Zeit weitere Progenitorzellen identifiziert, welche sich nicht mit dem zuvor beschriebenen klassischen Modell vereinbaren lassen. So wurden zum Beispiel Zellen mit partiellem B-Zell und myeloischem Potential idenifiziert, welche weder Megakaryozyten noch Erythrozyten hervorbringen können (Kawamoto et al. 1998). Basierend auf diesen Erkenntnissen, entwickelte Kawamoto das „myeloisch-basierte" Modell der Hämatopoese, welches anstelle einer dichotomen Aufspaltung, eine Differenzierung der MPP in drei verschiedene Vorläuferzellen postuliert (Katsura and Kawamoto 2001).

In murinen *in vivo* Experimenten fanden sich Zellen mit sowohl B-Zell, T-Zell als auch Granulozyten und Makrophagen Potential, welche jedoch nicht multipotent sind (Adolfsson et al. 2005). Da diese Erkenntnisse sich weder mit dem klassischen Modell noch mit dem myeloisch basierten Modell der Hämatopoese vereinbaren ließen, entwickelte Adolfsson das „*composite"* Modell. In diesem Modell findet zunächst eine dichotome Aufspaltung in einen lympho-myeloischen und einen myeloischen Zweig statt, wobei sich aus beiden Zweigen Granulozyten und Makrophagen entwickeln können (Abbildung 1).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass myeloisch determinierte murine Progenitorzellen in der Lage sind, nach Transplantation langfristig einzelne Zelltypen, hier Megakaryozyten oder Erythrozyten, wiederherzustellen (Yamamoto et al. 2013). Yamamoto postuliert eine direkte Abspaltung megakaryozytärer Vorläufer von MPP, was sich mit keinem der drei oben genannten Modelle der Hämatopoese vereinbaren lässt.

In unserer Arbeitsgruppe konnten mit Hilfe des Oberflächenantigens CD133 neue Lininenverwandtschaften in der humanen Hämatopoese nachgewiesen werden (Görgens et al. 2013b). Hämatopoetische Stammzellen gemeinsam mit multipotenten Progenitoren und lympho-myeloisch restringierten Vorläuferzellen *(LMPP: lympho-myeloid primed progenitor)*, sowie späte lymphatische und Granulozyten-Monozyten Vorläufer *(MLP: multilymphoid progenitors; GMP: granulocyte and monocyte progenitor)* sind in der $CD133^{+}$ Population angereichert, wohingegen erythro-myeloisch differenzierte Progenitoren *(EMP: erythro-myeloid progenitor)* $CD133^{low/-}$ sind (Yin et al. 1997, Görgens et al. 2013b, Dmytrus et al. 2016). Eine Unterteilung von HSZ/MPP und LMPP, GMP, MLP sowie EMP innerhalb der $CD133^{+}$ und $CD133^{low/-}$ Fraktionen ist mittels weiterer Oberflächenantigene wie CD45RA, CD38 und CD10 möglich (Lansdorp et al. 1990, Görgens et al. 2014, Radtke et al. 2015, Radtke et al. 2016).

Wie in Abbildung 2 dargestellt, führten diese Ergebnisse zu einer erneuten Revision des Modells der Hämatopoese. Dieses Modell postuliert die Entstehung von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten aus einem lympho-myeloischen Zweig und die Entwicklung basophiler und eosinophiler Granulozyten, sowie Erythrozyten und Megakaryozyten aus einem erythro-myeloischen Progenitor. Darüberhinaus können Makrophagen sowohl aus lympho-myeloischen als auch aus erythro-myeloischen Progenitoren entstehen (Abbildung 2).

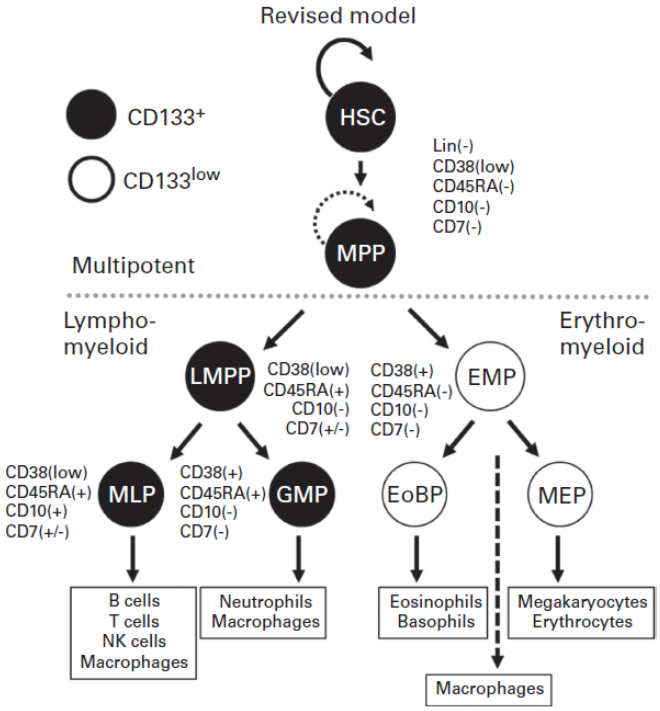


Abbildung 2 Das revidierte Modell der Hämatopoese
Abbildung modifiziert nach Görgens et al. 2016. Das „revised" Modell postuliert eine dichotome Aufspaltung in einen lymphatischen (lymphoid-primed multipotent progenitor: LMPP) und einen erythro-myeloischen (erythroid myeloid progenitor: EMP) Zweig. Aus beiden Progenitoren können Granulozyten hervorgehen, wobei aus LMPP neutrophile Granulozyten und aus EMP basophile und eosinophile Granulozyten entstehen.

Neuere Forschungsergebnisse postulieren außerdem einen Unterschied in der fetalen und adulten Hämatopoese (Abbildung 3). In der fetalen Leber finden sich sowohl multipotente Stammzellen als auch oligopotente Progenitorzellen, mit unterschiedlichen gemischten Differenzierungspotentialen. Während der Entwicklung zur adulten Hämatopoese gehen die oligopotenten Progenitoren weitestgehend verloren und es dominieren einerseits HSZ

und andererseits unipotente Progenitorzellen, wobei Megakaryozyten direkt aus HSZ entstehen (Notta et al. 2015).

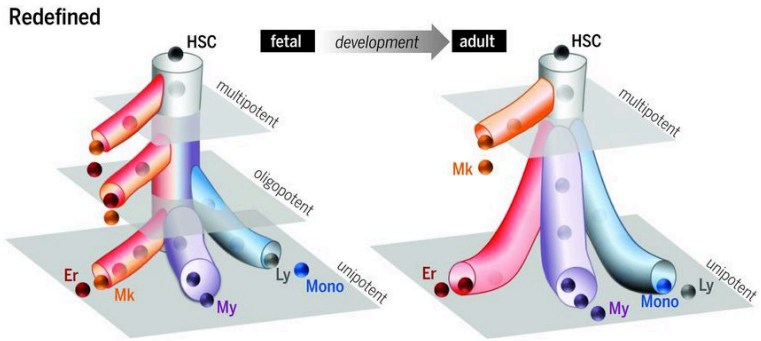


Abbildung 3 Unterschiede in der fetalen und adulten Hämatopoese
Abbildung modifiziert nach Notta et al. 2015. In der fetalen Hämatopoese spielen eine große Anzahl sowohl multipotenter als auch oligopotenter Progenitorzellen mit unterschiedlichen Entwicklungspotentialen in Erythrozyten (Er), Megakaryozyten (Mk), Granulozyten/Monozyten (My), Lymphozyten (Ly) und Monozyten (Mono) eine Rolle. In der adulten Hämatopoese finden sich vornehmlich multipotente HSZ (HSC) und unipotente Progenitoren, wohingegen die Population der oligopotenten Progenitoren kaum noch vorhanden ist (Notta et al. 2015).

Zusammenfassend sind weiterhin nicht alle Linienverwandtschaften hämatopoetischer Vorläuferzellen abschließend geklärt. Es ist zudem fraglich, inwiefern Beobachtungen aus dem murinen System auf die humane Hämatopoese übertragen werden können, wobei in den letzten Jahren zunehmend Parallelen in beiden Systemen aufgezeigt werden konnten.

1.1.3. Die Stammzellnische

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen bilden nach allgemeinem Verständnis ein Leben lang Blutzellen. Um diese sogenannte Homöostase aufrechterhalten zu können, wird angenommen, dass jederzeit ausreichend HSZ im menschlichen Körper vorhanden sind. Stammzellen verweilen im Knochenmark und in diesem Zusammenhang postulierten Schofield et al. bereits 1978 den Begriff der „Stammzellnische“ (Schofield 1978). Unter dem Begriff „Nische“ wird die spezielle Umgebung in unmittelbarer Nähe von HSZ bezeichnet, die sich aus Zellen und löslichen Faktoren zusammensetzt. Bereits 1975 machte Lord *et al.* die Beobachtung, dass sich HSZ vor allem in der Nähe der Knochenoberfläche aufhalten (Lord et al. 1975). Im weiteren Verlauf konnte spezifiziert

werden, dass sich HSZ an der Grenze zwischen Knochenoberfläche und dem intratrabekulärem Raum befinden. Diese Grenze wird als Endost bezeichnet und besteht aus einer dünnen Schicht von Osteoblasten (Calvi et al. 2003). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die pharmakologisch oder genetisch induzierte Modifikation von Osteoblasten einen direkten Einfluss auf die Anzahl von HSZ im Knochenmark und in *in vitro* Kulturansätzen hat (Calvi et al. 2003, Zhang et al. 2003). Visnjic et al. zeigten zudem, dass sich in Abwesenheit von Osteoblasten auch die Anzahl an HSZ deutlich verringert und es zu einer verstärkten extramedulären Hämatopoese in Milz und Leber kommt (Visnjic et al. 2004). Die Wechselwirkung zwischen Osteoblasten und HSZ findet dabei sowohl durch sezernierte Signalmoleküle/Zytokine als auch durch direkten Zell-Zellkontakt statt (Taichman and Emerson 1998).

Zusätzlich zu mesenchymalen Zellen, wie Osteoblasten, sind auch weitere Zellpopulationen, wie Endothelzellen, am Aufbau der Stammzellnische beteiligt. Arbeiten von Greenbaum *et al.* und Ding *et al.* haben gezeigt, dass endotheliale und mesenchymale Zellen für die Aufrechterhaltung unterschiedlicher Subpopulationen von HSVZ zuständig sind (Ding et al. 2013, Greenbaum et al. 2013).

Die verschiedenen Zellentitäten der Stammzellnische bilden gemeinsam ein Mikromilieu, welches für die Aufrechterhaltung und Proliferation der HSZ unerlässlich ist.

1.1.4. *In vitro* Kultivierung und Expansion von HSVZ für die klinische Anwendung

Die Möglichkeit der *in vitro* Kultivierung und Expansion von HSVZ bildet die Grundlage für die weitere Erforschung dieser Zellpopulation, ihrer Verwandtschaftsverhältnisse und der Mechanismen zur Aufrechterhaltung oder Differenzierung.

Bislang wurden keine *in vitro* Kulturbedingungen beschrieben, die eine verlustfreie Kultivierung oder Expansion von HSVZ mit Erhalt aller Linienpotentiale ermöglichen. In Suspensionskultur gehen Zellen mit erythrozytärem Potential und somit auch HSVZ innerhalb von 6 Tagen fast vollständig verloren (Görgens et al. 2013b). Die Kokultur von HSVZ mit murinen Stromazellen konnte zwar eine Expansion von HSVZ mit LTC-IC und und myeloischem Potential erreichen, jedoch konnten auch unter diesen Kulturbedingungen keine Zellen mit erythrozytärem Potential im CFC Ansatz nachgewiesen werden (Itoh et al. 1989, Suzuki et al. 1992, Issaad et al. 1993, Moore et al. 1997, Nolta et al. 2002, Feugier et al. 2005, Weisel et al. 2006, Fernandez-Sanchez et al. 2011, Tiwari et al. 2011, Görgens et al. 2014). Bereits in den 80er Jahren wurde

außerdem begonnen, auch MSZ aus humanem Knochenmark mit HSVZ zu kokultivieren. Auch im Rahmen dieser Arbeiten konnten zwar $CD34^+$ expandiert und Zellen mit LTC-IC, CFC Potential expandiert werden, jedoch wurde kein signifikanter Erhalt von multipotenten HSVZ mit erythrozytärem Potential erreicht (Koller et al. 1995, Yamaguchi et al. 2001, Kadereit et al. 2002, McNiece et al. 2004, Zhang et al. 2006, Li et al. 2007, Madkaikar et al. 2007, Magin et al. 2009, Bramono et al. 2011, Fernandez-Sanchez et al. 2011, Khoury et al. 2011, Hammoud et al. 2012, Fan et al. 2013, Zaker et al. 2013, Radtke et al. 2016). Auch die Kokultur mit Endothelzellen führte nur zu einer sporadischen Detektion von Zellen mit erythrozytärem Differenzierungspotential (Chute et al. 2005, Yildirim et al. 2005, Li et al. 2007, Magin et al. 2009). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben alle oben genannten Kokulturansätze, sowie die Tripletkultur von HSVZ mit Endothelzellen und mesenchymalen Zellen durchgeführt und analysiert (Görgens et al. 2014, Radtke et al. 2016). In allen getesteten Bedingungen verloren die phänotypisch primitiven HSZ ihre Multipotenz, was sich maßgeblich durch den Verlust des erythrozytäre Differenzierungspotentials nach bereits 6-14 Tagen in Kultur manifestierte.

1.2. Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung der Hämatopoese, bei der es zu einer klonalen Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen und deren Ausschwemmung in die periphere Blutbahn kommt. Die Inzidenz der AML liegt bei etwa 3,7/100.000/Jahr. Bezüglich der Ätiologie der AML gibt es verschiedene Faktoren, die die Entstehung der Krankheit unterstützen bzw. mit einer erhöhten Häufigkeit an AML Erkrankungen einhergehen. Eine Exposition gegenüber Benzol oder ionisierender Strahlung führen zu einem erhöhten Risiko an einer AML zu erkranken, ebenso wie genetische Faktoren wie Trisomie 21 und das Klinefelter Syndrom (XXY). Des Weiteren kann eine AML auch sekundär aus einer zuvor bestehenden hämatologischen Erkrankung, wie einem myelodysplatischen Syndrom (MDS) oder einer aplastischen Anämie entstehen (Herold 2014). Die AML lässt sich anhand zytochemischer Marker und diverser Chromosomenaberrationen in verschieden Subtypen unterteilen, die unterschiedliche Risiken, Prognosen und Therapiestrategien nach sich ziehen.

Typisch für die Diagnose einer AML ist eine kurze Anamnese mit Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Nachtschweiß. Es kommt zu einer erhöhten

Infektanfälligkeit durch eine Zytopenie reifer und funktionstüchtiger Blutzellen (Anämie, Thrombozytopenie, Granulozytopenie).

Therapeutisch wird möglichst früh und aggressiv anhand komplexer Protokolle mit einer Therapie begonnen. Häufig eingesetzte Chemotherapeutika sind hierbei Cytarabin, Daunorubicin oder Idarubicin. Durch diese Therapieregime kann in 60-80% der Fälle eine komplette Remission erreicht werden mit einer 5-Jahres Rezidivfreiheit von 30-40%.

Abhängig von Alter, Komorbidität und Subtyp der AML kommt die allogene Transplantation hämatopoetische Stammzellen (SZT) als Therapieoption in Frage. Erfolgt eine SZT bei einer AML in erster Remission, leben nach 10 Jahren noch 50% der Patienten, wobei 20% der Patienten ein Rezidiv erleiden. Die Prognose hängt in diesem Fall auch von schweren therapiebedingten Nebenwirkungen durch die myeloablative Behandlung ab (Herold 2014).

1.2.1. Leukämische Stammzellen (LSZ) und ihre Nische

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, erleiden trotz intensiver Therapiestrategien viele Patienten, auch nach Jahren in Remission, ein Rezidiv der AML. Die Ursache dieser hohen Rezidivraten liegt möglicherweise darin, dass nach jeder Therapie eine kleine Population an leukämischen Zellen zurückbleibt, welche erneut eine AML induzieren können. Da chemotherapeutische Substanzen darauf abzielen, schnell proliferierende Zellen zu zerstören, ist denkbar, dass diese persistierenden Zellen keine so hohe Proliferation aufweisen, sondern sich ähnlich wie ruhende HSZ verhalten (Ishikawa et al. 2007).

Bereits 1983 wurde von McCulloch et al. die Möglichkeit einer einzelnen malignen Zelle in Betracht gezogen, welche durch Proliferation zur Entstehung einer AML führen könnte (McCulloch 1983). Im weiteren Verlauf wurde der Begriff der leukämischen Stammzelle (LSZ) geprägt, welches eine Population unreifer leukämischer Progenitoren beschreibt (Lapidot et al. 1994, Bonnet and Dick 1997, Hope et al. 2004). Die LSZ stellen sich, wie HSZ, durchflusszytometrisch als $CD34^{+}CD38^{-}$ Zellen dar (Abbildung 4) und sind ebenso wie HSZ hierarchisch organisiert (Lapidot et al. 1994, Bonnet and Dick 1997).

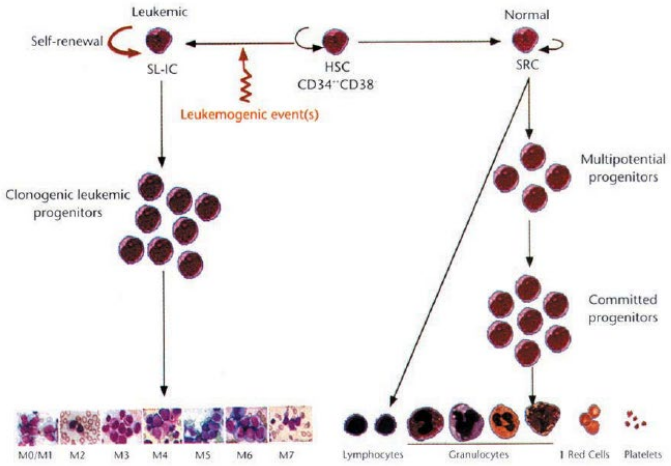


Abbildung 4 Entstehung der LSZ aus der Population der HSVZ
(Bonnet and Dick 1997) LSZ stellen sich durchflusszytometrisch, ebenso wie HSVZ, $CD34^{+}38^{-}$ dar. Sog. „Leukemogenic events" führen zu Veränderungen der HSZ und zur Entstehung der leukämischen Stammzelle (leukemia-initiating cell: SL-IC).

Wie auch gesunde hämatopoetische Stammzellen, können LSZ das Knochenmark immundefizienter Mäuse repopulieren und dort erneut eine AML induzieren, welche phänotypisch der des Spenders entspricht (Lapidot et al. 1994, Bonnet and Dick 1997). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass LSZ *in vivo*, ebenso wie gesunde HSVZ, die Knochenmarknische repopulieren (Ishikawa et al. 2007). Diese Eigenschaft ist insbesondere therapeutisch von großer Bedeutung, da LSZ, welche in der Nische „ruhen" und nicht proliferieren (*engl. quiescent*), mit konventionellen Chemotherapeutika nicht vernichtet werden können (Ishikawa et al. 2007, Konopleva and Jordan 2011).
Weitere Studien konnten darlegen, dass auch die Zellen der Stammzellnische in AML Patienten verändert sind und für eine Aufrechterhaltung der LSZ von entscheidender Bedeutung sind. Bereits 1996 wiesen Dührsen *et al.* nach, dass Veränderungen der Stromazellen zu verbesserten Wachstumsbedingungen für leukämische Progenitorzellen führen, sowie das Wachstum gesunder HSVZ hemmen (Duhrsen and Hossfeld 1996). Weitere Studien zeigten, dass MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten eine verminderte Expression des *stromal-derived factor-1* (SDF-1) aufweisen, was möglicherweise einen negativen Einfluss auf gesunde HSVZ hat (Ge et al. 2011). In Kokulturversuchen konnte nachgewiesen werden, dass AML Zellen mittels proinflammatorischer Zytokine Endothelzellen dazu stimulieren können, den Wachstumsfaktor G-CSF zu produzieren. Dieser Wachstumsfaktor fördert wiederum die Proliferation leukämischer Zellen (Griffin et al. 1987). Im Mausmodell wurde dargelegt, dass maligne Stromazellen durch eine Überproduktion des Zytokins SCF, das

Einwandern gesunder HSVZ in die leukämische Nische verhindern (Colmone et al. 2008). Medyouf et al. konnten 2014 zeigen, dass MSZ aus dem Knochenmark von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom verschiedene Zytokine sezernieren, welche das Einwandern humaner MDS Zellen in das Knochenmark immundefizienter Mäuse ermöglichen (Medyouf et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem MDS MSZ mit MSZ gesunder Spender kokultiviert und anschließend auf die Expression des Zytokins LIF (*leukemia inhibitory factor*) untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die LIF Expression auf gesunden MSZ nach dem Kontakt mit MSZ von MDS Patienten hochreguliert wird und MDS MSZ das Mikromilieu der Knochenmarknische somit aktiv beeinflussen (Medyouf et al. 2014).

Zusätzlich zu ihrer Bedeutung in der Aufrechterhaltung einer AML und MDS konnten verschiedene Arbeiten veränderte Stromazellen auch als direkten Auslöser der Krankheiten identifizieren. So führt der Verlust des Dicer-1 Gens in Osteoprogenitorzellen der Maus direkt zur Entstehung eines MDS (Raaijmakers et al. 2010). Weitere Studien zeigten, dass MSZ und leukämische Blasten aus demselben Patienten verschiedene Mutationen tragen können (Blau et al. 2011).

Zusammenfassend unterliegt die Entstehung und Aufrechterhaltung der AML und ihres potenziellen Vorläufers, des MDS, einem komplexen System verschiedenster Einflussfaktoren, in welchem Stromazellen eine wichtige Bedeutung zukommt. In der hierarchischen Struktur leukämischer Stammzellen konnten in vielerlei Hinsicht Parallelen zur gesunden humanen Hämatopoese nachgewiesen werden.

1.3. Zielsetzung

Humane HSVZ *in vitro* zu kultivieren und das Differenzierungspotential primitiver HSZ dabei zu erhalten, bildet eine wichtige Basis für die Grundlagenforschung mit dem Ziel die Verwandtschaftsverhältnisse der unterschiedlichen Subpopulation sowie die Mechanismen zur Aufrechterhaltung vs. Differenzierung zu erforschen.

Bislang konnten allerdings keine *in vitro* Kulturbedingungen entwickelt werden, welche eine verlustfreie Kultivierung bzw. Expansion primitiver HSZ und somit den Erhalt aller Linienpotentiale ermöglicht. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben in diesem Zusammenhang die Kokultivierung von HSVZ mit mesenchymalen und endothelialen Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender analysiert. In allen getesteten Bedingungen ging insbesondere das erythrozytäre Differenzierungspotential der HSVZ

verloren, so dass auch dieser Ansatz keine suffiziente *in vitro* Kultivierung bzw. Expansion multipotenter HSVZ ermöglicht (Radtke et al. 2016).

Da in der Pathophysiologie von Leukämien die gesteigerte Proliferation hämatologischer Stamm- und Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt humaner MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten auf gesunde HSVZ und den Erhalt ihres Differenzierungspotentials untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cryomolds	Sakura Finetek (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Einfrierröhrchen (2 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 20 ml)	Braun (Melsungen)
Filter (0,22 und 0,45 µm Porengröße)	Corning (New York, NY, USA) und TPP (Trasadingen, Schweiz)
Flachbodenplatten (6er, 24er, 96er)	Greiner (Frickenhausen)
MACS Separationssäulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg) und PeQLab (Erlangen)
Polypropylen-Röhrchen (14 ml, 50 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Polypropylen-Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Reagenzien-Reservoir	Corning (New York, NY, USA)
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm^2)	Greiner (Frickenhausen)
Zellsieb (40 µm Porengröße)	Partec (Münster)
Zentrifugationsröhrchen (40 ml)	Nalgene (Rochester, NY, USA)

2.1.2. Geräte und zugehörige Software

Tabelle 2 Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
CO_2-Inkubator	Hera Cell240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Durchflusszytometer	FC500 (Analysegerät)	Beckmann Coulter (Krefeld)
	Software: CXP 2.2 und Kaluza 1.1	
	FACS Aria I (Zellsortierer)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
	Software: Diva 6.1.2	
Einfrierhilfe	Typ 5100	Nalgene (Waltham, USA)
Mikroskope	CKX41	Olympus (Hamburg)
	Axio Observer Z1	Zeiss (Jena)
	Axio Vert.A1	Zeiss (Jena)
	Software: AxioVision Rel 4.8	
Waage	MP-300	Citizen
Zellkulturbank	HERAsafe KS12	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zentrifugen	5810R	Eppendorf (Hamburg)
	5424	Eppendorf (Hamburg)

2.1.3. Medien und Medienzusätze

Tabelle 3 Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (1 g/l Glucose)	PAA (Pasching, Österreich), Lonza (Basel, Schweiz)
DMEM (4,5g/l Glucose)	PAA (Pasching, Österreich), Invitrogen (Karlsruhe)
IMDM	Lonza (Basel, Schweiz)

Tabelle 4 Verwendete Seren

Bezeichnung	Hersteller
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom (Berlin), PAA (Pasching, Österreich)

Tabelle 5 Verwendete Zytokine

Bezeichnung	Firma
Flt3-Ligand (FTL3L)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
insulin-like growth factor (IGF-1)	PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Insulin	Sigma-Aldrich (Taufenkrichen)
stem cell factor (SCF)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
transforming growth factor beta (TGF-β1)	PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)
transforming growth factor beta (TGF-β3)	PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Thrombopoietin (TPO)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Tabelle 6 Verwendete Medienzusätze

Bezeichnung	Firma
2-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethanolamin	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 7 Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Alizerin Rot	Roth (Karlsruhe)
BD ITS	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Biocoll Separating Solution	Biochrom (Berlin)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMSO	Wak-Chemie (Steinbach)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Beta-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
IMBX	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Indomethacin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Lysepuffer (Erythrozytenlyse)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Methocult H4434 Classic	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
OilRedO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Baack Labor (Schwerin)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.1.4. Zellkulturmedien

Alle verwendeten Medien wurden steril hergestellt und enthielten Phenolrot zur pH-Kontrolle (pKs=7,4).

Tabelle 8 Medienzusammensetzung für Primärzellen

Hämatopoetische CD34$^+$ Zellen
20% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptamycin
100 U/ml L-Glutamin
10 ng/ml SCF
10 ng/ml Flt3-L
10 ng/ml TPO
In IMDM

Mesenchymale Zellen (MSZ)
5% humanes Thrombozytenlysat
100 U/ml Penicillin/Streptamycin
100 U/ml L-Glutamin
in DMEM (1 g/l Glucose)

Tabelle 9 Medienzusammensetzung für die Kokultur von hämatopoetischen CD34$^+$ Zellen und MSZ

Hämatopoetische CD34$^+$ Zellen und MSZ
10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptamycin
100 U/ml L-Glutamin
10 ng/ml SCF
10 ng/ml Flt3-L
10 ng/ml TPO
In IMDM

Tabelle 10 Medienzusammensetzung für die *in vitro* Differenzierung von MSZ

Adipogenese induzierendes Medium	**Adipogenese erhaltendes Medium**
10% FBS	10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptamycin	100 U/ml Penicillin/Streptamycin
100 U/ml L-Glutamin	100 U/ml L-Glutamin
1% Natriumpyruvat	1% Natriumpyruvat
1 µM Dexamethason	1 µM Dexamethason
200 µM Indomethacin	200 µM Indomethacin
in DMEM (4,5 g/l Glukose)	2 µM Insulin
	500 µM IBMX
	in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Osteogenese induzierendes Medium
10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptamycin
100 U/ml L-Glutamin
1% Natriumpyruvat
0,1 µM Dexamethason
10 mM beta-Glycerolphosphat
300 µM Ascorbinsäure
in DMEM (4,5 g/l Glucose)

2.1.5. Antikörper

Tabelle 11 Verwendete Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller	Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
CD31	PE	MEM-05	Exbio	CD49f	PE	GoH3	BD Biosciences
CD34	ECD	581	Beckman Coulter	CD73	PE	AD2	BD Biosciences
CD34	PE-Cy7	581	BD Biosciences	CD90	FITC	2G5	Immunotech
CD38	FITC	HIT2	BD Biosciences	CD105	FITC	SN6/N1-3A1	Ancell
CD44	FITC	J.173	Immunotech	CD133	PE	AC133	Miltenyi Biotec
CD44	APC	1219	BD Biosciences	CD144	PE	TEA1/31	Immunotech
CD45	FITC	5B1	Miltenyi Biotec	CD146	PE	TEA1134	Beckman Coulter
CD45	PE	J33	Beckman Coulter	CD164	FITC	N6B6	BD Biosciences
CD45	APC	2D1	BD Biosciences	CD166	PE	3A6	BD Biosciences
CD45	PE-Cy7	J33	Beckman Coulter	CD271	FITC	ME20.4-1H4	Miltenyi Biotec

2.1.6. Primärzellen

Alle Versuche mit humanem Zellmaterial wurden mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Essen durchgeführt [13-5675-BO; 12-5295-BO; 15-6430-BO].

