Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: PD Dr. med. Siegfried Görg

Einfluss und Bedeutung der RNA-abhängigen Adenosin-Deaminase ADAR1 während der humanen Erythropoese

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-
vorgelegt von
Stefanie Boie
aus Oldenburg (OH)
Lübeck, 2008

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Peter Schlenke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Seyfarth
Tag der mündlichen Prüfung:	03.12.2008
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	03.12.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1 **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** 6

2 **EINLEITUNG** 9

2.1 Das hämatopoetische System 9

2.2 Erythropoese 12

2.2.1 Charakteristische Stadien der Erythropoese 12

2.2.2 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren 13

2.3 RNA-Editierung 15

2.4 RNA-abhängige Adenosin-Deaminasen 16

2.5 Bedeutung von ADAR1 in der humanen Erythropoese 19

2.6 RNA-Interferenz 20

3 **ZIELSETZUNG** 23

4 **MATERIAL** 24

4.1 Chemikalien und Reagenzien 24

4.2 Zellkulturmedien und -zusätze 25

4.3 Geräte 26

4.4 Laborbedarf 27

4.5 Größenstandards 29

4.6 Antikörper 29

4.7 Lösungen und Kits 29

4.8 Reagenzien für die Transfektion 30

4.9 Humane adulte Stammzellen 30

4.10 Zelllinien 31

5 **METHODEN** 32

5.1 Zellkulturtechniken 32

5.1.1 Kultivierung von Zelllinien 32

5.1.2 Aussaat von Zellen 33

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 33

5.2 Isolierung von humanen CD34-positiven Zellen 33

5.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation 34
5.2.2 Bestimmung der Gesamt- und CD 34-positiven Zellzahl 34
5.2.3 Magnetische Zellaufreinigung CD 34-positiver Zellen 35
5.3 Kultur von humanen hämatopoetischen Stammzellen 35
5.3.1 2-Phasenmodell zur Erythropoese 36
5.3.2 3-Phasenmodell zur Erythropoese 36
5.4 Kurzzeitkultur 37
5.5 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelloberflächenmolekülen 37
5.5.1 Zellzahlbestimmung am FACS 38
5.5.2 Immunphänotypisierung der erythropoetischen Zellentwicklung 39
5.6 Morphologische Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung 39
5.6.1 Färbungen 39
5.6.2 Messung der Vitalität 40
5.7 „Small interfering RNA“ (siRNA) 40
5.7.1 siRNA zur spezifischen Hemmung von ADAR1-S und –L 40
5.8 Transfektion 40
5.8.1 Liposomen vermittelte Transfektion (DOTAP, Lipofectamin) 41
5.8.2 Transfektion via Transferrinrezeptor (DuoFect™) 41
5.8.3 Transfektion mittels Nukleofection (Amaxa) 42
5.9 Nukleinsäure-Standardtechniken 42
5.9.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren 42
5.9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 43
5.10 real-time RT-PCR 44
5.10.1 real-time RT-PCR zur relativen Quantifizierung von ADAR1-S und –L 44
5.11 cDNA Umschreibung und spezifische PCR 46
5.12 Proteinanalysen 48
5.12.1 Herstellung von Kernproteinextrakten 48
5.12.2 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration 48
5.12.3 SDS-Gelelektrophorese 49
5.13 Western Blotting und Detektion 50
5.13.1 Western Blotting zum Nachweis von ADAR1-Enzymen 50

5.13.2 Western Blotting zum Nachweis von Aktin 52
5.14 Genexpressionsanalysen 52
5.15 Arbeiten mit Radioaktivität 54
5.16 Statistik 55

6 **ERGEBNISSE** 56

6.1 Humane in-vitro Erythropoese 56
6.1.1 Proliferation 56
6.1.2 Koexpression von spezifischen Zelloberflächenmolekülen 57
6.1.3 Morphologische Beurteilung von Zytospinpräparaten 60
6.2 Bestimmung von Rhesus- und Blutgruppeneigenschaften 60
6.3 Vergleich der ADAR1 m-RNA Expression während der Erythropoese 61
6.3.1 Transfektionseffizienz von DOTAP, DuoFect und Amaxa im Vergleich 62
6.4 Transfektion von humanen CD34+ Stammzellen und Zelllinien 64
6.4.1 Transfektion von Antisense DNA in Huh7, K562 und CD34+ Stammzellen 64
6.4.2 Transfektion von siRNA zur spezifischen Hemmung von ADAR1 64
6.5 ADAR1 Westernblot 66
6.5.1 Westernblot von transfizierten, ADAR1 defizienten K562 66
6.5.2 Westernblot von transfizierten, ADAR1 defizienten humanen CD34+ Stammzellen 67
6.6 Kultur von transfizierten, ADAR1 defizienten humanen CD34+ Stammzellen 67
6.6.1 Proliferation 67
6.6.2 Differenzierung 68
6.6.3 Morphologische Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung 70
6.7 Koloniebildung 72
6.8 Genexpressionsanalysen während der Erythropoese 73
6.8.1 Genexpressionsanalyse von transfizierten, ADAR1 defizienten humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen 74
6.8.2 Genexpressionsanalyse von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen 74
6.9 Ergebnisse spezifischer PCR während der Erythropoese: GATA und TNF 75

7 **DISKUSSION** 77

7.1 Humanes in vitro Erythropoesemodell 78

7.2 ADAR1 m-RNA Expression während der Erythropoese 82

7.3 Transfektion primärer hämatopoetischer Stammzellen 83

7.4 Proliferation und Differenzierung von ADAR1 defizienten, humanen CD34+ Stammzellen 85

7.5 Koloniebildung von ADAR1 defizienten humanen CD34+ Stammzellen 86

7.6 Genexpressionsanalysen von humanen erythrozytären Zellen 88

8 **ZUSAMMENFASSUNG** 91

9 **LITERATURVERZEICHNIS** 93

10 **ANHANG** 107

10.1 Ethikkommission 107

10.2 Proteinarray 109

11 **DANKSAGUNG** 112

12 **PUBLIKATIONEN** 113

13 **CURRICULUM VITAE** 114

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Im Folgenden sind alle verwendeten Abkürzungen mit Ausnahme der im Duden zugelassenen Standardabkürzungen aufgeführt.

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADAR	Adenosine-Deaminase-acting-on-RNA
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
asODN	antisense Oligodesoxynukleotid
β	Beta
BFU-E	Burst-Forming-Unit-Erythrocyte
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsantigene)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CFU-GM	Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Macrophage
CY5	Cytochrom 5
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dsRAD	doppelsträngige RNA Adenosin Deaminase
dsRBM	Doppelstrang-RNA-bindendes Motiv
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure

DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
et al.	„et alii“ (und andere)
FAM	fluoreszenter Farbstoff
FCS	Foetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
× g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GPA	Glycophorin A
HbsAg	Hepatitis-B-Surface-Antigen
HDAg	Hepatitis-δ-Ag
HDV	Hepatitis-δ-Virus
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
I	Inosin
ICD	International Classification of Diseases
IFN	Interferon
IFN α	Interferon alpha
IFN γ	Interferon gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IU	international Unit (Internationale Einheit)
kDA	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MHC	major histocompatibility complex (Major Histokompatibilitätskomplex)
MNZ	mononukleäre Zellen
mock-Transfektion	Kontroll-Transfektion ohne Einsatz von DNA oder RNA
mRNA	messenger RNA

MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PE	Phycoerythrin
RISK	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCF	stem cell factor (Stammzellfaktor)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
ssDNA	single stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminale Deoxynucleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPO	Thrombopoetin
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
U	Unit
V	Volt
ZNS	Zentralnervensystem

2 EINLEITUNG

2.1 Das hämatopoetische System

Durch den Körper eines gesunden Erwachsenen fließen je nach Größe und Gewicht ca. 4,5 bis 6 Liter Blut. Das Blut setzt sich etwa zur Hälfte aus zellulären Bestandteilen (hauptsächlich Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) und zur anderen Hälfte aus Plasma und den Plasmaeiweißen zusammen. Ein komplexes Zusammenspiel all dieser Bestandteile ermöglicht es, dass das Blut in der Lage ist, viele lebenswichtige Funktionen zu erfüllen: Transport von Sauerstoff, Transport und Verteilung von Botenstoffen (z.B. Hormonen), Immunabwehr, Energieversorgung und vieles mehr.

Der Begriff Hämatopoese leitet sich von den griechischen Wörtern *haima* = Blut und *poiesis* = Bildung ab, bedeutet also „Blutbildung". Die Hämatopoese findet beim Embryo vor allem in der Leber und Milz, im gesunden Erwachsenen ausschließlich im Knochenmark statt. Die Stammzellen des blutbildenden Systems gehören zu den wenigen Zellen des Körpers, die zur Selbsterneuerung befähigt sind und somit in der Lage sind, eine lebenslange Blutbildung sicher zu stellen. Der Begriff „Stammzelle" geht auf Untersuchungen von McCulloch und Till aus dem Jahr 1960 zurück, die im Knochenmark die Zellen identifizierten, die zeitlebens für die Regeneration des hämatopoetischen Systems verantwortlich sind (61). Unter dem Begriff Stammzelle versteht man heute im Allgemeinen undifferenzierte Zellen, die sich einerseits selbst erneuern und andererseits in reife Zellen mit definierten morphologischen und funktionellen Eigenschaften differenzieren. Das Knochenmark produziert $1{,}75 \times 10^{11}$ Erythrozyten (rote Blutkörperchen) und 7×10^{10} Leukozyten (weiße Blutzellen) täglich und hat die Fähigkeit, bei Bedarf diese Produktivität um ein Vielfaches zu steigern (78). Ein charakteristisches Merkmal der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle ist ihre Fähigkeit, das gesamte hämatopoetische System zu repopulieren und somit eine Multilinien-Hämatopoese *in vivo* lebenslang aufrecht zu erhalten. Dafür müssen diese Zellen zwei Funktionen erfüllen: Die Selbsterneuerung („self-renewal") zur Erhaltung eines Vorrates von unreifen pluripotenten Stammzellen und die Fähigkeit der Differenzierung in die verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen (71).

Alle Blutzellen leiten sich von diesen pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen ab, aus denen sich dann zunächst Stammzellen mit eingeschränkter Potenz und anschließend linien-

determinierte Vorläuferzellen entwickeln. Linien-determinierte Vorläuferzellen sind in der Lage, in vitro koloniebildende Einheiten, sogenannte CFU (colony forming unit), zu bilden. Aus diesen koloniebildenden Einheiten entwickeln sich dann über mehrere Tage die morphologisch unterscheidbaren Vorläuferzellen der einzelnen Reihen und nachfolgend ausdifferenzierte Zellen. Es entstehen Vorläuferzellen der lymphoiden Zellreihe, aus denen sowohl immunkompetente B- und T-Lymphozyten als auch NK-Zellen hervorgehen. Aus myeloiden Vorläuferzellen reifen insbesondere Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen heran. Zur Zeit wird angenommen, dass Erythrozyten und Thrombozyten aus einer gemeinsamen „bipotenten" Vorläuferzelle hervorgehen könnten.

Für den gesamten Entwicklungsprozess spielen viele Faktoren bei der Proliferation und Differenzierung dieser Zellen eine wichtige Rolle. So ist z.B. das „Micro-Environment" der hämatopoetischen Zellen, das Knochenmark-Stroma, bei der Differenzierung von Bedeutung. Die Differenzierungsrichtung ist vor allem abhängig davon, dass spezifische Zytokine in der richtigen Konzentration zur richtigen Zeit vorhanden sind (47). Ebenso ist die Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp mit dem An- und Abschalten von Genen, die mehr oder weniger charakteristisch sein können, verbunden (1, 39).

Wie aus der Abbildung 1 ersichtlich, tragen Zellpopulationen auf ihrer Oberfläche verschiedene Antigene. Die detaillierte Analyse dieser Ag-Expressionsmuster ermöglicht eine weitgehende Charakterisierung der Zellen. Die schematische Übersicht der „myeloiden" Differenzierungsreihen zeigt die entsprechenden Oberflächenproteine, die die einzelnen Zellen exprimieren. Ein charakteristisches Merkmal der unreifen hämatopoetischen Stammzelle ist die Expression eines bestimmten Oberflächenprotein, des CD34 Antigens (CD = „cluster of differentiation") (7). Das CD34-Antigen ist ein transmembranes Glykoprotein von 110 kDA, das natürlicherweise auch auf Gefäßendothelzellen vorkommt. Die Funktion ist weitgehend unbekannt, wahrscheinlich hat es eine Bedeutung bei der Adhäsion (89). Das CD34-Antigen wird auch noch von erythrozytären Vorläuferzellen, die *colony forming units-granulocyte-erythrocyte-monocyte-macrophage* (CFU-GEMM), *burst forming units-erythroid* (BFU-E) und *colony forming units-erythroid* (CFU-E), die zur Koloniebildung befähigt sind, exprimiert.

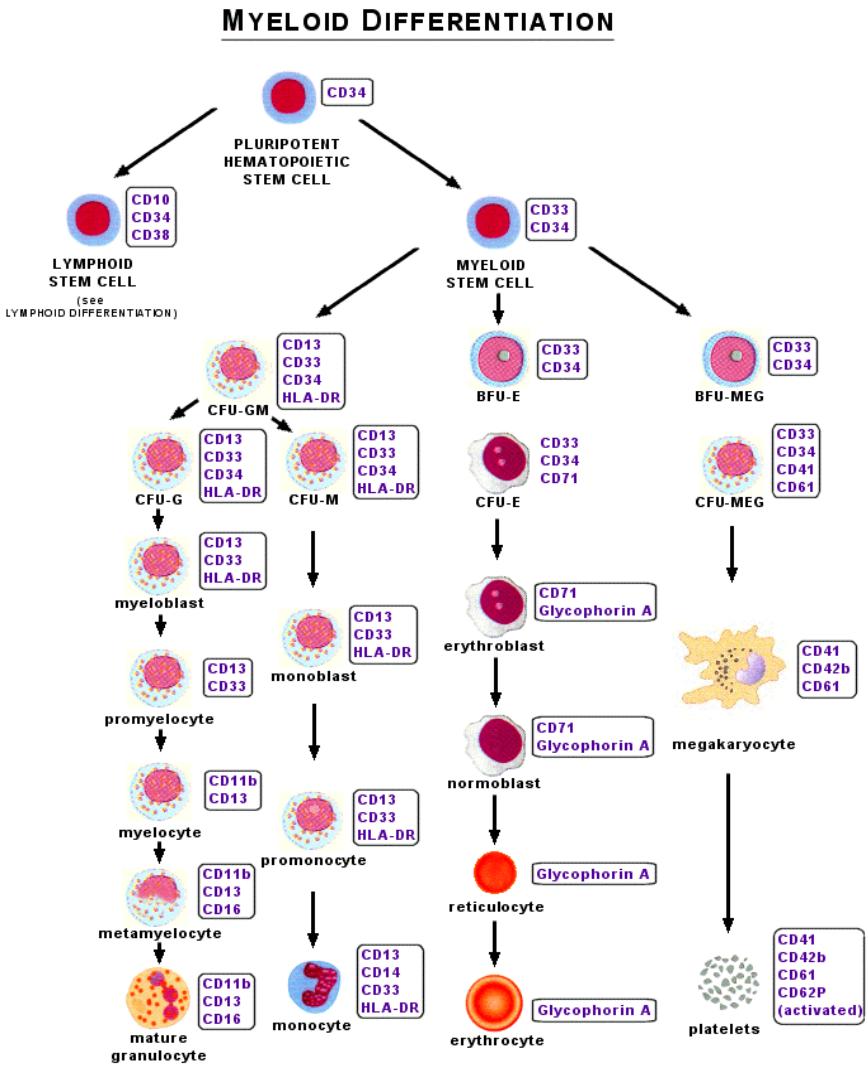

Abb.1: Schematische Darstellung der „myeloiden" Differenzierung. *Während der humanen Hämatopoese teilt sich die „myeloide Stammzelle" in Vorläuferzellen, die einerseits zu Zellen der granulozytären / monozytären Reihe und andererseits zu Zellen der Erythro-bzw.-Megakaryopoese reifen. (Quelle:http://www.rrk-berlin.de/imarklab/my_gif.htm)*

Im Knochenmark tragen 1-2% der Zellen dieses CD34-Antigen. Nur ein sehr geringer Anteil (< 0,1%) tritt in das periphere Blut über. Morphologisch lassen sich die im peripheren Blut zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen nicht von kleinen Lymphozyten unterscheiden. Während der erythrozytären Reifung und Ausdifferenzierung verliert die Zelle dann das CD34-Antigen. Darüber hinaus lassen sich CD34+ Stammzellen im Nabelschnurblut nachweisen. Zur Zeit der Geburt enthält das Blut der Nabelschnur ca. 0,1% hämatopoetische CD34+ Stammzellen, die definitionsmäßig die frühsten adulten Stammzellen sind und durch Punktion der Nabelschnurvene unmittelbar nach der Geburt ohne großes Risiko für Mutter und

Kind entnommen werden können. Grundsätzlich können diese zirkulierenden Nabelschnurblutstammzellen prophylaktisch gewonnen und für vielseitige therapeutische Zwecke kryokonserviert werden. Ein funktionelles Merkmal einer Subgruppe von CD34+ Zellen ist ihre Fähigkeit, in-vitro klonal proliferierende Zellen in geeigneten semisoliden Nährmedien zu bilden. Abbildung 2 zeigt morphologisch unterscheidbare Kolonien von Vorläuferzellen, den „burst-forming unit-erythrocyte“ (BFU-E) und den „colony-forming unit –granulocyte macrophage“ (CFU-GM).

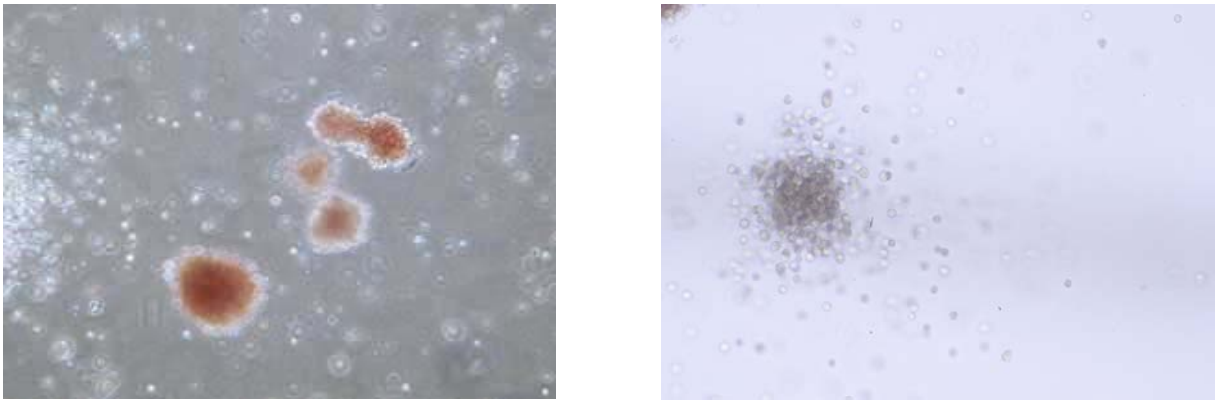

Abb. 2: Koloniebildung in einer semisoliden Kurzzeitkultur nach 14 Tagen Inkubation. *Das linke Foto zeigt dicht gepackte, hämoglobinreiche Zellen, die einer BFU-E zugeordnet werden, am Bildrand transparente, heterogen verteilte Zellen, die zu einer CFU-GM gehören. Das rechte Foto zeigt eine CFU-GM. (Aufnahme freundlicherweise von B. Driller zur Verfügung gestellt.) Lichtmikroskopie, 4o-fache Vergrößerung.*

2.2 Erythropoese

2.2.1 Charakteristische Stadien der Erythropoese

Erythrozyten zählen zu den am häufigsten vorkommenden, terminal differenzierten Zelltypen des menschlichen Körpers. Die Erythrozyten entwickeln sich nach der Geburt wie alle Zellen des peripheren Blutes aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (s.oben). Als Erythropoese bezeichnet man einen komplexen, mehrstufigen Prozess, in dem Stammzellen und nachfolgende Vorläuferzellen der roten Reihe verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen. Das früheste morphologisch fassbare Stadium ist der **Proerythroblast**. Die anschließenden Differenzierungsstufen umfassen den **basophilen**

Erythroblast, der etwas kleiner als der Proerythroblast ist und ein ribosomenreiches basophiles Zytoplasma zeigt, und den **polychromatischen Erythroblast**, der letzten teilungsfähigen Zelle der roten Reihe mit einem kondensierten Kern und graublauem Zytoplasma infolge der beginnenden Hämoglobinsynthese. Ohne weitere Zellteilung reift der hämoglobinreiche **Normoblast** heran und nach Ausstoßung des mittlerweile pyknotisch gewordenen Zellkerns, einen Vorgang, den man als Enukleation bezeichnet, entsteht der **Retikulozyt**. Der Retikulozyt wandert vom Knochenmark ins periphere Blut und wird dort, nach Abbau restlicher Zellorganellen, zum **Erythrozyten**, einer kernlosen, diskoiden Zelle, die morphologisch hervorragend an bestimmte Funktionen, wie z.B. den Sauerstofftransport, angepasst ist.