Die Abnahme der Nabelschnurrestblute erfolgte in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Kimmig nach Zustimmung der Mütter.

Die verwendeten Knochenmarkproben (Rückstellproben) gesunder Spender wurden von der Klinik für Knochenmarktransplantation unter der Leitung von Prof. Dr. Dietrich W. Beelen zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung und Expansion von Zellen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle adhärent wachsenden Zellen regelmäßig bei einer Konfluenz von 80-90% für 5 Minuten trypsiniert, mit dem Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst und anschließend in circa 50 ml Medium bei 900 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen und das entstandene Pellet in 1-2 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis von 1:5 gesplittet und mit frischem Medium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung und Konservierung lebender Zellen wurden diese zunächst zu einem Pellet zentrifugiert und anschließend in wenig Medium resuspendiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer gezählt, um 500.000 beziehungsweise 250.000 Zellen pro Aliquot einzufrieren. Jedes 1,5 ml fassende Aliquot enthielt zu gleichen Teilen Zellsuspension und Einfriermedium (80% FBS, 20% DMSO), so dass insgesamt eine finale DMSO Konzentration von 10% erreicht wurde. Um eine gleichmäßige Senkung der Temperatur um 1°C/min zu gewährleisten, wurden mit Isopropanol gefüllte Einfrierhilfen verwendet und die Zellen im Verlauf bei -80°C eingefroren. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Zellen in Stickstofftanks gelagert.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden diese mit 37°C warmen Medium im Aliquot resuspendiert und in circa 5 ml Medium zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert, um das für die Zellen bei Raumtemperatur schädliche DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden dann, abhängig vom Zellgehalt des Aliquotes, in kleine (25 cm^2) oder mittelgroße (75 cm^2) Zellkulturflaschen überführt und nach 24 h wurde das Medium gewechselt um tote Zellen zu entfernen.

2.2.1.3. Isolierung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurrestblut

Zur Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ) wurde das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Zunächst wurden 15 ml FICOLL Lösung (Dichte 1,077 g/ml; Biocoll Separating Solution) vorgelegt und anschließend 35 ml Nabelschnurrestblut oder Knochenmark darauf pipettiert, so dass beide Phasen sich nicht mischten. Stand nicht ausreichend Probenmaterial zur Verfügung, wurde dieses mit PBS

auf 35 ml aufgefüllt. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur und 900 x g für 20 min. zentrifugiert, wobei die Bremsfunktion der Zentrifuge ausgeschaltet wurde, um ein zu plötzliches Abbremsen und erneutes Vermischen von Probe und Ficoll zu vermeiden. Nach der Dichtegradientenzentrifugation waren vier Schichten abzugrenzen. Aufgrund ihrer hohen Dichte sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten als lockeres Pellet am Boden des Gefäßes. Darüber liegt die FICOLL Lösung und das Plasma. Zwischen FICOLL und Plasma befindet sich die relativ schmale Interphase, welche die MNZs, vor allem Lymphozyten, Monozyten und $CD34^+$ HSVZ, enthält. Mit Hilfe einer Pipette wurde zunächst ein Großteil des Plasmas abgenommen und verworfen, um anschließend die Interphase abzunehmen und in ein neues Falcon zu überführen. Die Interphase wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 650 x g für 7 Minuten erneut zentrifugiert. Bedingt durch ihre geringere Dichte verblieben noch vorhandene Thrombozyten im Überstand, wohingegen die MNZ sich zu einem Pellet sammelten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert. Um die MNZ schließlich noch von eventuell vorhandenen Erythrozyten zu befreien, wurden die Zellen mit Lysepuffer auf 15 ml aufgefüllt und bei 4°C für 7 min. inkubiert. Der osmotisch wirksame Lysepuffer bringt die Erythrozyten zum platzen. Um die MNZ nicht zu zerstören, wurde die Reaktion nach 7 min. gestoppt und die Zellsuspension mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 900 x g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Es folgten durchflusszytometrische Messungen des Zellgehaltes und des Gehaltes an $CD34^+$ HSVZ.

2.2.1.4. Anreicherung humaner $CD34^+$ HSVZ / Magnetische Zellseparation

Um eine Anreicherung von $CD34^+$ Zellen aus der mononukleären Zellfraktion zu erreichen, wurden diese mittels magnetischer Zellseparation (MACS – „Magnetic assisted cell sorting“) separiert (Miltenyi et al. 1990). Die Zellen wurden hierzu pelletiert und in circa 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Fc-Rezeptoren Blockingreagenz resuspendiert und 40 µl je $1x10^8$ Zellen anti-CD34-Antkörper, welche mit ferromagnetischen Partikeln konjugiert sind, für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit MACS Puffer aufgefüllt und bei 900 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml MACS Puffer resuspendiert und durch einen 40 µm Filter in die Separationssäule gegeben. Diese wurde im Vorfeld und im Anschluss 2-3 Mal mit MACS Puffer gespült. Auf diese Weise

verbleiben lediglich die markierten $CD34^+$ Zellen in der Säule. Diese wurde anschließend vom Magneten getrennt und die verbliebenen Zellen mit MACS Puffer aus der Säule gespült. Zur Qualitätskontrolle wurde der Spülpuffer vor und nach Entfernung des Magneten auf den Gehalt an 34^+ Zellen untersucht.

2.2.1.5. Anzucht von MSZ aus dem Knochenmark

Die Knochenmarkproben wurden zunächst, wie vorangehend beschrieben, mittels Dichtegradientenzentrifugation auf die Fraktion der MNZ aufgereinigt. Anschließend wurden circa $1x10^6$ Zellen mit jeweils 2 ml MSZ-Medium pro Vertiefung auf 6er Flachbodenlatten ausplattiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden vollständig und im weiteren Verlauf alle 3 Tage zur Hälfte gewechselt. Nach 7-10 Tagen zeigten sich erste Kolonien adhärent wachsender Zellen. Bei einer Konfluenz von circa 80% wurden die Zellen trypsiniert und auf 25 cm^3 Zellkulturflaschen ausplattiert. Es wurde so weiter verfahren bis zur 80%igen Konfluenz einer 125 cm^3 Zellkulturflasche. Daraufhin wurden die Zellen trypsiniert, aliquotiert und eingefroren. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von für MSZ typischen Oberflächenproteinen analysiert.

2.2.2. Durchflusszytometrie

2.2.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission optischer Signale von einzeln durch einen Laserstrahl geleiteten Zellen. Zellen werden durch eine Kapillare in das Gerät geführt und durch hydrodynamische Fokussierung so separiert, dass jede Zelle einzeln die Messkammer passiert (Mauro et al. 1986). In der Messkammer werden die Einzelzellen durch einen fokussierten Laserstrahl geführt und das entstehende Streulicht durch einen Photoelektronenvervielfacher (PMT) detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ergibt sich aus Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt von der Größe bzw. vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) entsteht durch Refraktion des Lichts und wird durch die Granularität der Zelle bestimmt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu färben. Die Fluorochrome absorbieren Energie des Lasers, werden kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gehoben und nehmen anschließend ihren Ausgangszustand wieder ein. Bei diesem Vorgang kommt es zur Emission von Energie in Form von Licht, welches durch PMTs detektiert werden kann.

Das Licht wird abhängig von der Wellenläge durch verschiedene Filter aufgetrennt, verstärkt und quantifiziert. Es gibt einen Kurzpassfilter, welcher nur kurzwelliges Licht passieren lässt, einen entsprechenden Langpassfilter und eine Kombination aus beidem, den Bandpassfilter, für zuvor definierte Spektren. Durch die Verwendung mehrerer Laser und unterschiedlicher Filter können zur gleichen Zeit mehrere Fluoreszenzsignale detektiert werden. Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer FC500 der Firma Beckman Coulter besitzt einen 488 nm Argon Laser, sowie einen 638nm Helium-Neon-Laser und ermöglicht die gleichzeitige Messung von 5 unterschiedlichen Fluoreszenzen. Für die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde der FACSAriaI der Firma BD Bioscience verwendet. Dieser besitzt zusätzlich einen ultravioletten 405 nm Laser und ermöglicht die gleichzeitige Messung von 9 bis zu 11 Fluoreszenzen. Die simultane Messung mehrerer Fluoreszenzen führt zu einer Überlagerung der unterschiedlichen Emissionspektren, welche mathematisch herausgerechnet werden muss. Man bezeichnet diesen Vorgang als Kompensation. Für die Kompensation werden vor Beginn der eigentlichen Messungen, Zellen mit nur einem Fluorochrom markiert und gemessen und das Durchflusszytometer kalibriert (Traganos 1984, Alexander et al. 2009, Pierzchalski et al. 2011).

2.2.2.2. Durchflusszytometrische Zellsortierung

Mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung ist es möglich, Zellen z.B. anhand ihrer Oberflächenantigene zu diskriminieren und dann in unterschiedliche Gefäße zu separieren (Fulwyler 1965, Hulett et al. 1969). Für diesen Zweck wird der die Zellen umhüllende Flüssigkeitsstrahl nach Passieren der Messeinheit piezoelektrisch zum Schwingen angeregt (Frequenz: 14 kHz). Durch die Frequenz und Amplitude definierte Schwingungen, geht der Flüssigkeitsstrahl am sog. Tropfenabrisspunkt (*drop delay*) in einzelne Tropfen über, in welchen, bei entsprechenden Einstellungen, jeweils eine Zelle enthalten ist. Zum Zeitpunkt des Tropfenabrisspunktes, wird der Strahl kurzzeitig elektrisch geladen. Die einzelnen Tropfen werden im weiteren Verlauf zwischen zwei Kondensorplatten deflektiert (*deflection plates*) und so separat aufgefangen (Ibrahim and van den Engh 2007).

Für die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde eine 130 µm *Nozzle* und ein Probenflüssigkeitsdruck von 10 psi (*pound per square inch*) verwendet. Bei der Trägerflüssigkeit handelte es sich um steriles PBS (PAA) und die Kalibrierung des Systems, einschließlich des Tropfenabrisspunktes, wurden mit standardisierten

Kalibrierungsbeads durchgeführt (BD Cytometer Setup & Tracking Beads, BD Biosciences). Um eine homogene und aggregatfreie Verteilung der zu sortierenden Zellen zu gewährleisten, wurden diese vor der Messung durch ein steriles Zellsieb filtriert (Porengröße 35 µm) und in Zellmedium aufgenommen. Um nach der Sortierung eine Zellreinheit von mind. 99% zu gewährleisten, wurden die Zellen re-analysiert. Bei einer Reinheit von unter 99% wurden die Zellen erneut sortiert. Die erhobenen Daten wurden computergestützt gespeichert und mittels der Software Diva 6.1.2 ausgewertet.

2.2.3. *In vitro* Differenzierung von HSVZ

2.2.3.1. „Colony forming cell“ (CFC) Assay

Der *colony forming cell* Ansatz (CFC) ermöglicht die quantitative Erfassung von HSVZ mit erythrozytärem, myeloischem sowie erythro-myeloischem Differenzierungspotential (Pike and Robinson 1970, Moore et al. 1973). Es wurden durchflusszytometrisch 200 $CD34^+$ HSVZ in semisolides methylzellulosehaltiges H4434 Medium (StemCell Technologies) abgelegt und auf zwei Vertiefungen einer 24er Flachbodenplatte aufgeteilt. Das semisolide Medium verringert den Bewegungsraum der Zellen sowie ihrer Tochterzellen und ermöglicht somit die Ausbildung von Kolonien. Die restlichen Vertiefungen wurden mit PBS aufgefüllt, um eine Austrocknung der Ansätze zu verhindern. Um eine Differenzierung der HSVZ in Granulozyten, Erytrozyten und Makrophagen zu ermöglichen, enthielt das Medium die Zytokine SCF, GM-SCF, IL-3 und Epo. Die Ansätze wurden für 14 Tage bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach 14 Tagen erfolgte die mikroskopische Auswertung, indem die einzelnen Kolonietypen gezählt wurden. Es wurden folgende Kolonietypen (*CFU=colony forming unit*) unterschieden: CFU-E (*colony-forming unit-eryhtroid*), BFU-E (*burst-forming unit-eryhtroid*), CFU-G (*colony-forming unit-granulocyte*), CFU-M (*colony-forming unit-macrophage*), CFU-GM (*colony-forming unit-granulocyte-macrophage*) und CFU-GEMM (*colony-forming unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*).

2.2.4. *In vitro* Differenzierung von MSZ

Zu den in der Literatur beschriebenen funktionellen Charakteristika von MSZ gehört unter anderem die Differenzierungsfähigkeit in Adipozyten und Osteoblasten (Pittenger et al. 1999). Die folgenden Differenzierungsprotokolle wurden entsprechend der Publikation Hemeda et al. Durchgeführt (Hemeda et al. 2010).Für die Differenzierung wurden auf einer 12er Flachbodenplatte $4x10^4$ Zellen je Vertiefung ausplattiert. Die

Zellen wurden in MSZ Medium bis zu einer Konfluenz von circa 80% bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Anschließend erfolgte die adipogene bzw. osteogene Differenzierung.

2.2.4.1. Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die MSZ zuerst 4 Tage in Adipogenese-induzierendem Medium kultiviert. Anschließend wurde dieses durch Adipogenese-erhaltendes Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 10 Tage kultiviert. An Tag 14 wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 5 Minuten mit 4%igem Para-Formaldehyd (PFA) fixiert. Danach wurden diese einmal mit PBS gewaschen und für 1 Minute mit 1 ml einer 0,5%igen Ölrot-O-Isopropanollösung pro Vertiefung bei RT gefärbt. Zur Entfernung überschüssiger Farbe wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen.

2.2.4.2. Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben ausplattiert und für 14 Tage mit Osteogenese-induzierendem Medium kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage zur Hälfte ausgetauscht und an Tag 14 vollständig entfernt. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit PFA fixiert und die entstandene Calcium-Knochenmatrix mit 1 ml Alizarinrot pro Vertiefung für 1 Minute bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen.

2.2.5. Ko-Kultivierung von HSVZ mit MSZ

Vorbereitend für die Kokultur wurden zunächst 2,4 x 10^3 MSZ je Vertiefung einer 12er Flachbodenplatte ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 bis zu einer Konfluenz von ca. 50% kultiviert. Anschließend wurde das zellspezifische Medium vollständig abgenommen und je Vertiefung 1000 durchflusszytometrisch sortierte $CD34^+$ Zellen in 1 ml Kokulturmedium hinzugefügt. Nach 7 tägiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 wurden 500 µl des Kulturmediums abgenommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 7 Tagen wurden die hämatopoetischen Zellen mitsamt Medium abgenommen und mit PBS auf dasselbe Volumen aufgefüllt. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension durchflusszytometrisch auf die Oberflächenmarker CD34, CD38, CD133 und CD45 untersucht. Aus der restlichen Zellsuspension wurden mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung 200 $CD34^+$ Zellen durchflusszytometrisch in den CFC Ansatz überführt.

2.2.6. Statistische Analysen

Alle aufgeführten Daten sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (standard deviation = SD) oder Standardfehler (standard error of the mean = SEM) angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden über den zweiseitig gepaarten *student t-Test* mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2007 und GraphPad Prism 8 berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden wie folgt in den Abbildungen gekennzeichnet: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$. Die Berechnung der Korrelation erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 8 unter Verwendung des Spearman Korrelationskoeffizienten. Berechnete Koeffizienten mit $r^2>0.500$ bzw. $r^2<-0.500$ wurden per Definition als korrelierend bewertet.

3. Ergebnisse

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, stehen HSVZ *in vivo* in engem Kontakt mit anderen Zellen des Knochenmarks, wie Osteoblasten, MSZ oder Endothelzellen. Über direkte Zell-Zell Kontakte, sowie die Sekretion verschiedener Zytokine sind diese Zellen essenziell für die Biologie von HSVZ. In der Pathophysiologie maligner hämatopoetischer Erkrankungen, kommt es sowohl in den hämatopoetischen Zellen als auch in den Stromazellen der Stammzellnische zu Veränderungen. So finden sich in bis zu 25% der MSZ aus dem Knochenmark von AML und MDS Patienten genetische Aberrationen, die sich von denen der HSVZ unterscheiden (Blau et al. 2011). Arbeiten von Geyh et al. haben ebenfalls gezeigt, dass MSZ von MDS und AML Patienten strukturell und genetisch verändert sind und dadurch zu einer insuffizienten Hämatopoese beitragen (Geyh et al. 2013, Geyh et al. 2016). Medyouf et al. konnten im Mausmodell beobachten, dass MSZ aus dem Knochenmark von Patienten mit MDS das Einwandern von hämatopoetischen MDS Zellen unterstützen. Im Gegensatz dazu, ließen sie die Expansion und Proliferation gesunder HSVZ nicht zu (Medyouf et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten einen anderen Einfluss auf die frühe humane Hämatopoese haben als MSZ aus dem Knochenmark von gesunden Probanden. In diesem Fall wurde der Effekt der verschiedenen MSZ auf gesunde HSVZ aus Nabelschnurrestblut analysiert. Zu diesem Zweck wurden MSZ von AML Patienten und gesunden Spendern aus Knochenmarkproben isoliert, expandiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.5 und 2.2.1.1) und quantitativ sowie qualitativ untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.2 und 2.2.4). Anschließend wurden über 14 Tage Kokulturen der verschiedenen MSZ Stromazelllinien mit HSVZ aus Nabelschnurrestblut durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.2.1.3; 2.2.1.4; 2.2.5). Im Anschluss an die Kokultivierung wurden die hämatopoetischen Zellen durchflusszytometrisch anhand verschiedener Oberflächenmarker analysiert und im CFC Ansatz funktionell untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3.1).

3.1. Charakterisierung der Knochenmarkproben von gesunden Spendern und AML Patienten

Um der Fragestellung nachzugehen, ob MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten einen anderen Effekt auf HSVZ haben als MSZ von gesunden Spendern, wurden zunächst Knochenmarkproben gesammelt und MSZ aus diesen angezogen. Für die Anzucht der AML MSZ wurden Proben aus der Routine der Klinik für Hämatologie (Prof. Dr. Ulrich

Dührsen) verwendet. Die MSZ aus dem Knochenmark gesunder Kontrollpersonen wurden aus Rückstellproben der Klinik für Knochenmarktransplantation (Prof. Dr. Dietrich W. Beelen) generiert.

Es wurden Proben von drei gesunden und sieben AML Patienten verwendet (Tabelle 12; Tabelle 13). Die Proben mit den Nummern 6 und 9 stammen von derselben Patientin und wurden im Therapieverlauf zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Von den gesunden Spendern liegen nur für die Nummer 3 Alter und Geschlecht vor. In der Gruppe, der an AML erkrankten Spender wurden die Proben von sieben Frauen und zwei Männern erhalten, wobei es sich bei den Proben 2 und 10 um peripheres Blut handelt, welches nicht weiter untersucht bzw. verwendet wurde. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme 21 Jahre alt, die älteste Patientin 78 Jahre, das Durchschnittliche Alter lag in der Kohorte der erkrankten Patienten bei 59 Jahren.

Die Proben wurden darüber hinaus dahingehend gruppiert, ob die Patienten zum Zeitpunkt der Probeentnahme bereits chemotherapeutisch vorbehandelt waren. Sechs von acht Knochenmarkproben wurden vor der ersten Gabe von Chemotherapie entnommen, die Proben mit den Nummern 1 und 3 nach vorheriger Gabe von Chemotherapeutika.

Die Diagnose der AML wurde von der Klinik für Knochenmarktransplantation gestellt. Zu gängigen diagnostischen Schritten gehört hierbei die Untersuchung des Blutbildes, die Knochenmarkzytologie und Histologie. Bei einer AML liegt defintionsgemäß ein Blastenanteil von >20% im Knochenmark vor. Liegt der Blastenanteil darunter spricht man von einem MDS. Weiterhin werden für die klinische Einteilung unterschiedlicher AML Subtypen zytogenetische Untersuchungen durchgeführt, beispielsweise bezüglich des Karyotypes und etwaiger Mutationen, sowie moleklargenetische Analysen, zum Beispiel der Nachweis von Mutationen der *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3), (Tabelle 12; Tabelle 13). In den Proben Nummer 1 und 5 fand sich eine Deletion von Chromosom 7, wohingegen die Probe Nummer 10 eine Insertionsmutation aufwies (Tabelle 13). Bei keinem der daraufhin untersuchten Patienten lag eine Mutation des FLT3 Gens vor. Die Einteilung nach der FAB Klassifikation (French American British Klassifikation) erfolgte nur bei 4 Patienten. Demnach haben Patient 3 und 10 eine M1 AML, Patient 8 eine M4 AML, und bei Patient 2 wurde eine M5 AML diagnostiziert (Tabelle 14).

Insgesamt präsentiert sich die Kohorte der AML Patienten als heterogene Gruppe mit einer großen Varianz bezogen auf Alter, Karyotyp und molekulargenetischen Merkmalen. Darüberhinaus liegen leider nicht für alle Patienten die oben genannten Daten wie FAB Klassifikation, Karyotyp oder FLT3 Mutationsstatus vor.

Tabelle 12 Patientendaten der verwendeten Rückstellproben

Probennr.	Probe vom	Material	Alter	Geschlecht
1	31.05.2011	KM	-	-
2	20.06.2011	KM	-	-
3	27.06.2011	KM	61	w

KM=Knochenmark; w=weiblich.

Tabelle 13 Patientendaten der Knochenmarkproben von AML Patienten

Probe	Probe vom	Material	Alter	Geschlecht	ED	Karyotyp	FAB	FLT3 Mutation	CTX	CTX vor Probe
1	02.05.2011	KM	65	w	02/2011	45 XX -7	-	neg.	02/2011	ja
2	13.05.2011	PB	21	w	05/2011	46 XX dr(7)t(1;7)(q21;q22) i(13)(q10)[21]	M5	-	05/2011	-
3	03.06.2011	KM	32	w	04/2011	46 XX	M1	neg.	04/2011	ja
4	06.06.2011	KM	-	m	-	-	-	-	-	-
5	08.06.2011	KM	74	w	07/2010	45 XX -7	-	-	07/2011	-
6	08.06.2011	KM	63	w	06/2011	46 XX (13)	-	neg.	06/2011	nein
7	08.06.2011	KM	74	w	06/2011	46 XX	-	-	07/2011	-
8	24.06.2011	KM	63	m	06/2011	46 XY t(4;12)(q12;p13)[25]	M4	neg.	06/2011	-
9	24.06.2011	KM	63	w	06/2011	46 XX (13)	-	neg.	06/2011	nein -
10	24.06.2011	PB	78	w	06/2011	47 XX +8[11]	M1	-	06/2011	-
			Ø = 59							

KM=Knochenmark; PB=peripheres Blut; w=weiblich; m=männlich; ED=Erstdiagnose laut Arztbrief; FAB=French American British Klassifikation; FLT3=FMS-like tyrosine kinase 3, CTX=erste Chemotherapie erhalten am; CTX vor Probe=PatientIn hat vor Entnahme der in dieser Arbeit verwendeten Probe Chemotherapie erhalten.

Tabelle 14 FAB Klassifikation

AML Subtypen			
M0	Minimal differenzierte AML	M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M1	AML ohne Ausreifung	M5	Akute monozytäre Leukämie
M2	AML mit Ausreifung	M6	Akute Erythroleukämie
M3	Akute Promyelozyten Leukämie	M7	Akute megakaryozytäre Leukämie

3.1.1. Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben

Um die Knochenmarkproben anhand einheitlicher Kriterien zu charakterisieren, wurde die Qualität der darin enthaltenen mononukleären Zellen zunächst durchflusszytometrisch untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit war insbesondere der Anteil und der Phänotyp der leukämischen Blasten von Interesse. Wie bereits im Einleitungsteil

erläutert, lassen sich Blasten anhand der Expression verschiedener Oberflächenantigene charakterisieren und hierarchisch einteilen (vgl. 1.2.1). Die Knochenmarkproben wurden vor der durchflusszytometrischen Analyse, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, aufgearbeitet und anschließend auf die Expression der Marker CD34, CD133, CD38 und CD45 untersucht. Gemessen und dargestellt ist der prozentuale Anteil der Expression des jeweiligen Oberflächenantigens.

Tabelle 15 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von gesunden Spendern

Probe	$CD45^+$	$CD34^+$	$CD133^+$	$CD34^+ 133^-$	$CD34^+ 133^+$	$CD34^+ 38^-$	$CD34^+ 38^+$	$CD38^+ 133^+$	$CD38^- 133^+$
1	97,93	3,16	2,12	1,96	1,46	0,84	2,83	2,03	0,58
2	97,78	9,32	2,27	6,88	2,56	0,63	8,7	2,05	0,62
3	97,27	2,4	1,19	1,41	1,12	0,33	2,14	1,37	0,38

Werte angegeben in % der Mononukleären Zellen.

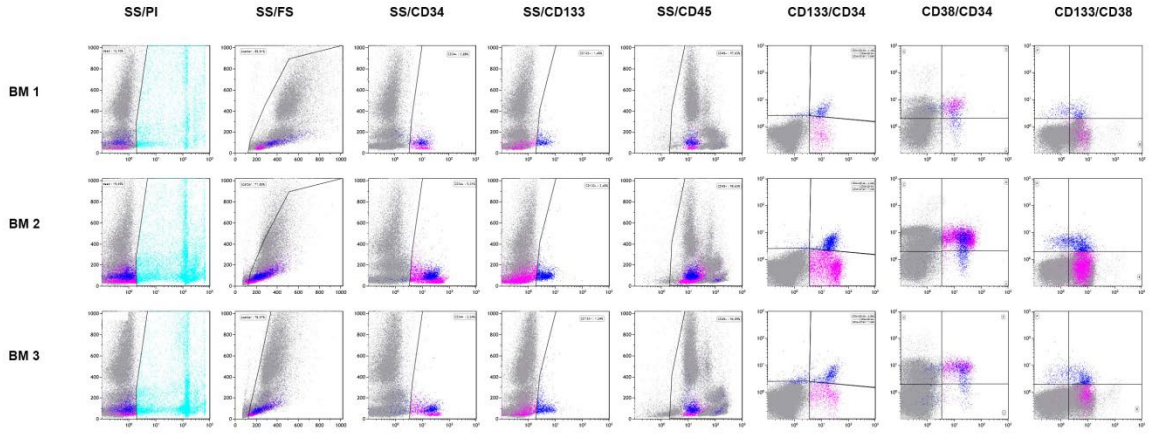


Abbildung 5 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von gesunden Spendern
Primäre durchflusszytometrische Untersuchung der Knochenmarkproben, durchgeführt jeweils am Tag des Erhaltens. Abkürzungen: BM=bone marrow

Alle Proben enthielten $CD45^+$ Zellen, wobei der Anteil in den Proben gesunder Spender bei über 97,66% lag (max. 97,93%; min. 97,27%) (Tabelle 15). In den AML Proben war die Verteilung deutlich heterogener, wobei durchschnittlich auf 79,36% der Zellen CD45 exprimiert wurde (max. 94,43%; min. 50,3%) (Tabelle 16). In allen Proben konnten $CD34^+$ Zellen nachgewiesen werden, wobei in den gesunden Proben CD34 im Mittel auf 4,96% der Zellen detektiert wurde (max. 9,32%; min. 2,4%) und in den AML Proben auf 50,61% (max. 93,76%; min. 7,1%). Eine ähnliche Verteilung fand sich auch bei der

Messung von CD133. In diesem Fall konnte in den gesunden Proben auf 1,86% (max. 2,27%; min. 1,19%) und in den AML Proben auf durchschnittlich 59,97% (max. 90,9%; min. 9,88%) der Zellen CD133 nachgewiesen werden. Eine Ko-Expression von CD34 und CD133 fand sich auf 1,7% (max. 2,56%; min. 1,12%) der Zellen in der Gruppe der gesunden Spender und auf 41,99% (max. 90,63%; min. 7,16%) der Zellen aus den AML Proben. Darüber hinaus fanden sich in allen Proben Populationen $CD34^+CD133^-$ Zellen, und zwar im Mittel 3,4% (max. 6,88%; min. 1,41%) in den gesunden Proben und 8,83% (max. 49,13%; min. 0,06%) in den AML Proben. Sowohl CD34 als auch CD38 fanden sich in 4,6% (max. 8,7%; min. 2,14%) der Fälle auf Zellen der gesunden Spender und in 19% (max. 56,4%; min. 0,63%) auf Zellen der AML Patienten. Subpopulationen von $CD34^+CD38^-$ Zellen waren in den gesunden Proben kaum erkennbar (max. 0,84%), wobei durchschnittlich 31,6% der Zellen aus den AML Proben $CD34^+CD38^-$ waren (max. 93,18%; min 2,6%).