2.2.2 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Diverse Wachstumsfaktoren steuern die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der hämatopoetischen Vorläuferzellen in die verschiedenen Zellreihen und tragen zur Selbsterneuerung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle bei. Die Faktoren werden vor allem lokal sezerniert, überwiegend durch Knochenmarkstromazellen (19). Einige Faktoren wirken selektiv nur auf bestimmte Reifestadien, während andere pleiotrop wirken, d. h. das Wachstum mehrerer Zellreihen beeinflussen (52, 87). Die Wirkungsweise von Wachstumsfaktoren kann direkt die Zellzyklusaktivität betreffen oder Apoptose einleitende Mechanismen inhibieren oder stimulieren (68). SCF und EPO sind die wichtigsten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren für die Erythropoese. SCF wird von Fibroblasten, Hepatozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Stromazellen bereitgestellt. SCF fördert die DNA-Synthese und damit die Proliferation von Stammzellen und erythrozytären Vorläuferzellen (17, 65, 68). Die membrangebundene Form von SCF reguliert die Proliferation von Vorläuferzellen der myeloiden, lymphoiden, megakaryozytären und erythroiden Zelllinien meist in Synergie mit anderen Zytokinen (IL-3, -6, -11, GM-CSF, G-CSF und EPO) (38). EPO ist ein Glykoprotein, das pränatal überwiegend in der Leber und erst nach der Geburt zu 90% in der Niere und zu 10% in den Hepatozyten produziert wird. EPO fördert die Differenzierung und ist ein Wachstumsfaktor für erythrozytäre Vorstufen und Blutgefäße (78). Die Hauptaufgabe besteht in der Stimulation der Proliferation von

erythroiden Vorläuferzellen, insbesondere den EPO-Rezeptor tragenden CFU-E, die zu juvenilen Erythrozyten ausreifen. Bei Sauerstoffmangel wird EPO vermehrt freigesetzt und es kommt unter diesen physiologischen Bedingungen zur verstärkten Bildung und Ausschleusung von erythropoetischen Zellen aus dem Knochenmark und dem Nachweis von Retikulozyten im peripheren Blut. Des Weiteren schützt EPO die erythrozytären Vorläuferzellen durch die Aktivierung antiapoptotischer Proteine, beispielsweise Bcl-X(L), und ist notwendig für die terminale Enukleation (20, 66). Tabelle 1 zeigt eine Auswahl an hämatopoetischen Wachstumsfaktoren:

Tabelle 1: Darstellung verschiedener hämatopoetischer Wachstumsfaktoren

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren	**Wirkung**
Erythropoetin (EPO)	- Hauptregulator für die Bildung von Erythrozyten in vivo - Stimuliert die Proliferation und Differenzierung - Wirkt auf späte Differenzierungsstadien
Stem cell factor (SCF)	- Wirkt als Wachstumsfaktor für unreife hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, die CD34 exprimieren - Wirkt auf frühe Zellen der Erythropoese
Granulocyte-Colony-stimulating factor (G-CSF)	- Stammzellmobilisierung
Interleukin 3 (IL-3)	- Stimuliert das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen - Wirkt auf die frühe Erythropoese
Interleukin 6 (IL-6)	- Unterstützt zusammen mit IL-3 die Proliferation hämato-poetischer Vorläuferzellen
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	- Wirkt stimulierend auf erythroide Vorläuferzellen

Auch andere Faktoren wie Insulin und IGF-1 sind für die terminale Differenzierung wichtig (64, 65, 68). Dexamethason beeinflusst direkt die Proliferation erythrozytärer Vorläuferzellen, während es die Differenzierung unterdrückt (102).

Für Untersuchungen der humanen Erythropoese ist eine effektive und weitgehend homogene in-vitro Vermehrung erythrozytärer Vorläuferzellen notwendig. Die in-vitro Erythropoese sollte dabei im Stande sein, alle Entwicklungsstadien - vergleichbar mit der Erythropoese in-vivo – zu durchlaufen und insbesondere auch kernlose Retikulozyten hervorzubringen. Der Zusatz von vielen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die das Überleben und die Reifung der Zellen in-vitro fördern, ist deshalb notwendig.

Verschiedene Flüssigkulturen wurden auf dieser Grundlage während der letzten Jahre entwickelt (83, 103). Teilweise stand Nabelschnurblut als eine alternative primäre Stammzellquelle zur Verfügung. Es ließen sich unter dem synergistischen Einfluss von SCF und EPO in einem 2-Phasenmodell EPO-abhängige Zellpopulationen, nämlich koloniebildende erythrozytäre Vorläuferzellen vom BFU-E bzw. CFU-E Typ, amplifizieren (73). Ein 3-Phasenmodell, ebenfalls mit Nabelschnurblut als primäre Stammzellquelle, zeigte unter serumfreien Bedingungen eine hohe Expansionsrate der Zellen, jedoch unter Inkaufnahme einer fehlenden terminalen Differenzierung (69). Hierbei wurden die Zellen in der ersten Phase mit SCF, Thrombopoetin (TPO) und Flt3-Ligand (Flt3-L) kultiviert. Diese auf die frühe noch unreife Stammzelle wirkenden Zytokine können das gute Wachstumsverhalten erklären (67, 100).

2.3 RNA-Editierung

Eine Möglichkeit, vorgegebene genetische Information zu diversizieren, besteht darin, Nukleotide nachträglich, d.h. posttranskriptional, zu verändern (RNA-Editierung). Ursprünglich ging man davon aus, dass der genetische Informationsfluss direkt vom Gen zum Protein führt und die Aminosäuresequenz eines Proteins mit der kodierenden Sequenz im Genom übereinstimmt, d.h. eine strikte Genotyp - Phänotyp - Zuordnung vorliegt.

Die RNA-Editierung ist ein posttranskriptionaler Mechanismus, der von diesem Dogma abweicht. RNA-Editierung wird definiert als eine in-vivo Veränderung der Information einer RNA durch andere Mechanismen als Splicen, 5´- oder 3´Prozessierung oder Bildung hypermodifizierter Basen (84). Die RNA-Editierung führt zu einer Diversifizierung der genetischen Information eines Lebewesens über das genomisch mögliche Maß hinaus.

Es gibt unterschiedliche Editierungs-Mechanismen:

- Die Insertion bzw. Deletion von Nukleotiden
- Die Modifikation von Nukleotiden, die vor allem in den Zellkernen höherer Eukaryonten auftritt

Erstmals wurde RNA-Editierung von Benne et al. in Kinetoplasten-RNA von Trypanosomen beschrieben. Die multiple Insertion und Deletion von Uridinnukleotiden in die mitochondriale mRNA dieser Protozoen führt zu offenen Leserasterverschiebungen und ist nötig, um funktionelle Proteine zu erzeugen (6). Bei den Säugetieren sind bislang nur wenige RNA-Editierungen bekannt, erstmals im Transkript des Apolipoprotein B, einem Bestandteil des Lipidstoffwechsels, beschrieben (15). Durch die Umwandlung der Base Cytosin zu Uracil an einer bestimmten Position wird aus einem Glutamincodon ein Stopcodon. Aus dem gleichen Gen entstehen so zwei funktionell verschiedene Proteine. Die meisten RNA-Editierungen in Säugetieren betreffen bislang hauptsächlich die Informationsverarbeitung im ZNS (85). RNA-Editierungs-Mechanismen, die die Umwandlung von Adenosin-zu-Inosin betreffen, wurden für den Glutamat-Rezeptor (46, 58, 90, 91), Hepatitis-δ-Virus (12, 41) und den Serotonin-Rezeptor (9) beschrieben. Später fand man weitere RNA-Editierungs-Mechanismen in Protozoen, Pflanzen und Zellkernen höherer Eukaryonten (42). Editierung wurde in nukleolärer, mitochondrialer und auch in Virus-codierter RNA nachgewiesen.

2.4 RNA-abhängige Adenosin-Deaminasen

Die **A**denosine-**D**eaminase-**a**cting on **R**NA (ADAR) Enzyme bilden eine einheitliche Proteinfamilie bei allen Organismen, vom einzelligen Protozoen bis zum Menschen (45, 70). Erstmals wurde das Enzym 1987 bei Xenopus laevis beschrieben. Die Konversion von Adenosin zu Inosin wurde zunächst als Doppelstrang-RNA (dsRNA) aufwindende Aktivität beschrieben, welche die dsRNA destabilisiert (4). Die dsRNA destabilisierende Wirkung resultiert durch eine Umwandlung vieler Adenosin-Uridin-Basenpaare in die weniger stabilen Inosin-Uridin-Fehlpaarungen. Erst später wurde die modifizierende Aktivität der dsRAD (doppelsträngige RNA Adenosin Deaminase) beschrieben (5). Diese dsRNA bindenden Proteine katalysieren die hydrolytische Desaminierung von Adenosin zur seltenen Base Inosin

(s. Abb. 3). Das H_2O Molekül greift dabei nukleophil über den Sauerstoff das C6 vom Adenosin an. Dabei wird NH_3 freigesetzt und es bildet sich die seltene Base Inosin.

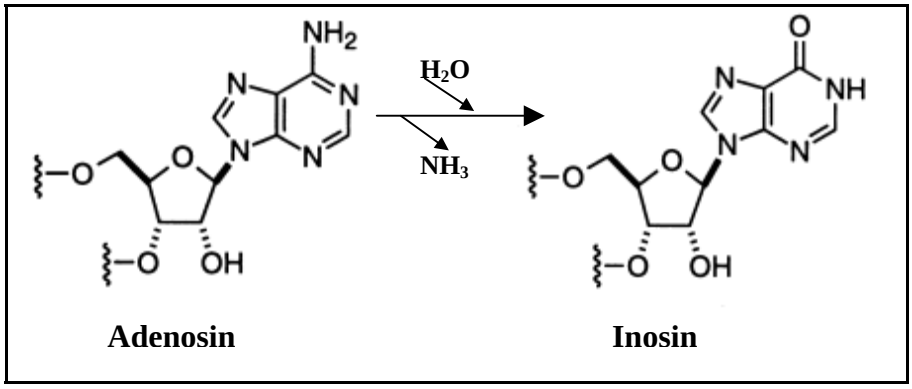

Abb. 3: Deaminierung. *ADAR katalysiert die hydrolytische Deaminierung von Adenosin zu Inosin.*

Bei den ADAR-Enzymen können drei Regionen unterschieden werden.

- eine hochkonservierte Deaminase-Domäne am 3´carboxyterminalen Ende
- eine zentrale Region mit einer variablen Zahl von dsRNA bindenden Motiven unterbrochen von sog. Spacern, die in Länge und Sequenz variieren können
- ein 5´aminoterminales Ende, das signifikant in Länge und Sequenz variiert

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der drei verschiedenen Isoformen von ADAR, die bis jetzt in Säugern beschrieben wurden: ADAR1 (45, 70), ADAR2 (63) und ADAR3 (62).

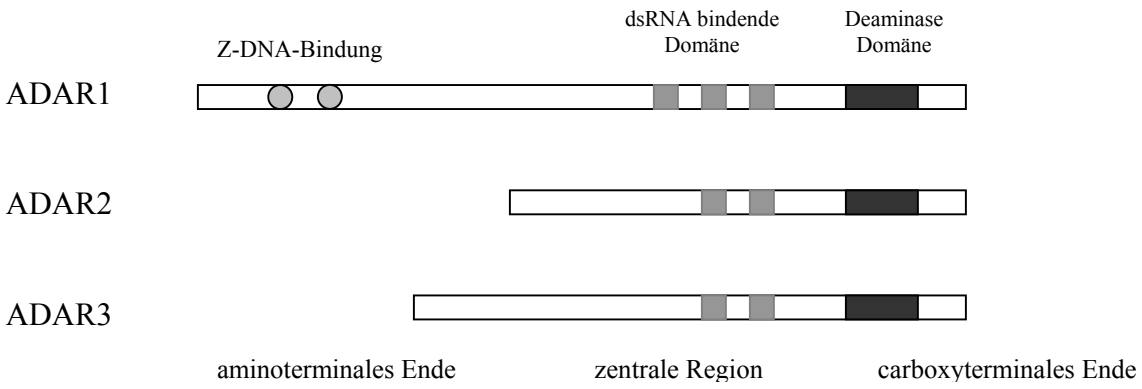

Abb. 4: ADAR1-3. *Eine schematische Darstellung der drei RNA-abhängigen Adenosin-Deaminasen (modifiziert nach Hartner „Die RNA-abhängige Adenosin Deaminase ADAR1“)*

ADAR1: ADAR1 enthält drei dsRNA bindende Bereiche und im N-terminalen Bereich zwei Z-DNA-Bindemotive. ADAR1 ist beim Menschen in zwei verschiedenen Formen nachweisbar (74). Es gibt ein ADAR1-L(large)-Enzym von 150 kDa und ein ADAR1-S(small)- Protein von 110 kDa. ADAR1-S wird konstitutiv exprimiert, das ADAR1-L-Gen ist durch Interferon-α (IFN-α) induzierbar (26, 75). IFN-α kann in-vivo als Antwort auf Virusinfektionen gebildet werden. Beide Formen von ADAR1 werden von einer mRNA mit 15 Exons transkribiert, die sich nur im ersten Exon unterscheiden. ADAR1-L ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, ADAR1-S wird größtenteils im Nukleus gefunden (74, 75, 104). ADAR1 wird in embryonalen Stammzellen, Gehirn, Leber und vielen anderen Geweben exprimiert (45).

ADAR2: ADAR2 zeigt im Vergleich zu ADAR1 einen kürzeren Amino-Terminus, der keine Z-DNA-bindende Domäne enthält. Die Aktivität dieser Domäne scheint keine Bedeutung für die Deaminase-Aktivität oder die dsRNA-bindende Aktivität von ADAR2 zu spielen. ADAR2 enthält im Gegensatz zu ADAR1 nur zwei dsRBM (70).

ADAR3: ADAR3 zeigt eine Spezifität für das zentralen Nervensystem (ZNS) und wird nur in bestimmten Regionen im Gehirn exprimiert. Es kann mit seinen zwei Doppelstrang-RNA-bindenden Motiven (dsRBM) sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA binden. Es hat keine nachweisbare enzymatische Aktivität; ein Substrat für Editingreaktionen von ADAR3 konnte bislang noch nicht identifiziert werden (14, 62).

Die dsRNA Bindungsdomänen vermitteln die Bindung an dsRNA. Die ADARs zeigen keine offensichtliche Sequenz-spezifische Bindung. Die Spezifität der ADAR Isoformen scheint eher an der Struktur der dsRNA zu liegen, als an deren RNA-Sequenz (55). Weitere Untersuchungen zeigten aber auch, dass bestimmte Nachbarbasen bevorzugt editiert werden. Sowohl die ADAR1 als auch die ADAR2 Form editieren in vitro bevorzugt Adenosine, die als 5'-Nachbarn Adenosin oder Uridin aufweisen. Adenosine mit Cytidin oder Guanosin als 5'-Nachbar werden seltener von ADAR1 oder ADAR2 editiert. ADAR2 bevorzugt und editiert zusätzlich Adenosine mit Uridin und Guanosin als 3'-Nachbarn (54, 79). In lebenden Zellen scheint das Editing durch die intrazelluläre Kompartimentierung der Enzyme reguliert zu

werden. ADAR2 „shuttelt“ zwischen dem Nukleolus und dem Nukleoplasma, wohingegen ADAR1 sich zwischen dem Nukleolus, dem Nukleoplasma und dem Zytoplasma hin- und herbewegt (18).
Hauptsächlich kommt ADAR im ZNS vor, kann aber ubiquitär in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (45). Zur Aufklärung der physiologischen Funktion und der Substratspezifität der verschiedenen ADAR-Enzyme sind weitere Untersuchungen an Knock-Out-Tiermodellen oder Gen-Inhibitions-Experimente in der in vitro Entwicklung humaner Zellen erforderlich.

2.5 Bedeutung von ADAR1 in der humanen Erythropoese

Die Bedeutung von Adenosin zu Inosin RNA Editing im humanen System ist bislang nur unzureichend erforscht. Obwohl ADAR1 in vielen unterschiedlichen Geweben nachgewiesen und eine entsprechende Korrelation von Inosin enthaltener mRNAs vorliegt (37, 76, 104), konnten bislang nur wenige Zielgene, die als endogenes Substrat für ADAR1 fungieren, identifiziert werden. Die Möglichkeit, über posttranskriptionelle Modifikation die funktionellen Fähigkeiten von mRNAs und bestimmten Proteinprodukten zu erhöhen, wurde beispielsweise für den Glutamatrezeptor nachgewiesen (86). Die Expression und das Vorkommen von ADAR1 nicht nur im ZNS, sondern auch in vielen anderen Organen und Geweben, könnten auf weitere physiologische Funktionen, Steuerungsmechanismen und Substratspezifitäten von ADAR1 hinweisen.
Die physiologische Bedeutung von ADAR1 für die Entwicklung und das Überleben von embryonalen Mäusen wurde von der Arbeitsgruppe Wang et al. festgestellt (105), die chimäre ADAR1 defiziente Mäuse erzeugten. Die auf die Hälfte reduzierte ADAR1 Expression führte zum Tod der Chimären bereits vor dem 14. Embryonaltag. Während der normalen murinen Embryonalentwicklung verlagert sich die Erythropoese um den 12. Embryonaltag vom Dottersack in die Leber. Die erythrozytären Vorläuferzellen des Dottersacks sind noch überwiegend kernhaltig (primitive Erythropoese). In der Leber entkernen diese Zellen und differenzieren dann zu reifen Erythrozyten. Die chimären Mausembryonen zeigten eine Desintegration des Lebergewebes und eine gestörte Erythropoese. Die Enukleation und die endgültige Differenzierung finden nicht statt. Wahrscheinlich liegt die Ursache in dem Mangel

oder Fehlen von bislang noch nicht identifizierten Proteinen, zu deren Synthese die Wirkung des ADAR1,eines Adenin zu Inosin mRNA Editing, benötigt wird. Die Arbeitsgruppe von Seeburg untersuchte ebenfalls die physiologische Bedeutung von ADAR1 in der Maus. Die vollständige Inaktivierung des ADAR1-Gens in der Maus, sog. Nullmutanten, führte zu embryonaler Letalität. Die Tiere starben zwischen E11,5 und E12,5. Hämatopoetische Zellen in der fetalen Leber dieser Tiere zeigten eine deutlich verminderte Proliferation und einen vermehrten Zelltod. Das koloniebildende Potential myeloider und erythroider Vorläuferzellen war drastisch reduziert. Allerdings waren Defekte außerhalb der fetalen Leber in den ADAR1 defizienten Embryonen nicht beobachtet worden.