Auf Grund der Ergebnisse lässt sich sagen, dass die Expression der gemessenen Oberflächenantigene in den Proben der AML Patienten, wie erwartet, sehr heterogen war. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben fand sich durchschnittlich eine hohe Anzahl $CD34^+$ Zellen (50,61% vs. 4,96%), wobei die Werte breit gestreut waren (max. 93,76%; min. 7,1%). Diese Ergebnisse sind kongruent mit Daten aus der Literatur, dass ein Großteil leukämischer Blasten CD34 exprimiert (Sperling et al. 1993). Die Proben AML 5, 6 und 7 wiesen als einzige CD34 Werte <20% auf, wobei in den Proben 5 und 7 große $CD133^+$ Populationen detektiert wurden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen AML Subtyp mit $CD34^-$ Blasten.

Tabelle 16 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von AML Patienten

Probe	$CD45^+$	$CD34^+$	$CD133^+$	$CD34^+ 133^-$	$CD34^+ 133^+$	$CD34^+ 38^-$	$CD34^+ 38^+$	$CD38^+ 133^+$	$CD38^- 133^+$
1	56,95	93,76	90,9	3,18	90,63	93,18	0,63	0,43	90,59
3	90,98	89,42	87,56	2,46	87	78,9	10,55	9,15	78,05
4	92,85	65,35	55,8	11,34	54,66	8,75	56,4	50,14	7,11
5	92,71	7,1	79,59	0,29	7,16	3,31	3,59	5,58	74,22
6	94,43	11,83	9,88	2,5	9,35	2,61	9,21	6,99	2,74
7	89,48	9,71	80,46	0,06	10,14	2,6	7,6	16,79	66,84
8	50,3	50,25	48,99	1,67	48,81	9,89	40,51	39,24	9,83
9	67,18	77,45	26,58	49,13	28,19	53,53	23,54	11,25	17,81

Werte angegeben in % der Mononukleären Zellen.

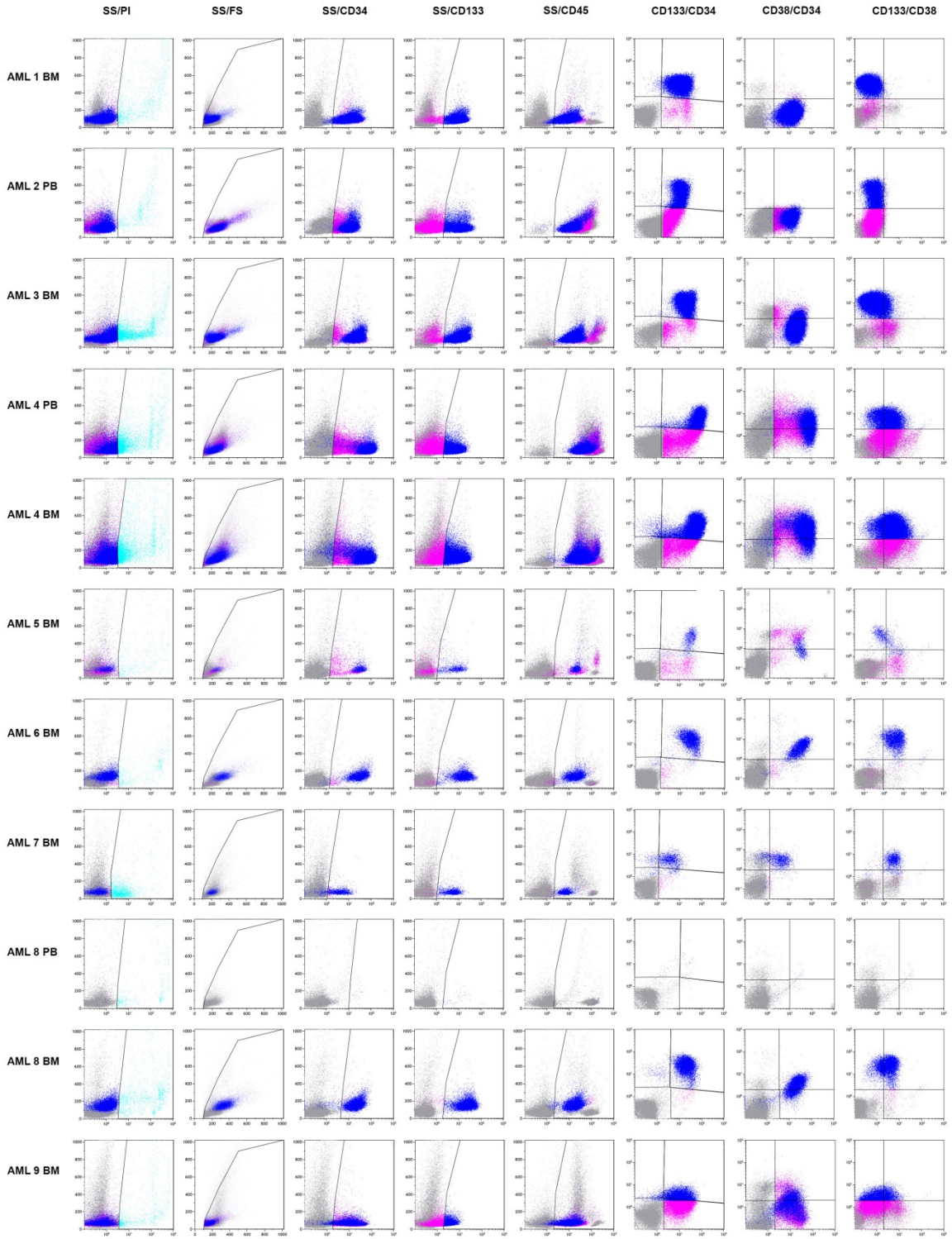


Abbildung 6 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von AML Patienten

Primäre durchflusszytmetrische Untersuchung der Knochenmarkproben, durchgeführt jeweils am Tag des Erhaltens. Abkürzungen:BM=bone marrow; PB=peripheres Blut

Die Proben 6 und 9 stammen von derselben Patientin und wurden im Abstand von 16 Tagen entnommen. Initial handelte es sich hierbei möglicherweise um myelodysplastische Veränderungen mit rascher Progression in eine AML. Der erste Chemotherapie Zyklus wurde in diesem Fall nach Entnahme der zweiten Probe begonnen. Es findet sich eine deutliche Zunahme aller Populationen unter anderem auch der $CD34^{+}CD38^{-}$ Fraktion (Probe 6: 2,61%; Probe 9: 53,53%). Innerhalb dieser Subpopulation sind laut Bonnet und Dick et al. auch die leukämischen Stammzellen (LSZ) zu finden (Bonnet and Dick 1997). Die Verteilung der $CD34^{+}CD38^{-}$Subpopulation ist innerhalb der AML Proben sehr unterschiedlich, wobei sich der größte Anteil in den Proben 1, 2 und 9 findet.

In den Proben der Kontrollpersonen stellte sich die Antigenexpression insgesamt homogener und wie erwartet dar. Die einzige Auffälligkeit war der hohe Anteil $CD34^{+}$ Zellen in Probe BM2 (9,32%), welcher jedoch als Zufallsbefund gewertet wurde. Auf Basis der durchflusszytometrischen Analyse, wurden alle Proben, bis auf die Proben aus peripherem Blut (vgl. Abbildung 6), für die weiteren Versuche verwendet.

3.1.2. Anzucht von MSZ aus dem Knochenmark von gesunden Kontrollpersonen und AML Patienten

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben wurde mit der Anzucht von MSZ begonnen. Die MSZ aus den Knochenmarkproben von gesunden Patienten wurden nicht speziell für diese Arbeit angezogen, sondern wurden in unserer Arbeitsgruppe für andere Experimente expandiert. Für die Versuche dieser Arbeit wurden sie aufgetaut und verwendet.

Die Knochenmarkproben der AML Patienten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und die MSZ anschließend in speziellen Nährmedien über mehrere Wochen expandiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.5). Erste kolonie-ähnliche Ansammlungen adhärent wachsender, spindelförmiger Zellen konnten nach etwa 5-7 Tagen beobachtet werden. Je Vertiefung der Flachbodenplatte fanden sich etwa drei bis fünf Kolonien mit sehr heterogener Morphologie und Größe. Die Zellen enthielten viel Zytoplasma mit einem mittelständigen runden Zellkern und bildeten außerdem sowohl Filopodien als auch Lamellipodien aus. Bei nahezu vollständiger Konfluenz bildeten die Zellen parallele, straßen-ähnliche Strukturen aus (Abbildung 7).

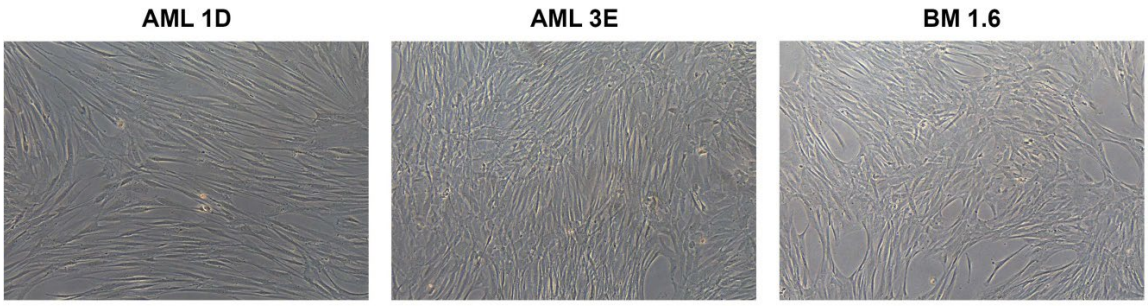


Abbildung 7 Mikroskopische Darstellung einzelner MSZ Linien
Beispielhaft dargestellt sind MSZ der Linien AML 1D und 3E, sowie die Linie BM 1.6.

Initial sollten im Rahmen dieser Arbeit sowohl MSZ als auch Endothelzellen aus den Knochenmarkproben angezogen werden. Die Knochenmarkproben wurden daher aufgeteilt und zur Hälfte in MSZ bzw. Endothel Nährmedium kultiviert. Da die Anzucht von Endothelzellen nicht gelungen ist, wurde dieser Plan nicht weiterverfolgt. Für die weiteren Versuche wurden nur die Zellen, welche von Anfang an in MSZ Medium kultiviert wurden, verwendet. Da aus der Probe 5 allerdings nur sehr wenig MSZ angezogen werden konnten, wurden initial in Endothelmedium ausgesäte Zellen nach der ersten Passage in MSZ Medium weitergeführt und verwendet (AML Probe 5B). Im weiteren Verlauf der Experimente, wiesen diese Zellen auch nach dem Einfrier- und Auftauvorgang weniger Expansionspotential auf als die übrigen Zelllinien.
Auch die MSZ aus Probe 8 zeigten eine verzögerte Expansion und konnten nicht auf eine Dichte von über 70% angezogen werden, weshalb von diesen Zelllinien nur wenige Proben eingefroren werden konnten. Ansonsten wurde, wenn möglich, aus jeder erhaltenen Knochenmarkprobe von AML Patienten drei voneinander unabhängige oligoklonale Zelllinien generiert.
Zusammenfassend konnte trotz unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit, aus allen erhaltenen Knochenmarkproben erfolgreich adhärent wachsende Zellen angezogen werden. Alle Zellen wiesen morphologisch einen für MSZ typischen Phänotyp auf.

3.1.3. Durchflusszytometrische Analyse der MSZ

Um nachzuweisen, dass es sich bei den expandierten Zellen um MSZ handelt, wurden diese durchflusszytometrisch auf die Expression verschiedener Oberflächenantigene untersucht. Zwar ist bislang kein einzelnes Oberflächenantigen bekannt, welches spezifisch nur auf MSZ exprimiert wird, jedoch sind in der Literatur verschiedene Marker beschrieben, die in ihrer Kombination dem mesenchymalen Phänotyp entsprechen

(Pittenger et al. 1999). MSZ exprimieren die Oberflächenantigene CD44, CD73, CD105, CD146 sowie CD90. Hämatopoetische Marker wie CD45 und Oberflächenantigene wie CD31, welches zum Beispiel auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, finden sich nicht auf MSZ. Um MSZ von endothelialen und hämatopoetischen Zellen zu diskriminieren, wurde nachfolgend die Expression von CD90 in Kombination mit CD45 und CD31 durchflusszytometrisch analysiert. Obwohl alle Zellen die für MSZ typischen Oberflächenantigene exprimierten, war die Intensität der Expression (*mean fluorescent intensity: MFI*) zwischen den einzelnen Zelllinien sehr unterschiedlich (Abbildung 8; Abbildung 9; Tabelle 17). Die MFI Werte für CD44 variierten zwischen 9,4 (AML 1D) und 75,4 (AML 7F), wohingegen die minimalen und maximalen MFI Werte der gesunden MSZ zwischen 19,06 und 34,47 lagen. Ähnlich heterogen war auch die Expression von CD73 (MFI: 0,34 (AML 3F) – 75,33 (AML 9F) bzw. 13,77 (BM 1.6) – 48,59 (BM 3.4)), CD146 (MFI: 7,29 (AML 4E) – 39,71 (AML 5F) bzw. 9,7 (BM 2.6) – 22,94 (BM 3.4)) und CD105 (MFI: 7,68 (AML 8E) – 26,49 (AML 9E) bzw. 6,36 (BM 1.4) – 17,98 (BM 3.4)). Die Expression des Antigens CD45 lag in den meisten Fällen bei einer MFI <1. Nur kleine Subpopulationen von Zellen präsentierten eine MFI >1 ((MFI: 0,43 (AML 4E) – 4,11 (AML 7E) bzw. 0,57 (BM 1.4) – 1,88 (BM 3.4)) ebenso wie das Oberflächenantigen CD31 (MFI: 0,35 (AML 3F) – 10,8 (AML 9E) bzw. 0,36 (BM 1.4) – 0,94 (BM 3.4)).
Zusammenfassend exprimierten alle getesteten Zellen die für MSZ charakteristischen Marker. Die fehlende Expression von CD73 und CD146 auf den MSZ der Linie AML 3F wurde als Pipetierfehler gewertet. Im nachfolgenden Abschnitt werden die funktionellen Eigenschaften der expandierten Zellen näher untersucht.

Tabelle 17 MFI Werte der analysierten MSZ

BM MSZ	CD44	CD49f	CD73	CD90	CD105	CD146	CD31	CD45	CD271
1.4	25,55	1,65	24,31	33,17	6,36	15,14	0,36	0,57	0,57
1.6	19,58	2,67	13,77	17,08	9,57	14,65	0,5	1,17	0,49
2.4	33,16	3,56	16,79	29,1	16,5	10,23	0,63	0,66	-0,08
2.6	28,62	2,98	16,75	34,91	15,49	9,7	0,66	0,67	-0,02
3.4	34,47	2,46	48,59	27,9	17,98	22,94	0,94	1,88	0,43
3.5	19,06	1,91	43,62	20,01	16,52	19,75	0,66	1,76	0,54
MW	26,74	2,54	27,31	27,03	13,74	15,40	0,63	1,12	0,32
SEM	2,68	0,29	6,15	2,90	1,90	2,13	0,08	0,24	0,12

AML MSZ	CD44	CD49f	CD73	CD90	CD105	CD146	CD31	CD45	CD271
1A	8,97	1,56	19,8	19,55	12,88	2,98	0,82	1,14	0,96
1D	9,4	1,19	15,67	17,9	19,93	3,4	0,55	0,91	0,67
3E	60,86	4,85	13,05	24,61	14,91	10,06	0,43	0,99	0,42
3F	15,98	3,08	0,34	25,84	12,72	0,49	0,35	0,85	0,95
4E	9,75	3,1	28,9	16,98	13,07	7,29	0,77	0,43	0,14
4F	21,7	1,71	28,32	41,36	11,74	6,58	0,79	2,08	0,04
5B	30,44	4,29	43,04	30,29	12,31	22,66	0,96	0,67	0,02
5F	60,58	9,48	56,24	36,36	24,75	39,71	1,81	4,43	1,39
6D	65,02	4,62	53,08	46,5	14,12	14,4	0,82	3,17	0,02
6F	11,99	6,85	31,96	30,07	17,11	16,44	0,74	0,46	-0,34
7E	24,64	2,1	35,97	25,4	14,82	19,03	1,8	4,11	1,15
7F	75,4	3,14	68,51	57,29	17,55	6,73	0,97	2,46	2,34
8D	20,08	4,95	33,88	20,74	11,56	17,49	1,27	2,7	1,88
8E	21,25	2,15	25,9	20,24	7,68	13,98	1,52	3,19	1,87
9E	13,51	11,42	26,4	9,22	26,49	6,1	10,8	1,31	0,8
9F	40,62	3,39	75,33	90,2	21,99	20,92	1,92	3,03	1,6
MW	30,64	4,24	37,07	32,03	15,85	13,85	1,65	2,00	0,87
SEM	5,64	0,72	4,81	4,94	1,29	2,48	0,62	0,33	0,20

Alle Werte graphisch dargestellt in Abbildung 8 und Abbildung 9.

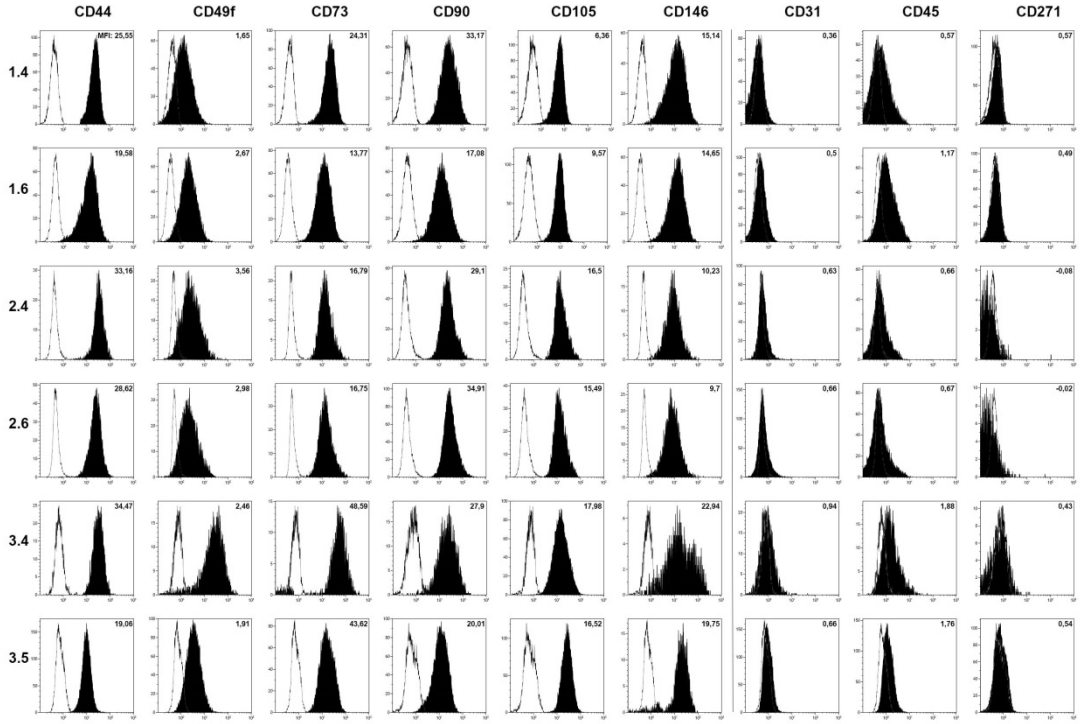


Abbildung 8 Durchflusszytometrische Analyse der MSZ angezogen aus Knochenmarkproben von gesunden Personen

Durchflusszytometrische Charakterisierung humaner MSZ, welche aus dem Knochenmark gesunder Spender angezogen worden sind (weiß = Isotyp-Kontrolle; schwarz = Fluoreszenzintensität; MFI = mittlere Fluoreszenzintensität).

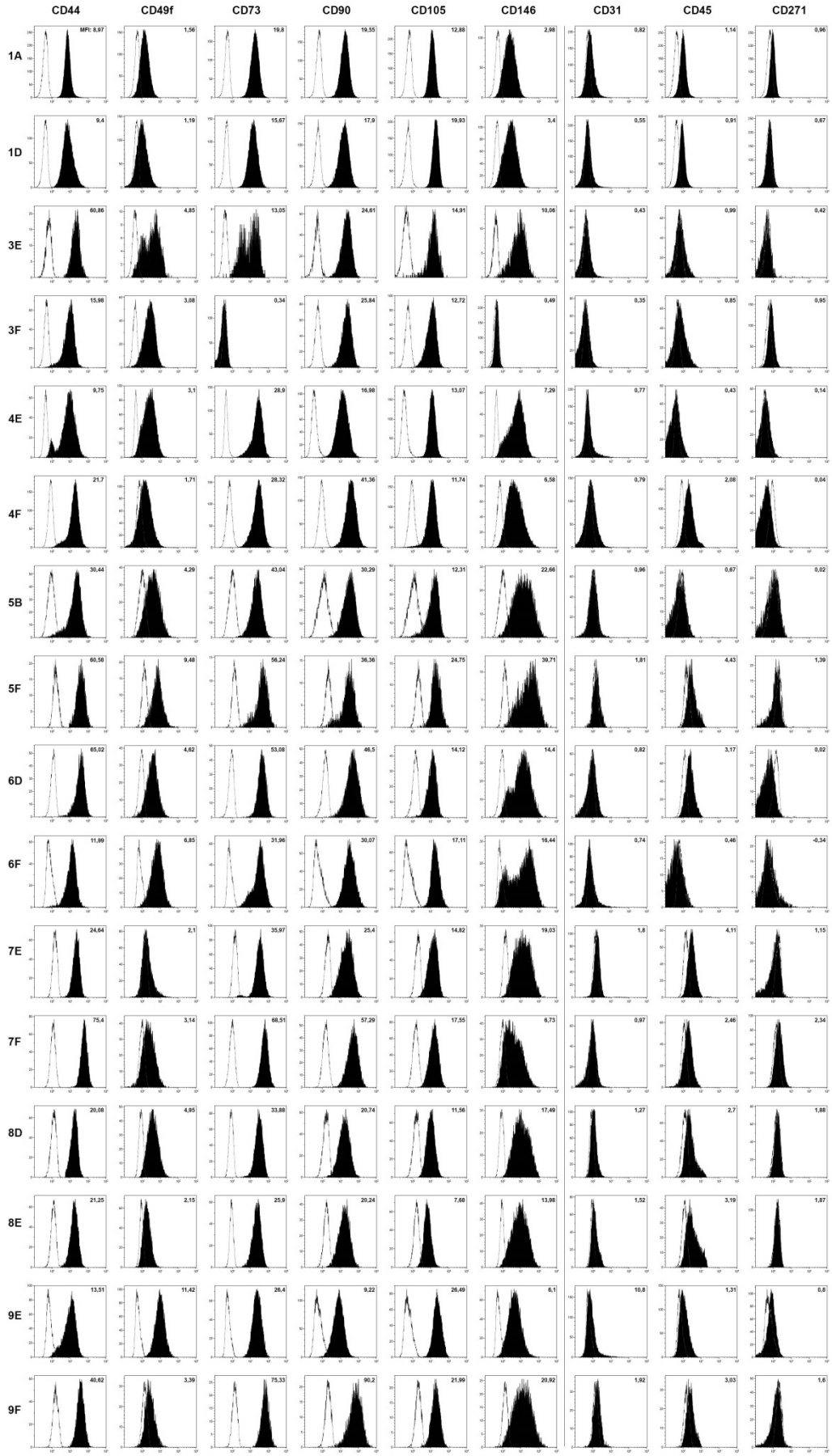

CD44
CD49f
CD73
CD90
CD105
CD146
CD31
CD45
CD271
1A
1D
3E
3F
4E
4F
5B
5F
6D
6F
7E
7F
8D
8E
9E
9F

Abbildung 9 Durchflusszytometrische Analyse der MSZ angezogen aus Knochenmarkproben von AML Patienten
Durchflusszytometrische Charakterisierung humaner MSZ, welche aus dem Knochenmark von an AML erkrankten Patienten angezogen worden sind (weiß = Isotyp-Kontrolle; schwarz = Fluoreszenzintensität; MFI = mittlere Fluoreszenzintensität).

3.1.4. Funktionelle Analyse phänotypischer MSZ

In der Literatur wird beschrieben, dass MSZ aus dem Knochenmark unter anderem die Fähigkeit zur adipogenen und osteogenen Differenzierung aufweisen (Pittenger et al. 1999). Um zusätzlich zur phänotypischen auch eine funktionelle Analyse der expandierten Zellen durchzuführen, wurden im Folgenden die zuvor durchflusszytometrisch charakterisierten Stromazelllinien hinsichtlich ihres osteogenen und adipogenen Differenzierungspotentials analysiert.

Bei der adipogenen Differenzierung lassen sich in den Zellen in Form von Vakuolen eingelagerte Triglyzeride mit dem Farbstoff Oil-Red-O rot anfärben (Kutt and Tsaltas 1959) (vgl. 2.2.4.1). In den adipogenen Ansätzen reichte die Varianz differenzierter Zellen von nur vereinzelten Zellen bis hin zur annähernd vollständigen Differenzierung aller Zellen (Abbildung 10). Eine besonders hohe Frequenz adipogen differenzierter Zellen konnte bei den Linien AML 4B/E, 7A, 9B und BM2 detektiert werden. Bei den AML-Zelllinien 4D, 6B/F, 7B/F, 8C, 9D, sowie allen Oligoklonen der Linien BM1 und 3 konnte nur eine sehr gering ausgeprägte adipogene Differenzierung beobachtet werden. In den übrigen Ansätzen lagerten zwischen 20% und 80% der Zellen Triglyzerid-Vesikel ein.

Bei MSZ mit osteogenem Differenzierungspotential kommt es nach der Induktion zur Kalzifizierung der extrazellulären Matrix. Die gebildeten Hydroxylapatitkristalle können mittels Alizarinrot angefärbt werden (vgl. 2.2.4.2). Eine besonders intensive Kalzifizierung fand sich in Ansätzen der Linien AML 3, 4 und 7. Die Zelllinien AML 8D und BM 2.4 bildeten als einzige keine Kristalle aus. Insgesamt zeigten sich im Mittel weniger Kristalle in den Ansätzen der gesunden Knochenmarkproben als in denen der AML MSZ. In den übrigen Ansätzen war der Anteil osteogen differenzierter Zellen auch innerhalb der Zelllinien derselben Knochenmarkprobe sehr variabel. Der prozentuale Anteil differenzierter Zellen lag hier zwischen 10% und annähernd 100%.

Die Zelllinien AML 5C-F und 8A/F konnten aufgrund ihres geringen Proliferationspotentials nicht für die Differenzierungsversuche eingesetzt werden (vgl. 3.1.2).