2.6 RNA-Interferenz

RNA Interferenz ist ein endogener zellulärer Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) ganz spezifisch eine komplementäre Sequenz in einer Zelle erkennt und zu einem hocheffizienten posttranskriptionellen Abbau von Ziel-RNA führt. Vermutlich handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus zur Abwehr von Viren. Das Phänomen wurde erstmals im Fadenwurm *C.elegans* beschrieben. Die Injektion von dsRNA führte zu einer effizienten und spezifischen Herunterregulierung der Genaktivität (24, 25, 97, 98). 2006 erhielten Andrew Fire und Craig Mello für ihre Entdeckung den Nobelpreis für Medizin (25). Der Einsatz von RNA-Interferenz als molekulare Technik zur funktionellen Analyse von Genen wird immer wichtiger. Mit dieser Methode ist es möglich, die Funktion von Proteinen in einer Zelle zu untersuchen, indem die Expression der fraglichen Proteine gezielt unterdrückt wird. Studien führten zur Erkenntnis, dass dsRNA von 21 bis 23 bp (siRNA) die sequenzspezifische Degradation von mRNA bewirkt. Entscheidend für den Einsatz in Säugern war die Arbeit von Elbashir et al., die zeigen konnten, dass synthetische dsRNA von 21 bp Länge, direkt in Säugerzellen eingebracht, zu einer sequenzspezifischen Hemmung der Genexpression führt ohne eine unspezifische Aktivierung der Protein-Kinase R (23). In höheren Eukaryontenzellen führt lange dsRNA, ein Intermediat bei der Replikation vieler Viren, zu einer sequenzunabhängigen Aktivierung des antiviralen Interferonsystems und damit verbunden zu einer Phosphorylierung der Protein-Kinase R und im weiteren Verlauf zur unspezifischen Hemmung der Proteinbiosynthese. Man glaubt heute, dass der initiale Schritt bei der

Genunterdrückung die Erkennung und Bindung von der injizierte dsRNA durch ein spezifisches Rnase III-Enzym (Dicer) ist, welches dsRNA in 21-23 bp lange Stücke schneidet, den sogenannten siRNAs (small interfering RNAs). Diese siRNAs sind die eigentlichen Effektoren der RNA-Interferenz. Die Einzelstränge dieser siRNA werden in den Zellen nach der Bindung an den RNA Induced Silencing Complex (RISC) getrennt. Der im RISC verbleibende Einzelstrang ermöglicht nun die Kopplung an komplementäre mRNA, wodurch schließlich der hochspezifische Abbau der Ziel mRNA durch Nukleasen ausgelöst wird. Die Schritte sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

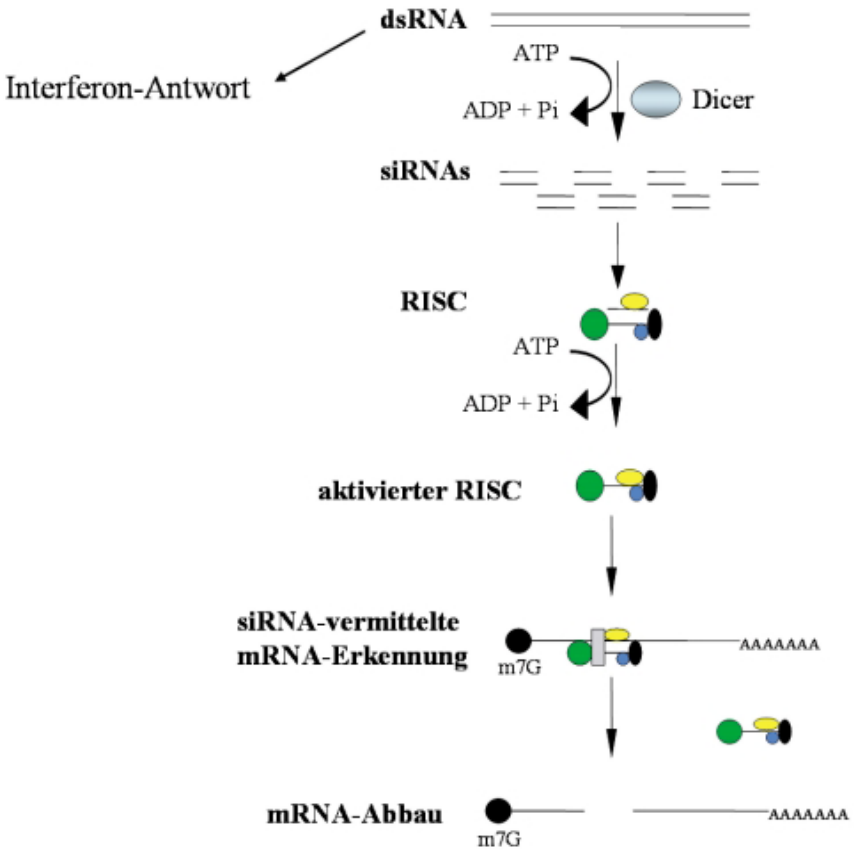

Abb. 5: Mechanismus der RNA-Interferenz. *Das Enzym Dicer, ein Rnase III-Enzym, schneidet lange dsRNA in 21-23 bp lange Stücke, den sogenannten siRNAs (small interfering RNAs). Die siRNAs werden vom RNA Induced Silencing Complex (RISC) aufgenommen. Dieser wird aktiviert und spaltet die Ziel-RNA, nachdem diese mit Hilfe der siRNA zuvor erkannt wurde.(Quelle Bioforum 4/2004, www.bioforum.de)*

Die RNA-Interferenz-Technik mit synthetisch hergestellter siRNA, die mittels diverser Transfektionsreagenzien in die Zelle eingebracht werden, hat sich als molekulares Verfahren zur funkionellen Genanalyse und bei der Suche nach neuen Medikamenten und Therapieansätzen in jüngster Zeit fest etabliert.

3 ZIELSETZUNG

Die RNA Editierung durch selektive Deaminierung von Adenosin zu Inosin in Transkripten wird durch das Enzym Doppelstrang-RNA-bindende Adenosin Deaminase (ADAR) katalysiert. Zielgene, die als endogenes Substrat für verschiedene Isoformen des ADAR-Enzyms fungieren, wurden bislang nur wenige identifiziert.

Ausgehend von den eindrucksvollen Ergebnissen der Arbeitsgruppe Wang in *Science*, die Störungen der Blutbildung, vor allem Bildungs- und Reifungsstörung der Erythrozyten in ADAR1-defizienten Mäusen beschrieben, war das Ziel dieser Arbeit, erstmals die bislang unbekannte Wirkung des Enzyms ADAR1 auf die humane Hämatopoese zu untersuchen und neue Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der erythropoetischen Ausreifung zu gewinnen.

Dazu wurde, ausgehend von humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, zunächst ein Erythropoese-Zellkulturmodell entwickelt, das in der Lage ist, die erythropoetische Reifung über alle auch in vivo vorkommenden Stadien zu reproduzieren und der physiologischen Situation im lebenden Organismus sehr nahe kommt.

ADAR1 wird in vielen Geweben exprimiert. Zunächst sollte festgestellt werden, ob humane hämatopoetische Stammzellen ebenfalls ADAR1 in einem relevanten Umfang exprimieren und inwieweit der Expressionsgrad von den Differenzierungsstadien der Erythropoese abhängig ist. Die Inaktivierung des ADAR1-Gens im Mausmodell gab Hinweise auf die physiologische Bedeutung von ADAR1 in vivo. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob ADAR1 auch im Menschen eine wichtige Rolle für die Hämatopoese spielt. Es wurden zwei verschiedene Geninhibitionstechniken untersucht, um eine selektive Geninhibierung in den humanen Zellen zu etablieren. ADAR1 wurde durch die siRNA-Interferenz-Technik mit geeigneter siRNA, die mittels Transfektion in die hämatopoetischen Vorläuferzellen eingebracht wurde, inhibiert. Die Auswirkungen von ADAR1-Defizienz auf die humane Hämatopoese wurden untersucht.

4 MATERIAL

4.1 Chemikalien und Reagenzien

- Aceton *(Merck, Darmstadt)*
- Acrylamid 30% (*Sigma, Deisenhofen)*
- Agarose NA *(Amersham Biosciences, Uppsala/Schweden)*
- Ammoniumpersulfat (APS) 40% *(Merck, Darmstadt)*
- Aqua ad injectabile (*Braun, Melsungen)*
- Borsäure *(Merck, Darmstadt)*
- Bovine Serum Albumin (BSA) *(Fluka, Steinheim)*
- 123 bp-DNA-Leiter GIBCOBRL *(Invitrogen, Karlsruhe)*
- Bromphenolblau (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Coomassie Brilliant Blue G (*Sigma, Deisenhofen)*
- Di-ethylpyrocarbonat (DEPC) *(Sigma-Aldrich, Steinheim)*
- Dinatriumhydrogenphosphat *(Merck, Darmstadt)*
- Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat *(Merck, Darmstadt)*
- Dithiothreitol (DTT) 20 mM *(Merck, Darmstadt)*
- Ethylenediamintetraactic acid (EDTA) (*Sigma, Deisenhofen)*
- Essigsäure *(Merck, Darmstadt)*
- Ethanol *(Merck, Darmstadt)*
- Ethidiumbromid *(Appligene, Heidelberg)*
- Fast Blue BB Base (*Sigma, Deisenhofen)*
- Ficoll Typ 400 (*Sigma, Deisenhofen)*
- Glycin (Merck, Darmstadt)
- humanes Albumin (*DRK Blutspendedienst, Springe)*
- Isopropanol *(Merck, Darmstadt)*
- Magnesiumchlorid *(Merck, Darmstadt)*
- Mercaptoethanol *(Merck, Darmstadt)*
- Methanol *(J.T.Baker Deventer, Holland*
- Methylenblau *(Merck, Darmstadt)*
- Methylenthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromide (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

- Natriumazid (*Merck, Darmstadt)*
- Natriumchlorid (NaCl) (*Merck, Darmstadt)*
- Natriumdihydrogenphosphat *(Merck, Darmstadt)*
- Natriumdodecylsulfat (SDS) *(Merck, Darmstadt)*
- Natriumcitrat 4%(ACDA) *(Baxter, München)*
- Natriumnitrat *(Merck, Darmstadt)*
- N,N-Dimethylformamide (*Sigma, Deisenhofen)*
- Paraformaldehyd *(Merck, Darmstadt)*
- Poly-L-Lysin *(Sigma, Taufkirchen)*
- 2-Propanol *(Merck, Darmstadt)*
- Protein-G-Agarose *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)*
- Tetramethylenethylendiamin (TEMED) (*Sigma, Deisenhofen)*
- Tris 100mM pH6,8 *(Merck, Darmstadt)*
- Tris Base *(Merck, Darmstadt)*
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan *(Merck, Darmstadt)*
- Tween 20 *(Merck, Darmstadt)*
- Wasserstoffperoxid (*Sigma, Deisenhofen)*

4.2 Zellkulturmedien und –zusätze

- Bovines Serumalbumin (BSA) *(Fluka Biochemika, Neu Ulm)*
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) *(Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien)*
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) *(Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien)*
- Fetales Kälberserum (FCS), Mycoplex *(PAA Laboratories Inc., Österreich)*
- Kulturmedium RPMI 1640 *(BioWhittacker, Heidelberg)*
- L- Glutamin *(BioWhittacker, Heidelberg)*
- 2-Mercaptoethanol *(Merck, Darmstadt)*
- Natrium-Pyruvat (*BioWhittacker, Heidelberg)*
- Penicillin 10000 E/ml, Streptomycin 10000µg/ml *(BioWhittacker, Heidelberg)*

- Trypsin-EDTA 0,25% (200 mg/l EDTA; 500 mg/l Trypsin 1:250) *(Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien)*

4.3 Geräte

- ABI Prism 7700 *(Applied Biosystem, Weiterstadt)*
- Analysenwaage LC 6200S (*Sartorius, Göttingen*)
- Autoklav (*Webeco, Bad Schwartau*)
- Brutschrank (Water Jacketed Incubator) (*Labotect Labortechnik, Göttingen*)
- Coulter Counter T-660 *(Beckman Coulter, Krefeld)*
- Cycler ABI Prism 7700 Sequence Detection System (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*)
- Cycler Gene Amp PCR System 9600 (*Perkin-Elmer Cetus, Vaterstetten*)
- Diaplan Lichtmikroskop *(Leitz, Stuttgart)*
- Digitalkamera Canon EOS 10D (*Canon Inc., Tokyo/Japan*)
- Digitalkamera Leica DC350F (*Leica, Bensheim*)
- Durchflußzytometer Epics® XL-MCL *(Beckman Coulter, Krefeld)*
- Elektroblotvorrichtung, Nova Blot (*Pharmacia LKB., Freiburg*)
- Elektrophoresekammer Gelelectrophoresis Apparatus GNA-100 (*Pharmacia LKB., Freiburg*)
- Fluoreszenzmikroskop DMLM DC350F (*Leica, Bensheim*)
- Gefriertruhe, -80°C *(Nuaire, Plymouth,/USA)*
- Gene Amp PCR System 2400 *(Perkin Elmer, Wellesley/USA)*
- High Performance OCD Imaging System *(Appligene, Illkrich/Frankreich)*
- Kammer für Polyacrylamidgel (*MBTBrand, Gießen)*
- Kühlplatte, Multitemp III 15 °C (*Pharmacia LKB., Freiburg)*
- Kühlzentrifuge Centrikon T-324 mit Rotor A 6.9 (*Kontron, München)*
- Laborwaage 12116 MP *(Sartorius, Göttingen)*
- Magnetic cell separator MACS *(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)*
- Magnetrührer *(Heidolph, Kelheim)*

- Multiphor II® Elektrophorese-Einheiten *(Pharmacia, Freiburg)*
- Netzgerät GPS 200/400 für Agarose-Gel (*Pharmacia LKB., Freiburg)*
- Netzgerät Power Supply 3500 XL für Immunoblot (*Pharmacia LKB., Freiburg)*
- Netzgerät Microcomputer Electrophoresis Power Supply (*MBTBrand, Gießen)*
- Omnifuge 2.0 RS mit Rotor 2251 (*Heraeus Sepatech, Hamburg)*
- pH- Meter 83 Autocal *(Radiometer, Kopenhagen/Dänemark)*
- Pipette Combi-Pipette Typ 3180L *(Eppendorf, Hamburg)*
- Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 200-1000µl (*Eppendorf, Hamburg*)
- Quarzküvetten (*Hellma, Mühlheim)*
- Schüttler (*Heidolph polymax 1040, Kehlheim)*
- Software „Primer Express“ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*
- Spektralphotometer Hitachi U-3000 *(Hitachi, Bremen)*
- Sterile Werkbank II AI B3; *(Nuaire Plymouth/USA)*
- Thermomixer 5436 *(Eppendorf, Hamburg)*
- Trockenschrank *(Heraeus Christ GmbH, Osterode)*
- UV-Tisch N9 (Benz, Wiesloch)
- Vakuumtransfersystem (Dot Blotter SRC 96D Minifold I, *Schleicher & Schuell, Dassel*)
- Wasserbad *(GFL Labortechnik, Burgwedel)*
- Zentrifuge Kühlzentrifuge 2K15 *(Sigma, Deisenhofen)*
- Zentrifuge Minifuge 5414 C *(Eppendorf, Hamburg)*
- Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS (*Heraeus Christ GmbH, Osterode)*

4.4 Laborbedarf

- Einmalkanülen BD Microlance™ 3, steril, 0.45 x 13 mm (*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)*
- Einmalspritzen, steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml *(Becton Dickinson, Heidelberg)*
- Elektrodenstreifen (*Ammersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)*

- ExcelGel® SDS Homogenous 7,5% Gele *(Amersham Biosciences, Freiburg)*
- Filterpapier, Munktell 1F Grade (*Amersham Biosciences, Freiburg)*
- Flachboden-Mikrotiterplatten Costar *(Corning Incorp. New York/USA)*
- Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml (*Greiner, Nürtingen*)
- Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluß, 15 ml, 50 ml (*Greiner, Nürtingen)*
- Latex- Einmalhandschuhe *(Ansell, München)*
- Microcon- 10, 30-, 100- Filter *(Millipore GmbH, Schwalbach)*
- Nitrozellulose-Membran (*Bio-Rad, München*)
- Nunc® Stericup Filtrationssystems *(Millipore GmbH, Schwalbach)*
- Nylon-Zellsieb (*BD Biosciences, Bedford/USA)*
- Objektträger Super Frost *(Menzel Gläser, Braunschweig)*
- PCR- Reaktionsgefäße GenAmp tube 0,5 ml (*Eppendorf, Hamburg*)
- PCR- Reaktionsgefäße micro tubes 0,2 ml (*Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA)*
- PCR tube caps (*Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA)*
- Petrischalen (*Becton Dickinson, Plymouth, UK*)
- Pipettenspitzen, 1-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl *(Greiner, Nürtingen)*
- Pipettenspitzen, Sterilfiltertips, gestopft 10 µl, -1000 µl *(Biozym Diagnostics, Oldendorf)*
- Pipettenspitzen, Combitips, steril, 0.5 ml, 1.25 ml, 2.5 ml, 5 ml, 12.5 ml *(Eppendorf, Hamburg)*
- Reagenzröhrchen *(Sarstedt, Nümbrecht)*
- Reaktionsgefäße 1.5 ml *(Sarstedt, Nümbrecht)*
- Reaktionsgefäße 1.5 ml, mit Schraubdeckel *(Nunc™, Roskilde, Dänemark*)
- Separationssäulen Größe LS (*Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach)*
- Stabpipetten, steril, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (*Greiner, Nürtingen)*
- Sterile Kunststoffröhrchen 15 ml, 50 ml *(Becton Dickinson, Plymouth; UK)*
- Zellkulturflaschen, 175 ml *(Nunc™, Roskilde, Dänemark*)
- Zellkultur-Schalen 35 mm, Multidish 6 wells *(Nunc™, Roskilde, Dänemark*)
- Zellsieb 4 µm *(BD Falcon, Heidelberg)*
- Zellulosenitrat-Membran 0,2 µm *(Schleicher und Schüll, Dassel)*

4.5 Größenstandards

- 123 Basenpaar DNA Leiter *(Gibco, Paisley, UK)*
- Rainbow-Längenstandard 10.000-250.000 k *(Amersham, Uppsala, Schweden)*

4.6 Antikörper

- Poly Fast™ Rabbit anti-ADAR1" *(Zymed, München)*
- Horseradish peroxidase-konjugierten goat anti-rabbit antibody *(Santa Cruz, Heidelberg)*
- Anti-actin rabbit polyclonal IgG antibody (I-19) *(Santa Cruz, Heidelberg)*

4.7 Lösungen und Kits

- AmpliTaq Gold™ Polymerase (250U, 5U/µl) (*Applied Biosystems, Weiterstadt)*
- BioWhittaker™ Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, 0,0095 M *(Cambrex, Verviers/Belgien)*
- Deoxynucleotide Triphosphat 10µmol (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) (*Roche, Indianapolis/USA)*
- Diff-Quick® Fix *(Medion Diagnostics, Düdingen, Swiss)*
- DNA-free-Kit (*Ambion, Austin/USA*)
- DNeasy DNA-Tissue-Isolations Kit (*Qiagen GmbH, Hilden*)
- Hanks Buffered Salts *(Sigma-Aldrich, Steinheim)*
- Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077 (*PAA Labratories GmbH, Pasching/Austria)*
- $MgCL_2$ 25 mM (*Promega GmbH, Mannheim*)
- NucleoSpin®-RNA-II-Kit *(Macherey and Nagel, Düren)*
- One-Step RT-PCR Master Mix Reagent Kit *(Applied Biosystems, Weiterstadt)*
- 10x PCR-Puffer II ohne $MgCl_2$ (*Applied Biosystems, Weiterstadt)*
- RNeasy RNA-Isolations Kit (*Qiagen GmbH, Hilden*)

• SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat *(Pierce, Rockford, IL, USA)*

4.8 Reagenzien für die Transfektion

• Antisense-Oligodesoxynukleotid (*TIB Molbiol, Berlin)*
• DOSPER *(Roche Diagnostics, Mannheim)*
• DOTAP *(Roche Diagnostics, Mannheim)*
• DuoFect *(Qbiogene)*
• Fugene-6-Transfektions-Reagenz *(Roche Diagnostics, Mannheim)*
• Lipofectamin *(Gibco)*
• Lipofectin Reagenz (*Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA)*
• Opti-Mem I (*Gibco, Paisley, UK)*

4.9 Humane adulte Stammzellen

Die humanen Stammzellen, die in die Flüssigmedien zur Untersuchung der humanen Erythropoese eingebracht wurden, stammten von Patienten. Die Patienten wurden über die Verwendung aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung dazu. Ein positives Votum der Ethik-Kommission des UKSH, Campus Lübeck, (Aktenzeichen 04-088, siehe Anhang 10.1) liegt vor. Die Leukapheresen wurden im Rahmen einer geplanten Hochdosis-Chemotherapie durchgeführt. Die Stammzellen wurden vor der Apherese mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF (10 µg/kg Körpergewicht/Tag) mobilisiert. G-CSF bewirkt eine gesteigerte Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation durch transendotheliale Migration. Nach mehrtägiger Gabe wird ein bis zu hundertfacher Anstieg an CD34+ Zellen im peripheren Blut beobachtet (94). Nach Durchschreiten des Leukozytennadirs (>1000 Leukozyten/µl) oder mindestens 10 CD34+ Zellen/µl wurden die hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut durch eine Stammzellapherese mit einem Amicus Zellseparator der Firma Baxter, Geräteeinstellungen laut Hersteller, gewonnen. Der Zellseparator trennt das Vollblut auf Grund unterschiedlicher Dichte in seine Bestandteile auf. Die hämatopoetischen Stammzellen

befinden sich innerhalb der mononukleären Zellfraktion und wurden gesammelt. Ein kleiner, überschüssiger Anteil dieser Zellen wurde zu Forschungszwecken verwandt. Die anderen Blutbestandteile erhält der Patient zurück. Um die mononukleären Zellen des Leukapherese produktes zu isolieren, wurde anschließend eine Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei 400 g durchgeführt (Seromed Biochrome).