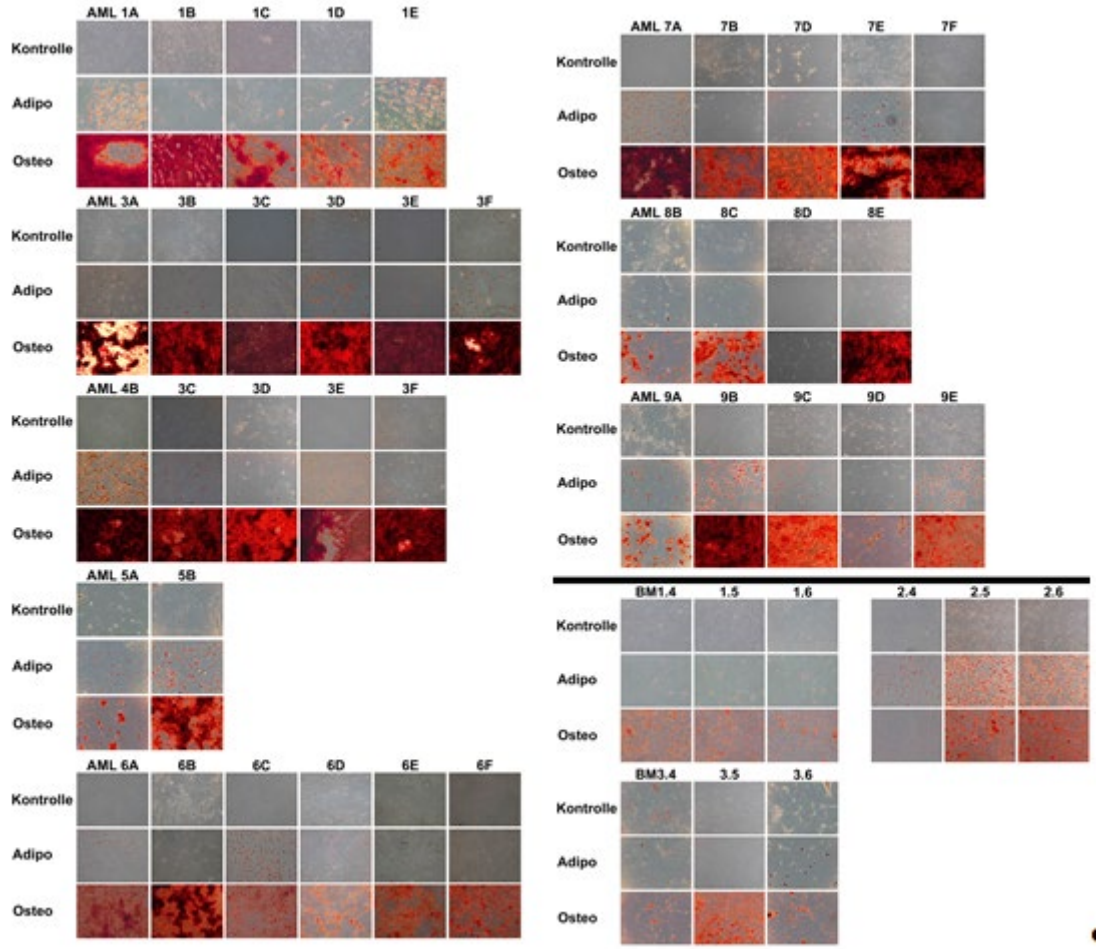


Abbildung 10 Funktionelle Analyse der verwendeten MSZ
Adipo=adipogene Differenzierung; Osteo=osteogene Differenzierung; Kontrolle=Zellen wurden in Standardmedium kultiviert

Bis auf wenige Ausnahmen erfüllten alle für diese Arbeit isolierten und charakterisierten Zellen die Kriterien mesenchymaler Stroma-/Stammzellen. Inwiefern die phänotypischen und funktionellen Unterschiede der MSZ einen Einfluss auf die HSVZ in den nachfolgenden Kokulturversuchen haben, wird im Abschnitt 3.2 näher untersucht.

3.2. Ko-Kultivierung von HSVZ mit MSZ

Nach Anzucht und Charakterisierung der MSZ aus den Knochenmarkroben, sowie Anreicherung $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurrestblut, folgte als nächstes die Ko-Kultivierung beider Zelltypen. Für die Kokulturversuche wurden die entsprechenden Stromazellen aufgetaut, für einige Tage kultiviert und anschließend circa 800 MSZ/cm² in Flachbodenplatten mit 12 Vertiefungen ausgesät. Nach 3 Tagen wurden 1000 durchflusszytometrisch sortierte $CD34^+$ HSVZ auf die Stromazellen ausgebracht und für

14 Tage kultiviert (s. Abschnitt 262.2.5). An Tag 14 erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung sowie die funktionelle Analyse der hämatopoetischen Nachkommenschaft im CFC Ansatz (s. Abschnitt 3.2.2).

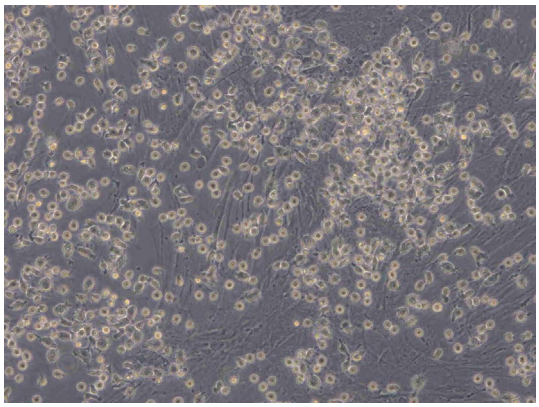


Abbildung 11 Exemplarische Darstellung eines Kokulturansatzes an d14 der Kultur
Bild 100-fach vergrößert.

3.2.1. Durchflusszytometrische Analyse der Expansion von HSVZ in Kokultur mit MSZ

Es wurden aus jeder Knochenmarkprobe zwei der expandierten Zelllinien ausgewählt und mit HSVZ aus insgesamt acht verschiedenen Nabelschnurrestbluten kokultiviert. Nach 14 tägiger Kokultur wurde die hämatopoetische Nachkommenschaft auf die Expression der Oberflächenantigene CD38, CD34, CD133 und CD45 analysiert (Abbildung 12; Tabelle 18).

In Kokultur mit allen MSZ, sowohl von AML Patienten als auch von gesunden Spendern, wurde ein Erhalt von $CD34^{+}CD133^{+}$ sowie $CD34^{+}CD133^{low}$ HSVZ in der hämatopoetischen Nachkommenschaft beobachtet (Abbildung 12 und Tabelle 18). Im Vergleich zum murinen AFT024 Stroma war die Frequenz beider Subpopulationen in den humanen MSZ Kulturen deutlich geringer. Im Vergleich zur Suspensionskultur wiesen alle Stromakulturen eine höhere Frequenz von HSVZ auf.

Die Frequenz $CD34^{+}CD133^{+}$ Zellen lag in Kokultur mit AFT024 Zellen im Mittel bei 14,21% (± 5,04; n=8), wohingegen die Frequenzen in den übrigen Kulturen um das 2 bis 5-fache geringer waren (Tabelle 18). In der Gruppe der AML Stromata war die Frequenz $CD34^{+}CD133^{+}$ Zellen nach Kokultur mit Zellen der Linie AML 1D (7,95 ± 3,35%; n=8) am höchsten. Ähnlich hohe Werte konnten in Kokultur mit Zellen der Linien AML 6F

(7,05 ± 2,56%; n=8) und 7E (7,10 ± 3,01%; n=8) ermittelt werden. Die geringste Frequenz $CD34^+CD133^+$ Zellen wurde in Kokultur mit MSZ der Linie AML 4E nachgewiesen (3,85 ± 1,82%; n=8). In Kokulturen mit MSZ gesunder Spender war die Frequenz in allen Zelllinien circa um das 3-fache geringer als in AFT024 Kulturen. Die höchste Frequenz lag mit 5,64% nach Kultur mit BM 3.5 vor (± 2,72; n=8), die geringste nach Kultur mit BM 3.4 (3,83 ± 2,66%; n=8).

Die Frequenz $CD34^+CD133^{low}$ Zellen war in allen Kulturen um das annähernd 20-fache geringer als mit AFT024 Zellen (19,69 ± 3,02%; n=8) (Tabelle 18). Die höchste Frequenz $CD34^+CD133^{low}$ Zellen konnte nach Kokultur mit Stromazellen der Linien AML 1D (2,51 ± 1,52%; n=8) und BM 3.5 (2,77 ± 2,57%; n=8) ermittelt werden.

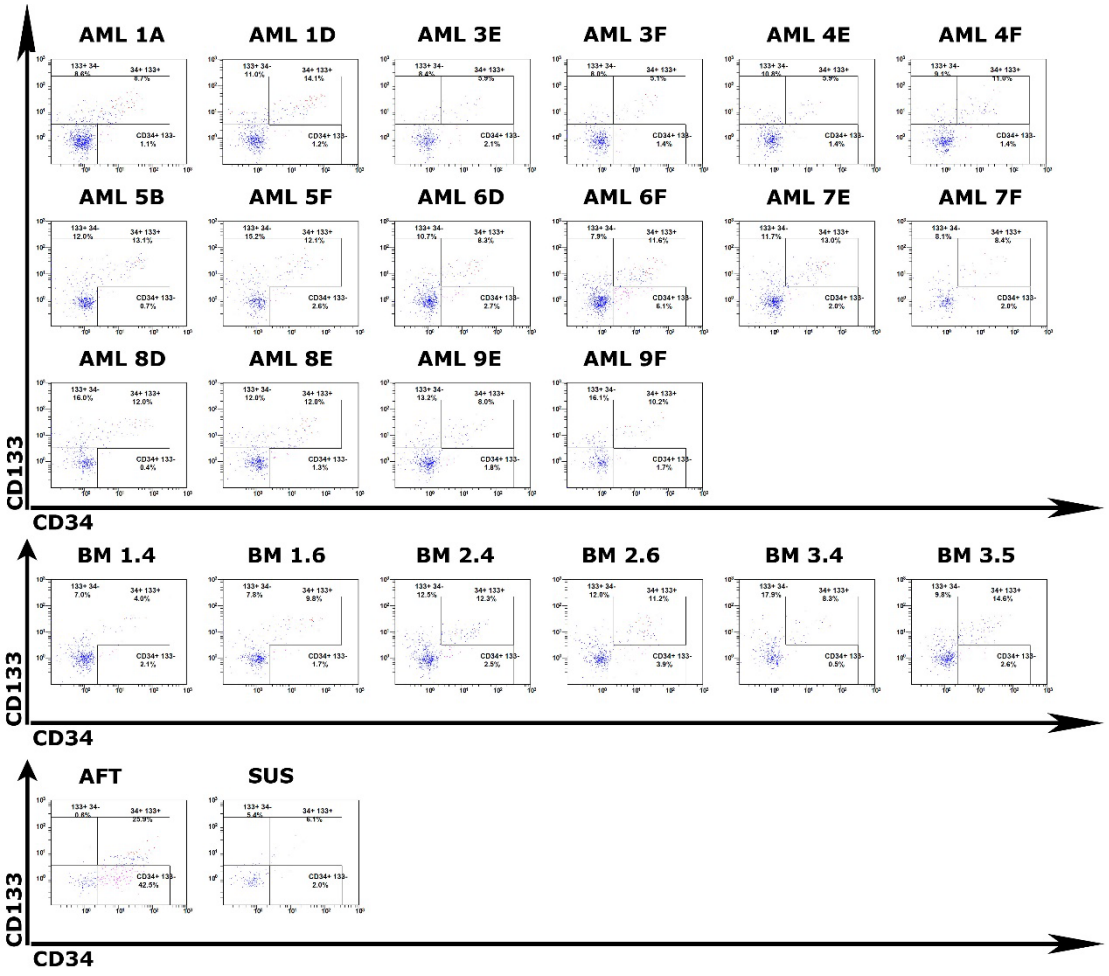


Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse der HSVZ nach Kokultur mit MSZ
Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von $CD133^+34^+$ Zellen nach 14-tägiger Kokultur mit MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten und gesunden Vergleichspersonen. Als zusätzliche Kontrollen wurde jeweils eine Suspensionskultur angesetzt, sowie eine Kokultur mit Zellen der Linie AFT024.

Tabelle 18 Frequenz von $CD34^+CD133^+$ und $CD34^+CD133^{low}$ Zellen in Kokultur mit MSZ

CD 133+	AML 1A	AML 1D	AML 3E	AML 3F	AML 4E	AML 4F	AML 5B	AML 5F	AML 6D	AML 6F	AML 7E	AML 7F
V1	1,78	1,34	4,18	7,70	2,53	6,41	0,92	4,85	0,62	4,32	3,12	4,47
V2	2,12	5,84	7,66	4,89	3,38	7,99	5,76	4,98	8,67	4,66	3,18	4,48
V3	0,55	6,82	0,41	0,83	0,48	0,59	0,64	0,85	1,03	4,39	6,18	0,25
V4	8,95	13,39	7,72	7,62	6,08	8,97	7,63	8,43	7,74	8,16	11,18	9,83
V5	9,91	8,79	7,51	6,01	3,83	7,09	6,00	9,53	6,85	7,95	9,23	12,86
V6	4,96	7,60	3,50	2,66	3,22	4,35	4,63	5,22	3,97	5,92	4,70	4,71
V7	4,94	8,95	6,48	8,05	4,75	5,89	5,40	9,57	6,21	8,87	8,85	7,27
V8	6,81	10,90	6,29	7,89	6,53	6,98	6,32	8,86	10,95	12,11	10,37	8,74
MW	5,00	7,95	5,47	5,71	3,85	6,04	4,66	6,54	5,75	7,05	7,10	6,58
SEM	3,19	3,35	2,42	2,54	1,82	2,43	2,38	2,88	3,40	2,56	3,01	3,67

CD 133+	AML 8D	AML 8E	AML 9E	AML 9F	BM 1.4	BM 1.6	BM 2.4	BM 2.6	BM 3.4	BM 3.5	AFT 024	SUS
V1	0,80	0,60	1,72	4,05	2,74	2,75	1,93	4,80	1,55	2,15	13,66	0,00
V2	8,04	10,93	5,57	6,10	5,50	5,54	2,49	2,37	2,38	0,56	12,41	0,00
V3	4,34	4,60	1,99	0,00	0,96	2,54	2,18	2,03	0,00	9,13	6,95	0,00
V4	7,48	7,84	7,10	7,09	7,93	6,47	7,71	6,90	8,60	7,40	13,89	0,36
V5	13,06	7,05	5,97	6,05	4,60	6,11	7,10	5,06	6,96	5,61	12,86	2,05
V6	5,81	4,98	4,91	5,66	2,54	5,77	7,18	6,80	4,27	7,90	13,72	2,39
V7	4,79	5,20	4,05	2,44	4,10	4,33	7,21	0,00	2,58	6,59	26,23	2,22
V8	7,22	5,29	7,38	7,20	5,42	7,04	4,15	7,20	4,32	5,79	13,96	4,38
MW	6,44	5,81	4,84	4,83	4,22	5,07	4,99	4,39	3,83	5,64	14,21	1,42
SEM	3,31	2,78	2,00	2,35	2,02	1,58	2,39	2,49	2,66	2,72	5,04	1,50

CD 133low	AML 1A	AML 1D	AML 3E	AML 3F	AML 4E	AML 4F	AML 5B	AML 5F	AML 6D	AML 6F	AML 7E	AML 7F
V1	0,66	1,01	1,13	1,58	3,13	1,42	0,35	0,61	0,26	3,55	1,12	1,31
V2	1,21	3,21	0,83	0,52	1,00	0,81	0,77	0,44	2,93	1,65	0,89	2,69
V3	0,55	4,54	1,24	1,66	2,17	1,72	1,23	0,00	1,45	2,17	1,80	1,25
V4	4,03	4,64	2,56	3,01	3,15	3,03	2,58	2,39	4,20	4,02	3,21	3,81
V5	3,41	3,04	3,45	2,80	2,14	2,37	2,29	2,11	5,50	6,18	4,64	4,80
V6	0,65	0,64	1,26	0,73	0,75	0,55	0,25	1,12	1,30	3,13	0,71	1,13
V7	2,12	0,68	0,93	1,45	1,58	0,00	1,35	1,30	0,73	1,81	0,51	0,55
V8	1,36	2,34	1,30	2,05	1,63	0,92	0,51	2,33	1,81	2,82	1,83	1,07
MW	1,75	2,51	1,59	1,73	1,94	1,35	1,17	1,29	2,27	3,17	1,84	2,08
SEM	1,24	1,52	0,86	0,83	0,83	0,93	0,82	0,85	1,69	1,38	1,33	1,43

CD 133low	AML 8D	AML 8E	AML 9E	AML 9F	BM 1.4	BM 1.6	BM 2.4	BM 2.6	BM 3.4	BM 3.5	AFT 024	SUS
V1	0,12	0,76	1,28	0,77	0,80	0,70	0,54	0,76	0,39	0,94	19,48	0,00
V2	1,15	3,49	0,66	3,71	1,55	1,14	0,41	0,30	0,56	0,56	17,71	0,00
V3	1,92	0,00	0,41	0,26	0,38	1,10	3,69	2,66	1,28	5,48	18,01	6,02
V4	2,50	3,05	4,60	3,57	3,02	2,87	2,94	2,80	2,71	3,50	26,26	0,81
V5	7,04	5,40	3,72	3,82	4,60	4,64	7,95	6,68	5,21	8,16	17,22	10,39
V6	0,20	0,52	1,10	0,92	1,33	1,02	1,44	2,34	0,28	1,43	17,39	1,59
V7	0,73	0,45	0,76	0,30	1,17	0,60	1,66	n.v.	1,17	0,86	18,53	0,00
V8	1,44	1,15	2,29	2,24	0,96	0,79	1,42	1,86	0,70	1,24	22,89	1,46
MW	1,89	1,85	1,85	1,95	1,72	1,61	2,51	2,49	1,54	2,77	19,69	2,53
SEM	2,09	1,79	1,45	1,47	1,31	1,33	2,30	1,92	1,57	2,57	3,02	3,50

Alle Werte sind in % angegeben; Abkürzungen: Sus = Suspension; MW = Mittelwert; Die angegebenen Werte stellen die Frequenz $CD45^+CD34^+CD133^+$ bzw. $CD45^+CD34^+CD133^{low}$ Zellen nach 14-tägiger Kokultur mit MSZ dar.

Die Expansion $CD34^+$ Zellen wurde nach 14-tägiger Kokultur mit HSVZ durchflusszytometrisch quantifiziert (Tabelle 19; Abbildung 13). Bis auf wenige Ausnahmen in einzelnen Ansätzen, konnte in Kokultur mit allen getesteten mesenchymalen Stromazellen eine Expansion (Faktor >1) von $CD34^+$ Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zu AFT024 Zellen (125,7 ± 109,5; n = 8) konnte in den Kulturen mit MSZ der Linien AML 1D (108,7 ± 159,8; n = 8) und 7E (120,6 ± 199,5; n = 8) eine annähernd gleich starke Expansion ermittelt werden. Die geringste Expansion fand sich nach Kokultur mit Zellen der Linien AML 4E (41,8 ± 56,7; n = 8) und 9E (39,6 ± 49,8; n = 8) (Tabelle 19). In Kokultur mit MSZ gesunder Spender fand sich die höchste Expansion nach Kultur mit BM 3.5 (51,2 ± 68,4; n = 8) und die Geringste nach Kultur mit BM 2.6 (20,1 ± 21,3; n = 8).

Tabelle 19 Expansion der $CD34^+$ Fraktion in Kokultur mit MSZ

CD 34+	AML 1A	AML 1D	AML 3E	AML 3F	AML 4E	AML 4F	AML 5B	AML 5F	AML 6D	AML 6F	AML 7E	AML 7F
V1	14,8	17,1	15,1	65,4	28,2	56,7	8,5	23,2	6,7	70,3	25,3	19,0
V2	2,5	5,7	9,4	9,3	6,8	8,1	7,0	4,7	13,6	11,3	6,8	3,6
V3	2,4	23,3	1,0	3,9	3,8	1,2	1,2	0,2	4,5	4,7	8,7	0,9
V4	343,6	509,2	393,2	316,9	184,9	446,1	333,9	314,5	366,1	408,7	622,2	456,1
V5	164,9	180,2	184,0	116,9	60,4	145,5	57,7	87,1	161,4	139,0	207,4	110,8
V6	20,9	35,9	13,5	14,6	8,4	19,3	20,6	12,2	13,2	39,7	21,0	5,9
V7	20,0	47,8	17,6	35,3	14,9	19,9	8,3	10,6	8,0	21,9	16,2	11,6
V8	44,1	50,5	36,8	42,9	26,9	20,8	13,6	13,6	44,4	85,3	57,0	23,3
MW	76,7	108,7	83,8	75,7	41,8	89,7	56,4	58,3	77,2	97,6	120,6	78,9
SEM	112,5	159,8	129,6	97,5	56,7	141,5	106,2	100,2	119,8	124,8	199,5	146,5

CD 34+	AML 8D	AML 8E	AML 9E	AML 9F	BM 1.4	BM 1.6	BM 2.4	BM 2.6	BM 3.4	BM 3.5	AFT 024	SUS
V1	5,0	6,6	12,3	15,4	11,2	18,4	10,8	17,4	6,8	12,8	95,1	0,0
V2	23,5	15,1	3,1	7,9	4,7	6,6	2,5	1,5	3,3	0,8	65,4	0,0
V3	10,7	2,5	1,9	0,3	1,9	6,3	8,4	2,3	3,4	22,3	67,8	0,4
V4	356,9	332,1	158,2	419,3	226,0	167,6	178,0	67,0	212,5	215,9	408,9	1,9
V5	326,5	117,3	56,8	53,3	49,6	104,7	120,8	38,2	53,1	99,8	131,8	2,2
V6	14,4	15,6	14,2	8,4	7,4	9,6	36,4	17,8	10,1	24,4	107,4	2,3
V7	12,6	16,0	10,2	4,1	12,9	8,8	9,1	0,0	5,3	17,4	68,2	0,5
V8	36,2	20,1	60,6	32,0	26,1	17,1	11,9	16,5	7,7	16,3	60,9	3,3
MW	98,2	65,7	39,6	67,6	42,5	42,4	47,2	20,1	37,8	51,2	125,7	1,3
SEM	141,1	106,5	49,8	133,9	70,8	56,5	61,4	21,3	67,9	68,4	109,5	1,2

Alle Werte sind als x-fache Expansion angegeben. Abkürzungen: Sus = Suspension; MW = Mittelwert; n.v. = nicht verfügbar. Werte graphisch dargestellt in Abbildung 13.

Betrachtet man die absoluten Zellzahlen an d14 der Kokultur, so sind in Kultur mit AFT024 Zellen aus 1000 an d1 eingebrachten $CD34^+$ HSVZ durchschnittlich 126.000 $CD34^+$ Zellen (± 110.000; n=8) entstanden (Tabelle 20; Abbildung 13). Von diesen $CD34^+$ HSVZ, waren im Durchschnitt 49.000 $CD133^+$ (± 37.000; n=8) und 77.000 $CD133^{low}$ (± 73.000; n=8). Ähnlich hohe Zellzahlen konnten nach Kokultur mit MSZ der

Linien AML 1D ($CD34^+$ 109.000 ± 160.000; $CD34^+CD133^+$ 82.000 ± 118.000; $CD34^+CD133^{low}$ 26.000 ± 42.000; n=8) und AML 7E ($CD34^+$ 120.000 ± 200.000; $CD34^+CD133^+$ 92.000 ± 154.000; $CD34^+CD133^{low}$ 29.000 ± 47.000; n=8) ermittelt werden. Die geringsten absoluten Zellzahlen wurden nach Kokultur mit AML 4E ($CD34^+$ 42.000 ± 57.000; $CD34^+CD133^+$ 27.000 ± 37.000; $CD34^+CD133^{low}$ 14.000 ± 20.000; n=8) und AML 9E ($CD34^+$ 40.000 ± 500.000; $CD34^+CD133^+$ 26.000 ± 30.000; $CD34^+CD133^{low}$ 14.000 ± 20.000; n=8) beobachtet.

Nach Kokultur mit MSZ gesunder Spender lagen die absoluten Zellzahlen jeweils deutlich unter denen der AFT024. Hier konnten nach Kokultur mit BM 3.5 ($CD34^+$ 51.000 ± 68.000; $CD34^+CD133^+$ 32.000 ± 44.000; $CD34^+CD133^{low}$ 19.000 ± 26.000; n=8) die höchsten und mit BM 2.6 ($CD34^+$ 23.000 ± 21.000; $CD34^+CD133^+$ 15.000 ± 14.000; $CD34^+CD133^{low}$ 8.000 ± 8.000; n=8) die geringsten Zellzahlen ermittelt werden. Bezüglich der absoluten Zellzahl hämatopoetischer, also $CD45^+$ Zellen, lag die absolute Zellzahl nach Kokultur mit AFT024 bei 36.2000 Zellen (± 263.000; n=8). In allen Kokultur Ansätzen mit AML MSZ wurden höhere Werte $CD45^+$ Zellen ermittelt. Die höchsten Werte fanden sich nach Kultur mit MSZ der Linien AML 7E (965.000 ± 1.335.000; n=8) und die niedrigsten in AML 9E (444.000 ± 397.000; n=8). Nach Kokultur mit MSZ gesunder Spender lag nur BM 2.6 unter den Werten der AFT024 (259.000 ± 203.000; n=8), wobei nach Kultur mit BM 1.6 die höchsten Werte ermittelt wurden (514.000 ± 557.000; n=8).

Für jeden der 8 Kokulturansätze wurden jeweils HSVZ aus einem Nabelschnurrestblut verwendet. Die höchste Anzahl $CD45^+$ Zellen in Kokultur mit AFT024 MSZ wurde mit 1.018.000 Zellen in Versuch 4 ermittelt (Tabelle 21; Abbildung 13). Auch in Kokultur mit AML MSZ (3.136.000 ± 709.000; n=16) und gesunden MSZ (1.680.000 ± 460.000; n=6) konnten nach Kokultur mit HSVZ aus Versuch 4 die höchsten absoluten Zellzahlen $CD45^+$ Zellen beobachtet werden. Die geringste Anzahl $CD45^+$ Zellen nach Kultur mit AFT024 fand sich in Versuch 7 (152.000), mit AML MSZ (111.000 ± 59.000; n=16) in Versuch 3 und mit gesunden MSZ (82.000 ± 8.000; n=6) in Versuch 2. Konkordant zu diesen Ergebnissen, fanden sich in Versuch 4 ebenfalls die höchsten Zellzahlen $CD34^+CD133^+$ (AFT024: 141.000; AML MSZ: 268.000 ± 88.000 n=16; BM MSZ: 127.000 ± 27.000 n=6) und $CD34^+CD133^{low}$ (AFT024: 267.000; AML MSZ: 104.000 ± 26.000 n=16; BM MSZ: 50.000 ± 16.000 n=6) Zellen. Die geringsten Werte $CD34^+CD133^+$ Zellen nach Kokultur mit AML MSZ und AFT024 fanden sich in Versuch 3 (AFT024: 19.000; AML MSZ: 3.000 ± 4.000) und mit BM MSZ in Versuch 2 (3.000 ±

2.000). Die geringste Anzahl $CD34^+CD133^{low}$ Zellen in Kokultur mit AFT024 fand sich in Versuch 3 (19.000), mit AML MSZ gleichermaßen in den Versuchen 2, 3 und 7 (2.000 ± 2.000) und mit gesunden MSZ in Versuch 2 (1.000 ± 0) (Tabelle 21; Abbildung 13).

Tabelle 20 Absolute Anzahl $CD45^+$, $CD34^+CD133^+$, $CD34^+CD133^{low}$ HSVZ an d14 der Kokultur

Stroma	$CD45^+$		$CD34^+$		$CD34^+CD133^+$		$CD34^+CD133^{low}$	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
AML 1A	747.000	791.000	77.000	113.000	55.000	78.000	21.000	34.000
AML 1D	833.000	860.000	109.000	160.000	82.000	118.000	26.000	42.000
AML 3E	871.000	1.217.000	83.000	130.000	62.000	96.000	22.000	34.000
AML 3F	822.000	888.000	76.000	97.000	56.000	69.000	20.000	29.000
AML 4E	574.000	603.000	42.000	57.000	27.000	37.000	14.000	20.000
AML 4F	890.000	1.158.000	90.000	142.000	69.000	105.000	21.000	37.000
AML 5B	694.000	1.001.000	56.000	106.000	43.000	79.000	14.000	27.000
AML 5F	576.000	909.000	58.000	100.000	46.000	78.000	12.000	22.000
AML 6D	767.000	949.000	77.000	120.000	50.000	76.000	27.000	44.000
AML 6F	837.000	1.001.000	98.000	125.000	64.000	83.000	33.000	43.000
AML 7E	965.000	1.335.000	120.000	200.000	92.000	154.000	29.000	47.000
AML 7F	612.000	1.047.000	79.000	146.000	58.000	105.000	21.000	41.000
AML 8D	882.000	1.112.000	98.000	141.000	71.000	99.000	27.000	44.000
AML 8E	689.000	928.000	66.000	1.070.000	46.000	75.000	20.000	32.000
AML 9E	444.000	397.000	40.000	500.000	26.000	30.000	14.000	20.000
AML 9F	701.000	1.230.000	68.000	134.000	46.000	89.000	22.000	45.000
BM 1.4	497.000	609.000	42.000	70.000	30.000	51.000	13.000	20.000
BM 1.6	514.000	557.000	42.000	57.000	29.000	37.000	13.000	20.000
BM 2.4	485.000	501.000	47.000	61.000	31.000	41.000	16.000	23.000
BM 2.6	259.000	203.000	23.000	21.000	15.000	14.000	8.000	8.000
BM 3.4	446.000	552.000	38.000	68.000	27.000	51.000	10.000	17.000
BM 3.5	509.000	586.000	51.000	68.000	32.000	44.000	19.000	26.000
AFT024	362.000	263.000	126.000	110.000	49.000	37.000	77.000	73.000
SUS	41.000	51.000	1.000	1.172	700	800	700	600

Absolute Zellzahlen an d14 der Kokultur; alle Werte gerundet auf 1000; MW = Mittelwert; n = 8 für alle Werte

Tabelle 21 Absolute Zellzahlen abhängig vom Nabelschnurrestblut

AML MSZ	V1		V2		V3		V4	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
$CD34^+CD133^+$	17.000	15.000	7.000	4.000	3.000	4.000	268.000	88.000
$CD34^+CD133^{low}$	7.000	7.000	2.000	1.000	2.000	2.000	104.000	26.000
$CD45^+$	561.000	173.000	117.000	54.000	111.000	59.000	3.136.000	709.000

AML MSZ	V5		V6		V7		V8	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
$CD34^+CD133^+$	91.000	46.000	15.000	7.000	15.000	10.000	31.000	15.000
$CD34^+CD133^{low}$	45.000	25.000	3.000	3.000	2.000	2.000	7.000	4.000
$CD45^+$	1.117.000	386.000	300.000	109.000	231.000	102.000	379.000	134.000

BM MSZ	V1		V2		V3		V4	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
$CD34^+CD133^+$	10.000	3.000	3.000	2.000	4.000	5.000	127.000	39.000
$CD34^+CD133^{low}$	3.000	1.000	1.000	0	3.000	3.000	50.000	16.000
$CD45^+$	394.000	78.000	82.000	20.000	156.000	64.000	1.680.000	460.000

BM MSZ	V5		V6		V7		V8	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM

$CD34^+CD133^+$	38.000	16.000	14.000	9.000	9.000	4.000	13.000	5.000
$CD34^+CD133^{low}$	40.000	17.000	3.000	2.000	2.000	1.000	3.000	1.000
$CD45^+$	634.000	222.000	239.000	89.000	180.000	54.000	235.000	82.000

AFT024	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**	**V6**	**V7**	**V8**
$CD34^+CD133^+$	39.000	27.000	19.000	141.000	56.000	47.000	40.000	23.000
$CD34^+CD133^{low}$	56.000	38.000	49.000	267.000	75.000	60.000	28.000	38.000
$CD45^+$	287.000	217.000	272.000	1.018.000	438.000	345.000	152.000	165.000

Absolute Zellzahlen abhängig vom verwendeten Nabelschnurrestblut. Für jeden Versuchsansatz V1-8 wurden jeweils ein anderes Nabelschnurrestblut aufgearbeitet und die gewonnenen HSVZ verwendet (n=8). Alle Werte gerundet auf 1.000; n=16 für AML MSZ; n=6 für BM MSZ.

Eine Expansion von $CD34^+$ HSVZ ist somit in Kokultur mit allen getesteten MSZ möglich. Einzelne Zelllinien führten zu einer ähnlich hohen Expansion wie die Vergleichskulturen mit AFT024 Zellen, wobei eine breite Streuung der Ergebnisse auffiel. Die meisten der AML MSZ Ansätze ermöglichten aber eine deutlich höhere Expansion als mit MSZ aus dem Knochenmark gesunder Spender.

Die Frequenz, sowohl $CD34^+CD133^+$ als auch $CD34^+CD133^{low}$ HSVZ, war in beiden Ansätzen, AML MSZ und gesunde MSZ, deutlich geringer als in Kultur mit AFT024 Zellen. Die absoluten Zellzahlen $CD45^+$ Zellen lagen nach Kultur mit AML MSZ jeweils deutlich über denen nach Kultur mit AFT024, wohingegen die Werte nach Kultur mit MSZ gesunder Spender im Mittel zwischen denen der AML MSZ und der AFT024 lagen. Bezogen auf die absoluten Zellzahlen $CD34^+CD133^+$ HSVZ, konnten nach Kultur mit AML MSZ gleichwertige bzw. tendenziell höhere Werte ermittelt werden als nach Kultur mit AFT024. Die Werte nach Kultur mit gesunden MSZ lagen hier deutlich darunter. In beiden Kulturvarianten lagen die Zellzahlen $CD34^+CD133^{low}$ HSVZ unter denen nach Kultur mit AFT024.

Unklar ist, inwiefern die Qualität der Nabelschnurrestblute die oben genannten Ergebnisse beeinflusst. Besonders auffällig waren hier die deutlich höheren absoluten Zellzahlen aller drei Subpopulationen ($CD45^+$, $CD34^+CD133^+$, $CD34^+CD133^{low}$) in Versuchsansatz 4, im Vergleich zu allen anderen Versuchsansätzen (Tabelle 21).

Auf Grund der Ergebnisse lässt sich bislang nicht eindeutig feststellen, ob AML MSZ einen spezifischen Einfluss auf den Erhalt primitiver HSVZ haben. Daher wurden die HSVZ im weiteren Verlauf im CFC Ansatz funktionell untersucht.

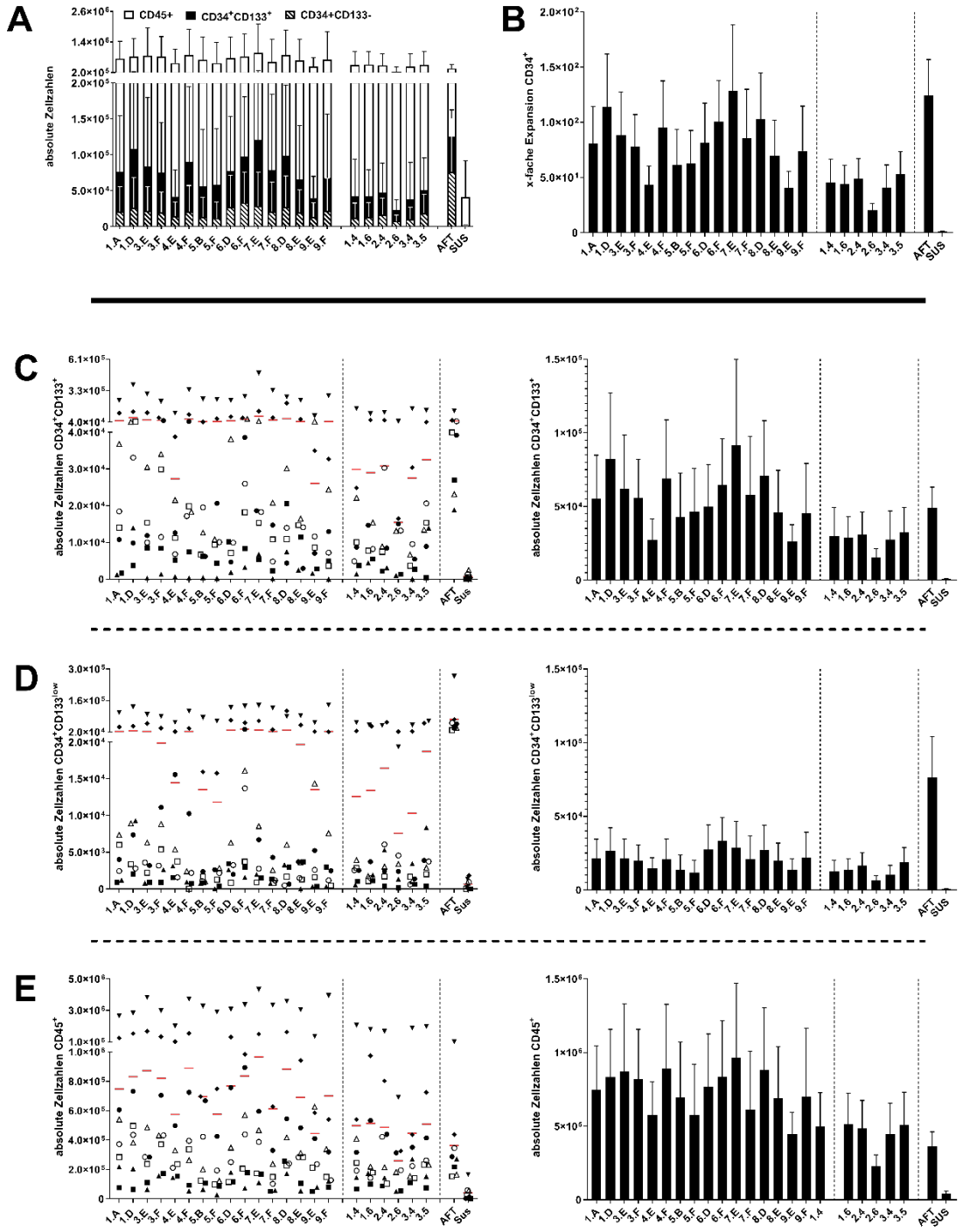


Abbildung 13 HSVZ an Tag 14 der Kokultur mit MSZ

Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 19 und Tabelle 20. ***(A-B)*** *Nach 14-tägiger Kokultur der HSVZ mit MSZ, Zellen der murinen Zelllinie AFT024 und in Suspension wurde die Expansion hämatopoetischer Subpopulationen durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die absoluten Werte der CD45$^+$, CD34$^+$CD133$^+$ und die CD34$^+$CD133$^-$ Populationen entstanden aus an Tag 1 1000 in die Kokultur eingebrachten HSVZ, sowie die x-fache Expansion CD34$^+$ Zellen.* ***(C-E)*** *Dargestellt sind jeweils die absoluten Werte für die einzelnen oben genannten Populationen. Auf der linken Seite steht jedes Symbol für das jeweils verwendete Nabelschnurrestblut. Werte dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n=8 für alle Werte.*

3.2.2. Funktionelle Analyse CD34$^+$ HSVZ nach Kokultur mit MSZ

Um zu analysieren, ob HSVZ nach Kokultur mit MSZ weiterhin Koloniebildungspotential aufweisen, wurden diese im Anschluss an die Kokultur in den CFC Ansatz (vgl. Abschnitt 2.2.3.1) eingebracht. Hierzu wurden aus jedem Kokultur Ansatz 200 CD34$^+$ Zellen durchflusszytometrisch sortiert und nach 14-tägiger Kultur die Anzahl der Kolonien sowie ihre Qualität ermittelt. Der CFC Ansatz ermöglicht die morphologische Unterscheidung von Kolonien entstanden aus Zellen mit monozytärem (CFU-M), granulozytärem (CFU-G) und erythrozytärem (CFU-E, BFU-E) Koloniebildungspotential. Außerdem finden sich gemischte Kolonien aus Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) und Granuloyten, Makrophagen und Erythrozyten (CFU-MIX). Für die Versuchsauswertung wurde zum einen die Frequenz koloniebildender Zellen berechnet, bezogen auf die Anzahl quantifizierter HSVZ nach 14 tägiger Kokultur. Außerdem wurde die Expansion ausgewertet, welche der x-fachen Expansion koloniebildender Zellen von 1000 ursprünglich in die Kokulturansätze eingebrachten HSVZ entspricht.

Die Frequenz koloniebildender Zellen in der CD34$^+$ Population nach Kokultur mit AML MSZ liegt im Mittel etwa 1,4-fach höher als nach Kokultur mit AFT024 Zellen (4,93% ± 1,09%;) (Tabelle 22). Die höchste Frequenz fand sich in Kokultur mit AML 1D (9,43% ± 0,86%) und AML 4E (9,43% ± 2,32%), die geringste nach Kultur mit AML 5F (4,64% ± 1,4%). In Kokultur mit gesunden BM MSZ konnte im Vergleich zur AFT024 eine 1,7-fach höhere Frequenz koloniebildender Zellen ermittelt werden. Hier fand sich die höchste Frequenz nach Kultur mit BM 2.4 (9,0% ± 2,15%) und BM 2.6 (11,5% ± 2,48%) MSZ, wohingegen nach Kultur mit BM 3.4 (6,64% ± 0,93%) die niedrigste Frequenz nachgewiesen wurde (Tabelle 22).

Des Weiteren konnte in Kokultur mit allen expandierten MSZ eine Expansion (Faktor >1) koloniebildender Zellen beobachtet werden (Tabelle 22, Abbildung 14). Die im Mittel stärkste Expansion von Zellen mit Koloniebildungspotential im Vergleich zum AFT024 Ansatz (8,14 ± 3,96-fach, n=7) wurde in Kokultur mit Zellen der AML 1D (10,58 ± 5,85-fach, n=7) und AML 7E (9,32 ± 6,18-fach, n=7) ermittelt (Tabelle 22, Abbildung 14). In 11 von 16 Fällen lag die Expansion nach Kultur mit AML MSZ unter der nach Kultur mit AFT024 Zellen. Im Fall der MSZ aus dem Knochenmark gesunder Spender lag die Expansion immer unterhalb derer in Kokultur mit AFT024 Zellen.

Tabelle 22 Frequenz und Expansion von CFC in der CD34$^+$ Fraktion nach Kokultur mit MSZ

Freq.	AML 1A	AML 1D	AML 3E	AML 3F	AML 4E	AML 4F	AML 5B	AML 5F	AML 6D	AML 6F	AML 7E	AML 7F
V1	2,00	7,00	6,50	9,50	8,00	3,00	3,00	2,50	3,00	2,50	1,50	13,50
V2	1,00	7,50	1,00	5,50	3,50	8,50	1,50	2,50	5,00	0,00	3,00	8,50
V3	4,50	12,00	1,00	5,50	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	1,00	1,50
V4	14,00	8,50	10,00	11,00	10,50	6,00	8,00	4,00	7,50	8,00	7,00	5,00
V5	6,00	9,50	10,00	5,50	15,50	10,50	9,50	6,50	10,50	11,50	8,50	6,50
V6	9,50	8,50	7,00	10,00	11,50	7,00	5,00	11,50	15,00	15,50	7,50	10,00
V7	12,00	13,00	14,00	9,00	17,00	4,50	8,00	5,50	11,50	8,00	11,00	8,50
MW	7,00	9,43	7,07	8,00	9,43	5,64	5,00	4,64	7,93	6,50	5,64	7,64
SEM	1,88	0,86	1,82	0,91	2,32	1,33	1,38	1,40	1,74	2,24	1,45	1,44

Freq.	AML 8D	AML 8E	AML 9E	AML 9F	BM 1.4	BM 1.6	BM 2.4	BM 2.6	BM 3.4	BM 3.5	AFT 024	SUS
V1	3,00	6,00	0,50	1,00	10,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,50	0,00	1,50
V2	5,00	5,00	0,00	1,50	3,50	2,50	2,00	6,50	5,50	0,50	0,50	0,50
V3	3,00	1,50	10,00	0,00	5,00	5,50	2,00	4,00	3,00	2,50	0,00	4,50
V4	6,50	6,50	12,00	4,00	12,50	12,00	10,50	13,50	9,00	8,00	7,50	7,50
V5	6,00	8,50	16,00	12,00	12,50	15,50	12,50	18,50	8,00	8,50	0,00	7,50
V6	8,00	13,50	8,50	7,50	6,00	11,00	14,50	9,50	4,00	11,50	17,50	7,00
V7	8,00	6,50	0,50	9,50	6,00	10,00	15,50	21,50	9,00	12,00	17,50	6,00
MW	5,64	6,79	7,93	5,07	7,93	8,79	9,00	11,50	6,64	7,50	4,93	6,14
SEM	0,79	1,38	2,21	1,76	1,39	1,73	2,15	2,48	0,93	1,66	1,09	3,10

Exp.	AML 1A	AML 1D	AML 3E	AML 3F	AML 4E	AML 4F	AML 5B	AML 5F	AML 6D	AML 6F	AML 7E	AML 7F
V1	0,30	1,20	0,98	6,21	2,25	1,70	0,26	0,58	0,20	1,76	0,38	2,57
V2	0,03	0,43	0,09	0,51	0,24	0,69	0,10	0,12	0,68	0,00	0,20	0,31
V3	0,11	2,79	0,01	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,09	0,01
V4	48,11	43,28	39,32	34,86	19,42	26,77	26,71	12,58	27,45	32,70	43,56	22,80
V5	9,89	17,12	18,40	6,43	9,36	15,28	5,48	5,66	16,94	15,99	17,63	7,20
V6	1,98	3,05	0,95	1,46	0,96	1,35	1,03	1,40	1,98	6,15	1,58	0,59
V7	2,40	6,22	2,46	3,17	2,54	0,89	0,67	0,58	0,91	1,75	1,78	0,99
MW	8,97	10,58	8,89	7,55	4,97	6,67	4,89	2,99	6,90	8,33	9,32	4,92
SEM	6,65	5,85	5,65	4,65	2,69	3,92	3,71	1,76	4,12	4,58	6,18	3,13

Exp.	AML 8D	AML 8E	AML 9E	AML 9F	BM 1.4	BM 1.6	BM 2.4	BM 2.6	BM 3.4	BM 3.5	AFT 024	SUS
V1	0,15	0,40	1,04	0,15	1,12	0,92	0,65	1,22	0,55	1,21	1,43	0,00
V2	1,18	0,76	0,02	0,12	0,16	0,17	0,05	0,09	0,18	0,00	0,33	0,00
V3	0,32	0,04	0,00	0,00	0,10	0,35	0,17	0,09	0,10	0,56	3,05	0,00
V4	23,20	21,59	15,82	16,77	28,25	20,12	18,69	9,05	19,13	17,27	30,67	0,15
V5	19,59	9,97	6,82	6,40	6,21	16,23	15,10	7,06	4,25	8,48	9,88	0,00
V6	1,15	2,11	2,27	0,63	0,44	1,06	5,28	1,69	0,40	2,80	7,52	0,41
V7	1,00	1,04	0,86	0,39	0,77	0,88	1,41	0,00	0,48	2,08	4,09	0,08
MW	6,66	5,13	3,83	3,49	5,29	5,67	5,91	2,74	3,58	4,63	8,14	0,09
SEM	3,83	3,04	2,19	2,38	3,91	3,26	2,94	1,41	2,65	2,36	3,96	0,06

Die Frequenzen sind als prozentuale Werte angegeben, die Expansion als x-fache Expansion. Abkürzungen: Sus = Suspension; MW = Mittelwert; Freq. = Frequenz; Exp. = Expansion.

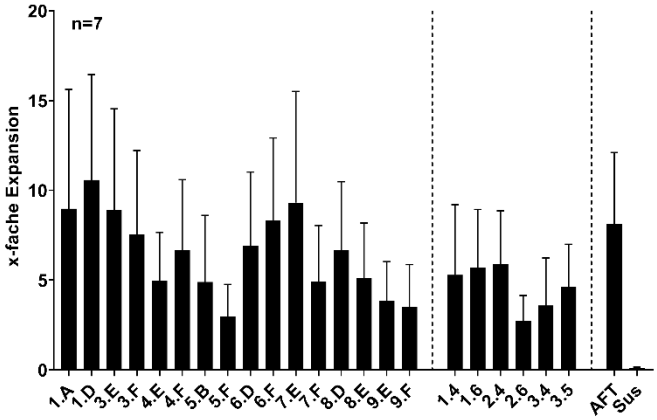


Abbildung 14 Expansion von CFC in Kokultur mit MSZ
Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 22. Expandierte CD 34$^+$ Zellen wurden an d14 durchflusszytometrisch sortiert und in den CFC Ansatz überführt.

Die morphologische Analyse der unterschiedlichen Kolonietypen im CFC Ansatz ergab, dass im Durchschnitt aller Versuchsansätze (n=7) in allen getesteten Bedingungen Zellen mit CFU-G, CFU-M und CFU-GM Potential nachgewiesen werden konnten (Abbildung 15). Zellen mit erythrozytärem und/oder erythro-myeloischem Potential (CFU-E, CFU-GEMM) fanden sich in ähnlich geringer Anzahl wie in Suspensionskultur in 10 von 16 AML MSZ Kokulturen und in 4 von 6 BM MSZ Kokulturen (Abbildung 15, Tabelle 23). Somit erlauben unter den gewählten Bedingungen weder AML MSZ noch gesunde MSZ den Erhalt von Progenitoren der EMP Population.

Tabelle 23 Anzahl der CFC Ansätze mit erythrozytärem und/oder erythro-myeloischen Kolonien

	AML 1A	AML 1D	AML 3E	AML 3F	AML 4E	AML 4F	AML 5B	AML 5F	AML 6D	AML 6F	AML 7E	AML 7F
V1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
V2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V4	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
V5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V6	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
V7	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEM	0	0	0,15	0,07	0,07	0	0,07	0,07	0,14	0	0	0,14

	AML 8D	AML 8E	AML 9E	AML 9F	BM 1.4	BM 1.6	BM 2.4	BM 2.6	BM 3.4	BM 3.5	AFT 024	SUS
V1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
V2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
V3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
V5	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
V6	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
V7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEM	0	0,07	0,09	0,07	0,09	0	0,09	0,10	0,07	0	0,09	0,07

Die dargestellten Werte geben die Anzahl erythrozytärer und/oder erythromyeloischer Kolonien je 100 CD34$^+$ HSVZ an. Für die graphische Darstellung der aufgeführten Werte vgl. Abbildung 15.

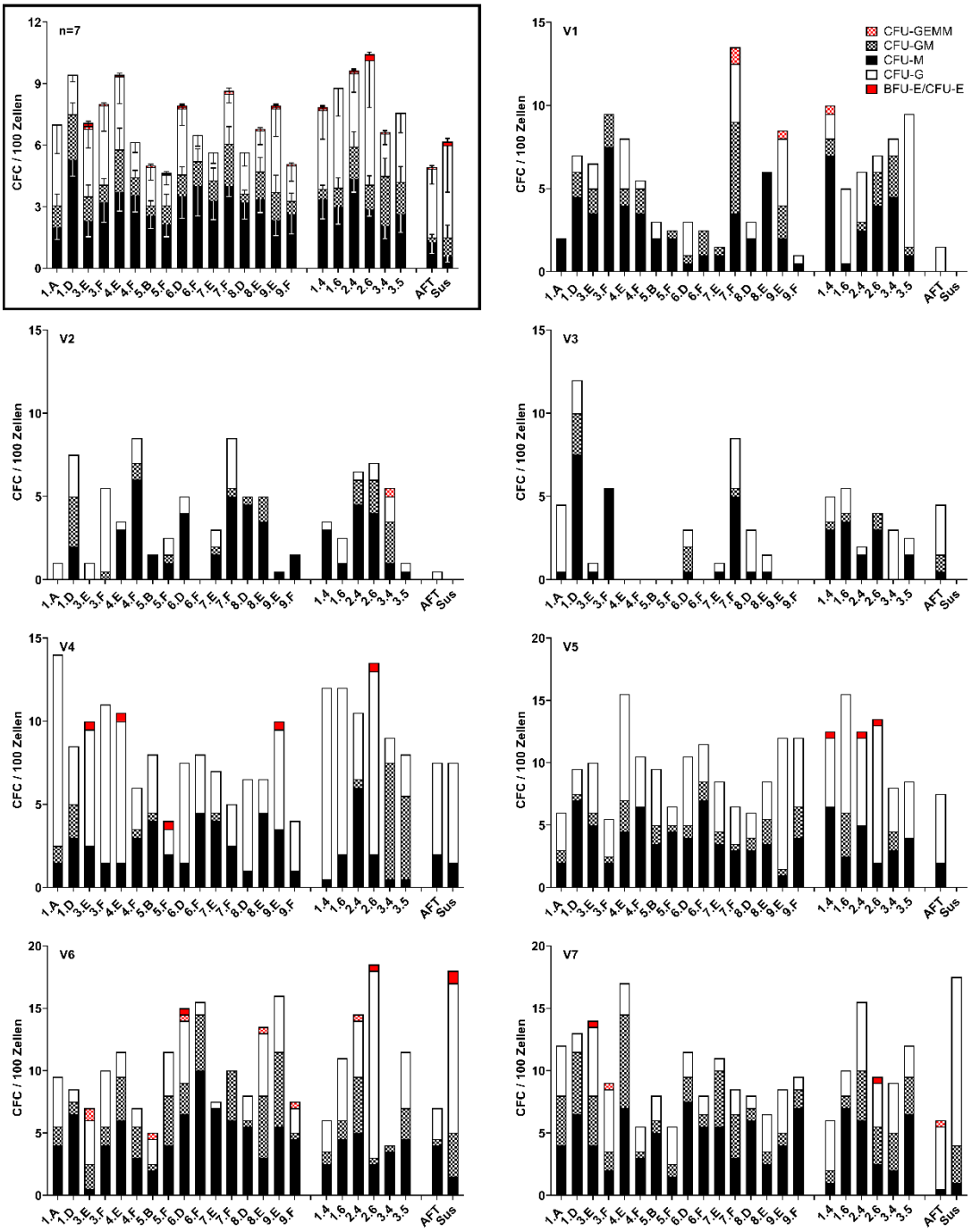


Abbildung 15 CFC Potentiale in der CD34$^+$ Population
Dargestellt ist für jeden Verschsansatz (V1 – V7) die jeweilige Anzahl an CFC je 100 CD34$^+$ HSVZ, sowie die durchschnittliche Anzahl aller Versuche.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben dargelegt, dass an d0 der Aufbereitung humaner HSVZ circa 10% der Zellen erythroides Potential aufweisen (Radtke et al. 2015). In allen im Rahmen dieser Arbeit getesteten Bedingungen, mit AML MSZ, MSZ gesunder Spender, sowie murinen AFT024 Zellen, wurde diese Rate unterschritten und es kam zu einem weitestgehenden Verlust des erythroiden und /oder erythro-myeloischen Potentials (Tabelle 23).

Zusammenfassend konnte zwar in allen getesteten Bedingungen eine Expansion koloniebildender Zellen erreicht werden, allerdings kam es in allen Versuchsansätzen zu einem fast vollständigen Verlust des roten Koloniebildungspotentials. Besonders auffällig waren die großen Unterschiede bezogen auf die Höhe der Expansion koloniebildender Zellen. So wurde beispielsweise in V4 eine zum Teil bis zu 40-fach höhere Expansion erreicht als in V1-V3 (Tabelle 22). Außerdem lag die Expansion nach Kokultur mit MSZ gesunder Spender in allen getesteten Bedingungen unter der mit AFT024, wohingegen sich in Kultur mit AML MSZ eine große Varianz der ermittelten Werte ergab.

3.3. Korrelation

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den erhobenen Daten feststellen zu können, wurden alle in den vorhergehenden Abschnitten ermittelten Messwerte miteinander korreliert. Der Fokus dieser Korrelationsanalyse lag dabei auf dem Vergleich der durchflusszytometrisch ermittelten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) verschiedener Oberflächenantigene auf den expandierten MSZ mit den Analysen der leukämischen Blasten sowie der ermittelten Expansion und Untersuchung der HSVZ nach 14-tägiger Kokultur. Die Korrelation der verschiedenen Parameter zueinander wurde nach Spearman berechnet. Korrelationskoeffizienten (r^2) größer 0,7 mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ wurden als sehr stark korrelierend angenommen.