4.10 Zelllinien

- Huh-7-Zellen *(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England)*
- Kg1a-Zellen *(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England)*
- K562-Zellen *(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England)*

5 METHODEN

5.1 Zellkulturtechniken

5.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien durchgeführt. Die Kultivierung fand in geeigneten Schalen oder Flaschen bei 37°C und 5% CO_2 in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre statt. Je nach Wachstumsverhalten wurden die Zellen zweimal wöchentlich im Verhätnis 1:2 bis 1:20 in frisches Medium umgesetzt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Kultivierung der verschiedenen Zelllinien.

Zelllinie	Kulturmedium	Wachstum	Mediumwechsel
KG1a	IMDM + 20% FCS + 1% Pen-Strep + 1% L-Glut	Suspension	2mal wöchentlich 1:10
K562	RPMI + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 1% L-Glut	Suspension	2mal wöchentlich 1:20
Huh-7	DMEM + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 1% L-Glut	Monolayer	2mal wöchentlich 1:2 – 1:5

Die adhärent wachsenden Leberkarzinomzellen Huh-7 wurden nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers durch Behandlung mit Trypsin-EDTA 0,25% (10ml/175ml Zellkultur-Flasche) von der Unterlage der Zellkulturflasche gelöst. Trypsin gehört in die Gruppe der Proteasen und führt zur Hydrolyse von Adhäsionsproteinen. Der enzymatische Verdau wurde nach 5-10 min bei 37°C und 5% CO_2 durch Zugabe von DMEM gestoppt. Die Zellen wurden bei RT für 10 min bei 300 × g gewaschen und in 10ml Kulturmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 1% L-Glutamin) resuspendiert und in der entsprechenden Verdünnung in eine frische Zellkulturflasche überführt.

Die Suspensionszelllinien KG1a und K562 wurden gut gemischt und 2,5 ml bzw. 5 ml davon in eine frische Kulturflasche überführt und mit entsprechendem Medium ad 30 ml aufgefüllt. Unter dem Mikroskop wurde die Zelldichte überprüft.

5.1.2 Aussaat von Zellen

Für Transfektionsversuche wurde die Zellzahl der Huh-7 Zellen mit Hilfe des automatischen Zellzählers (Coulter-Counter) bestimmt, 5×10^5 Zellen in jede Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und die Zellen 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Die Suspensionszellen wurden während der Transfektion in Kulturmedium ohne Zusatz von Pen-Strep kultiviert.

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (FCS mit Zusatz von 10% DMSO) in geeignete Kryoröhrchen aliquotiert. Um eine mögliche Kristallbildung während des Einfriervorgangs zu verhindern und eine gleichmäßige Abkühlung von ca. 1°C/min zu erreichen, wurden die Aliquots zunächst für mindestens 24 Stunden in einer Styroporbox bei –80°C gelagert und erst anschließend in flüssigem Stickstoff asserviert. Die eingefrorenen Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken im 37°C Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden 5 ml FCS tropfenweise dazugegeben und die Zellen 10 min bei 300 × g gewaschen, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Das Pellet wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 15 ml Zellkulturflasche überführt.

5.2 Isolierung von humanen CD34-positiven Zellen

Die CD34-positiven Stammzellen befinden sich innerhalb der mononukleären Zellfraktion des Stammzellproduktes. Um diese Zellen zu isolieren, wurde eine Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation (Seromed Biochrome) durchgeführt. Nach einem Waschschritt mit MACS-Puffer (Phosphatpuffer mit 0,5% BSA, sterilfiltriert und nach Zugabe von 0,2 mM

EDTA 10 min entgast) erfolgte anschließend eine zweifache Positivselektion der CD34-positiven Zellen mittels einer immunmagnetischen Säule (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Bei dieser MACS-Zellaufreinigung werden die Zielzellen in einer Suspension mittels Antikörper, die spezifische Oberflächenepitope erkennen, aufgereinigt.

5.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die sehr zellreiche Stammzellprobe wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurde 20 ml Ficoll-Hypaque-Lösung (1,077 g/ml) vorgelegt und mit der gleichen Menge der verdünnten Stammzellprobe vorsichtig überschichtet. Danach wurden die Zellen für 20 min bei 600 g, 15°C ohne Bremse zentrifugiert. In der Mitte bildet sich ein weißlicher Ring, der die mononukleären Zellen (MNZ) enthält. Dieser wurde vorsichtig in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min, 300 g, 20°C, mittlere Bremse). Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in einem kleinen Volumen MACS-Puffer resuspendiert, so dass die Konzentration der MNZ ca. 3×10^8/ml beträgt. Der prozentuale Anteil der Stammzellen und die Leukozytengesamtzahl in den verschiedenen Präparaten variierte – wie zu erwarten war - stark.

5.2.2 Bestimmung der Gesamt- und CD 34-positiven Zellzahl

100 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl monoklonalem Phycoerythrin (PE)-konjugierten anti-CD34 Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) und 20 µl monoklonalem anti-CD45-PC5 Antikörper (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich), für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Beads zugegeben und die Analyse am Durchflusszytometer Coulter Epics XL mit entsprechendem Protokoll unter Verwendung der System II Software, Version 3.0 durchgeführt.

5.2.3 Magnetische Zellaufreinigung CD 34-positiver Zellen

Die CD34-Oberflächenantigene der Stammzellen wurden im ersten Schritt mit monoklonalen Antikörpern, CD34-PE Antikörper (Klon: AC136), markiert. Diese monoklonalen Antikörper sind zudem noch mit magnetischen Mikropartikeln gekoppelt. Wenn die markierten Zellen eine Auftrennungssäule durchlaufen, bleiben sie, solange ein magnetisches Feld auf sie einwirkt, an der Stahlwollmatrix der Auftrennungssäule hängen, während unmarkierte Zellen die Säule unbehindert passieren. Nach der Entfernung des Magneten können die Zielzellen von der Säule eluiert werden. Die Reinheit der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Es wurde das CD34 Progenitor Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec verwendet: 1×10^8 mononukleäre Zellen wurden mit 100 µl FcR Blocking-Reagenz und 100 µl Hapten-Antikörper gemischt und 15 min bei 6°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit MACS-Puffer gewaschen, in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert und anschließend 100 µl Anti-Hapten MicroBeads zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit MACS–Puffer gewaschen und durch ein 30 µm Zellsieb gegeben. Anschließend wurden die Zellen auf die vorher mit MACS-Puffer gespülte LS-Säule des MACS-Separators gegeben. Die Säule wurde dreimal mit Puffer gewaschen. Nach Entfernung des Magneten wurden die CD34-positiven Zellen durch Spülen der Säule mit 3 ml Puffer gewonnen. Um die Reinheit der CD34-positiven Zellen zu erhöhen, wurde die immunmagnetische Aufreinigung wiederholt. Die Reinheit der CD34-positiven Zellen wurde am Durchflusszytometer bestimmt.

5.3 Kultur von humanen hämatopoetischen Stammzellen

Die aufgereinigten CD34+ Zellen wurden durchflusszytometrisch quantifiziert, auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und in zwei unterschiedliche Flüssigkultursysteme für 16 Tage (2-Phasen Modell) oder für 21 Tage (3-Phasen Modell) bei 37°C unter 5% CO_2 in Sechs-Loch-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit jeweils 2 ml befüllt, kultiviert. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert und in der Regel alle 2-3 Tage erneut durchflusszytometrisch quantifiziert und erneut auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml

eingestellt, indem ein partieller Austausch von entsprechendem Medium vorgenommen wurde.

5.3.1 2-Phasenmodell zur Erythropoese

Dem Medium Dulbecco´s modified Eagle´s Medium (DMEM, BioWhittaker, Wakersville, USA) wird folgendes zugesetzt: 15% FCS, 1% BSA (Fluka Biochemica, Buchs, CH), 15% destilliertes Wasser, 1,9 mM Natriumbicarbonat, 10^{-4} mol/l β-Merkaptoethanol, 128 µg/ml Eisen gesättigtes Transferrin (alles von Sigma, München), 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin.
Dieses Basismedium wurde für Tag 1 bis Tag 8 supplementiert mit folgenden Wachstumsfaktoren und Zusätzen: 1 IU/ml recombinanten humanen EPO (rhEPO) (R&D Systems, Wiesbaden), 100 ng/ml SCF (Strathmann Biotec, Hamburg), 40 ng/ml long-R^3 insulin-like growth factor-1 (IGF-1), 10^{-6} mol/l Dexamethason und 10^{-6} mol/l β-Östradiol (alles von Sigma) (Proliferationsmedium).
Von Tag 9 bis Tag 16 wurde diesem Medium nur noch 1 IU/ml rhEPO and 1 µg/ml Insulin (Sigma) hinzugefügt (Differenzierungsmedium).

5.3.2 3-Phasenmodell zur Erythropoese

Es wurde das gleiche Basismedium mit folgenden Zusätzen verwendet:
Von Tag 1 bis Tag 7 wurde das Medium mit 100 ng/ml SCF, 50 ng/ml humaner Flt3-Ligand (Flt3-L) (Strathmann Biotec), 100 ng/ml Thrombopoetin (TPO) (Strathmann Biotec) and 100 µg/ml Insulin (Sigma) supplementiert.
Während der zweiten Phase (Tag 8 bis Tag 14) wurde dem Medium erstmalig EPO in einer Konzentration von 3 IU/ml aber auch 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml IGF-1 (Sigma) und 100 µg/ml Insulin zugegeben.
Von Tag 15 bis Tag 21 wurde nur noch 3 IU/ml rhEPO, 50 ng/ml IGF-1 and 100 µg/ml Insulin zu dem Medium hinzugefügt.

5.4 Kurzzeitkultur

Neben den Langzeitflüssigkulturen wurden die aufgereinigten Stammzellen (ohne oder mit Transfektion) in eine semisolide Kurzzeitkultur eingebracht. Hierfür wurden direkt nach der Transfektion Einzelzellsuspensionen (500 bzw. 1000 Zellen in 100 µl Medium pro Ansatz) hergestellt und in 0,9% Methyl-Zellulose mit definierten Wachstumsfaktoren (ready for use Kit: Methocult T™GF H4435) eingebracht, die ein optimales Wachstum und klonogenes Potential sowohl der erythroiden (CFU-E und BFU-E) als auch der myeloischen (CFU-GM) Vorläuferzellen gewährleisten. Die Methyl-Zellulose wurde bei RT aufgetaut, gründlich gemischt und mindestens 5 Minuten stehen gelassen, um Luftblasen zu vermeiden. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 1 ml Methyl-Zellulose umgeben und in einer 35-mm Petri-Kulturschale vermischt. Es wurden jeweils 3 Ansätze pipettiert und die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der BFU-E und CFU-GM unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

5.5 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelloberflächenmolekülen

Die Phänotypisierung der Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen am EPICS XL MCL (Beckman Coulter) durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der man verschiedene Zellpopulationen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften und Zelloberflächenmarker unterscheiden und ggf. auftrennen kann. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung verschiedener physikalischer und biologischer Eigenschaften einzelner Zellen. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom perlschnurartig hintereinander angeordnet und einzeln mittels eines Argonlaserstrahls analysiert. Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften können Zellgröße und Granularität für eine große Anzahl von Einzelzellen bestimmt werden. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (FSC = forward light scatter) ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl abgelenkte Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) wird durch intrazelluläre Bestandteile wie die Zellgranularität und das Kern/Zytoplasma-Verhältnis beeinflusst. Nach Anfärbung der exprimierten Antigene mittels Antikörpern, die einen fluorochromen Farbstoff tragen oder durch Expression fluoreszierender Proteine (z.B. green fluorescent protein)

können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Emittierung von unterschiedlichen Fluoreszenzen angeregt werden. Oberflächenproteine können auch mit einem Primärantikörper erkannt und mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper detektiert werden. Die Detektion der Oberflächenmarker erfolgte simultan mittels dreier Fluoreszenzkanäle. Die verwendeten Fluorochrome (Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Cytochrom 5 (CY5)) werden durch den Argonlaser bei 488nm angeregt und emittieren das Fluoreszenzlicht bei unterschiedlicher Wellenlänge (525, 575 und 650nm). Mittels eines optischen Detektionssystems werden die erzeugten Emissionen erfasst, amplifiziert und in elektrische Signale konvertiert an einen Rechner weitergeleitet. Die Verstärkung und Kompensation der einzelnen Fluochrome erfolgte analog zu den Herstellerangaben und auf Basis von Kompensationsprotokollen. Die Höhe der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Antigendichte auf der Zelle und abhängig von der Protein/Fluorochrom-Ratio des verwendeten Antikörpers.

5.5.1 Zellzahlbestimmung am FACS

Um die isolierten Stammzellen nach der Aufreinigung zu quantifizieren und die Reinheit zu bestimmen, wurden die Suspensionszellen vor der Messung zunächst gut gemischt. 100 µl Zellsuspension wurden dann mit 10 µl monoklonalen PE-konjugiertem anti-CD34 Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) und 10 µl monoklonalen FITC-konjugiertem anti-CD45 Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden 100 µl Beads (vorher ebenfalls sehr gut gemischt) zugegeben. Die Beads-Zellsuspension wurde gründlich gemischt und nach Zugabe von PBS sofort am FACS gemessen.

Das verwendete „Flow count“ Protokoll wurde vorher auf die entsprechenden Angaben des Herstellers abgeglichen, um eine exakte Messung vornehmen zu können. Die Reinheit der CD34-positiven Zellen wurde mit entsprechender Kompensation ausgewertet. Das Auswertefenster in einem linearen Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Diagramm wurde so positioniert, dass Zelldebris ausgeschlossen war.

5.5.2 Immunphänotypisierung der erythropoetischen Zellentwicklung

Um die unterschiedlichen Stadien der erythropoetischen Zellentwicklung in den Flüssigkulturen beurteilen zu können, wurden co-exprimierte weitere Oberflächenantigenen während der Kultivierung analysiert.

Es wurden 1×10^5 Zellen in 100 µl Zellsuspension 15 Min bei RT im Dunkeln mit 10 µl monoklonalen PE markierten anti-human Glycophorin A (GPA) Antikörper, 10 µl monoklonalen FITC-konjugiertem CD36 Antikörper und 10 µl monoklonalem anti-CD45 Antikörper markiert mit dem Tandem Farbstoff PE-Cytochrome 5 (alle von Beckman Coulter, Krefeld) inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS gewaschen und in einem geringen Volumen PBS (0,5 ml) resuspendiert und bei der anschließenden Messung am Coulter Epics XL unter Verwendung eines 3-Farbenprotokolls mit entsprechender Kompensation ausgewertet. Das Auswertefenster in einem linearen Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Diagramm wurde ebenfalls so festgelegt, dass Zelldebris von der Analyse ausgeschlossen war.

5.6 Morphologische Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung

5.6.1 Färbungen

Von den kultivierten humanen Stammzellen wurden regelmäßig Aliquots entnommen. Zur Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung wurden ca. 100.000 Zellen auf einen Glasobjektträger in einer Zytozentrifuge 10 Min bei 500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit May Grünwald-Giemsa (Diff-Quick® Fix von Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) gefärbt.

Die Quantifizierung und morphologische Beurteilung der erythroiden Reifestufen erfolgte an einem Lichtmikroskop (Leica) mit 100facher Vergrößerung. Auf jedem Objektträger wurden 200 Zellen morphologisch beurteilt und den unterschiedlichen Reifestadien der Hämatopoese (Stammzelle, Proerythroblast, basophiler und polychromatischer Erythroblast, Normoblast, Retikulozyt und nicht-erythroide Zelle) zugeordnet.

5.6.2 Messung der Vitalität

Zur Beurteilung der Vitalität wurden von den kultivierten humanen Stammzellen 10 µl Aliquots entnommen und mit Trypanblau (Sigma) im Verhältnis 1:1 gemischt. 10 µl der Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer anschließend sofort analysiert. Man kann so die Zellkonzentration und den Anteil vitaler Zellen quantifizieren.

5.7 „Small interfering RNA“ (siRNA)

Als RNA-Interferenz wird der durch siRNA induzierte Abbau von spezifischen mRNA bezeichnet, gegen welche die siRNA gerichtet sind. Die siRNA Moleküle sind 21 bis 23 Nukleotide lange RNA-Duplices mit 5´Phosphat- und 3´Hydroxylenden. Sie binden an komplementäre mRNA und führen zu deren Abbau. Synthetisch hergestellte siRNA dienen zur gezielten Herunterregulierung der Expression bestimmter Gene („Gene Silencing“) und können z.B. via Transfektion in die Zielzellen befördert werden.

5.7.1 siRNA zur spezifischen Hemmung von ADAR1-S und –L

Die siRNA wurde von IBA Nucleic Acids Synthesis GmbH (Göttingen) bezogen. Die siControl RNA (co-siRNA) ist eine nicht funktionale siRNA. Die Sequenzen der siRNA lauten:

- siADAR1 top strand, 5´-CCAGCACAGCGGAGUGGUAUUdTdT-3`; bottom strand, 5`-UACCACUCCGCUGUGCUGGUUdTdT-3`
- siControl top strand, 5`-CGCGUAGAAGAUGAAGUUGdTdT-3`; bottom strand, 5`-CAACUUCAUCUUCUACGCGdTdT-3`

5.8 Transfektion

Transfektion ist die Bezeichnung für das Einschleusen fremder Nukleinsäure in Zellen. Humane CD34+ Stammzellen und die Suspensionszelllinie K562 wurden einer transienten

Transfektion mit siRNA unterzogen, um auf diese Weise eine Herunterregulierung der ADAR1-Proteinexpression zu erreichen. Es wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden erprobt: Liposomale Reagenzien (DOTAP, Lipofectamin), via Transferrinrezeptor (DuoFect) und Nucleofection (Amaxa).

5.8.1 Liposomen vermittelte Transfektion (DOTAP, Lipofectamin)

Positiv geladene Liposomen interagieren mit den negativ geladenen Phosphaten der Nukleinsäure und Nukleinsäure-Liposomen-Komplexe werden endozytiert. Die Transfektion mit den liposomalen Reagenzien Lipofectamin (Gibco) und DOTAP (Roche) wurden nach Herstellerangabe in einer 6-Loch-Platte (Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Humane CD34+ hämatopoetische Stammzellen wurden vor der Transfektion für mindestens 1 Stunde bei 37°C, 5% CO_2 in IMDM Medium ohne Pen/Strep mit 10% FCS und 1% L-Glutamin in einer Konzentraton von 3×10^5 Zellen/ml vorinkubiert.
DOTAP: Lösung A: 1 µg Oligonukleotide bzw. siRNA, ad 10 µl HBS-Puffer. Lösung B: 5 µl DOTAP, ad 20 µl HBS-Puffer. Lösung A und B wurden gemischt und 15 Minuten im Dunkeln bei RT vorinkubiert. Die Mischung wurde tropfenweise zu den Zellen pipettiert und 3 Stunden lang bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde das Medium wieder gegen Vollmedium (siehe 2-Phasen und 3-Phasenmodell zur Erythropoese) ersetzt.

5.8.2 Transfektion via Transferrinrezeptor (DuoFect™)

Die Transfektion von Zellen mit DuoFect (Qbiogene) beruht auf der Bindung von DNA an Transferrin und anschließender Endozytose über den Transferrinrezeptor. Die an Polyethylenimine gekoppelten Transferrinmoleküle sind so modifiziert, dass sie DNA binden und dann über den Transferrinrezeptor der Zelle endozytiert werden. In den Endosomen wirken die Polyethylenimine als Protonenschwamm und führen zur Freisetzung der DNA. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangabe.

5.8.3 Transfektion mittels Nukleofection (Amaxa)

Die Zelllinie K562 wurde mittels Elektroporation mit der siRNA bzw. dem Kontroll-Plasmid transfiziert. Es wurde das Nucleofector-Kit V (Amaxa Biosystems, Köln) mit dem Nucleofector-Elektroporationsgerät verwendet. Für die Transfektion wurden 2×10^6 Zellen mit 100 µl Nucleofector-Reagenz (0,5 ml Supplement und 2,25 ml Nucleofector-Lösung) gemischt und 2 µl 100 µM siRNA bzw. Co-siRNA zugefügt. Dieser Ansatz wurde in eine Küvette gefüllt und in das Nucleofector-Gerät eingesetzt. Die Transfektion erfolgte mit dem Programm T-16. Danach wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium (Cambrex BioScience, Verviers, Belgium) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin and 1% L-Glutamin kultiviert (alles von PAA Laboratories).
Humane CD34+ Stammzellen wurden ebenfalls mittels Elektroporation mit der siRNA bzw. dem Kontroll-Plasmid transfiziert. Es wurde das Human-CD34-Cell-Nucleofector-Kit (Amaxa Biosystems, Köln) mit dem Nucleofector-Elektroporationsgerät verwendet. Für die Transfektion wurden 3×10^6 CD34+ Zellen mit 100 µl Human-CD34-Cell Nucleofector-Reagenz (0,5 ml Supplement und 2,25 ml Nucleofector-Lösung) gemischt und 2 µl 100 µM siRNA zugefügt. Die Transfektion erfolgte mit dem Programm U-08. Danach wurden die Zellen in den oben beschriebenen Flüssigzellkulturen der humanen Erythropoese kultiviert.
Die Zelllinie K562 und die humanen CD34+ Zellen wurden ebenfalls mit dem Plasmid pmaxGFP (Amaxa Biosystems) transfiziert. Das Plasmid pmaxGFP enthält ein grünes Fluoreszenz Markerprotein, welches bei erfolgreicher Transfektion in der Zelle angeschaltet wird und so am Fluoreszenzmikroskopie oder FACS zur Ermittlung der Transfektionseffizienz verwendet wurde.

5.9 Nukleinsäure-Standardtechniken

5.9.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

Um einen Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen) zu vermeiden, wurden grundsätzlich nur Rnase-freie Materialien verwendet, hitzestabile Geräte und Lösungen autoklaviert (20 Minuten, 121°C) und hitzelabile Lösungen sterilfiltriert

eingesetzt. Die Arbeitsschritte wurden fast durchweg unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, wobei ständig Einweghandschuhe getragen wurden.

Die Isolierung der Gesamt-RNA der Zelllinie K562 und der mit siRNA transfizierten humanen Stamm- und Vorläuferzellen erfolgte laut Herstellerangabe mit dem NucleoSpin®-RNA-II-Kit (Macherey and Nagel, Düren). Die Zellen wurden herunterzentrifugiert. Zu dem Pellet wurde 350 µl RA1-Puffer unter Zusatz von 3,5 µl Merkaptoethanol hinzupipettiert. Das Zelllysat wurde auf die Probenröhrchen mit Nucleo-Spin-Filter aufgetragen. Diese Röhrchen wurden für 1 Minute bei 11.000 × g zentrifugiert. Zum gefilterten Lysat wurde 350 µl 70% Ethanol zugegeben und alles auf eine Nucleospin-RNA-II-Säule gegeben. Die Säule wurde 30 Sekunden bei 8000 × g zentrifugiert und dann mit 350 µl Membran-Entsalzungspuffer beladen und für weitere 60 Sekunden bei 11.000 × g zentrifugiert. Zur Degradation von genomischer DNA wurde 95 µl DNAse-Reaktionspuffer für 15 Minuten auf jede Säule gegeben. Es folgten mehrere Waschschritte: Zunächst mit Puffer RA2 und zwei weitere Waschschritte mit Puffer RA3. Um die an die Säule gebundene RNA zu eluieren, wurde jede Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-Tube) gestellt und 60 µl RNase-freies Aqua dest. auf die Säule gegeben. Die Zentrifugation wurde bei 11.000 × g für 1 Minute durchgeführt. Die Konzentration der eluierten RNA wurde anschließend sofort photometrisch bestimmt und die RNA bei –70°C gelagert.

5.9.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen wurde photometrisch am Spektralphotometer Hitachi U-3000 (Hitachi, Bremen) in Quarzküvetten durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Für eine OD260 von 1 wurden die Referenzkonzentrationen von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 40 µg/ml für RNA zugrunde gelegt (82). Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu g/ml) = \text{OD } (260nm) \times 40\ \mu g/ml \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

5.10 real-time RT-PCR

Die PCR ermöglicht es, eine bestimmte DNA-Sequenz in-vitro enzymatisch zu vervielfältigen. Es werden kurze DNA-Oligonukleotide, sogenannte Primer verwendet, die komplementär zu den Anfangs- und Endbereichen der Zielsequenz sind. Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert diese Oligonukleotide. Es folgen wiederholende Zyklen von thermischer Denaturierung der dsDNA in Einzelstränge, erneuter Primeranlagerung und DNA-Synthese. Es wird eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht.
Durch die Einführung der real-time RT (Reverse Transkriptase)-PCR (53) unter Einsatz fluorogener Oligonukleotid-Sonden, ist die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan möglich. Die Methode kann zur Quantifizierung von DNA oder RNA in Lösung verwendet werden. Dazu wird der Abbau einer fluorogenen Sonde gemessen. Eine fluorogene Sonde besteht aus 15 bis 30 Nukleotiden und ist an ihrem 5´-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (z.B. 6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und an ihrem 3´-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethylrhodamin, TAMRA) und blockierendem Phosphatrest markiert. Durch die räumliche Nähe zum Quencher wird bei der intakten Sonde trotz Anregung des Reporter-Farbstoffes die Fluoreszenz unterdrückt. Durch die 5´-3´-Exonuklease Aktivität der Ampli Taq Polymerase wird die hybridisierte Sonde geschnitten und die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter wird unterbrochen. Nicht-hybridisierte Sonden werden nicht geschnitten. Entsprechend der Zunahme der Konzentration des PCR-Produktes steigt proportional die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs mit jedem PCR-Zyklus an. Das gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch. Die Veränderungen der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe werden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Weiterstadt) im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

5.10.1 real-time RT-PCR zur relativen Quantifizierung von ADAR1-S und –L

Zur Quantifizierung der ADAR1-S und ADAR1-L mRNA-Expression in der Zelllinie K562, in humanen CD34+ Stammzellen und erythrozytären Vorläuferzellen wurde eine RT-PCR mit dem TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagenz Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenz der Primer und Sonden wurde mittels der Software „Primer Express“ von

Applied Biosystems ermittelt. Eine zusätzlich mitgeführte endogene Kontrolle (humane Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase mRNA, GAPDH) diente zur Normalisierung des ADAR1-Signals. Alle verwendeten Primer und Sonden wurden von TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert. Tabelle 3 zeigt die Sequenzen der Primer und Sonden der real-time-RT-PCR zur Quantifizierung von ADAR1-S+L. Tabelle 4 gibt an, was je Reaktionsgefäß für die RT-PCR pipettiert wurde (auf Eis).

Tabelle 3 : Sequenzen der Primer und Sonden zur Quantifizierung von ADAR1-S+L

	Sequenz von 5`zu 3`
ADAR1-S Vorwärts-Primer	GGCAGCCTCCGGGTG
ADAR1-S Rückwärts-Primer	CTGTCTGTGCTCATAGCCTTGA
ADAR1-S-Sonde	FAM-CCGGCCGTGTCCCGAGGA-TAMRA

Tabelle 4 : RT-PCR Reaktionsansatz

2 × Master Mix	25 µl
40 × Multiscribe Reagenz	1,25 µl
5 µM ADAR1-S Vorwärts-Primer	2 µl
5 µM ADAR1-S Rückwärts-Primer	4 µl
Sonde ADAR1-S-Sonde	0,4 µl
20 × GAPDH-Reagenz	1 µl
Wasser (RNasefrei)	14,35 µl

Anschließend wurde jedem Ansatz 200 ng Gesamt-RNA, mit Rnasefreiem Aqua dest. ad 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, zugefügt. Alle Proben wurden im Doppelansatz pipettiert und es wurde eine negative Kontrolle (alle Substanzen mit Ausnahme von RNA) mitgeführt, die Kontamination der Reagenzien mit RNA oder DNA anzeigt.

Die RT-PCR wurde bei folgender Temperatur- und Zeitsteuerung durchgeführt:

- 30 min bei 48°C für die reverse Transkription zur cDNA Synthese
- 10 min bei 95°C zur Denaturierung der cDNA
- 40 Zyklen mit jeweils 15 sek bei 95°C und 1 min bei 60°C zur DNA Amplifikation

Nach Beendigung der PCR kann die Software des ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems die Amplifikationskinetik jedes Reaktionsansatzes gegen die Hintergrundfluoreszenz eines Leerwertes (alle Reagenzien ohne RNA) errechnen. Es ergeben sich Kurven, die aus einer Basislinie (entspricht der Hintergrundfluoreszenz des Leerwertes), einer exponentiellen (maximale Amplifikation unter optimalen Bedingungen) und einer Plateauphase bestehen. Aus den gesammelten Daten der Fluoreszenzmessungen wurde der „Threshold Cycle“ (Ct) jeder Probe berechnet. Der Ct-Wert gibt den PCR-Cyclus an, bei dem das Fluoreszenzsignal der Probe signifikant die Basislinie übersteigt. Die relative ADAR1S und –L mRNA Expression der Proben wurde dann mit derΔΔCt-Methode berechnet. Dazu wird zunächst die ADAR1-Expression der Probe auf die Expression der konstant exprimierten GAPDH-mRNA derselben Probe normalisiert ($\Delta Ct = Ct_{\text{ADAR1s und-L}} - Ct_{\text{GAPDH}}$). Anschließend wird die normalisierte ADAR1 mRNA Expression der Probe relativ zur mRNA Expression eines Kalibrators angegeben ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}}$). Der Kalibrator kann eine andere Probe aus dem Versuch sein, beispielsweise Proben, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Den mRNA-Expressionsunterschied kann man dann unter Verwendung der Formel: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnen (56).

5.11 cDNA Umschreibung und spezifische PCR

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus den humanen CD34+ Stammzellen und den erythrozytären Vorläuferzellen wurde diese RNA zur Durchführung von spezifischen PCR Reaktionen zunächst mittels einer Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren:

- 1 µg RNA + 1 µl Oligo dT15 Primer (Fa. Promega) ad 10 µl a. dest.
- Der Ansatz wird 5 Minuten bei 70°C inkubiert
- Anschließend Zugabe von 4 µl M-MLV RT 5 × Puffer + 2 µl dNTPs 10 mM (Applied Biosystems) + 2,3 µl DTT (0,1%) + 0,7 µl Rnasin (40 U/µl) (Promega) + 1 µl M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl, Promega)
- Der Ansatz wird 60 Minuten bei 37°C und anschließend 5 Minuten bei 90°C inkubiert. Die cDNA wird bei –20°C gelagert.

Spezifische RT-PCR:

Zur Durchführung einer spezifischen RT-PCR wurde pro Ansatz 1 µl cDNA verwendet und dazu wurde zugefügt: 2 µl 10 × Taq Puffer mit 1,5 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems) + 0,40 µl dNTPs 10 mM (jeweils 2,5 mM)(Applied Biosystems) + 0,20 µl je Primer (100 µM) + 0,15 µl Taq Polymerase (Taq Gold, Applied Biosystems) + 0,60 µl DMSO (100%, Q Biogene) ad 20 µl a. dest. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 95°C inkubiert und dann in variablen Zyklenzahlen die PCR durchgeführt: 45 Sekunden 95°C, 30 Sekunden 50-63°C (Primerspezifische Annealingtemperatur), 30 Sekunden 72°C inkubiert. Am Ende der PCR wurde der Ansatz 10 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend bei 4°C gehalten. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primersequenzen, die entsprechende Annealingtemperatur, durchgeführte Zyklenzahl und die zu erwartende Produktgröße der untersuchten Gene.

Tabelle 5: Übersicht über die untersuchten Gene und die wichtigsten PCR-Kenngrößen

Gen	Primersequenz	Annealingtemp.	Zyklenzahl	Produktgröße
BCL-XL	GTCAGTTTAGTGATGTGGAA GCCAGCGGTTGAAGCGTTCC	60	23	566 bp
GATA-1	TCAATTCAGCAGCCTATTCC TTCGAGTCTGAATACCATCC	60	23	378 bp
GATA-2	TGTTGTGCAAATTGTCAGAC GCTTCTCCTGCATGCACTTTG A	60	25	231 bp
EPO-R	GGACCCCAAGTTCGAGAGCA GCTGTAGGCAGCGAACACCA	64	28	243 bp
TNF-α	Biomol		33	181 bp
TNFRSF 1A	Biomol		30	171 bp
TNFR2	TGCGTTGGACAGAAGGGCGC CTCAGCCCACCTTGGCTACG	65	25	420 bp
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC GGGATCTAGACGGCAGGTCA GGTCCACC	63	20	577 bp

Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze mit Gel-Ladepuffer im Verhältnis 6:1 gemischt und anschließend auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetragen (1 g Agarose NA mit 99 ml 1 × TBE – Puffer mischen, in der Mikrowelle aufkochen und in die Gel-Schlitten gießen. Nach dem Erstarren können die Gele bis zur Verwendung im Kühlschrank aufgehoben werden). Die Laufzeit des Gels betrug bei einer Spannung von 90 Volt ca. 30 Minuten. Die spezifischen

DNA-Banden waren nach einem ca. 20 minütigen Ethidiumbromidbad unter UV-Licht sichtbar, weil das Ethidiumbromid in wässriger Lösung mit der DNA interkaliert und dann durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 500-590 nm angeregt werden kann. Die GAPDH-Bande diente als Standard und zeigt an, dass gleiche cDNA Konzentrationen verwendet wurden.

5.12 Proteinanalysen

5.12.1 Herstellung von Kernproteinextrakten

Zur Herstellung von Kernproteinextrakten wurde ein Minimum von 5×10^6 humanen Zellen aus den Flüssigkulturen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit kalter PBS-Lösung gewaschen (10 Minuten, 300 g, 20°C, mittlere Bremse) und in 500 µl Extraktionspuffer I (20 mM HEPES (Gibco BRL, Paisley, England), 0,1 mM EDTA (Sigma, Steinheim), 0,5 mM Pefa Block (Biomol, Hamburg), 1 mM Dihiothreitol (DTT) (Merck, Darmstadt), 10 mM KCl resuspendiert. Nach 15 Minuten auf Eis wurden die Zellen durch Zugabe von 30 µl 10% NP-40 (Merck) für 15 Sekunden lysiert und zentrifugiert (13.000 g). Der Überstand wurde verworfen. Die Kerne im Zellpellet wurden durch die Zugabe von 50 µl Extraktionspuffer II (Extraktionspuffer I + 400 mM NaCl) lysiert.
Nach 15 Minuten auf Eis, wurden die Proben bei 13.000 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Gesamt-Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

5.12.2 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration

Die Gesamt-Proteinkonzentration wurde mittels Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm in Quarzküvetten am Hitachi U3000-Spektralphotometer bestimmt. Die Proben wurden 1:10 mit 0,9%-iger NaCl-Lösung verdünnt und gegen einen Leerwert (100 µl 0,9%-ige NaCl-Lösung) gemessen. Die Messung ist zwischen den Extinktionswerten 0,1 bis 1,4 linear. Nach folgender Formel konnte dann die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgen:

$$\text{Konzentration (mg/ml)} = OD_{280nm} \times 1{,}55 - OD_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Des Weiteren wurde die Gesamt-Proteinkonzentration mit dem Bradford-Proteinassay von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, München) bestimmt. Das Testprinzip beruht darauf, dass sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 von 465 nm bei Bindung an Proteine auf 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Das BioRad Färbereagens (enthält: Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure) wurde laut Herstellerangabe 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Zur Probenlösung wurde davon 1 ml hinzugegeben und nach 10 Minuten bei RT wurde die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Als Referenz diente 1 ml verdünntes Färbereagens.

5.12.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (96). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (β-Merkaptoethanol oder DTT) aufgespalten. Der SDS-Protein Komplex wandert im elektrischen Feld zum Pluspol.

Durchgeführt wurde die SDS-PAGE mit ExcelGel® SDS Homogenous 7,5%igen Gelen PAGE (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) auf einer Multiphor II® Elektrophorese-Einheit. Der Separationsumfang beträgt für die 7,5%-igen Gele 20 bis 300 kDa. Jede Probe wurde mit reduzierendem Laemmli-Probenpuffer (mit Merkaptophenol) im Verhältnis 1:5 verdünnt und für 5 Min bei 95°C erhitzt (50). Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach

Herstellerangaben. Als Protein-Größenstandard wurde der Rainbow-Längenstandard (10.000-250.000 kDa, Fa. Amersham) mitgeführt. Die Laufzeit betrug bei 600 Volt, 50 mA, 30 Watt, 15°C zwei Stunden.

5.13 Western Blotting und Detektion

Beim Western Blotting (99) werden die elektophoretisch aufgetrennten Proteingemische vom Gel der SDS-PAGE auf eine Zellulosenitrat-Membran transferiert. Mittels einer Blotting-Apparatur werden die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung vom Gel auf die Membran übertragen. Anschließend werden die Zielproteine auf der Membran mit spezifischen Antikörpern detektiert.

5.13.1 Western Blotting zum Nachweis von ADAR1-Enzymen

Man benötigt folgende Puffer:

- Anodenpuffer I : 3,63 g Trisaminomethan (Merck), 200 ml Methanol (Merck) mit Aqua dest. ad 1000 ml
- Anodenpuffer II: 36,3 g Trisaminomethan (Merck), 200 ml Methanol (Merck) mit Aqua dest. ad 1000 ml
- Kathodenpuffer: 3,03 g Trisaminomethan, 5,25 g Aminohexansäure (Merck), 200 ml Methanol, 1 ml 10% SDS, mit Aqua dest. ad 1000 ml

Die Zellulosenitrat-Membran (0,2 µm, Fa. Schleicher & Schnell, Dassel) wurde mit Anodenpuffer I befeuchtet. Nach Beendigung der Proteinelektrophorese wurde das SDS-Gel auf die feuchte Zellulosenitrat-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Zellulosenitrat-Membran wurden 4 Filterpapierstreifen, die mit Anodenpuffer I getränkt sind, und 4 Filterpapierstreifen, die mit Anodenpuffer II getränkt sind, gelegt. Das SDS-Gel wurde mit 4 Filterpapierstreifen, die mit dem Kathodenpuffer befeuchtet sind, bedeckt. Die vorbereitete Membran mit dem Polyacrylamidgel wurde auf die Graphitelektrode gelegt. Es wurde eine

Blotting-Apparatur der Firma Bio-Rad verwendet, die nach Herstellerangabe bedient wurde. Der Blotaufbau geschah nach dem Schema in Abbildung 6.

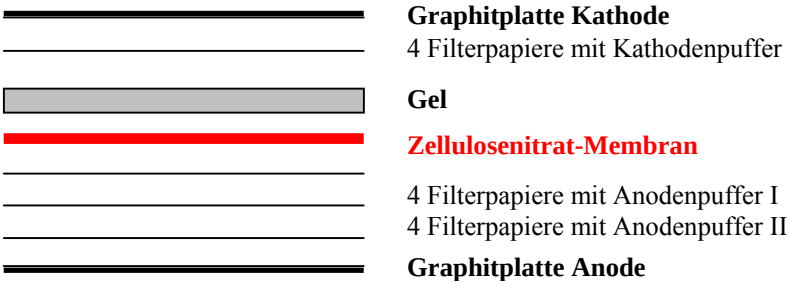

Abb. 6: Blotting Apparatur. *Schematischer Aufbau der ADAR1 Blotting Apparatur*

Der Transfer für ein Gel (250 × 110 × 0,5 mm) wurde bei 145 mA und 1 Watt für 60 Minuten bei RT in der Blot-Apparatur durchgeführt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau S-Lösung für 5 bis 10 Minuten gefärbt. Zur Herstellung der Ponceau S-Lösung wurden 0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure gelöst. Nach Ponceaufärbung der Membran wurde der Hintergrund mit 15%-iger Essigsäure entfärbt. Nach Kontrolle der Proteinbanden wurde die Membran mit Anodenpuffer II (36,3 g Trisaminomethan, 200 ml Methanol (Merck) mit Aqua dest. ad 1000 ml) vollständig entfärbt.

Vor der Inkubation mit dem ADAR1-Antikörper wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation bei RT (oder über Nacht bei 2-8°C) mit einer 3%-igen BSA und 0,5% Tween20 in PBS-Puffer blockiert. Die Blockierlösung wurde entfernt und es folgte für eine weitere Stunde, unter leichtem Schütteln, die Zugabe des verdünnten Erstantikörpers „Poly Fast™ Rabbit anti-ADAR1" (Zymed, München) in 1%-iger BSA/PBS/Tween20-Lösung in einer Konzentration von 40 ng/ml. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten mit Waschpuffer (5 ml 10% Tween20 in 1000 ml PBS-Puffer) gewaschen. Es folgte die einstündige Inkubation mit dem verdünnten Zweitantikörper „horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody" (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in 1%-iger BSA/PBS/Tween20-Lösung in einer Konzentration von 16 ng/ml. Die Membran wurde dann erneut dreimal für 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Dann erfolgte die Darstellung der Banden mit dem SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat (Pierce, Rockford, IL, USA). Zur

Entwicklung der Chemilumineszenz wurde die Membran mit der Substrat-Lösung der Peroxidase bedeckt (5 ml Peroxidase Lösung und 5 ml Luminol/Enhancer Lösung, frisch angesetzt) und 5 Minuten darin inkubiert. Die Substratlösung wurde vorsichtig abgetupft und die Membran luftblasenfrei in eine Plastikhülle eingebracht und in einer Filmkassette plaziert. Im Fotolabor wurden unter Rotlicht verschiedene Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten (10 Sekunden, 30 Sekunden, 1 Minute, 5 Minuten) auf die Membran aufgelegt und die Filme unmittelbar nach der Exposition entwickelt.