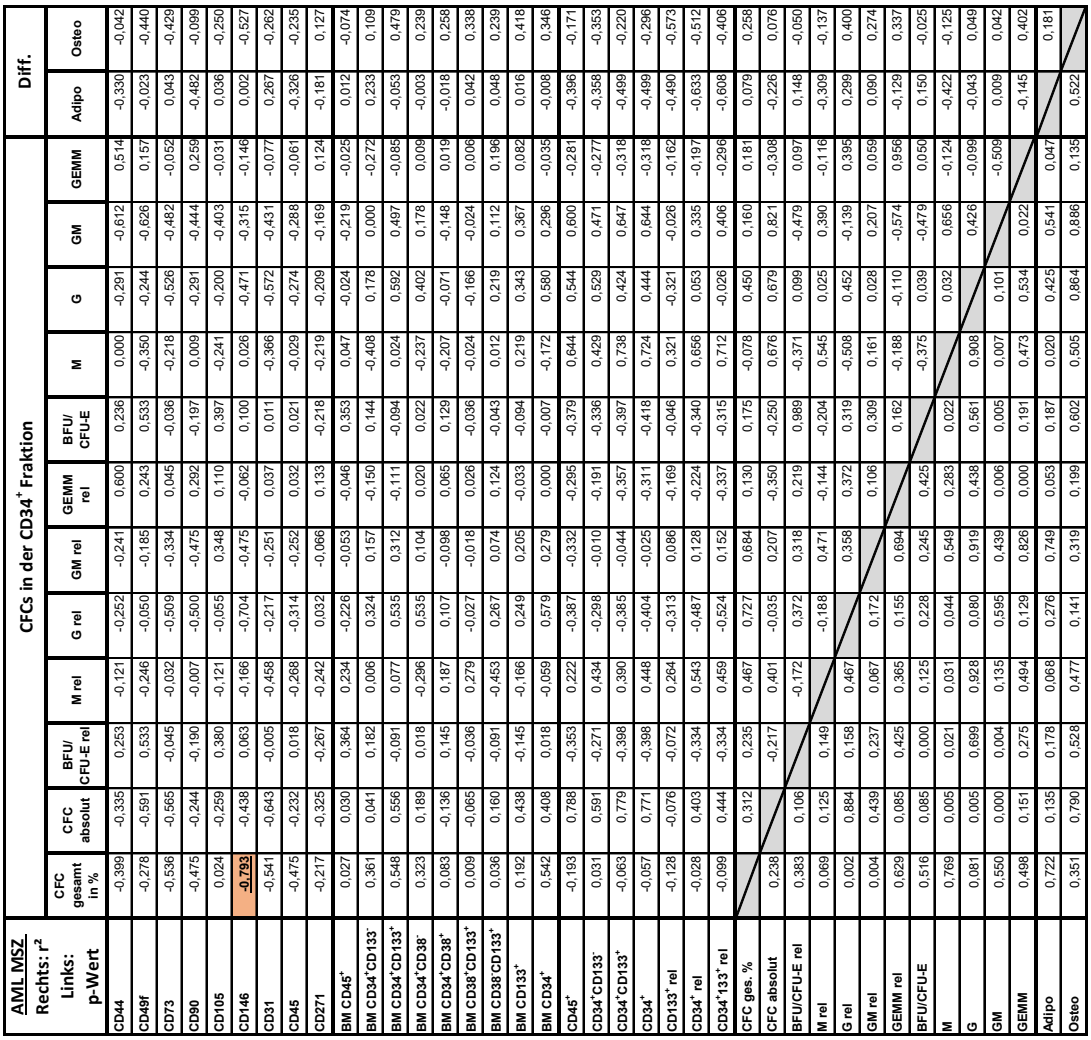
Bei den MSZ aus dem Knochenmark gesunder Spender konnten mittels der Spearman Rangkorrelation keine signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei den MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten waren allerdings insbesondere die Oberflächenantigene CD73 und CD146 auffällig (Abbildung 16). MSZ mit einer hohen Expression von CD73 wiesen gleichzeitig eine hohe Expression von CD146 auf (r^2=0,729). Eine stärkere Expression des Oberflächenantigen CD73 korrelierte mit einem geringeren Anteil $CD34^+$ Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse der primär erhaltenen Knochenmarkproben (r^2=-0,734). Entsprechend findet

sich ebenfalls eine negative Korrelation der CD73 Expression auf den AML MSZ mit dem Anteil $CD34^+CD133^+$ und $CD34^+CD38^-$ Zellen im Knochenmark (r^2=-0,793; r^2=-0,71). Auch die Expression des Glykoproteins CD146 auf den expandierten MSZ korreliert mit einem geringeren Anteil an $CD34^+$ und $CD34^+CD133^+$ in den Knochenmarkproben der AML Patienten (r^2=-0,74; r^2=-0,769). Darüber hinaus wiesen MSZ mit einer hohen Expression von CD146 eine geringere Expansion von Zellen mit CFC Potential auf (r^2=-0,793). Eine höhere Expression des Oberflächenantigens CD271 war mit einem geringeren Anteil $CD45^+$ in den primären Knochenmarkproben assoziiert (r^2=-0,74). Mit Hilfe der Spearman Rangkorrelation konnten somit bei den expandierten AML MSZ die Oberflächenantigene CD73, CD146 und CD271 identifiziert werden, die möglicherweise im Zusammenhang mit dem Vorhandensein bestimmter Subpopulation von HSVZ bzw. leukämischen Blasten in Patienten mit AML stehen.

Um die Versuchsergebnisse der AML MSZ mit den MSZ gesunder Spender vergleichen zu können, wurden die Signifikanzniveaus über den zweiseitig gepaarten *student t-Test* berechnet. Hierzu wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der jeweiligen Proben verwendet. Wie in Abbildung 17 dargestellt enthielten die Knochenmarkroben von AML Patienten signifikant mehr $CD133^+$ HSVZ (Abbildung 17). Der Vergleich der MFI Werte der Oberflächenantigenexpression expandierter MSZ ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen MSZ gesunder Spender und AML MSZ. In der Analyse des Differenzierungsansatzes, konnte nachgewiesen werden, dass AML MSZ einen signifikant höheren osteogenen Differenzierungsgrad erreichen als MSZ gesunder Spender. Beim Ausmaß der adipogenen Differenzierung fanden sich keine Unterschiede.

An Tag 14 der Kokulturversuche wurden alle HSVZ auf die Expression der Oberflächenantigene CD45, CD34 und CD133 hin durchflusszytometrisch untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.1). Nach Kokultur mit AML MSZ fanden sich an Tag 14 signifikant mehr $CD45^+$, $CD34^+$, $CD34^+CD133^+$ und $CD34^+CD133^-$ Zellen als nach Kokultur mit MSZ gesunder Spender (Abbildung 17). Auch die Frequenz von $CD133^+$ und $CD34^+CD133^+$ HSVZ war Tag 14 der Kokultur mit AML MSZ signifikant höher (Abbildung 17). Der Vergleich der generierten Kolonien im CFC Ansatz ergab, dass HSVZ nach Kokultur mit AML MSZ signifikant mehr CFU-M Kolonien bilden. Der Vergleich der übrigen Kolonietypen und der gesamten Anzahl kultivierter CFC ergab keinen signifikanten Unterschied.

AML MSZ Rechts: r^2 Links: p-Wert	Expression der Oberflächenantigene									Durchflusszytometrische Analyse der primären Knochenmarkprobe									Expansion hämatopoetischer Subpopulationen						
	CD44	CD49f	CD73	CD90	CD105	CD146	CD31	CD45	CD271	BM $CD45^+$	BM $CD34^+CD133^-$	BM $CD34^+CD133^+$	BM $CD34^+CD38^-$	BM $CD34^+CD38^+$	BM $CD38^+CD133^+$	BM $CD38^-CD133^+$	BM $CD133^+$	BM $CD34^+$	$CD45^+$	$CD34^+CD133^-$	$CD34^+CD133^+$	$CD34^+$	$CD133^+$ rel	$CD34^+$ rel	$CD34^+CD133^+$ rel
CD44		0,332	0,594	0,750	0,144	0,509	0,274	0,529	0,180	0,260	-0,473	-0,550	-0,515	-0,024	0,107	-0,107	-0,154	-0,550	-0,012	-0,021	-0,035	-0,003	0,094	0,100	0,050
CD49f	0,208		0,353	0,132	0,379	0,476	0,322	0,068	-0,081	0,266	-0,065	-0,598	-0,266	0,136	-0,053	-0,314	-0,568	-0,391	-0,294	-0,126	-0,347	-0,321	0,312	-0,085	-0,153
CD73	0,017	0,180		0,679	0,276	**0,729**	0,608	0,459	0,208	0,231	-0,260	**-0,793**	**-0,710**	-0,089	0,095	-0,379	-0,462	**-0,734**	-0,224	0,062	-0,179	-0,091	0,159	0,115	0,053
CD90	0,001	0,625	0,005		0,088	0,444	0,124	0,344	0,031	0,420	-0,254	-0,538	-0,515	-0,089	-0,018	-0,213	-0,237	-0,485	0,138	0,150	0,079	0,124	-0,009	0,200	0,132
CD105	0,594	0,148	0,299	0,746		0,079	0,274	0,088	0,038	0,083	0,207	-0,237	-0,024	-0,355	-0,361	0,189	-0,036	0,030	-0,335	0,024	-0,135	-0,100	0,268	0,141	0,141
CD146	0,046	0,064	0,002	0,087	0,771		0,503	0,421	0,063	0,189	-0,408	**-0,769**	-0,556	-0,047	0,006	-0,284	-0,426	**-0,740**	0,009	0,056	-0,103	-0,044	0,132	0,088	0,041
CD31	0,303	0,222	0,014	0,646	0,303	0,049		0,692	0,537	-0,361	-0,098	-0,515	-0,278	0,056	0,195	-0,163	-0,400	-0,417	-0,390	-0,213	-0,361	-0,322	0,283	-0,104	-0,063
CD45	0,037	0,805	0,076	0,192	0,746	0,106	0,004		0,595	-0,290	-0,337	-0,337	-0,290	-0,012	0,166	-0,101	-0,183	-0,367	0,038	0,082	0,106	0,115	0,400	0,309	0,335
CD271	0,503	0,761	0,438	0,911	0,889	0,816	0,034	0,017		**-0,740**	-0,346	0,086	0,080	0,030	0,275	0,258	0,189	-0,030	-0,166	-0,079	0,068	0,026	0,380	0,181	0,200
BM $CD45^+$	0,332	0,320	0,391	0,108	0,766	0,485	0,162	0,268	0,001		0,048	-0,429	-0,524	0,048	-0,048	-0,429	-0,286	-0,381	0,030	-0,018	-0,101	-0,095	-0,254	-0,077	-0,089
BM $CD34^+CD133^-$	0,063	0,800	0,320	0,332	0,443	0,113	0,703	0,195	0,177	0,877		0,429	0,524	0,381	0,048	-0,214	-0,286	0,667	-0,136	0,000	-0,314	-0,243	-0,320	-0,426	-0,444
BM $CD34^+CD133^+$	0,028	0,016	0,000	0,032	0,367	0,001	0,041	0,195	0,753	0,103	0,103		0,810	0,167	0,071	0,405	0,548	0,905	0,243	0,071	0,249	0,201	-0,243	-0,142	-0,101
BM $CD34^+CD38^-$	0,042	0,309	0,003	0,042	0,921	0,026	0,285	0,268	0,770	0,042	0,042	0,000		0,024	-0,262	0,548	0,405	0,905	0,006	-0,130	-0,071	-0,107	-0,219	-0,320	-0,314
BM $CD34^+CD38^+$	0,921	0,619	0,732	0,732	0,172	0,851	0,838	0,956	0,916	0,877	0,151	0,547	0,947		0,857	-0,643	-0,524	0,119	0,006	-0,107	-0,201	-0,189	-0,059	-0,320	-0,331
BM $CD38^+CD133^+$	0,699	0,834	0,732	0,939	0,165	0,991	0,467	0,542	0,301	0,877	0,877	0,807	0,334	0,000		-0,571	-0,333	-0,119	0,053	-0,053	0,000	-0,006	0,065	-0,124	-0,083
BM $CD38^-CD133^+$	0,683	0,230	0,144	0,417	0,485	0,278	0,531	0,699	0,334	0,103	0,434	0,126	0,032	0,009	0,024		0,881	0,381	-0,006	-0,219	0,130	0,030	-0,101	-0,059	0,018
BM $CD133^+$	0,557	0,023	0,071	0,367	0,886	0,098	0,120	0,485	0,480	0,290	0,290	0,032	0,126	0,042	0,213	0,000		0,357	0,166	-0,136	0,349	0,225	-0,148	0,030	0,148
BM $CD34^+$	0,028	0,131	0,002	0,056	0,921	0,001	0,104	0,157	0,891	0,151	0,007	0,000	0,000	0,673	0,673	0,151	0,181		0,130	0,107	0,065	0,065	-0,290	-0,225	-0,237
$CD45^+$	0,969	0,268	0,404	0,609	0,204	0,978	0,134	0,891	0,532	0,921	0,603	0,367	0,991	0,991	0,851	0,974	0,542	0,635		0,715	0,865	0,874	0,068	0,485	0,482
$CD34^+CD133^-$	0,943	0,641	0,822	0,579	0,935	0,839	0,421	0,763	0,765	0,939	0,991	0,800	0,619	0,683	0,834	0,404	0,603	0,699	0,003		0,691	0,824	0,126	0,647	0,503
$CD34^+CD133^+$	0,900	0,188	0,505	0,771	0,617	0,705	0,168	0,697	0,803	0,699	0,230	0,355	0,783	0,443	0,991	0,635	0,187	0,817	0,000	0,004		0,974	0,397	0,765	0,800
$CD34^+$	0,996	0,226	0,738	0,649	0,713	0,874	0,220	0,672	0,923	0,715	0,355	0,457	0,683	0,471	0,974	0,921	0,404	0,817	0,000	0,000	0,000		0,347	0,776	0,765
$CD133^+$ rel	0,730	0,239	0,556	0,978	0,315	0,625	0,287	0,126	0,147	0,332	0,221	0,355	0,404	0,817	0,817	0,699	0,572	0,268	0,805	0,641	0,129	0,188		0,703	0,744
$CD34^+$ rel	0,713	0,755	0,672	0,456	0,602	0,746	0,694	0,244	0,499	0,766	0,098	0,588	0,221	0,221	0,635	0,817	0,921	0,391	0,059	0,008	0,001	0,001	0,003		0,953
$CD34^+133^+$ rel	0,856	0,571	0,848	0,625	0,602	0,882	0,811	0,204	0,454	0,732	0,084	0,699	0,230	0,203	0,749	0,956	0,588	0,367	0,061	0,049	0,000	0,001	0,001	0,000	
CFC ges. %	0,125	0,292	0,034	0,063	0,932	0,000	0,032	0,063	0,412	0,926	0,170	0,030	0,223	0,761	0,978	0,899	0,474	0,033	0,468	0,911	0,811	0,828	0,630	0,915	0,711
CFC absolut	0,204	0,018	0,025	0,361	0,332	0,091	0,008	0,385	0,215	0,921	0,886	0,028	0,485	0,603	0,800	0,557	0,093	0,119	0,000	0,018	0,001	0,001	0,780	0,123	0,087
BFU/CFU-E rel	0,348	0,037	0,348	0,132	0,152	0,599	0,427	0,489	0,065	0,179	0,522	0,222	0,427	0,613	0,314	0,222	0,149	0,427	0,027	0,065	0,015	0,015	0,297	0,034	0,034
M rel	0,650	0,353	0,902	0,976	0,650	0,531	0,073	0,310	0,358	0,381	0,987	0,778	0,245	0,487	0,295	0,071	0,509	0,795	0,405	0,094	0,135	0,083	0,321	0,032	0,075
G rel	0,334	0,841	0,044	0,048	0,828	0,003	0,403	0,227	0,905	0,374	0,221	0,035	0,035	0,694	0,890	0,316	0,350	0,021	0,134	0,253	0,136	0,117	0,230	0,055	0,037
GM rel	0,358	0,480	0,199	0,062	0,185	0,062	0,337	0,334	0,793	0,812	0,560	0,239	0,702	0,686	0,916	0,786	0,445	0,294	0,201	0,958	0,858	0,914	0,751	0,634	0,572
GEMM rel	0,016	0,362	0,851	0,272	0,684	0,555	0,825	0,813	0,620	0,618	0,369	0,453	0,798	0,817	0,817	0,650	0,650	0,744	0,134	0,277	0,080	0,117	0,318	0,224	0,094
BFU/CFU-E	0,379	0,036	0,387	0,133	0,130	0,714	0,490	0,517	0,109	0,184	0,600	0,259	0,492	0,638	0,364	0,351	0,259	0,426	0,022	0,036	0,017	0,013	0,364	0,034	0,045
M	1,004	0,184	0,417	0,978	0,367	0,926	0,161	0,917	0,408	0,869	0,113	0,939	0,367	0,430	0,921	0,974	0,417	0,513	0,009	0,099	0,002	0,002	0,226	0,007	0,003
G	0,273	0,361	0,038	0,273	0,456	0,068	0,022	0,304	0,431	0,921	0,513	0,018	0,125	0,783	0,528	0,417	0,195	0,021	0,032	0,037	0,104	0,087	0,226	0,848	0,926
GM	0,014	0,011	0,061	0,087	0,123	0,235	0,095	0,278	0,524	0,404	0,991	0,053	0,513	0,572	0,921	0,683	0,165	0,268	0,016	0,068	0,008	0,009	0,926	0,204	0,120
GEMM	0,044	0,557	0,657	0,328	0,713	0,423	0,586	0,631	0,645	0,727	0,195	0,565	0,827	0,854	0,817	0,464	0,763	0,700	0,184	0,190	0,141	0,141	0,389	0,319	0,166
Adipo	0,054	0,466	0,626	0,009	0,610	0,525	0,335	0,057	0,189	0,547	0,405	0,375	0,482	0,446	0,590	0,606	0,563	0,470	0,027	0,041	0,007	0,007	0,008	0,000	0,001
Osteo	0,717	0,060	0,067	0,569	0,258	0,024	0,224	0,283	0,648	0,623	0,693	0,072	0,386	0,714	0,782	0,387	0,121	0,205	0,404	0,127	0,309	0,192	0,014	0,029	0,082



AML MSZ Rechts: r^2 Links: p-Wert	CFCs in der CD34$^+$ Fraktion													Diff.	
	CFC gesamt in %	CFC absolut	BFU/ CFU-E rel	M rel	G rel	GM rel	GEMM rel	BFU/ CFU-E	M	G	GM	GEMM	Adipo	Osteo
CD44	-0,399	-0,335	0,253	-0,121	-0,252	-0,241	0,600	0,236	0,000	-0,291	-0,612	0,514	-0,330	-0,042
CD49f	-0,278	-0,591	0,533	-0,246	-0,050	-0,185	0,243	0,533	-0,350	-0,244	-0,626	0,157	-0,023	-0,440
CD73	-0,536	-0,565	-0,045	-0,032	-0,509	-0,334	0,045	-0,036	-0,218	-0,526	-0,482	-0,052	0,043	-0,429
CD90	-0,475	-0,244	-0,190	-0,007	-0,500	-0,475	0,292	-0,197	0,009	-0,291	-0,444	0,259	-0,482	-0,099
CD105	0,024	-0,259	0,380	-0,121	-0,055	0,348	0,110	0,397	-0,241	-0,200	-0,403	-0,031	0,036	-0,250
CD146	**-0,793**	-0,438	0,063	-0,166	-0,704	-0,475	-0,062	0,100	0,026	-0,471	-0,315	-0,146	0,002	-0,527
CD31	-0,541	-0,643	-0,005	-0,458	-0,217	-0,251	0,037	0,011	-0,366	-0,572	-0,431	-0,077	0,267	-0,262
CD45	-0,475	-0,232	0,018	-0,268	-0,314	-0,252	0,032	0,021	-0,029	-0,274	-0,288	-0,061	-0,326	-0,235
CD271	-0,217	-0,325	-0,267	-0,242	0,032	-0,066	0,133	-0,218	-0,219	-0,209	-0,169	0,124	-0,181	0,127
BM CD45$^+$	0,027	0,030	0,364	0,234	-0,226	-0,053	-0,046	0,353	0,047	-0,024	-0,219	-0,025	0,012	-0,074
BM CD34$^+$CD133$^-$	0,361	0,041	0,182	0,006	0,324	0,157	-0,150	0,144	-0,408	0,178	0,000	-0,272	0,233	0,109
BM CD34$^+$CD133$^+$	0,548	0,556	-0,091	0,077	0,535	0,312	-0,111	-0,094	0,024	0,592	0,497	-0,085	-0,053	0,479
BM CD34$^+$CD38$^-$	0,323	0,189	0,018	-0,296	0,535	0,104	0,020	0,022	-0,237	0,402	0,178	0,009	-0,003	0,239
BM CD34$^+$CD38$^+$	0,083	-0,136	0,145	0,187	0,107	-0,098	0,065	0,129	-0,207	-0,071	-0,148	0,019	-0,018	0,258
BM CD38$^+$CD133$^+$	0,009	-0,065	-0,036	0,279	-0,027	-0,018	0,026	-0,036	-0,024	-0,166	-0,024	0,006	0,042	0,338
BM CD38$^-$CD133$^+$	0,036	0,160	-0,091	-0,453	0,267	0,074	0,124	-0,043	0,012	0,219	0,112	0,196	0,048	0,239
BM CD133$^+$	0,192	0,438	-0,145	-0,166	0,249	0,205	-0,033	-0,094	0,219	0,343	0,367	0,082	0,016	0,418
BM CD34$^+$	0,542	0,408	0,018	-0,059	0,579	0,279	0,000	-0,007	-0,172	0,580	0,296	-0,035	-0,008	0,346
CD45$^+$	-0,193	0,788	-0,353	0,222	-0,387	-0,332	-0,295	-0,379	0,644	0,544	0,600	-0,281	-0,396	-0,171
CD34$^+$CD133$^-$	0,031	0,591	-0,271	0,434	-0,298	-0,010	-0,191	-0,336	0,429	0,529	0,471	-0,277	-0,358	-0,353
CD34$^+$CD133$^+$	-0,063	0,779	-0,398	0,390	-0,385	-0,044	-0,357	-0,397	0,738	0,424	0,647	-0,318	-0,499	-0,220
CD34$^+$	-0,057	0,771	-0,398	0,448	-0,404	-0,025	-0,311	-0,418	0,724	0,444	0,644	-0,318	-0,499	-0,296
CD133$^+$ rel	-0,128	-0,076	-0,072	0,264	-0,313	0,086	-0,169	-0,046	0,321	-0,321	-0,026	-0,162	-0,490	-0,573
CD34$^+$ rel	-0,028	0,403	-0,334	0,543	-0,487	0,128	-0,224	-0,340	0,656	0,053	0,335	-0,197	-0,633	-0,512
CD34$^+$133$^+$ rel	-0,099	0,444	-0,334	0,459	-0,524	0,152	-0,337	-0,315	0,712	-0,026	0,406	-0,296	-0,608	-0,406
CFC ges. %		0,312	0,235	0,467	0,727	0,684	0,130	0,175	-0,078	0,450	0,160	0,181	0,079	0,258
CFC absolut	0,238		-0,217	0,401	-0,035	0,207	-0,350	-0,250	0,676	0,679	0,821	-0,308	-0,226	0,076
BFU/CFU-E rel	0,383	0,106		-0,172	0,372	0,318	0,219	0,989	-0,371	0,099	-0,479	0,097	0,148	-0,050
M rel	0,069	0,125	0,149		-0,188	0,471	-0,144	-0,204	0,545	0,025	0,390	-0,116	-0,309	-0,137
G rel	0,002	0,884	0,158	0,467		0,358	0,372	0,319	-0,508	0,452	-0,139	0,395	0,299	0,400
GM rel	0,004	0,439	0,237	0,067	0,172		0,106	0,309	0,161	0,028	0,207	0,059	0,090	0,274
GEMM rel	0,629	0,085	0,425	0,365	0,155	0,694		0,162	-0,188	-0,110	-0,574	0,956	-0,129	0,337
BFU/CFU-E	0,516	0,085	0,000	0,125	0,228	0,245	0,425		-0,375	0,039	-0,479	0,050	0,150	-0,025
M	0,769	0,005	0,021	0,031	0,044	0,549	0,283	0,022		0,032	0,656	-0,124	-0,422	-0,125
G	0,081	0,005	0,699	0,928	0,080	0,919	0,438	0,561	0,908		0,426	-0,099	-0,043	0,049
GM	0,550	0,000	0,004	0,135	0,595	0,439	0,006	0,005	0,007	0,101		-0,509	0,009	0,042
GEMM	0,498	0,151	0,275	0,494	0,129	0,826	0,000	0,191	0,473	0,534	0,022		-0,145	0,402
Adipo	0,722	0,135	0,178	0,068	0,276	0,749	0,053	0,187	0,020	0,425	0,541	0,047		0,181
Osteo	0,351	0,790	0,528	0,477	0,141	0,319	0,199	0,602	0,505	0,864	0,886	0,135	0,522	

Abbildung 16 Korrelation der Expression von Oberflächenantigenen auf AML MSZ mit der durchflusszytometrischen Analyse der primären Knochenmarkproben und der Expansion phänotypischer und funktioneller HSVZ

Nach Spearman berechnete Korrelationskoeffizienten und Signifikanzniveaus für MSZ aus AML Knochenmarkproben. Die Korrelationen (r^2) sind in der rechten oberen Hälfte der Tabelle und die dazugehörigen Signifikanzniveaus (p) in der linken unteren Hälfte der Tabelle dargestellt. Statistisch signifikante Korrelationen sind fett gedruckt und rot hinterlegt.

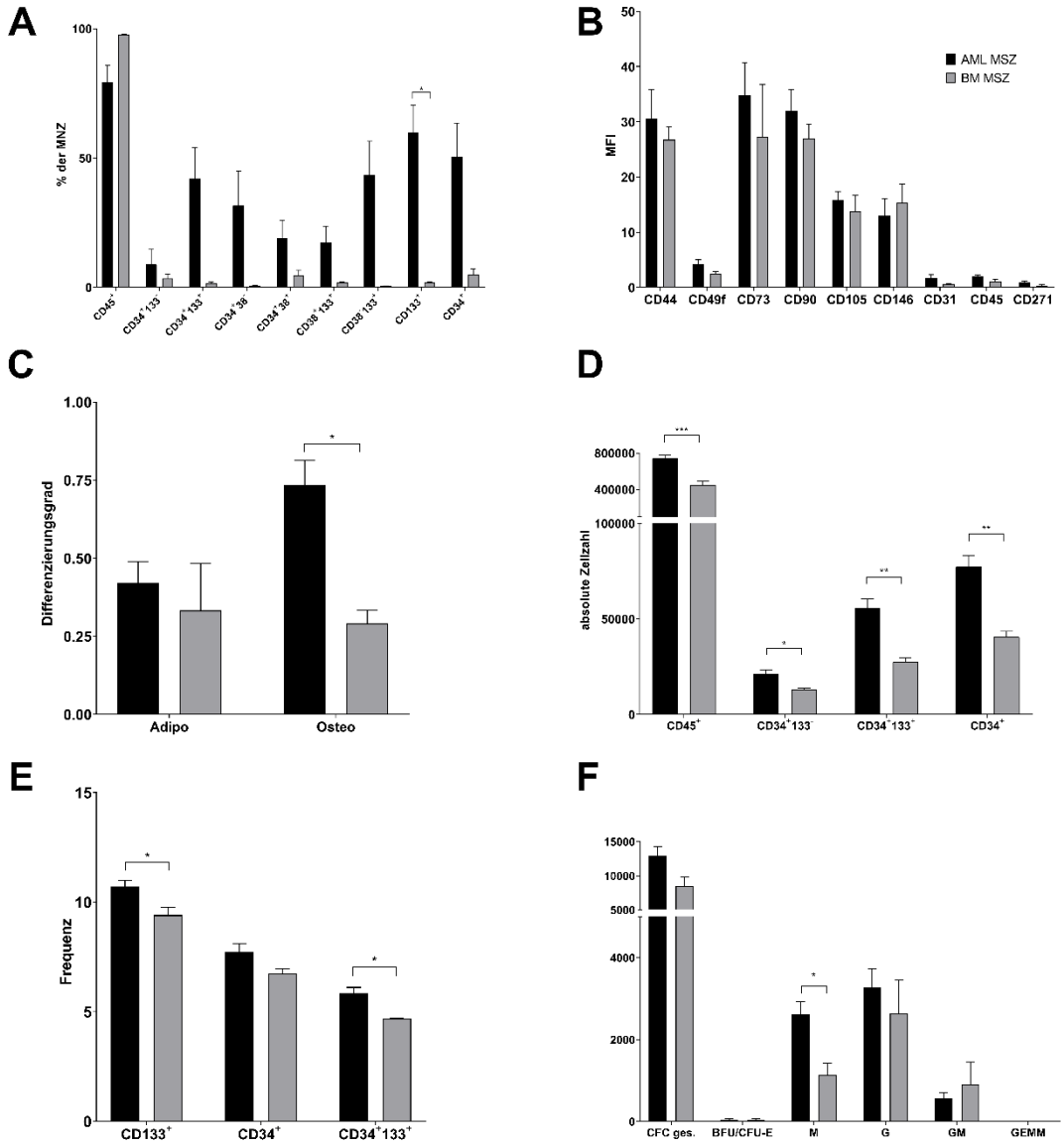


Abbildung 17 Vergleich von AML MSZ und gesunden MSZ

Vergleich der jeweiligen Versuchsergebnisse von AML MSZ und MSZ gesunder Spender. ***(A)*** *Verteilung der verschiedenen hämatopoetischen Subpopulationen in der primären durchflusszytometrischen Analyse der erhaltenen Knochenmarkproben.* ***(B)*** *MFI Werte der expandierten MSZ.* ***(C)*** *Optisch ausgewerteter Anteil adipogen und osteogen differenzierter MSZ im Differenzierungsansatz.* ***(D)*** *Absolute Anzahl expandierter HSVZ an d14 der Kokulturversuche.* ***(E)*** *Frequenz hämatopoetischer Subpopulationen an d14 der Kokulturversuche.* ***(F)*** *Absolute Anzahl der verschiedenen Kolonietypen im CFC Ansatz. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt in den Abbildungen gekennzeichnet: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.*

4. Diskussion

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten einen anderen Einfluss auf HSVZ aus Nabelschnurrestblut haben als MSZ aus dem Knochenmark gesunder Spender.