5.13.2 Western Blotting zum Nachweis von Aktin

Das vollständige Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“) von einer Westernblot-Membran ermöglicht ein mehrmaliges Detektieren von Antigenen („Reprobing“). Um nachzuweisen, dass identische Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden, wurde anschließend die Aktinbande gefärbt. Dazu wurde die Membran nach dem Nachweis der ADAR1-Enzymen „gestrippt“, d. h. die Antikörper wurden entfernt, indem man die Membran mit 20mM Glyzin-Puffer (pH 2.5) (Merck), der 1% SDS und 5 mM DTT enthält, für dreimal 2 Minuten bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal 2 Minuten mit PBS gespült und dann erneut geblockt (s.o.). Das Aktin wurde durch Zugabe des verdünnten Erstantikörpers („anti-actin rabbit polyclonal IgG antibody“ (I-19), Santa Cruz) in 1%-iger BSA/PBS/Tween20-Lösung in einer Konzentration von 40 ng gefärbt. Es folgten erneute Waschschritte und Inkubation mit dem verdünnten Zweitantikörper (16 ng/ml „horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody“) und die Darstellung der Aktinbanden mit dem „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ (Pierce, Rockford, IL, USA) (s.o.). Anschließend wurde die Membran mit Aqua dest. gespült und luftgetrocknet.

5.14 Genexpressionsanalysen

Zur Untersuchung der Genexpressionsaktivität in humanen erythropoetischen Zellen wurde ein orientierender GEN-Array der Firma SuperArray (Biomol) mit einer Auswahl repräsentativer Gene verwendet, die an der Regulation pro- und antiapoptotischer

Mechanismen beteiligt sind (GEArray Q series Human Apoptosis Gene Array Kit). Es befinden sich 96 DNA-Fragmente von Genen, die zur Apoptose beitragen und 13 Kontrollen auf der GEArray-Nylonmembran (Anhang 10.2). Die mRNA der untersuchten Zellen entspricht den aktuell in der Zelle transkribierten Genen. Diese mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und radioaktiv markiert. Die cDNA Proben werden dann mit den genspezifischen cDNA Fragmenten, die auf der Membran fixiert sind, hybridisiert. Die Hybridisierung kann dann, durch Auflegen auf einen Röntgenfilm, sichtbar gemacht werden. Zur Gewinnung von mRNA, als Ausgangsmaterial für die cDNA, wurden die humanen Stammzellen ca. 20 Stunden nach der Transfektion bzw. untransfizierte Zellen, jeweils am Tag 6 und 13 der Kultivierung (3-Phasenmodell der Erythropoese) entnommen und die RNA, wie in Abschnitt 6.9.1 und 6.9.2 beschrieben, isoliert und quantifiziert. Folgende Arbeitsschritte wurden anschließend durchgeführt:

1. **Umschreibung der RNA in cDNA :**

   - 1,5-5 µg der jeweiligen RNA mit Aqua dest. ad 7 µl + 3 µl PufferA. Die Proben wurden 3 Minuten bei 70°C und dann 2 Minuten bei 42°C in dem Thermoblock erhitzt.
   - Herstellung der RT (Reverse Transkription) Lösung: Pro Ansatz benötigte man 4 µl Puffer B, 1 µl RNAse Inhibitor, 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (200 Unit/µl; Promega, Cat. M1701), 3 µl α-32P-dCTP (9,25 MBq) (10 µCi/µl; 3,000 Ci/ml, Amersham Pharmacial Biotech, Cat.AA0005) und 1 µl RNAse freies Aqua dest.. Die RT-Lösung wurde 1 Minute auf dem Thermoblock bei 42°C erhitzt.
   - 10 µl der RT-Lösung wurden auf die RNA-Proben gegeben und für 25 Minuten bei 42°C erhitzt. Um die RT-Reaktion zu stoppen, wurden jeweils 2 µl Puffer C dazugegeben.
   - Zur Denaturierung wurden 2 µl Puffer D zugegeben und 20 Minuten bei 68°C inkubiert. Es wurden 25 µl Puffer E zugefügt und 10 Minuten bei 68°C erhitzt.

2. Hybridisierung:

- Zunächst fand die Prähybridisierung statt. Dazu wurde die Hybridisierungslösung und der Hybridisierungsofen auf 60 ºC vorgewärmt. Die Sheared Salmon Sperm-DNA (Invitrogen/GIBCO BRL) wurde einmalig 5 Minuten bei 100°C erhitzt und auf Eis gestellt. Die GEArray™ Membranen wurden mit Aqua dest. befeuchtet und in Glaszylinder gegeben. Pro Ansatz wurden 2 ml vorgewärmte GEAhyb Hybridisierungslösung und 20 µl Sheared Salmon Sperm-DNA zugegeben und für 1-2 Stunden bei 60ºC bei ständiger Rotation (5-10 rpm/min) vorhybridisiert.
- Nach Verwerfen der Prähybridisierungs-Lösung wurde 1 ml GEAhyb Hybridisierungs-Lösung, 10 µl Sheared Salmon Sperm-DNA und die jeweilige radioaktive denaturierte cDNA-Probe zugegeben und über Nacht bei 60ºC und ständiger Rotation (5-10 rpm/min) hybridisiert.

3. Waschen der Membranen:

- Die Membranen wurden zweimal mit jeweils 5 ml der auf 60°C vorgewärmter Waschlösung 1 (2 × SSC, 1% SDS) und zweimal mit Waschlösung 2 (0,1 × SSC, 0,5% SDS) für jeweils 15 Minuten bei 60ºC bei einer Rotation von 5-10 rpm/min gewaschen.
- Die Membranen wurden luftblasenfrei in Folie eingeschweißt, ein Röntgenfilm aufgelegt und für 4 Tage bei –70°C belichtet.

5.15 Arbeiten mit Radioaktivität

Alle Versuche, bei denen Radioaktivität und gentechnisch veränderte Organismen verwendet wurden, wurden unter geltenden Sicherheitsbestimmungen in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die Genehmigung zur Errichtung und zum Betrieb einer gentechnischen Anlage zur Durchführung gentechnischer Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 wurde am 17.02.1999 unter dem Aktenzeichen 576.211.202-01-99 erteilt.

5.16 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten statistischen Analysen wurden mit der SPSS 12.0 für Windows durchgeführt. Zur Beurteilung einer Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest zur Beurteilung der Signifikanz, wenn die zu testende Verteilung eine Normalverteilung ist, wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Werte < 0,05 gelten als signifikant.

6 ERGEBNISSE

Die physiologische Bedeutung der RNA-abhängigen Adenosin-Deaminase ADAR1 wurde zunächst im Mausmodell untersucht. Eindrucksvoll konnte gezeigt werden, dass ADAR1-Defizienz zu embryonaler Lethalität und Störungen der Erythropoese (105) und zur Beeinträchtigung der hämatopoetischen Zellen in der fötalen Leber (34) führt.
Um die Auswirkungen und die bislang unbekannte Wirkung des Enzyms ADAR1 auf die humane Hämatopoese zu untersuchen, wurde zunächst ein geeignetes in-vitro Zellkulturmodell etabliert, das ausgehend von humanen hämatopoetischen Stammzellen die erythropoetische Reifung über alle auch in-vivo vorkommenden Stadien abbildet und als Grundlage dient, die ADAR1 Expression in den humanen Stammzellen zu hemmen.

6.1 Humane in-vitro Erythropoese

Humane CD34+ Stammzellen wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Positivselektion über eine immunomagnetischen Säule isoliert. Die Reinheit der CD34+ Zellen betrug nach 2-facher Positivselektion ≥ 95%. Diese Zellen wurden in zwei unterschiedliche Flüssig-Kulturmodelle zur Erythropoese in einer Ausgangskonzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingebracht.

6.1.1 Proliferation

Im 2-Phasenmodell zur Erythropoese wurden Expansionsraten von bis zu 288-fach, im Mittel eine Zellkonzentration von $67 \pm 57 \times 10^6$ Zellen/ml, erreicht. Im 3-Phasenmodell zur Erythropoese mit einer EPO-unabhängigen Vorphase wurde dieses Proliferationsverhalten mit einer bis zu 980-fachen Expansionsrate übertroffen. Im Mittel wurde eine kumulative Zellzahl von $320 \pm 123 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht. Abbildung 7 zeigt die kumulativen Zellzahlen der beiden Modelle im Vergleich.

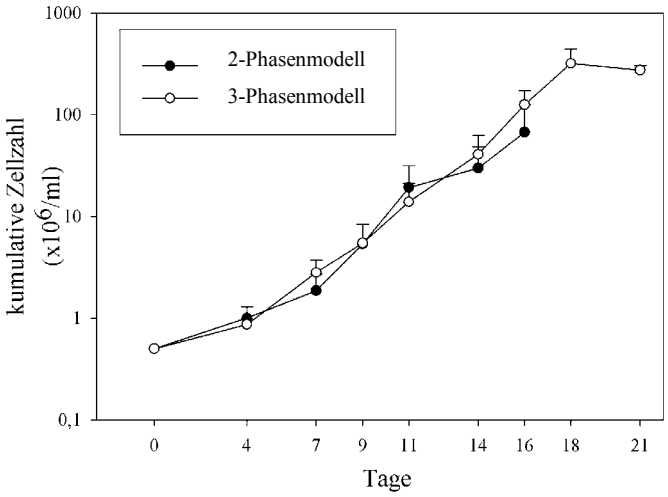

Abb. 7*: *Kumulative Zellzahl im 2-Phasen und 3-Phasenmodell. *Jede Linie repräsentiert die Proliferationsdaten aus 3 repräsentativen Experimenten. Zellzahl zu Beginn 0,5 × 10^6 Zellen/ml*.

6.1.2 Koexpression von spezifischen Zelloberflächenmolekülen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann man die verschiedenen Reifungsgrade der erythropoetischen Zellpopulationen in den Flüssigkulturen aufgrund ihrer Expression von weitgehend differenzierungsspezifischen Zelloberflächenmarkern besser beurteilen.

Sowohl die Herunterregulierung der prototypischen Antigene für humane Stammzellen (CD34) und Zellen der myeloischen Reihe (CD45) als auch der Nachweis der Oberflächenexpression von CD36 und GPA zeigten, dass die in-vitro generierten Zellen alle physiologischen Stadien einer normalen erythropoetischen Reifung durchlaufen. (Abb. 8). Glycoprotein IV (CD36), typischerweise exprimiert auf den Zellen, aus denen die kolonie-bildenden Einheiten, z. B. CFU-E entstehen, steigt in unseren Erythropoesemodellen schnell auf eine maximale Expression von 82 ± 12% am Tag 11 (2-Phasenmodell) und 86 ± 1% am Tag 14 (3-Phasenmodell) an. Glycophorin A (GPA, CD235a), ein spezifischer Marker für Zellen der erythropoetischen Reihe (13, 28, 93), wird erstmals im Stadium des basophilen Normoblasten exprimiert. Während der Differenzierung zu den Erythrozyten steigt die Expression stetig an. Am Tag 9 sind im 2-Phasenmodell 43 ± 6% der Zellen GPA positiv. Die Expressionsrate steigt dann zum Ende der Kultur auf 84 ± 17%. Im 3-Phasenmodell sind am

Tag 11 49 ± 6% der Zellen GPA positiv. Die Expressionsrate steigt zum Ende der Kultur auf über 90% (97 ± 2%). Während der Kultivierung sinkt der Anteil der Zellen, die den „Pan-Leukozyten Marker“ CD45 tragen, ein Marker, der von kontaminierenden nichterythroiden Zellen getragen wird, kontinuierlich. Der Anteil nicht-erythroider Zellen beträgt am Ende der Kultur in beiden Modellen nur noch ungefähr 1%.

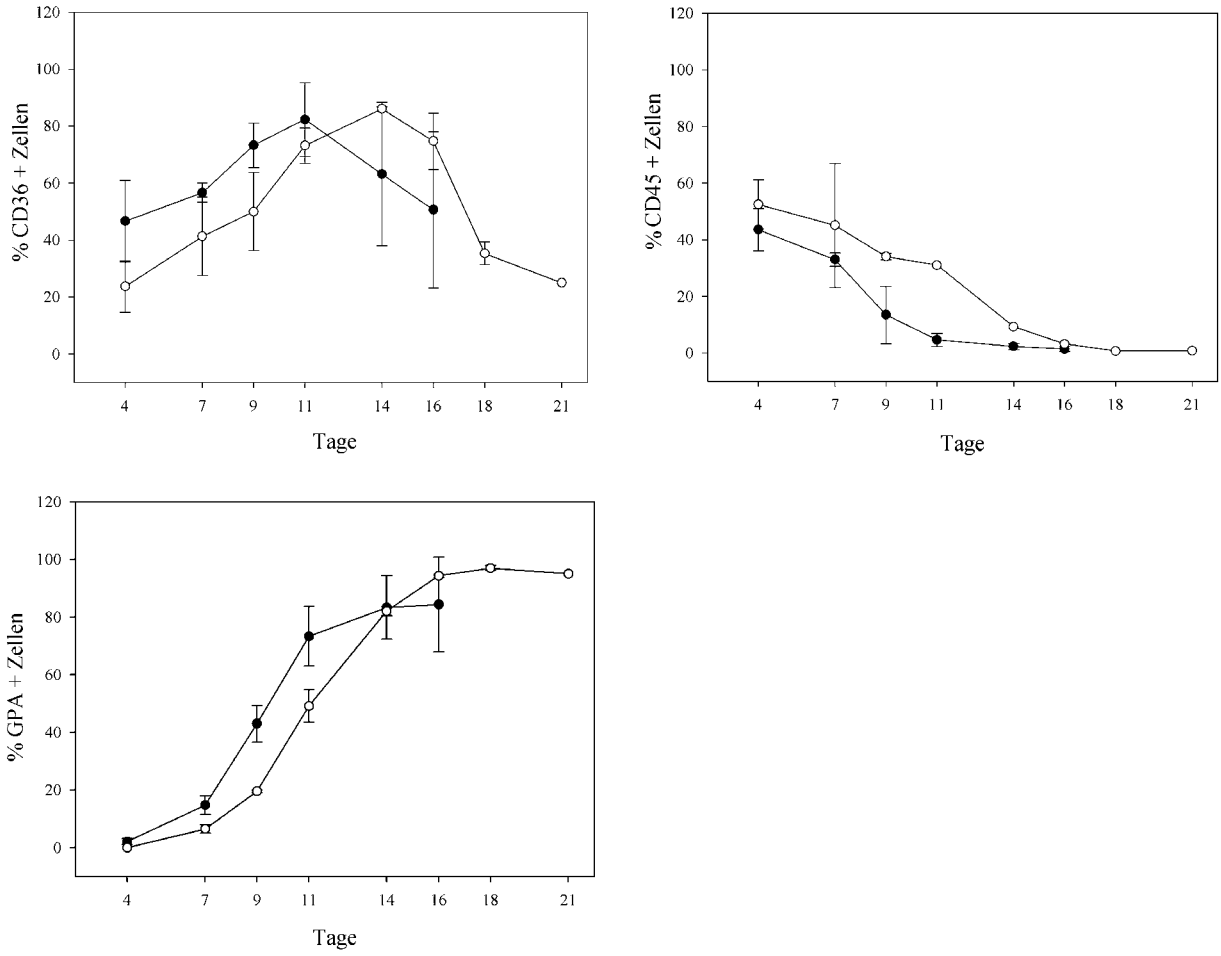

Abb. 8: Expression von Zelloberflächenmarkern: *Der prozentuale Anteil CD36+ ,GPA+ und CD45+ Zellen im 2- und 3-Phasenmodell wurde am FACS ausgewertet (n=3).*

Die Expression von differenzierungsspezifischen Zelloberflächenmarkern während der Erythropoese ist kein statischer Prozeß. Wenn man die Expression von GPA, CD45 und CD36 durchflusszytometrisch analysiert, erkennt man, dass die „Zellwolken“ in den Auswertequadranten stadienspezifisch, also ihrem Reifungsgrad entsprechend, „wandern“. Die Abbildung 9 zeigt für das 3-Phasenmodell zur Erythropoese eine repräsentative Ausreifung

über 21 Tage. In den ersten 7 Tagen wird der Kultur kein EPO zugesetzt, so dass am Tag 6 die meisten Zellen noch das CD45 Antigen tragen. Es sind 2 Haupt-Zellpopulationen zu erkennen, die sich in der CD36 Expression unterscheiden. Am Tag 16 haben die meisten Zellen CD45 verloren und tragen überwiegend CD36. Am Ende der Kultur liegen die meisten Zellen im unteren linken Quadranten, was einen weitgehenden Verlust an CD45 und CD36 Expression entspricht. Bei der Darstellung von CD36 gegen GPA exprimieren die Zellen am Tag 6 noch kein GPA und unterschiedlich viel CD36. Am Tag 12 sind 2 Haupt-Zellpopulationen zu erkennen: Eine „Zellwolke“ im Quadranten CD36 und GPA, die doppelt positiv für CD36 und GPA ist und eine weitere, die weder CD36 noch GPA exprimiert. Am Tag 16 tragen die meisten Zellen CD36 und GPA. Der Verlust von CD36 ist ein Zeichen von späten Differenzierungsstadien, so dass mit zunehmender Reifung die meisten Zellen am Ende der Kultur weitgehend die CD36 Antigene verlieren und GPA einfach bis stark positiv sind.

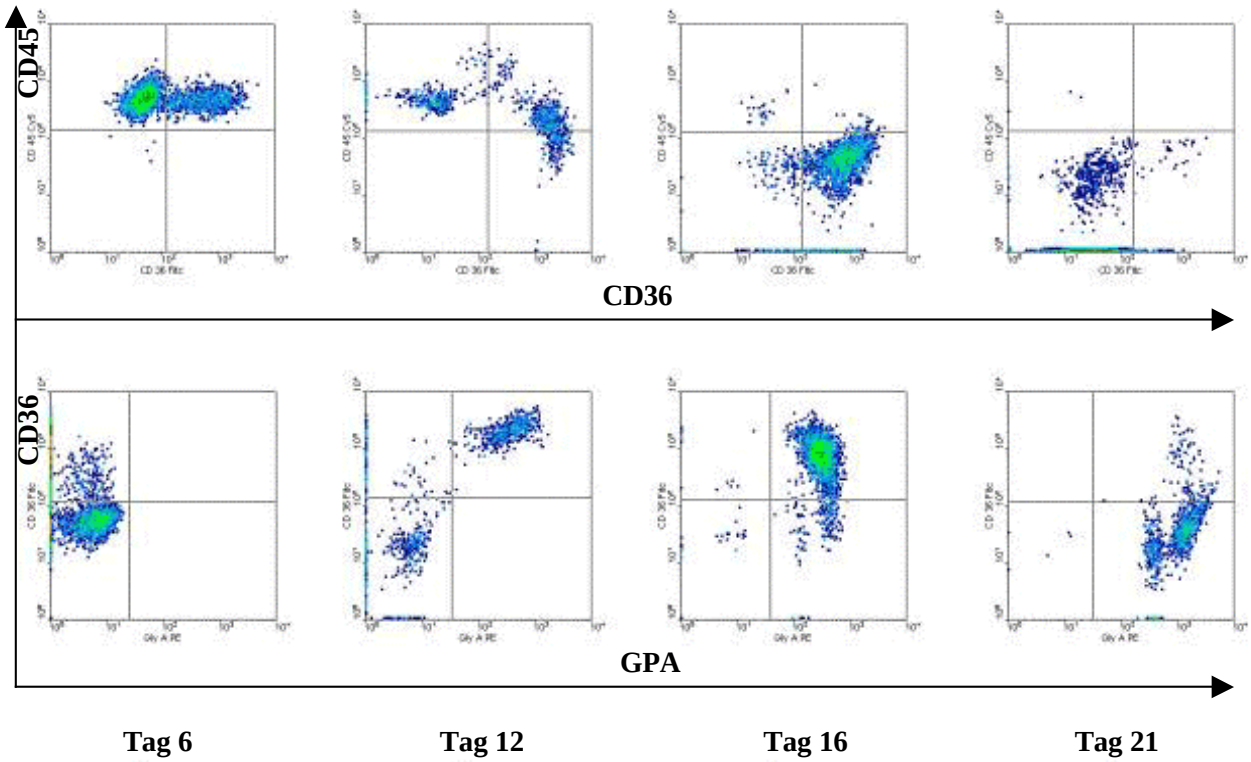

Abb. 9: Expression von Zelloberflächenmarkern: *Veränderung der Oberflächenexpression von CD36+,GPA+ und CD45+ Zellen während des 3-Phasenmodells*

6.1.3 Morphologische Beurteilung von Zytospinpräparaten

Zur Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung wurden Zellen aus den Flüssigkulturen entnommen, auf einen Glasobjektträger zentrifugiert und mit May Grünwald-Giemsa gefärbt. Die morphologische Beurteilung der unterschiedlichen Reifestadien der Hämatopoese erfolgte bei 100facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop, indem die Zellen den folgenden morphologisch unterscheidbaren Kategorien zugeordnet wurden:

- Stammzelle
- Proerythroblast
- basophiler Erythroblast
- polychromatischer Erythroblast
- Normoblast
- Retikulozyt
- nicht-erythroide Zelle

Die Zuordnung zu Ausreifungsstadien anhand der durchflusszytometrischen Analysen wurden grundsätzlich durch die mikroskopischen Untersuchungen bestätigt. In beiden Modellen zeigten die ausgesäten Stammzellen in Abhängigkeit von der EPO Stimulierung eindeutige erythroblastische Differenzierung und eine homogene Ausreifung. Am Ende des 2-Phasenmodells bestand die Kultur überwiegend aus Hämoglobin positiven Normoblasten (60%) und terminal entkernten Retikulozyten (34%). Am Ende des 3-Phasenmodells bestand die Kultur ebenfalls überwiegend aus Hämoglobin positiven Normoblasten (41%) und terminal entkernten Retikulozyten (36%), der Anteil nicht-erythrozytärer Zellen war jedoch größer im Vergleich zum 2-Phasenmodell.

6.2 Bestimmung von Rhesus- und Blutgruppeneigenschaften

Am Tag 18 der Ex-Vivo Kultivierung im 3-Phasenmodell wurden die AB0 und Rhesus-eigenschaften der erythropoetischen Zellen untersucht. Abbildung 10 zeigt, dass die erythrozytären Zellen, die über 18 Tage im 3-Phasenmodell aus humanen Stammzellen gereift

sind, „normale“ AB0 und Rhesuseigenschaften im verwendeten Testsystem zeigten. Die Abbildung 10 zeigt die Blutgruppe A Rhesus positiv (CcD.ee).

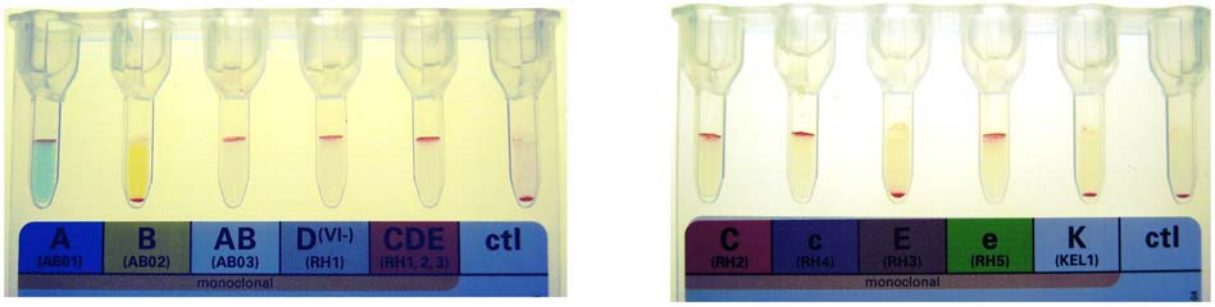

Abb. 10: Blutgruppenantigene nach Ex-Vivo-Expansion. *Auswertung der Zellen nach 18 Tagen Kultur im 3-Phasenmodell*

6.3 Vergleich der ADAR1 m-RNA Expression während der Erythropoese

Die ADAR1 mRNA Expression wurde mit einer spezifischen ADAR1 real-time-RT-PCR gemessen. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Amplifikationsdaten eines typischen „Taqman-Laufs“. Es sind die Kurven der ADAR1 mRNA Expression von human CD34+ Stammzellen (Tag 0), erythroiden Vorläuferzellen (Tag 3), erythrozytäre Zellen (Tag 12), und zur Kontrolle humane mononukleäre Zellen und die Hepatocarcinom-Zelllinie Huh7 gezeigt.

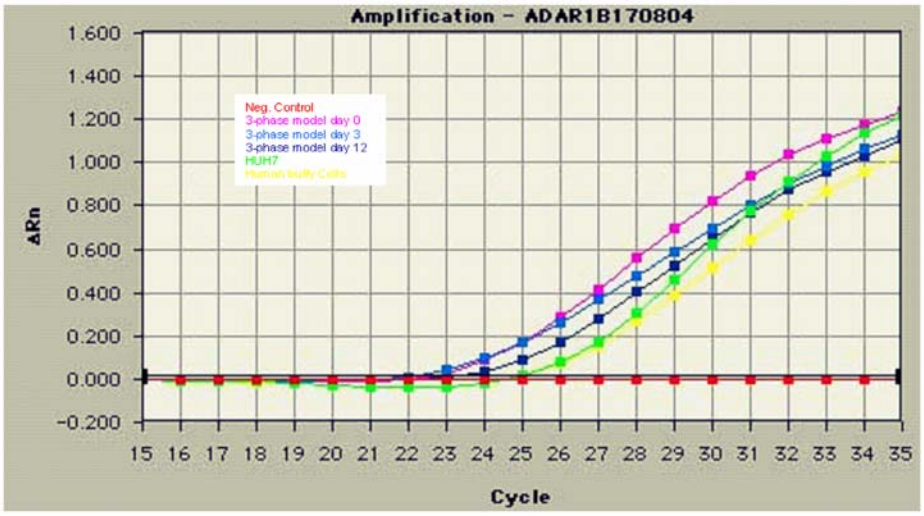

Abb. 11: Die ADAR1 mRNA Amplifikationsauswertung einer real-time-RT-PCR. *Die ADAR1 mRNA Expressionsdaten von humanen CD34+ Stammzellen im 3-Phasenmodell am Tag 0, erythroiden Vorläuferzellen am Tag 3 und erythrozytären Zellen (Tag 12), humanen mononukleären Zellen(„Human buffy Cells“) und der Zelllinie Huh7.*

Es konnte gezeigt werden, dass CD34+ Stammzellen, Vorläuferzellen und alle Stadien der erythrozytären Reifung im 2-Phasen und 3-Phasenmodell ADAR1 mRNA exprimieren, ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien der erythropoetischen Reifung. Verglichen mit dem Expressionsniveau in humanen mononukleären Zellen oder der Zelllinie Huh7 zeigte sich, dass die CD34+ Stammzellen und Vorläuferzellen und alle Stadien der erythrozytären Reifung im 2-Phasen und 3-Phasenmodell eine 2 bis 10fach höhere ADAR1 mRNA Expression zeigten. (Abb. 12).

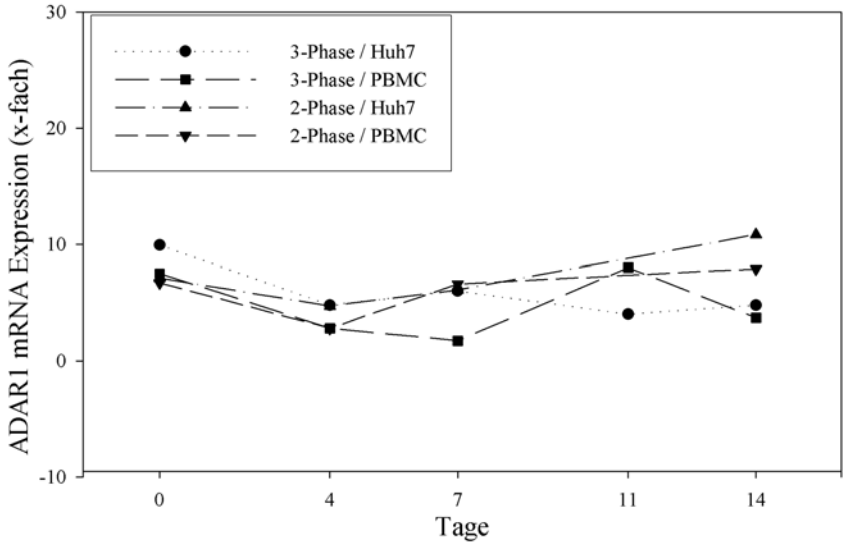

Abb. 12: ADAR1 mRNA Expression*. Die ADAR1 mRNA Expression in humanen CD34+ Zellen und erythroiden Zellen während des 2- und 3-Phasenmodells, Methodik: RT-PCR (n=5). Die Ergebnisse wurden auf den mRNA Gehalt von humanen mononukleären Zellen und Huh7 Zellen normalisiert unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Die Experimente wurden bis zum Tag 14 durchgeführt. Danach ist die RNA Isolierung auf Grund des zunehmenden Vorkommen von entkernten Retikulozyten in den Kulturen limitiert.*

6.3.1 Transfektionseffizienz von DOTAP, DuoFect und Amaxa im Vergleich

Der effiziente Transfer von spezifischer siRNA in Zellen ist der entscheidende Schritt zur effizienten Ausschaltung oder Unterdrückung von Genaktivitäten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden ausgetestet, um eine effiziente Transfektionsrate in der Modell-Zelllinie K562 und humanen CD34+ Stammzellen zu erreichen. Das Plasmid pmaxGFP (Amaxa Biosystems) wurde mit einer lipid-basierenden

Methode (Dotap), via Transferrinrezeptor (DuoFect) und Amaxa Nukleofektion in die K562 und humanen Stammzellen transfiziert.

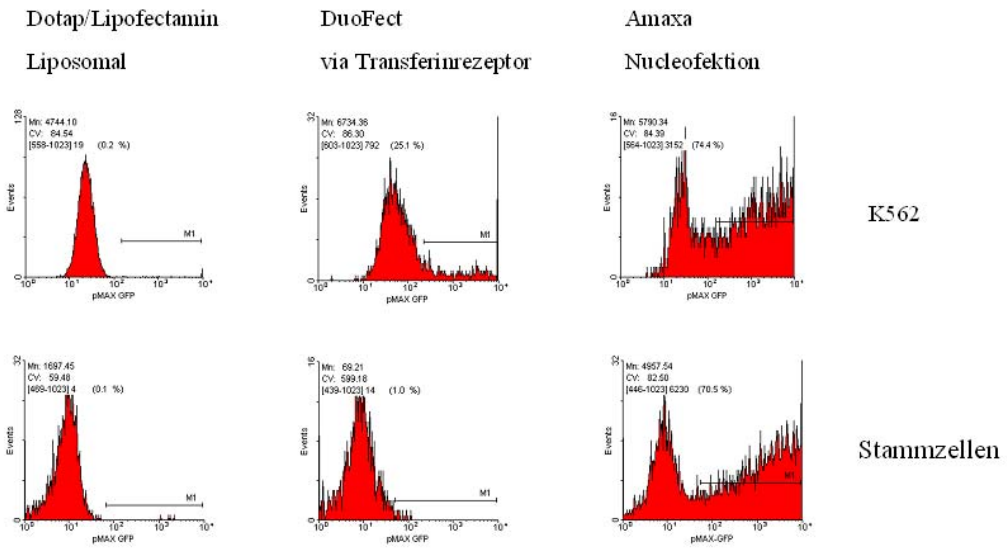

Abb. 13 : Transfizierte CD34+ Stammzellen und K562. *Vergleich von unterschiedlichen Transfektionsmethoden 24 Stunden nach Transfektion mit einem grünen Fluoreszenzplasmid (pmaxGFP). Die Zellen wurden durchflusszytometrisch ausgewertet. Dargestellt ist eine repräsentative Messung.*

Abbildung 13 zeigt repräsentative Transfektionseffizienzen für das Plasmid pmaxGFP (Amaxa Biosystems) für die drei angewandten Methoden. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch jeweils 24 Stunden nach der Transfektion am FACS. Die Modell-Zelllinie K562 konnte nicht mit Dotap und nur zu 25% mit DuoFect transfiziert werden. Beide Methoden versagten jedoch gänzlich bei der Transfektion primärer Stammzellen. Die höchsten Transfektionsraten konnten mit der Nukleofection erzielt werden. 67 ± 4% der humanen Stammzellen (n=3) und 78 ± 2% der Modell-Zelllinie K562 (n=3) wurden erfolgreich mit dem Plasmid pmaxGFP transfiziert (n=3).

Zur Bestätigung der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden die Transfektionsraten auch mikroskopisch ausgewertet. Abbildung 14 zeigt erfolgreich transfizierte Zellen am Fluoreszenzmikroskop.

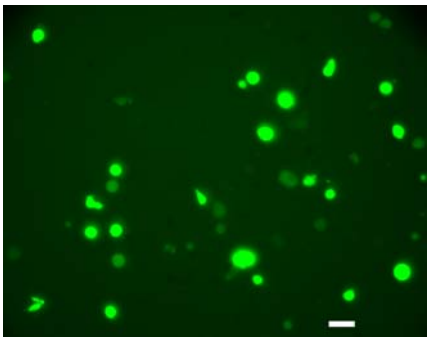

Abb. 14: Transfizierte CD34+ Stammzellen. *Fluoreszenzmikroskopische Auswertung 24 Stunden nach Nukleofektion (Amaxa) eines grünen Fluoreszenzplasmids (pmaxGFP). Die Messmarkierung beträgt 50 µm.*

6.4 Transfektion von humanen CD34+ Stammzellen und Zelllinien

6.4.1 Transfektion von Antisense DNA in Huh7, K562 und CD34+ Stammzellen

Durch EDV-gestützte Zielsequenzanalyse wurden verschiedene Antisense-Oligo-desoxynukleotid (asODN)-Sequenzen berechnet, die sich gegen einen m-RNA Abschnitt von ADAR1 (S und L Form) richten. Die Wirksamkeit dieser asODN gegen ADAR1-gesamt wurde in der humanen Leberkarzinomzelllinie Huh7 im Rahmen einer vorangehenden Studie beschrieben (36). In humanen Stammzellen konnte mit diesen asODN gegen ADAR1 keine Hemmung erreicht werden. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz zur Gen-Herunterregulierung nicht weiter verfolgt.

6.4.2 Transfektion von siRNA zur spezifischen Hemmung von ADAR1

Der Transfer von spezifischer siRNA ermöglicht eine effiziente und spezifische Gen-Herunterregulierung (24). Spezifische siRNA gegen ADAR1 S+L wurde von der Arbeitsgruppe Lazinsky et al. für die Huh7 Zelllinie beschrieben (107). Die Modell-Zelllinie K562 und die hämatopoetischen Stammzellen wurden mit siRNA gleicher Sequenz transfiziert. Um unspezifische Einflüsse von siRNA auszuschließen, wurden ein Teil der K562 und die hämatopoetischen Stammzellen mit einer siControl RNA (co-siRNA), einer nicht funktionalen siRNA gleicher Länge, transfiziert. Um eine Bezugsgröße für die natürliche

ADAR1 Expression der Zellen zu haben, wurde ein weiterer Teil der Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz und der Nukleofektion behandelt, ohne Zugabe von irgendeiner siRNA (mock-Kontrolle). 19 bis 24 Stunden nach der Transfektion wurde die RNA isoliert. Auf der Ebene der Proteinbiosynthese war der Effekt noch später erkennbar, so dass die Proteinisolierung (Gewinnung der Kernextrakte) erst 48 Stunden nach Transfektion erfolgte.
Die RNA der mit spezifischer siRNA transfizierten Zellen wurde in einer ADAR1 (S+L) spezifischen quantitativen real-time-RT-PCR analysiert. Die mRNA Expression der mock-transfizierten Zellen diente als Bezugsgröße für die relative mRNA Quantifizierung. Die mRNA Expression der mit co-siRNA transfizierten Zellen zeigten überwiegend vergleichbare Werte mit den mock-transfizierten Zellen, so dass unspezifische Effekte von siRNA ausgeschlossen werden konnten.
Abbildung 15 zeigt die Hemmung der ADAR1 mRNA Expression von K562 und CD34+ Stammzellen 20 Stunden nach der Transfektion mit siRNA verglichen mit mock-transfizierten Zellen (n=6). Nach dieser Zeit ist der ADAR1 mRNA Expressionslevel in CD34+ Stammzellen auf 38,7 ± 10,8% und in K562 auf 24,8 ± 6,9% Restaktivität reduziert, verglichen mit mock-transfizierten Zellen (n=6).

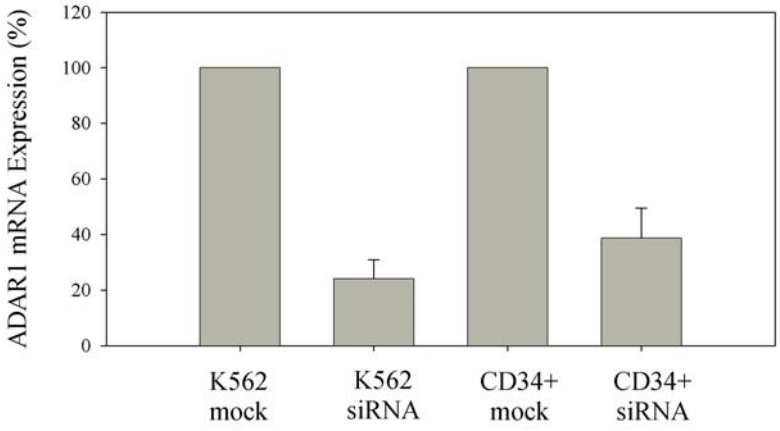

Abb. 15: Hemmung der ADAR1 mRNA Expression. *ADAR1 mRNA von K562 und CD34+ Stammzellen 20 Stunden nach der Transfektion mit siRNA verglichen mit mock-transfizierten Zellen (n=6).*

Abbildung 16 zeigt den ADAR1 mRNA-Level in CD34+ Stammzellen über einen Zeitraum von 72 Stunden nach der Transfektion. Nach 20 Stunden betrug die ADAR1 mRNA Expression 34%. Nach 72 Stunden war der Expressionslevel von ADAR1 noch auf 64%

reduziert, verglichen mit mock-transfizierten Zellen, so dass man von einer Hemmung von ADAR1 während der Erythropoesemodelle von wenigstens 3 Tagen ausgehen kann.

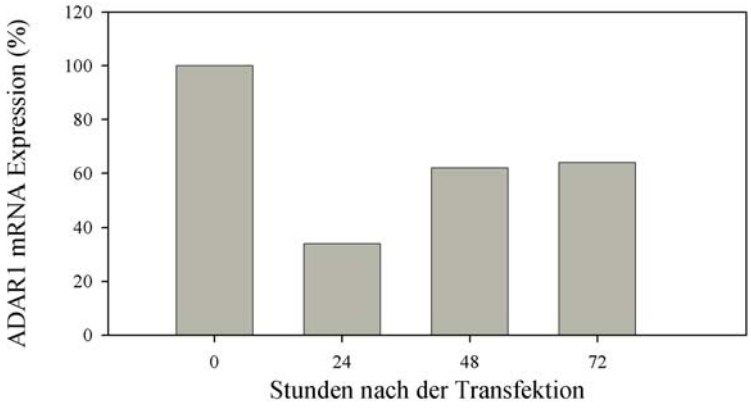

Abb. 16: Hemmung der ADAR1 mRNA Expression. *ADAR1 mRNA Level in CD34+ Stammzellen über 72 Stunden nach der Transfektion.*

6.5 ADAR1 Westernblot

6.5.1 Westernblot von transfizierten, ADAR1 defizienten K562

Westernblots wurden durchgeführt, um die Wirkung der spezifischen siRNA auch auf Proteinebene zu bestätigen (Abb. 17). Der deutlichste Effekt der ADAR1 Hemmung wurde 72 und 96 Stunden nach siRNA Transfektion erzielt. Verglichen mit mock- und co-siRNA-transfizierten Zellen zeigte sich eine fast komplette Hemmung der ADAR1-S Bande. Die Aktin-Banden zeigen die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben.