In der Pathophysiologie der AML spielen die Zellen der Stammzellnische, unter anderem auch MSZ, eine entscheidende Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung und die hohen Rezidivraten trotz initial erfolgreicher Therapie. Veränderte Stromazellen fördern die Proliferation leukämischer Stammzellen und hemmen dabei die gesunde Hämatopoese beispielsweise durch veränderte Expression von Zytokinen wie SDF-1, G-CSF oder SCF (Griffin et al. 1987, Colmone et al. 2008, Ge et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HSVZ aus Nabelschnurrrestblut mit MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten und gesunden Spendern kultiviert. Die Effekte dieser Kulturbedingungen wurden anschließend quantitativ mittels Durchflusszytometrie und qualitativ anhand des CFC Ansatzes ausgewertet und korreliert.

4.1. Patientenkohorte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkproben von insgesamt 8 AML Patienten und 3 gesunden Spendern analysiert (vgl. Absatz 3.1). Die Diagnose AML wurde durch die Klinik für Hämatologie anhand verschiedener Untersuchungsmethoden wie Zytochemie, Morphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik gestellt. Es liegen nur für 4 der 8 AML Knochenmarkproben Informationen darüber vor, ob die Patienten vor der Knochenmarkpunktion bereits Chemotherapie erhalten haben oder nicht. Auch die Einteilung nach FAB liegt nur für 2 der 8 verwendeten Proben vor. Für beide Faktoren kann daher keine Aussage über deren Signifikanz im Zusammenhang mit den Versuchsergebnissen getätigt werden. Da die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Proben der Klinik für Knochenmarktransplantation nicht vorlagen und um vergleichbare Ergebnisse für spätere Korrelationsanalysen zu generieren, wurden alle Proben nach Erhalt zunächst auf die Expression der Oberflächenantigene CD45, CD34, CD38 und CD133 untersucht.

Die statistische Analyse der primären durchflusszytometrischen Untersuchung der Knochenmarkproben ergab, dass sich im Knochenmark von AML Patienten signifikant mehr $CD133^+$ Zellen nachweisen ließen, als im Knochenmark gesunder Spender (vgl. Abschnitt 533.3). In allen Proben, außer Probe 6, waren mehr als 20% der analysierten

Zellen $CD133^+$ (vgl. Abschnitt 1.2.1). In 5 von 8 Proben waren mehr als die Hälfte der HSVZ $CD133^+$. Bezüglich der Expression von CD133 und deren Korrelation mit diagnostischen und prognostischen Faktoren finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. In früheren Arbeiten, wurde zunächst eine Korrelation zwischen dem FAB Subtyp und der Expression von $CD133^+$ angenommen, welche sich in weiteren Untersuchungen jedoch nicht bestätigte (Miraglia et al. 1997, Buhring et al. 1999, Horn et al. 1999). Des Weiteren legten Wuchter et al. 2011 dar, dass CD133 zwar möglicherweise zur genaueren Charakterisierung unreifer AML Subtypen geeignet ist, die Expression von CD133 jedoch keine Rückschlüsse auf die hierarchische Organisation leukämischer Stamm- und Vorläuferzellen zulässt (Wuchter et al. 2001). Neuere Arbeiten konnte vielversprechende Hinweise dazu erbringen, dass die Verwendung eines Fc-optimierten CD133 Antikörpers, die Aktivierung, Degranulation und Lyse von primären $CD133^+$ AML Zellen durch allogene und autologe NK-Zellen verstärkt und somit bei der Bekämpfung von MRD *(minimal residual disease)* hilfreich seien könnte (Koerner et al. 2017). Insgesamt ist die pathophysiologische Signifikanz von CD133 im Zusammenhang mit AML noch nicht abschließend erforscht.

Auch in der Expression der übrigen Oberflächenantigene fanden Unterschiede zwischen den Knochenmarkproben, diese erwiesen sich jedoch als nicht statistisch signifikant. Bezüglich der weiteren durchflusszytometrisch untersuchten Marker finden sich in der Literatur beispielsweise Daten, welche belegen, dass bei circa 75% aller AML Patienten $CD34^+$ Blasten vorhanden sind (Sperling et al. 1993). In guter Übereinstimmung mit diesen Daten konnten in allen Knochenmarkproben $CD34^+$ Blasten nachgewiesen werden. In 5 von 8 Proben waren über 50% der Zellen $CD34^+$. Da definitionsgemäß die Diagnose AML ab einem Blastenanteil von >20% im Knochenmark gestellt wird (Michiels et al. 2016) handelt es sich bei den übrigen Proben möglicherweise um $CD34^-$ AML Subtypen, myelodysplastische Vorstufen einer AML (Blastenanteil im Knochenmark <20%) oder um eine partielle Remission nach Chemotherapie.

Verschiedene Arbeiten haben außerdem dargelegt, das leukämische Stamm- und Vorläuferzellen (vgl. Abschnitt 1.2.1) in der $CD34^+CD38^-$ Population enthalten sind (Bonnet and Dick 1997, Hope et al. 2004, Ishikawa et al. 2007). In allen AML Proben dieser Arbeit konnten $CD34^+CD38^-$ Populationen nachgewiesen werden, wobei insbesondere in den Proben 1, 3 und 9 ein Großteil der im Knochenmark nachgewiesenen Zellen diesem Phänotyp entsprach. Neuere Publikationen konnten allerdings auch in anderen Subpopulationen, wie zum Beispiel in der $CD34^+CD38^+$ und der $CD34^-$ Fraktion

LSZ nachweisen (Goardon et al. 2011, Sarry et al. 2011). Zellen mit dieser Oberflächenantigenexpression fanden sich in höherem Maße in den Proben 4 und 8. Die Tatsache, dass die Unterschiede in der Expression dieser Oberflächenantigene im Vergleich mit den MSZ gesunder Spender nicht statistisch signifikant sind, liegt möglicherweise daran, dass die Knochenmarkproben der AML Patienten nicht anhand weiterer Kriterien, wie Stadium der Erkrankung, AML Subtyp, Erstdiagnose oder Rezidiv AML und Zustand vor oder nach Chemotherapie kategorisiert wurden. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung ist die Streuung der Ergebnisse sehr groß. So sind beispielsweise in Probe AML 1 über 94% der analysierten Zellen $CD34^+$, wohingegen in Probe 5 nur 7% $CD34^+$ Zellen enthalten sind (vgl. Abschnitt 3.1.1).

In der Zwischenzeit haben neuere Arbeiten weitere Oberflächenantigene detektiert, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. So konnte CD123 als vielversprechender Marker zur Identifikation von LSZ und als Therapieziel in AML Patienten identifiziert werden. Bereits 2001 wiesen Muñoz et al. eine Überexpression von CD123 in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen nach (Muñoz et al. 2001). Im Verlauf konnte eine Korrelation zwischen der gemessenen CD123 Expression bei Diagnosestellung der AML und einer geringeren Remissionsrate in diesen Patienten sowie einer insgesamt geringeren Überlebensdauer festgestellt werden (Testa et al. 2002). Mittlerweile spielt CD123 auch in der Therapie der AML, insbesondere der MRD, eine wichtige Rolle. In NOD/SCID Mäusen, welche mit einem CD123 Antikörper bzw. mit CART Zellen *(chimeric antigene receptor t cell)* behandelt wurden, konnte ein vermindertes Einwandern von LSZ in das Knochenmark und eine höhere Überlebensrate detektiert werden (Jin et al. 2009, Gill et al. 2014).

Zusammenfassend haben unsere Untersuchungen ergeben, dass im Vergleich zu Knochenmarkproben gesunder Spender die Expression von CD133 auf den HSVZ bzw. Blasten der AML Patienten signifikant erhöht ist.

4.2. *In vitro* Imitation der humanen hämatopoetischen Stammzellnische

Um ausreichend MSZ für die darauffolgenden Kokulturversuche zu erhalten, wurden diese zunächst expandiert und funktionell sowie durchflusszytometrisch untersucht (vgl. Abschnitt 3.1). Aus allen Knochenmarkproben konnten adhärent wachsende Zellen expandiert werden. In guter Übereinstimmung mit der Literatur exprimierten die generierten Zellen für MSZ typische Oberflächenantigene und es konnte eine

Differenzierung der Zellen in Adipozyten und Osteoblasten erreicht werden (Pittenger et al. 1999).

Bereits während der Expansionsphase wurde allerdings ein unterschiedlich schnelles und dichtes *in vitro* Wachstum der MSZ beobachtet. MSZ von den AML Proben 5 und 8 zeigten eine verminderte Expansion und ein langsameres Wachstum im Vergleich zu den MSZ der anderen Proben. Es konnte keine vollständige Konfluenz der Zellen erreicht werden und für weitere Versuche standen somit nur wenige Zellen zur Verfügung.

Die durchflusszytometrische Analyse der expandierten MSZ ließ keine signifikanten Unterschiede in der Expression der getesteten Oberflächenantigene zwischen AML MSZ und MSZ gesunder Spender erkennen. In der Literatur finden sich bislang nur wenige Arbeiten zu diesem Thema. Ein Beispiel ist die Arbeit von Huang et al., in welcher 2015 die Oberflächenantigenexpression von CD44, CD73 CD90, β1 Integrin und E-cadherin auf AML MSZ im Vergleich zu MSZ gesunder Probanden untersucht wurde (Huang et al. 2015). In dieser Studie wurden insgesamt MSZ aus 22 AML Proben und 5 gesunden Spendern expandiert. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Qualität und Quantität der Antigenexpression auf den untersuchten MSZ gefunden.

Bei der optischen Auswertung der angeschlossenen Differenzierungsansätze fiel sowohl zwischen den einzelnen Proben als auch zwischen den verschiedenen Zelllinien aus demselben Knochenmark eine unterschiedlich ausgeprägte Differenzierungsfähigkeit auf. MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten zeigten eine signifikant höhere osteogene Differenzierungsfähigkeit als MSZ aus dem Knochenmark gesunder Spender (vgl. Abschnitt 3.3). In einigen Proben lag der optisch ausgewertete Anteil adipogen und osteogen differenzierter Zellen bei wenigen Prozent, wohingegen in anderen Ansätzen nahezu alle ausgesäten Zellen Fettvesikel bzw. Calciumphosphateinlagerungen zeigten. Die MSZ aus Probe 5 zeigten trotz initial langsamerem Wachstum eine gute Differenzierungsfähigkeit, wohingegen die MSZ aus Probe 8 kaum adipogene Differenzierung erkennen ließen. Überraschenderweise zeigte Probe 8E allerdings eine osteogene Differenzierung von annähernd 100%, wohingegen MSZ aus Probe 8D kein Calciumphosphat sezernierten. In einer Arbeit von Chandran et al. konnte während der Expansion von MSZ aus insgesamt 11 Knochenmarkproben von AML Patienten in 5 Fällen ein normales Wachstum beobachtet werden. Die MSZ aus 4 Proben zeigten eine deutlich verzögerte Expansion und aus 2 Proben konnten keine adhärent wachsenden Zellen generiert werden (Chandran et al. 2015). Für die weiteren Versuche wurden nur

die 5 MSZ Zelllinien mit gutem Wachstum verwendet, und es wurde, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, kein Unterschied zwischen der Differenzierungsfähigkeit von AML MSZ (n=5) und gesunden MSZ (n=5) festgestellt (Chandran et al. 2015). Neuere Arbeiten von Geyh et al. beschreiben eine verminderte osteogene Differenzierung von aus AML Knochenmark generierten MSZ (Geyh et al. 2016). In der genannten Arbeit wurden n=64 MSZ Proben sowohl durchflusszytometrisch als auch funktionell im Rahmen von Differenzierungs- und Kokulturansätzen untersucht. Diese wurde anhand spezifischer Methylierungsmuster und mRNA Levels bestimmter Transkriptionsfaktoren analysiert. Als Ergebnis zeigte sich, dass MSZ von AML Patienten neben der statistisch signifikant verminderten osteogenen Differenzierungsfähigkeit zusätzlich verminderte Mengen an mRNAs der osteoblastischen Transkriptionsfaktoren Osx und des für die Knochenarchitektur wichtigen Faktors OC aufwiesen (Geyh et al. 2016). Die Diskrepanz zwischen der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Geyh et al. erklärt sich nicht durch die Methode der Auswertung der Differenzierungsergebnisse. In beiden Arbeiten wurden die Differenzierungsansätze mikroskopisch ausgewertet und der Anteil differenzierter Zellen geschätzt. Möglicherweise war die Anzahl gesunder Spender (vorliegende Arbeit n=3; Geyh et al. n=17) in dieser Arbeit zu gering und damit nicht ausreichend repräsentativ. Auch der AML Subtyp und das Stadium der Erkrankung könnte eine Rolle in der Differenzierungsfähigkeit der MSZ spielen, wobei sowohl in dieser Arbeit als auch in der Veröffentlichung von Geyh et al. die AML Patienten nicht anhand weiterer Merkmale unterteilt, sondern die Ergebnisse kumuliert betrachtet wurden. Ein weiterer Faktor, welcher zur Diskrepanz zwischen den vorliegenden Ergebnissen führen könnte, sind unterschiedliche Kulturbedingungen. So wurden HSVZ und MSZ in der Arbeit von Grey et al. für 5 Wochen kokultiviert, im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit lediglich für 14 Tage. Zusammenfassend sind die Unterschiede zwischen den vorliegenden Arbeiten am ehesten multifaktoriell bedingt und die Vergleichbarkeit ließe sich nur durch eine Angleichung der Versuchs- und Kulturbedingungen sowie größere Patientenkohorten verbessern.

4.3. Einfluss von AML MSZ auf HSVZ

Um den Einfluss der im Rahmen dieser Arbeit expandierten MSZ auf $CD34^+$ HSVZ zu untersuchen, wurden die HSVZ nach 14-tägiger Kokultur mit MSZ zunächst durchflusszytometrisch analysiert und anschließend im CFC Ansatz funktionell untersucht. Nach zweiwöchiger Kokultur wurden HSVZ anhand ihrer Expression der

Oberflächenantigene CD34, CD133, CD45 und CD38 untersucht. In allen getesteten Bedingungen konnte eine Expansion von $CD34^+$ HSVZ beobachtet werden. Nach Kokultur mit AML MSZ ließen sich signifikant mehr $CD45^+$, $CD34^+CD133^+$, $CD34^+CD133^-$ HSVZ nachweisen, als nach Kultur mit MSZ gesunder Spender. Ebenso war die Frequenz sowohl der gesamten $CD34^+$ HSVZ als auch der $CD34^+CD133^+$ Progenitoren, nach Kultur mit AML MSZ höher als mit MSZ gesunder Spender. MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten scheinen somit *in vitro* einen proliferationsfördernden Effekt auf gesunde HSVZ auszuüben. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Proliferation klonaler myeloischer Zellen in der Pathophysiologie der AML durch die mesenchymalen Zellen der Knochenmarknische beschleunigt und unterstützt werden könnte.

Im Anschluss an die Kokultur wurden die HSVZ für den CFC Ansatz anhand des Oberflächenantigens CD34 durchflusszytometrisch sortiert. Im Vergleich fanden sich signifikant mehr CFU-M Kolonien nach Kokultur mit AML MSZ. Der Vergleich der übrigen Kolonietypen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. In der Literatur finden sich hierzu bislang keine vergleichbaren Daten, aber im Rahmen dieser Arbeit konnte kein funktioneller Unterschied von HSVZ nach Kokultur mit AML MSZ und gesunden MSZ beobachtet werden. Des Weiteren konnte in allen Ansätzen, sowohl AML MSZ als auch MSZ gesunder Spender, ein annähernd vollständiger Verlust des erythrozytären Differenzierungspotentials beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.2). Dies bedeutet den Verlust sowohl von einem Großteil der MPP, den primitiven multipotenten HSVZ, als auch von EMP, da beide Progenitoren in der Lage sind, Erythrozyten hervorzubringen.

Neuere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe, haben dargelegt, wie sich anhand weiterer Oberflächenantigene einzelne HSVZ Fraktionen unterscheiden lassen (Görgens et al. 2013a). Diese Daten lassen erkennen, dass MPP $CD34^+CD133^+CD45RA^-CD38^{low}CD10^-$ sind und aus ihnen $CD34^+CD133^+CD45RA^+CD38^{low}CD10^-$ LMPP und $CD34^+CD133^{-/low}CD45RA^-CD38^{low}CD10^-$ EMP hervorgehen können (Görgens et al. 2013a, Görgens et al. 2013b, Görgens et al. 2014). Im CFC Ansatz würden sich MPP somit als $CD133^+$ mit erythroidem Koloniebildungspotential nachweisen lassen. Da die verwendeten HSVZ im Rahmen dieser Arbeit nur anhand von CD34 sortiert wurden, können rote Kolonien aus MPP oder EMP hervorgegangen sein. Für zukünftige Analysen wäre es daher notwendig, HSVZ anhand verschiedener Oberflächenantigene in Subpopulationen zu sortieren und in den CFC Ansatz einzubringen.

Durch weitere Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass multipotente HSZ/MPP sich asymmetrisch teilen (Görgens et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass das Oberflächenantigen CD133 bei circa 70% der HSZ/MPP asymmetrisch auf die beiden Tochterzellen verteilt wird. Möglicherweise kommt es durch die asymmetrische Zellteilung also *in vitro* eher zu einer Differenzierung der HSZ/MPP in weniger primitive Progenitoren wie LMPP oder EMP, als dass eine Selbsterneuerung der HSZ/MPP stattfindet. Dieser Vorgang könnte den progredienten Verlust von HSZ/MPP in allen bislang in unserer Arbeitsgruppe getesteten Kulturbedingungen erklären (Radtke et al. 2016).

Die Unterscheidung und Identifizierung verschiedener HSVZ Fraktionen ist nicht nur für die wissenschaftliche Erforschung von *in vitro* Kulturbedingungen von großem Interesse, sondern auch in der klinischen Praxis. Es scheint auch *in vivo* zu Veränderungen in den unterschiedlichen CD34 Subpopulationen zu kommen. So konnte gezeigt werden, dass in autologen Stammzelltransplantaten, welche aus peripherem Blut gewonnen wurden, signifikant mehr MPP, LMPP und EMP, also primitivere Vorläuferzellen, enthalten sind, als in Knochenmarkproben gesunder Spender. Hierdurch kommt es bei Transplantation von HSVZ aus peripherem Blut zu einem schnelleren Einwandern dieser Zellen in das Knochenmark des Empfängers und dadurch auch zu einer schnelleren Initialisierung erneuter Hämatopoese. In Knochenmarkproben, welche ein Jahr nach allogener Knochenmarktransplantation entnommen wurden, konnte wiederum ein deutlich geringerer Anteil an MPP detektiert werden. Grund für den Verlust der unreifen Progenitoren könnte möglicherweise replikativer Stress im Knochenmark oder toxische Veränderungen des Knochenmarks durch die vorab durchgeführte myeloablative Radio- und Chemotherapie sein (Quach et al. 2015, Dmytrus et al. 2016). Für zukünftige Arbeiten erscheint somit beispielsweise eine Unterscheidung der Patienten vor und nach Chemotherapie sinnvoll.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit ein proliferationsfördernder Effekt von AML MSZ auf gesunde HSVZ festgestellt werden. In der funktionellen Analyse der kultivierten HSVZ fanden sich nach Kultur mit AML MSZ signifikant mehr Makrophagen Kolonien im CFC Ansatz. Ein Erhalt primitiverer HSVZ Populationen oder ein signifikanter Verlust der HSVZ Funktionalität im Sinne einer pathologischen Veränderung der HSVZ durch Kultur mit maligne veränderte MSZ konnte nicht festgestellt werden.

4.4. Ausblick

Die hohe Rate an Rezidiven ist in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie weiterhin ein großes Problem. Bislang galten vor allem die leukämischen Blasten als primäres Therapieziel. Doch trotz Eradikation dieser Zellen und autologen bzw. allogenen Stammzelltransplantationen, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der AML, abhängig von Alter etc., zwischen 50 und 60%. Vor diesem Hintergrund werden zunehmend alternative Therapiestrategien erforscht und in diesem Zusammenhang auch die Rolle der Knochenmarkzellen in der Pathophysiologie dieser Erkrankung zunehmend untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit, sollte der Einfluss von MSZ aus dem Knochenmark von AML Patienten im Vergleich, zu dem von gesunden Spendern auf gesunde HSVZ aus Nabelschnurrestblut untersucht werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass AML MSZ während 14 tägiger Kokultur einen proliferationsfördernden Effekt auf gesunde HSVZ ausüben. Die funktionelle Analyse der kultivierten HSVZ im CFC Ansatz ergab allerdings kaum signifikante Unterschiede hinsichtlich Expansion und Frequenz koloniebildender Zellen, sowie dem Erhalt erythrozytären Differenzierungspotentials.

Da es sich bei der AML pathophysiologisch um ein heterogenes Krankheitsbild handelt, stellt sich die Frage, anhand welcher Kriterien Patienten bzw. die generierten MSZ für zukünftige Untersuchungen kategorisiert werden sollten. Zunächst wären für weiterführende Arbeiten größere Patientenzahlen wünschenswert, um repräsentativere Ergebnisse zu generieren und signifikante Zusammenhänge erkennen zu können. Die Daten könnten dann anhand von Alter, Subtyp der AML, Radio/Chemotherapie vor Entnahme der Probe oder stattgehabter autologer oder allogener Stammzelltransplantation unterteilt werden.

5. Zusammenfassung

In der Pathophysiologie der akuten myeloischen Leukämie (AML) kommt es unter anderem durch Veränderungen in der Stammzellnische zu einer gesteigerten Proliferation leukämischer Blasten und einer Suppression der gesunden Hämatopoese. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von mesenchymalen Stromazellen (MSZ) aus dem Knochenmark von AML Patienten im Vergleich zu MSZ aus dem Knochenmark gesunder Spender auf gesunde humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) aus Nabelschnurrestblut untersucht werden.

Zunächst wurden MSZ durchflusszytometrisch und mittels Differenzierungsansatz phänotypisch sowie funktionell charakterisiert. Alle generierten MSZ exprimierten charakteristische mesenchymale Oberflächenantigene und konnten in Adipozyten und Osteozyten differenziert werden. In der statistischen Analyse wiesen AML MSZ eine signifikant höhere osteogene Differenzierungsfähigkeit auf als MSZ gesunder Spender.

Die expandierten MSZ wurden für 14 Tage mit HSVZ aus Nabelschnurrestblut kokultiviert. Die kultivierten HSVZ wurden im Anschluss durchflusszytometrisch und im CFC Ansatz *(colony forming cell assay)* quantitativ und qualitativ untersucht. Nach Kokultur mit AML MSZ fanden sich signifikant mehr $CD45^+$, $CD34^+CD133^+$ und $CD34^+CD133^-$ HSVZ als nach Kultur mit MSZ gesunder Spender. Im CFC Ansatz zeigte sich nach allen Kokulturansätzen ein Verlust $CD34^+CD133^+$ HSVZ mit erythrozytärem Potenzial und somit multipotenter Progenitoren (MPP). Ein signifikanter Unterschied fand sich hier in der Anzahl der CFU-M Kolonien *(colony-forming unit-macrophage*), welche nach Kokultur mit AML MSZ signifikant häufiger zu beobachten waren.

Abschließend wurden alle erhobenen Daten miteinander korreliert und in der Kohorte der AML MSZ fanden sich negative Korrelationen zwischen der Expression von CD73 und dem Anteil $CD34^+CD133^+$ und $CD34^+CD38^-$ Subpopulationen in den primären durchflusszytometrischen Analysen der AML Knochenmarkproben. Ähnliche Ergebnisse ließen sich für CD146 ermitteln, wobei hier zusätzlich eine negative Korrelation mit der CFC Frequenz der HSVZ nach Kokultur bestand.

Zusammenfassend haben AML MSZ einen proliferationsfördernden Effekt auf gesunde HSVZ wobei im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante Funktionseinschränkung kokultivierter HSVZ beobachtet werden konnte. In der Zukunft sollte dies anhand weiterer Studien mit größeren Patientenzahlen näher untersucht werden.

6. Summary

In patients with acute myeloid leukemia (AML) changes in the bone marrow (BM) stem cell niche lead to increased proliferation of leukemic blasts and suppression of healthy hematopoiesis. The aim of this study was to investigate and compare the influence of mesenchymal stromal cells (MSCs) from the BM of AML patients with healthy donors on the expansion of healthy hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs).

First, MSCs were phenotypically and functionally analyzed by flow cytometry and differentiation assays, respectively. All MSCs expressed characteristic mesenchymal surface antigens. Comparison of AML MSC and MSC from healthy donors revealed no significant phenotypic differences. In functional read-outs, all MSCs realized adipogenic as well as osteogenic potentials. However, AML MSCs showed a significantly greater osteogenic differentiation potential compared to MSCs from healthy donors.

Expanded MSCs were cultivated together with umbilical cord blood (UCB) derived HSPCs for 14 days. Progeny were quantitatively and qualitatively analyzed by flow cytometry and CFC assay, respectively. In co-culture with AML MSCs significantly more $CD45^+$, $CD34^+CD133^+$ and $CD34^+CD133^-$ HSPCs were found compared to cultures with MSCs from healthy donors. In CFC assay, all conditions showed a loss of $CD34^+CD133^+$ HSPCs with erythroid potential and thus multipotent HSCs/MPPs. Of note, significantly more CFU-M colonies were found in coculture with AML MSCs.

Finally, data was correlated. CD73 and CD146 expression on AML MSCs negatively correlated with the presence of $CD34^+CD133^+$ and $CD34^+CD38^-$ subpopulations in the BM of AML patients. In addition, CD146 expression showed a negative correlation with the CFC frequency of expanded HSPC after coculture with AML MSCs.

In summary, we here show that AML MSCs promote the proliferation of HSPC in coculture assays. However, the functional analysis using the CFC assay showed no impaired function of cultured HSPCs. Further investigations with increased patient numbers should be made in the future.

7. Literaturverzeichnis

[1] Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson and S. E. Jacobsen (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." Cell 121: 295-306.

[2] Alexander, C. M., J. Puchalski, K. S. Klos, N. Badders, L. Ailles, C. F. Kim, P. Dirks and M. J. Smalley (2009). "Separating stem cells by flow cytometry: reducing variability for solid tissues." Cell Stem Cell 5: 579-583.

[3] Blau, O., C. D. Baldus, W. K. Hofmann, G. Thiel, F. Nolte, T. Burmeister, S. Turkmen, O. Benlasfer, E. Schumann, A. Sindram, M. Molkentin, S. Mundlos, U. Keilholz, E. Thiel and I. W. Blau (2011). "Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts." Blood 118: 5583-5592.

[4] Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med 3: 730-737.

[5] Boyer, L., A. Robert, C. Proulx and N. Pineault (2008). "Increased production of megakaryocytes near purity from cord blood CD34+ cells using a short two-phase culture system." J Immunol Methods 332: 82-91.

[6] Bradley, T. R. and D. Metcalf (1966). "The growth of mouse bone marrow cells in vitro." Aust J Exp Biol Med Sci 44: 287-299.

[7] Bramono, D. S., D. A. Rider, S. Murali, V. Nurcombe and S. M. Cool (2011). "The effect of human bone marrow stroma-derived heparan sulfate on the ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells." Pharm Res 28: 1385-1394.

[8] Buhring, H. J., M. Seiffert, A. Marxer, B. Weiss, C. Faul, L. Kanz and W. Brugger (1999). "AC133 antigen expression is not restricted to acute myeloid leukemia blasts but is also found on acute lymphoid leukemia blasts and on a subset of CD34+ B-cell precursors." Blood 94: 832-833.

[9] Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg and D. T. Scadden (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature 425: 841-846.

[10] Chandran, P., Y. Le, Y. Li, M. Sabloff, J. Mehic, M. Rosu-Myles and D. S. Allan (2015). "Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors." Leuk Res 39: 486-493.

[11] Chute, J. P., G. G. Muramoto, J. Fung and C. Oxford (2005). "Soluble factors elaborated by human brain endothelial cells induce the concomitant expansion of purified human BM CD34+CD38- cells and SCID-repopulating cells." Blood 105: 576-583.

[12] Civin, C. I., L. C. Strauss, C. Brovall, M. J. Fackler, J. F. Schwartz and J. H. Shaper (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol 133: 157-165.

[13] Colmone, A., M. Amorim, A. L. Pontier, S. Wang, E. Jablonski and D. A. Sipkins (2008). "Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells." Science 322: 1861-1865.

[14] Ding, L., T. L. Saunders, G. Enikolopov and S. J. Morrison (2013). "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells." Nature 481: 457-462.

[15] Dmytrus, J., S. Matthes-Martin, H. Pichler, N. Worel, R. Geyeregger, N. Frank, C. Frech and G. Fritsch (2016). "Multi-color immune-phenotyping of CD34 subsets reveals unexpected differences between various stem cell sources." Bone Marrow Transplant 51: 1093-1100.

[16] Dorn, I., P. Lazar-Karsten, S. Boie, J. Ribbat, D. Hartwig, B. Driller, H. Kirchner and P. Schlenke (2008). "In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems." Transfusion 48: 1122-1132.

[17] Doulatov, S., F. Notta, K. Eppert, L. T. Nguyen, P. S. Ohashi and J. E. Dick (2010). "Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development." Nat Immunol 11: 585-593.

[18] Duhrsen, U. and D. K. Hossfeld (1996). "Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases." Ann Hematol 73: 53-70.

[19] Fan, X., F. P. Gay, S. Y. Ong, J. M. Ang, P. P. Chu, S. Bari, T. K. Lim and W. Y. Hwang (2013). "Mesenchymal stromal cell supported umbilical cord blood ex vivo expansion enhances regulatory T cells and reduces graft versus host disease." Cytotherapy 15: 610-619.

[20] Fernandez-Sanchez, V., R. Pelayo, P. Flores-Guzman, E. Flores-Figueroa, J. Villanueva-Toledo, E. Garrido, E. Ruiz-Sanchez, E. Alvarez-Sanchez and H. Mayani (2011). "In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood." Blood Cells Mol Dis 47: 205-213.

[21] Feugier, P., N. Li, D. Y. Jo, J. H. Shieh, K. L. MacKenzie, J. F. Lesesve, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, R. G. Crystal, S. Rafii, J. F. Stoltz and M. A. Moore (2005). "Osteopetrotic mouse stroma with thrombopoietin, c-kit ligand, and flk-2 ligand supports long-term mobilized CD34+ hematopoiesis in vitro." Stem Cells Dev 14: 505-516.

[22] Fulwyler, M. J. (1965). "Electronic separation of biological cells by volume." Science 150: 910-911.

[23] Galy, A., M. Travis, D. Cen and B. Chen (1995). "Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset." Immunity 3: 459-473.

[24] Ge, J., R. Hou, Q. Liu, R. Zhu and K. Liu (2011). "Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia." Int J Hematol 93: 750-759.

[25] Geyh, S., S. Oz, R. P. Cadeddu, J. Frobel, B. Bruckner, A. Kundgen, R. Fenk, I. Bruns, C. Zilkens, D. Hermsen, N. Gattermann, G. Kobbe, U. Germing, F. Lyko, R. Haas and T. Schroeder (2013). "Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells." Leukemia 27: 1841-1851.

[26] Geyh, S., M. Rodriguez-Paredes, P. Jager, C. Khandanpour, R. P. Cadeddu, J. Gutekunst, C. M. Wilk, R. Fenk, C. Zilkens, D. Hermsen, U. Germing, G. Kobbe, F. Lyko, R. Haas and T. Schroeder (2016). "Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia." Leukemia 30: 683-691.

[27] Gill, S., S. K. Tasian, M. Ruella, O. Shestova, Y. Li, D. L. Porter, M. Carroll, G. Danet-Desnoyers, J. Scholler, S. A. Grupp, C. H. June and M. Kalos (2014). "Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells." Blood 123: 2343-2354.

[28] Goardon, N., E. Marchi, A. Atzberger, L. Quek, A. Schuh, S. Soneji, P. Woll, A. Mead, K. A. Alford, R. Rout, S. Chaudhury, A. Gilkes, S. Knapper, K. Beldjord, S. Begum, S. Rose, N. Geddes, M. Griffiths, G. Standen, A. Sternberg, J. Cavenagh, H. Hunter, D. Bowen, S. Killick, L. Robinson, A. Price, E. Macintyre, P. Virgo, A. Burnett, C. Craddock, T. Enver, S. E. Jacobsen, C. Porcher and P. Vyas (2011). "Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia." Cancer Cell 19: 138-152.

[29] Görgens, A., A. K. Ludwig, M. Mollmann, A. Krawczyk, J. Durig, H. Hanenberg, P. A. Horn and B. Giebel (2014). "Multipotent hematopoietic progenitors divide asymmetrically to create progenitors of the lymphomyeloid and erythromyeloid lineages." Stem Cell Reports 3: 1058-1072.

[30] Görgens, A., S. Radtke, P. A. Horn and B. Giebel (2013a). "New relationships of human hematopoietic lineages facilitate detection of multipotent hematopoietic stem and progenitor cells." Cell Cycle 12: 3478-3482.

[31] Görgens, A., S. Radtke, M. Mollmann, M. Cross, J. Durig, P. A. Horn and B. Giebel (2013b). "Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages." Cell Rep 3: 1539-1552.

[32] Greenbaum, A., Y. M. Hsu, R. B. Day, L. G. Schuettpelz, M. J. Christopher, J. N. Borgerding, T. Nagasawa and D. C. Link (2013). "CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance." Nature 495: 227-230.

[33] Griffin, J. D., A. Rambaldi, E. Vellenga, D. C. Young, D. Ostapovicz and S. A. Cannistra (1987). "Secretion of interleukin-1 by acute myeloblastic leukemia cells in vitro induces endothelial cells to secrete colony stimulating factors." Blood 70: 1218-1221.

[34] Hammoud, M., M. Vlaski, P. Duchez, J. Chevaleyre, X. Lafarge, J. M. Boiron, V. Praloran, P. Brunet De La Grange and Z. Ivanovic (2012). "Combination of low O(2) concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells." J Cell Physiol 227: 2750-2758.

[35] Hemeda, H., M. Jakob, A. K. Ludwig, B. Giebel, S. Lang and S. Brandau (2010). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev 19: 693-706.

[36] Herold, G. (2014). Innere Medizin. Köln, Dr. med. Gerd Herold.

[37] Hope, K. J., L. Jin and J. E. Dick (2004). "Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity." Nat Immunol 5: 738-743.

[38] Horn, P. A., H. Tesch, P. Staib, D. Kube, V. Diehl and D. Voliotis (1999). "Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells." Blood 93: 1435-1437.

[39] Huang, J. C., S. K. Basu, X. Zhao, S. Chien, M. Fang, V. G. Oehler, F. R. Appelbaum and P. S. Becker (2015). "Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration." Blood Cancer J 5: e302.

[40] Hulett, H. R., W. A. Bonner, J. Barrett and L. A. Herzenberg (1969). "Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence." Science 166: 747-749.

[41] Ibrahim, S. F. and G. van den Engh (2007). "Flow cytometry and cell sorting." Adv Biochem Eng Biotechnol 106: 19-39.

[42] Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, A. Hijikata, H. Kitamura, S. Tanaka, R. Nakamura, T. Tanaka, H. Tomiyama, N. Saito, M. Fukata, T. Miyamoto, B. Lyons, K. Ohshima, N. Uchida, S. Taniguchi, O. Ohara, K. Akashi, M. Harada and L. D. Shultz (2007). "Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region." Nat Biotechnol 25: 1315-1321.

[43] Issaad, C., L. Croisille, A. Katz, W. Vainchenker and L. Coulombel (1993). "A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34++/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays." Blood 81: 2916-2924.

[44] Itoh, K., H. Tezuka, H. Sakoda, M. Konno, K. Nagata, T. Uchiyama, H. Uchino and K. J. Mori (1989). "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow." Exp Hematol 17: 145-153.

[45] IUIS-WHO (1984). "Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee." Bull World Health Organ 62: 809-815.

[46] Jacobson, L. O., E. L. Simmons, E. K. Marks and J. H. Eldredge (1951). "Recovery from radiation injury." Science 113: 510-511.

[47] Jin, L., E. M. Lee, H. S. Ramshaw, S. J. Busfield, A. G. Peoppl, L. Wilkinson, M. A. Guthridge, D. Thomas, E. F. Barry, A. Boyd, D. P. Gearing, G. Vairo, A. F. Lopez, J. E. Dick and R. B. Lock (2009). "Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells." Cell Stem Cell 5: 31-42.

[48] Kadereit, S., L. S. Deeds, S. E. Haynesworth, O. N. Koc, M. M. Kozik, E. Szekely, K. Daum-Woods, G. W. Goetchius, P. Fu, L. A. Welniak, W. J. Murphy and M. J. Laughlin (2002). "Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer." Stem Cells 20: 573-582.

[49] Katsura, Y. and H. Kawamoto (2001). "Stepwise lineage restriction of progenitors in lympho-myelopoiesis." Int Rev Immunol 20: 1-20.

[50] Katz, F. E., R. Tindle, D. R. Sutherland and M. F. Greaves (1985). "Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells." Leuk Res 9: 191-198.

[51] Kawamoto, H., K. Ohmura and Y. Katsura (1998). "Presence of progenitors restricted to T, B, or myeloid lineage, but absence of multipotent stem cells, in the murine fetal thymus." J Immunol 161: 3799-3802.

[52] Khoury, M., A. Drake, Q. Chen, D. Dong, I. Leskov, M. F. Fragoso, Y. Li, B. P. Iliopoulou, W. Hwang, H. F. Lodish and J. Chen (2011). "Mesenchymal stem cells secreting angiopoietin-like-5 support efficient expansion of human hematopoietic stem cells without compromising their repopulating potential." Stem Cells Dev 20: 1371-1381.

[53] Koerner, S. P., M. C. Andre, J. S. Leibold, P. C. Kousis, A. Kubler, M. Pal, S. P. Haen, H. J. Buhring, L. Grosse-Hovest, G. Jung and H. R. Salih (2017). "An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia." Leukemia 31: 459-469.

[54] Koller, M. R., M. A. Palsson, I. Manchel and B. O. Palsson (1995). "Long-term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects." Blood 86: 1784-1793.

[55] Konopleva, M. Y. and C. T. Jordan (2011). "Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting." J Clin Oncol 29: 591-599.

[56] Krause, D. S., M. J. Fackler, C. I. Civin and W. S. May (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." Blood 87: 1-13.

[57] Kutt, H. and T. T. Tsaltas (1959). "Staining properties of oil red O and a method of partial purification of the commercial product." Clin Chem 5: 149-160.

[58] La Motte-Mohs, R. N., E. Herer and J. C. Zuniga-Pflucker (2005). "Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro." Blood 105: 1431-1439.

[59] Lansdorp, P. M., H. J. Sutherland and C. J. Eaves (1990). "Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow." J Exp Med 172: 363-366.

[60] Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature 367: 645-648.

[61] Li, N., P. Feugier, B. Serrurrier, V. Latger-Cannard, J. F. Lesesve, J. F. Stoltz and A. Eljaafari (2007). "Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity." Exp Hematol 35: 507-515.

[62] Lord, B. I., N. G. Testa and J. H. Hendry (1975). "The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur." Blood 46: 65-72.

[63] Madkaikar, M., K. Ghosh, M. Gupta, S. Swaminathan and D. Mohanty (2007). "Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells." Acta Haematol 118: 153-159.

[64] Magin, A. S., N. R. Korfer, H. Partenheimer, C. Lange, A. Zander and T. Noll (2009). "Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood--a comparative study." Stem Cells Dev 18: 173-186.

[65] Majeti, R., C. Y. Park and I. L. Weissman (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." Cell Stem Cell 1: 635-645.

[66] Manz, M. G., T. Miyamoto, K. Akashi and I. L. Weissman (2002). "Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11872-11877.

[67] Mauro, F., L. Teodori, J. Schumann and W. Gohde (1986). "Flow cytometry as a tool for the prognostic assessment of human neoplasia." Int J Radiat Oncol Biol Phys 12: 625-636.

[68] McCulloch, E. A. (1983). "Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982)." Blood 62: 1-13.

[69] McNiece, I., J. Harrington, J. Turney, J. Kellner and E. J. Shpall (2004). "Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells." Cytotherapy 6: 311-317.

[70] Medyouf, H., M. Mossner, J. C. Jann, F. Nolte, S. Raffel, C. Herrmann, A. Lier, C. Eisen, V. Nowak, B. Zens, K. Mudder, C. Klein, J. Oblander, S. Fey, J. Vogler, A. Fabarius, E. Riedl, H. Roehl, A. Kohlmann, M. Staller, C. Haferlach, N. Muller, T. John, U. Platzbecker, G. Metzgeroth, W. K. Hofmann, A. Trumpp and D. Nowak (2014). "Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit." Cell Stem Cell 14: 824-837.

[71] Michiels, J. J., M. Tevet, A. Trifa, E. Niculescu-Mizil, A. Lupu, A. M. Vladareanu, H. Bumbea, A. Ilea, C. Dobrea, D. Georgescu, O. Patrinoiu, M. Popescu, M. Murat, C. Dragan, F. Mihai, S. Zurac, S. Angelescu, A. Iova, A. Popa, R. Gogulescu and V. Popov (2016). "2016 WHO Clinical Molecular and Pathological Criteria for Classification and Staging of Myeloproliferative Neoplasms (MPN) Caused by MPN Driver Mutations in the JAK2, MPL and CALR Genes in the Context of New 2016 WHO Classification: Prognostic and Therapeutic Implications." Maedica (Buchar) 11: 5-25.

[72] Miller, J. S., C. Verfaillie and P. McGlave (1992). "The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture." Blood 80: 2182-2187.

[73] Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." Cytometry 11: 231-238.

[74] Miraglia, S., W. Godfrey, A. H. Yin, K. Atkins, R. Warnke, J. T. Holden, R. A. Bray, E. K. Waller and D. W. Buck (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." Blood 90: 5013-5021.

[75] Moore, K. A., H. Ema and I. R. Lemischka (1997). "In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells." Blood 89: 4337-4347.

[76] Moore, M. A., N. Williams and D. Metcalf (1973). "In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells." J Natl Cancer Inst 50: 603-623.

[77] Muñoz, L., J. F. Nomdedeu, O. Lopez, M. J. Carnicer, M. Bellido, A. Aventin, S. Brunet and J. Sierra (2001). "Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies." Haematologica 86: 1261-1269.

[78] Nolta, J. A., F. T. Thiemann, J. Arakawa-Hoyt, M. A. Dao, L. W. Barsky, K. A. Moore, I. R. Lemischka and G. M. Crooks (2002). "The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors." Leukemia 16: 352-361.

[79] Notta, F., S. Doulatov, E. Laurenti, A. Poeppl, I. Jurisica and J. E. Dick (2011). "Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment." Science 333: 218-221.

[80] Notta, F., S. Zandi, N. Takayama, S. Dobson, O. I. Gan, G. Wilson, K. B. Kaufmann, J. McLeod, E. Laurenti, C. F. Dunant, J. D. McPherson, L. D. Stein, Y. Dror

and J. E. Dick (2015). "Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny." Science 351: aab2116.

[81] Pierzchalski, A., A. Mittag and A. Tarnok (2011). "Introduction A: recent advances in cytometry instrumentation, probes, and methods--review." Methods Cell Biol 102: 1-21.

[82] Pike, B. L. and W. A. Robinson (1970). "Human bone marrow colony growth in agar-gel." J Cell Physiol 76: 77-84.

[83] Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science 284: 143-147.

[84] Quach, J. M., M. Askmyr, T. Jovic, E. K. Baker, N. C. Walsh, S. J. Harrison, P. Neeson, D. Ritchie, P. R. Ebeling and L. E. Purton (2015). "Myelosuppressive therapies significantly increase pro-inflammatory cytokines and directly cause bone loss." J Bone Miner Res 30: 886-897.

[85] Raaijmakers, M. H., S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J. A. Schoonmaker, B. L. Ebert, F. Al-Shahrour, R. P. Hasserjian, E. O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merkenschlager, C. Lin, J. M. Rommens and D. T. Scadden (2010). "Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia." Nature 464: 852-857.

[86] Radtke, S., A. Gorgens, L. Kordelas, M. Schmidt, K. R. Kimmig, A. Koninger, P. A. Horn and B. Giebel (2015). "CD133 allows elaborated discrimination and quantification of haematopoietic progenitor subsets in human haematopoietic stem cell transplants." Br J Haematol 169: 868-878.

[87] Radtke, S., A. Gorgens, B. Liu, P. A. Horn and B. Giebel (2016). "Human mesenchymal and murine stromal cells support human lympho-myeloid progenitor expansion but not maintenance of multipotent haematopoietic stem and progenitor cells." Cell Cycle 15: 540-545.

[88] Radtke, S., K. G. Haworth and H. P. Kiem (2016). "The frequency of multipotent CD133(+)CD45RA(-)CD34(+) hematopoietic stem cells is not increased in fetal liver compared with adult stem cell sources." Exp Hematol 44: 502-507.

[89] Sanchez-Dominguez, R., S. Pereira-Mendez, A. Gomez, M. Torrabadella, C. Azqueta, S. Querol, J. Barquinero and R. Gimeno (2012). "Notch signals contribute to preserve the multipotentiality of human CD34(+)CD38(-)CD45RA(-)CD90(+) hematopoietic progenitors by maintaining T cell lineage differentiation potential." Exp Hematol 40: 983-993 e984.

[90] Sarry, J. E., K. Murphy, R. Perry, P. V. Sanchez, A. Secreto, C. Keefer, C. R. Swider, A. C. Strzelecki, C. Cavelier, C. Recher, V. Mansat-De Mas, E. Delabesse, G. Danet-Desnoyers and M. Carroll (2011). "Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice." J Clin Invest 121: 384-395.

[91] Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells 4: 7-25.

[92] Six, E. M., D. Bonhomme, M. Monteiro, K. Beldjord, M. Jurkowska, C. Cordier-Garcia, A. Garrigue, L. Dal Cortivo, B. Rocha, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo and I. Andre-Schmutz (2007). "A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus." J Exp Med 204: 3085-3093.

[93] Sperling, C., H. Seibt-Jung, W. Gassmann, B. Komischke, C. Sauerland, W. Hiddemann, H. Loffler, T. Buchner, E. Thiel and W. D. Ludwig (1993). "Immunophenotype of acute myeloid leukemia: correlation with morphological characteristics and therapy response." Recent Results Cancer Res 131: 381-392.

[94] Sutherland, H. J., C. J. Eaves, A. C. Eaves, W. Dragowska and P. M. Lansdorp (1989). "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro." Blood 74: 1563-1570.

[95] Sutherland, H. J., C. J. Eaves, P. M. Lansdorp, J. D. Thacker and D. E. Hogge (1991). "Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells." Blood 78: 666-672.

[96] Suzuki, J., J. Fujita, S. Taniguchi, K. Sugimoto and K. J. Mori (1992). "Characterization of murine hemopoietic-supportive (MS-1 and MS-5) and non-supportive (MS-K) cell lines." Leukemia 6: 452-458.

[97] Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1998). "The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment." Stem Cells 16: 7-15.

[98] Terstappen, L. W., S. Huang, M. Safford, P. M. Lansdorp and M. R. Loken (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood 77: 1218-1227.

[99] Testa, U., R. Riccioni, S. Militi, E. Coccia, E. Stellacci, P. Samoggia, R. Latagliata, G. Mariani, A. Rossini, A. Battistini, F. Lo-Coco and C. Peschle (2002). "Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis." Blood 100: 2980-2988.

[100] Tiwari, A., M. L. Tursky, D. Mushahary, S. Wasnik, F. M. Collier, K. Suma, M. A. Kirkland and G. Pande (2011). "Ex vivo expansion of haematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood on acellular scaffolds prepared from MS-5 stromal cell line." J Tissue Eng Regen Med 7: 871-883.

[101] Traganos, F. (1984). "Flow cytometry: principles and applications. I." Cancer Invest 2: 149-163.

[102] Visnjic, D., Z. Kalajzic, D. W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo and H. L. Aguila (2004). "Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency." Blood 103: 3258-3264.

[103] Weisel, K. C., Y. Gao, J. H. Shieh and M. A. Moore (2006). "Stromal cell lines from the aorta-gonado-mesonephros region are potent supporters of murine and human hematopoiesis." Exp Hematol 34: 1505-1516.

[104] Worton, R. G., E. A. McCulloch and J. E. Till (1969). "Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture." J Cell Physiol 74: 171-182.

[105] Wuchter, C., R. Ratei, G. Spahn, C. Schoch, J. Harbott, S. Schnittger, T. Haferlach, U. Creutzig, C. Sperling, L. Karawajew and W. D. Ludwig (2001). "Impact of CD133 (AC133) and CD90 expression analysis for acute leukemia immunophenotyping." Haematologica 86: 154-161.

[106] Yamaguchi, M., F. Hirayama, M. Kanai, N. Sato, K. Fukazawa, K. Yamashita, K. Sawada, T. Koike, M. Kuwabara, H. Ikeda and K. Ikebuchi (2001). "Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells." Exp Hematol 29: 174-182.

[107] Yamamoto, R., Y. Morita, J. Ooehara, S. Hamanaka, M. Onodera, K. L. Rudolph, H. Ema and H. Nakauchi (2013). "Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells." Cell 154: 1112-1126.

[108] Yildirim, S., A. M. Boehmler, L. Kanz and R. Mohle (2005). "Expansion of cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture." Bone Marrow Transplant 36: 71-79.

[109] Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood 90: 5002-5012.

[110] Zaker, F., N. Nasiri, A. Oodi and N. Amirizadeh (2013). "Evaluation of umbilical cord blood CD34 (+) hematopoietic stem cell expansion in co-culture with bone marrow mesenchymal stem cells in the presence of TEPA." Hematology 18: 39-45.

[111] Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature 425: 836-841.

[112] Zhang, Y., C. Chai, X. S. Jiang, S. H. Teoh and K. W. Leong (2006). "Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells." Tissue Eng 12: 2161-2170.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Modellvorstellungen der humanen Hämatopoese 7
Abbildung 2 Das revidierte Modell der Hämatopoese 9
Abbildung 3 Unterschiede in der fetalen und adulten Hämatopoese 10
Abbildung 4 Entstehung der LSZ aus der Population der HSVZ 14
Abbildung 5 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von gesunden Spendern 31
Abbildung 6 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von AML Patienten 33
Abbildung 7 Mikroskopische Darstellung einzelner MSZ Linien 35
Abbildung 8 Durchflusszytometrische Analyse der MSZ angezogen aus Knochenmarkproben von gesunden Personen 37
Abbildung 9 Durchflusszytometrische Analyse der MSZ angezogen aus Knochenmarkproben von AML Patienten 39
Abbildung 10 Funktionelle Analyse der verwendeten MSZ 40
Abbildung 11 Exemplarische Darstellung eines Kokulturansatzes an d14 der Kultur .. 41
Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse der HSVZ nach Kokultur mit MSZ .. 42
Abbildung 13 HSVZ an Tag 14 der Kokultur mit MSZ 48
Abbildung 14 Expansion von CFC in Kokultur mit MSZ 51
Abbildung 15 CFC Potentiale in der $CD34^+$ Population 52
Abbildung 16 Korrelation der Expression von Oberflächenantigenen auf AML MSZ mit der durchflusszytometrischen Analyse der primären Knochenmarkproben und der Expansion phänotypischer und funktioneller HSVZ 56
Abbildung 17 Vergleich von AML MSZ und gesunden MSZ 57

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Verbrauchsmaterialien 17
Tabelle 2 Verwendete Geräte 17
Tabelle 3 Verwendete Zellkulturmedien 17
Tabelle 4 Verwendete Seren 18
Tabelle 5 Verwendete Zytokine 18
Tabelle 6 Verwendete Medienzusätze 18
Tabelle 7 Verwendete Reagenzien und Chemikalien 18
Tabelle 8 Medienzusammensetzung für Primärzellen 19
Tabelle 9 Medienzusammensetzung für die Kokultur von hämatopoetischen $CD34^+$ Zellen und MSZ 19
Tabelle 10 Medienzusammensetzung für die *in vitro* Differenzierung von MSZ 19
Tabelle 11 Verwendete Antikörper 20
Tabelle 12 Patientendaten der verwendeten Rückstellproben 30
Tabelle 13 Patientendaten der Knochenmarkproben von AML Patienten 30
Tabelle 14 FAB Klassifikation 30
Tabelle 15 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von gesunden Spendern 31
Tabelle 16 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkproben von AML Patienten 32
Tabelle 17 MFI Werte der analysierten MSZ 36
Tabelle 18 Frequenz von $CD34^+CD133^+$ und $CD34^+CD133^{low}$ Zellen in Kokultur mit MSZ 43
Tabelle 19 Expansion der $CD34^+$ Fraktion in Kokultur mit MSZ 44
Tabelle 20 Absolute Anzahl $CD45^+$, $CD34^+CD133^+$, $CD34^+CD133^{low}$ HSVZ an d14 der Kokultur 46
Tabelle 21 Absolute Zellzahlen abhängig vom Nabelschnurrestblut 46
Tabelle 22 Frequenz und Expansion von CFC in der $CD34^+$ Fraktion nach Kokultur mit MSZ 50
Tabelle 23 Anzahl der CFC Ansätze mit erythrozytärem und/oder erythro-myeloischen Kolonien 51

10.Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BFU-E	*Burst Forming Units-Erythroid*
	(Zelle, welche “explosionsartig” erythroide Kolonien bildet)
CFU	*Colony Forming Unit*
	(Koloniebildende Einheit)
CFU-G	*Colony Forming Unit-Granulocyte*
	(Granulozytäre koloniebildende Zelle)
CFU-GEMM	*Colony Forming Unit-Granulocyte Erthroid Macrophage Megakaryocyte*
	(Granulozytäre, erythroide, makrozytäre und megakaryozytäre koloniebildende Zelle)
CFU-M	*Colony Forming Unit-Macrophage*
	(Makrozytäre koloniebildende Zelle)
CLP	*Common Lymphoid Progenitor*
	(Vorläuferzelle der lymphatischen Linie)
CMP	*Common Myeloid Progenitor*
	(Vorläuferzelle der myeloischen Linie)
DMEM	Dulbeco´s modifiziertes essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*
	(Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	*epidermal growth factor*
	(Epidermaler Wachstumsfaktor)
eGFP	*enhanced Green Fluorescent Protein*
	(Verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
FBS	*fetal bovine serum*
	(Fötales Rinderserum)
FGF	*fibroblast growth factor*
	(Fibroblasten Wachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	*forward scatter*
HA	Hyaluronsäure
HPZ	Hämatopoetische Progenitorzelle
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
HVZ	Hämatopoetische Vorläuferzelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

LPS	Lipopolysaccharid
LTC-IC	*Long Term Culture-Initiating Cell*
	(Nachweis früher myeloischer Progenitoren nach Langzeitkultivierung)
M	Molar
ML-IC	*Myeloid Lymphoid-Initiating Cell*
	(Myeloide und lymphatische Progenitorhervorbringende Zelle)
MNZ	Mononukleäre Zelle(n)
NK	Natürliche Killerzelle(n)
NK-IC	*Natural Killer cells-Initiating Cell*
	(Zelle, welche funktionelle NK hervorbringt)
NOD-SCID	*Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency*
	(Nicht fettleibiger diabetischer-schwerer kombinierter Immundefekt)
P	Passage
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	*platelet derived growth factor*
	(Blutplättchen Wachstumsfaktor)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PL	Plättchenlysat
rpm	*rotations per minute*
	(Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SOP	*Sensory Organ Precursor*
	(sensorische Organvorläuferzelle)
SSC	*side scatter*
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
tRFP	*turbo Red Fluorescent Protein*
TSZ	Tumorstammzelle
U	Unit
UEA-I	Ulex Europaeus Agglutinin I
ÜN	über Nacht
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
	(Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vWF	von Willebrand Faktor

11.Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben. Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Peter A. Horn für die Möglichkeit mein Projekt im Institut für Transfusionsmedizin bearbeiten zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dietrich W. Beelen aus der KMT und Herrn Prof. Ulrich Duehrsen aus der Klinik für Hämatologie für die Bereitstellung der Knochenmark Rückstellproben sowie der AML Knochenmark Proben bedanken. Ein großer Dank geht außerdem an Herrn Prof. Rainer Kimmig aus der Frauenklinik für die Versorgung mit Nabelschnurrestbluten.

Vielen Dank an Herrn Prof. Bernd Giebel, der es mir ermöglicht hat, als medizinische Doktorandin in einer biologischen Arbeitsgruppe mit wissenschaftlich erfahrenen Kollegen zu lernen und zu arbeiten. Vielen Dank für die Zeit und Unterstützung und die konstruktive Kritik, die mir bei der Anfertigung meiner Arbeit eine große Hilfe war.

Ein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an Herrn Dr. rer. nat. Stefan Radtke. Du hast mich von meinem ersten Tag im Labor bis zur Fertigstellung meiner Arbeit geduldig und professionell unterstützt und begleitet. Deine Erklärungen und dein Ansporn waren mir immer eine große Hilfe und du hast einen großen Anteil an der Fertigstellung dieses interessanten und anspruchsvollen Projektes.

Ich möchte mich außerdem ganz herzlich bei meinen Kollegen der AG Giebel und allen anderen Mitarbeitern aus dem Robert-Koch-Haus bedanken. Ich habe mich immer willkommen gefühlt und hatte eine großartige, interessante und lehrreiche Zeit mit euch.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an meine Familie und meine Freunde, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben. Danke für euer Interesse an meiner Arbeit und ein offenes Ohr in jeder Situation.

12.Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.