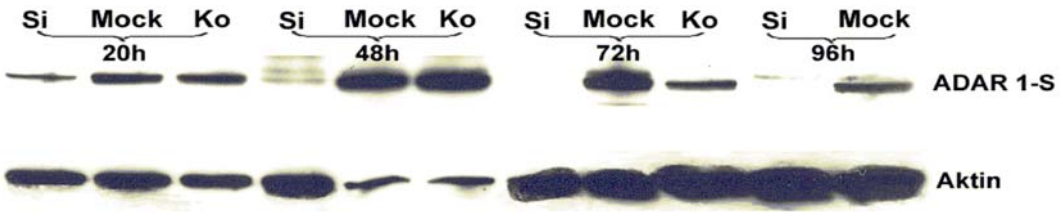

Abb. 17: Westernblot zum Nachweis von ADAR1 nach siRNA Transfektion. *Der Blot zeigt den ADAR-S und Aktin-Proteinlevel. Die Proteine wurden 20, 48, 72 und 96 Stunden nach der siRNA Transfektion aus K562 isoliert; mock und co-siRNA (ctr.) transfizierte Zellen sind ebenfalls dargestellt.*

6.5.2 Westernblot von transfizierten, ADAR1 defizienten humanen CD34+ Stammzellen

Um die signifikante Genexpressionshemmung auch auf Proteinebene zu beweisen, wurden ebenfalls Westernblots der transfizierten humanen CD34+ Stammzellen durchgeführt. Der Westernblot zum Nachweis von ADAR1 zeigte 48 Stunden nach Transfektion eine deutlich geringere ADAR1-S Bande.

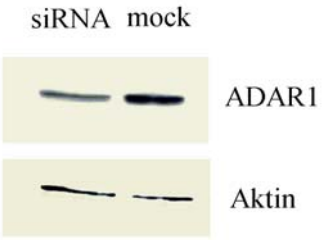

Abb. 18: Westernblot zum Nachweis von ADAR1 nach siRNA Transfektion. *Der Blot zeigt den ADAR1 und Aktin-Proteinlevel in CD34+ Stammzellen 24 Stunden nach der siRNA Transfektion verglichen mit mock-transfizierten Zellen.*

6.6 Kultur von transfizierten, ADAR1 defizienten humanen CD34+ Stammzellen

Unmittelbar nach Positivselektion wurden die hämatopoetischen CD34+ Stammzellen mit spezifischer siRNA gegen ADAR1 transfiziert, um dieses Enzym gezielt in den Zellen zu hemmen. Die Zellen wurden direkt nach der Transfektion in einer Konzentration von $1{,}0 \times 10^6$ Zellen/ml in den beiden Flüssig-Kulturmodellen kultiviert. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert und während der Kultur alle 2 bis 3 Tage auf eine Konzentration von $0{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt, indem ein partieller Austausch von entsprechendem Medium vorgenommen wurde.

6.6.1 Proliferation

Das Wachstumsverhalten transfizierter CD34+ Stammzellen in den beiden Flüssigkulturen ist in Abbildung 19 dargestellt. In den ersten Tagen nach der Transfektion sinkt die Vitalität aller Zellen auf Grund der zellschädigenden Wirkung der Transfektionsprozedur. 7 Tage nach der Transfektion erreicht die Zellkonzentration siRNA transfizierter Zellen $1{,}2 \pm 0{,}6 \times 10^6$

Zellen/ml (2-Phasenmodell) und 0,6 ± 0,3 × 10^6 Zellen/ml (3-Phasenmodell). Danach expandieren die erythroiden Progenitorzellen auf eine kumulative Zellzahl von 5,6 ± 1,1 × 10^6 Zellen/ml (2-Phasenmodell) und 37,7 ± 34,3 × 10^6 Zellen/ml (3-Phasenmodell). Die Proliferationsraten mock-transfizierter CD34+ Stammzellen sind mit diesen Resultaten vergleichbar. Somit konnte keine signifikante Auswirkung durch die transiente Ausschaltung von ADAR1 auf das Wachstumsverhalten humaner Erythropoese beobachtet werden.

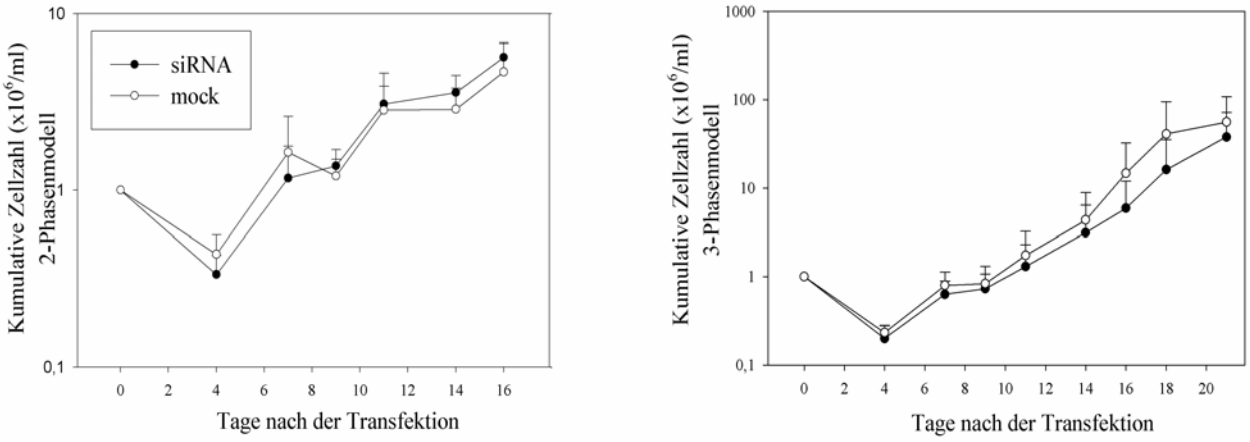

Abb. 19: Kumulative Zellzahl im 2-Phasen und 3-Phasenmodell nach Transfektion. *Jede Linie repräsentiert die Proliferationsdaten aus 3 repräsentativen Experimenten. Zellzahl zu Beginn 1,0 × 10^6 Zellen/ml.*

6.6.2 Differenzierung

Um die Differenzierung der transfizierten erythropoetischen Zellen zu kontrollieren, wurden die Zellen im Durchflusszytometer zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur auf die Expression von differenzierungsspezifischen Zelloberflächenmolekülen analysiert. Die Herunterregulierung von CD45 und die Oberflächenexpression von CD36 und GPA zeigten, dass auch die transfizierten Zellen alle physiologischen Stadien einer normalen erythropoetischen Reifung durchlaufen (Abb. 20). CD36 stieg an und erreichte im 2-Phasenmodell am Tag 9 die maximale Expression von 89 ± 3% (siRNA) und 88 ± 4% (mock) und sank danach. Im 3-Phasenmodell stieg die CD36 Expression aufgrund der EPO-unabhängigen Vorstimulation etwas langsamer an und erreichte das Maximum am Tag 16: 81,5 ± 6,3% (siRNA) und 79,7 ± 9,6% (mock) und sank ebenfalls danach. Im 2-Phasenmodell,

unter Stimulation mit EPO und Insulin, stieg die Zahl GPA+ Zellen kontinuierlich auf 93,3 ± 1,5% am Tag 14 (siRNA) und 93 ± 2,8% (mock). Im 3-Phasenmodell, in dem erst ab Tag 8 mit EPO stimuliert wurde, stieg die Zahl GPA positiver Zellen langsamer auf 93 ± 3,3% (siRNA) und 92 ± 4,3% (mock) am Tag 21.

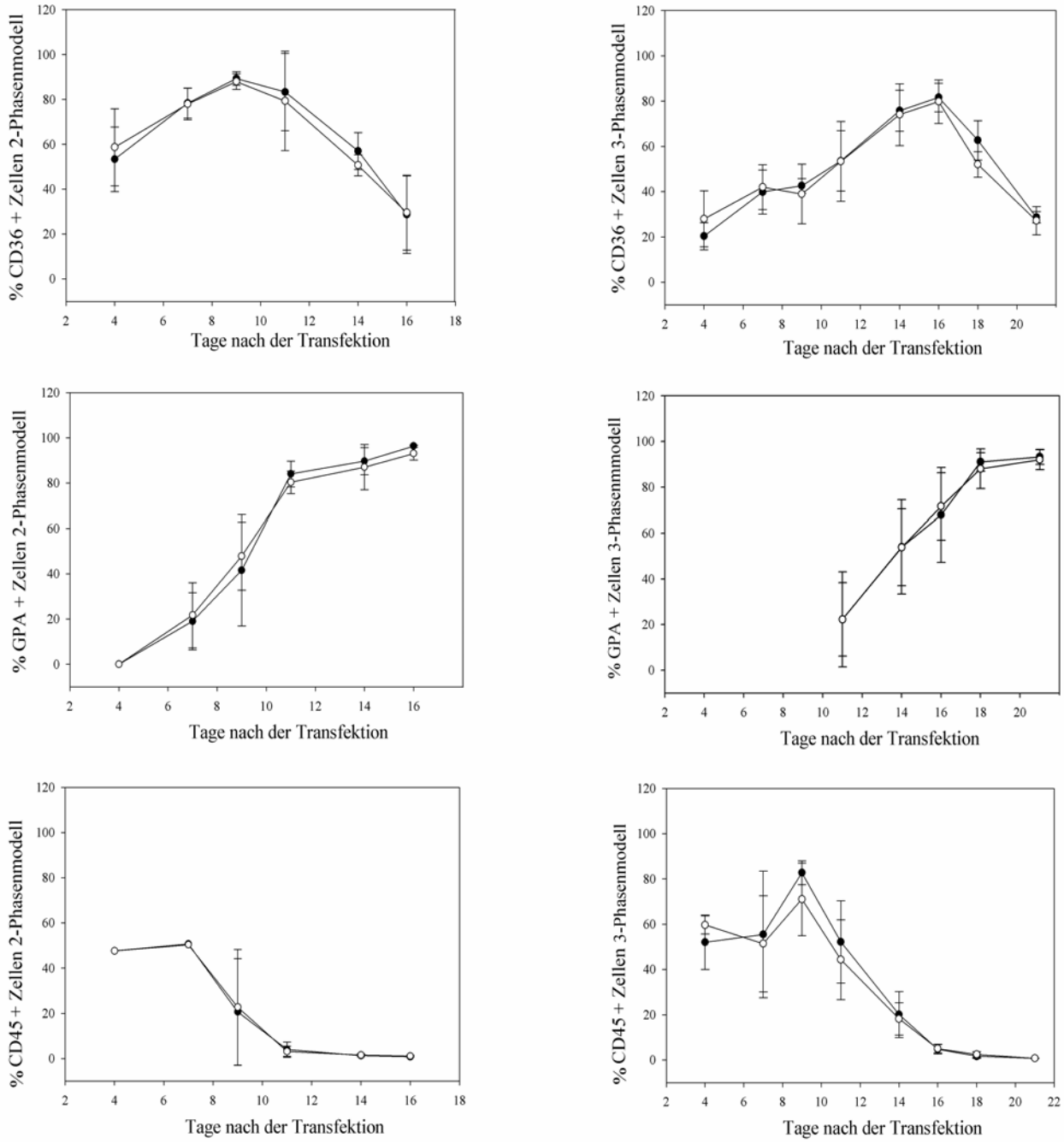

Abb. 20: Expression von Zelloberflächenmarkern nach Transfektion. *Der %-Anteil CD36+, GPA+ und CD45+ Zellen im 2- und 3-Phasenmodell wurde am FACS ausgewertet (n=3).*

Während der Kultivierung sank der Anteil der Zellen, die CD45 tragen, kontinuierlich. CD45 ist auf myeloischen Zellen der humanen Hämatopoese, nicht aber auf ausgereiften Erythrozyten vorhanden. Der Anteil CD45+ Zellen betrug am Ende der Kultur in beiden Modellen nur noch ungefähr 1%.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse in beiden humanen Erythropoesemodellen eine homogene und vollständige Ausreifung zu erythrozytären Zellen. Die humane Erythropoese ist somit nicht von der Herunterregulierung des ADAR1 Enzyms beeinflusst worden. Dies gilt auch insbesondere für den fehlenden Nachweis eines terminalen Differenzierungarrestes im Sinne einer ausbleibenden Enukleation.

6.6.3 Morphologische Beurteilung der erythropoetischen Zellentwicklung

Zu den Analysetagen wurden Zellen den Erythropoesemodellen entnommen, nach Pappenheim gefärbt, und gemäß ihrer Morphologie mikroskopisch evaluiert. Hierbei wurden folgende „Reifestadien“ unterschieden: Stammzelle, Proerythroblast, basophiler und polychromatischer Erythroblast, Normoblast, Retikulozyt und nicht-erythroide Zelle (andere). Abbildung 21 zeigt Zytospinfotos der transfizierten Zellen an verschiedenen Tagen während der Reifung in den beiden Modellen.

Im 2-Phasen Erythropoesemodell wurden die ersten polychromatischen Erythroblasten am Tag 9 entdeckt, 29 ± 7% (siRNA) und 28 ± 9% (mock). Nach alleiniger Stimulation mit Insulin und EPO in der 2. Phase erfolgte die weitere Ausdifferenzierung sehr schnell. Am Tag 16 zeigten die Zellen ein dunkelrotes Pellet und die Kultur bestand hauptsächlich aus hämoglobin-positiven Normoblasten (65 ± 1% (siRNA) versus 67 ± 4% (mock)) und terminal differenzierten, entkernten Retikulozyten (28 ± 2% versus 28 ± 5%) (Abb. 21).

Im 3-Phasen Erythropoesemodell waren die ersten hämoglobin-positiven Zellen am Tag 13 erkennbar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen siRNA und mock-transfizierten Zellen gezeigt werden. Am Tag 19 waren die Zellen überwiegend zu Normoblasten 59 ± 6% (siRNA) versus 53 ± 4% (mock) und Retikulozyten, 17 ± 1% (siRNA) versus 21 ± 3% (mock) ausdifferenziert. Am Ende bestand die Kultur zu mehr als 90% aus Normoblasten und entkernten Retikulozyten.

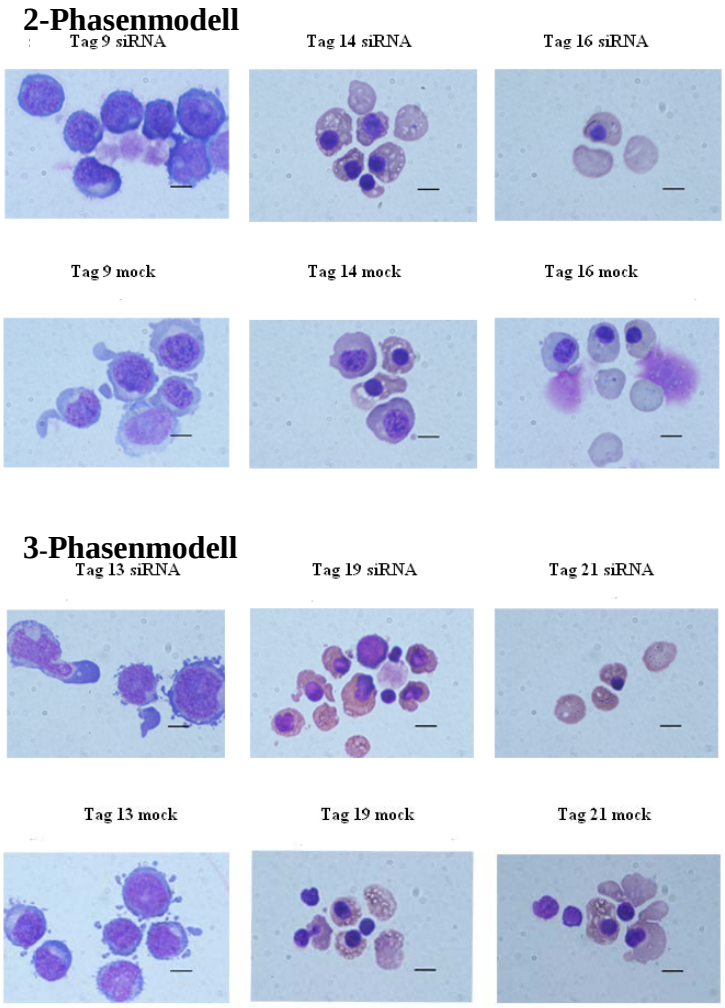

Abb. 21: Fotos der Zytospins nach Transfektion.
(oben) 2-Phasenmodell und (unten) 3-Phasenmodell. Sowohl siRNA- als auch mock-transfizierte Zellen differenzieren zu Normoblasten und Retikulozyten. Zytospinfotos am Tag 9, 14 und 16 (2-Phasenmodell) und Tag 13, 19 und 21 (3-Phasenmodell).
Die Messmarkierung beträgt 10 µm.

Abbildung 22 zeigt die Auswertung der unterschiedlichen Reifestadien der Erythropoese nach Transfektion mit siRNA gegen ADAR1 in den zwei Flüssigkulturmodellen.

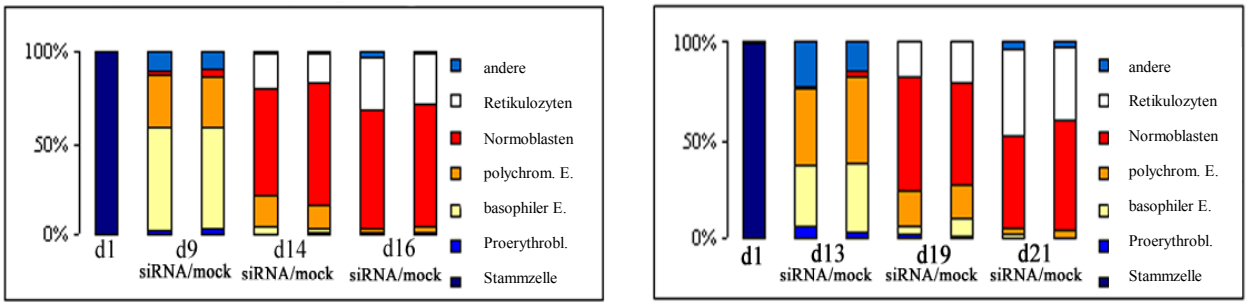

Abb. 22: Auswertung der Zytospins nach Transfektion. *Auswertung der Zellstadien in den zwei Flüssigkulturen nach Transfektion*

Im Einklang mit den zuvor gezeigten Ergebnissen der durchflusszytometrischen Phänotypisierung erbrachte auch die morphologische Auswertung keine signifikanten Unterschiede der erythrozytären Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen, die mit spezifischer siRNA gegen ADAR1 transfiziert wurden, verglichen mit untransfizierten Stammzellen.

6.7 Koloniebildung

Direkt nach der Transfektion wurden die hämatopoetischen Stammzellen in konstanter Anzahl aus der Flüssigkultur entnommen und in eine semisolide Kurzzeitkultur mit definierten Wachstumsfaktoren eingebracht, um so das Wachstum und klonogene Potential der hämatopoetischen Stammzellen auszuwerten (n=6). Die Kurzzeitkulturen wurden nach 14 Tagen ausgewertet, indem die koloniebildenden Einheiten, die BFU-E und CFU-GM, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt wurden (Abb. 23).

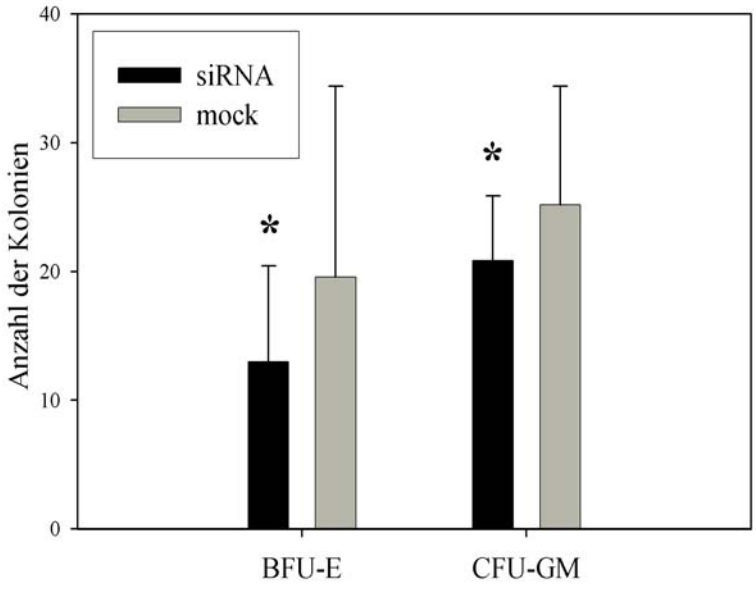

Abb. 23: Hämatopoetische Kurzzeitkulturen. *Statistische Auswertung der BFU-E und CFU-GM. Transfizierte CD34+ Stammzellen wurden in einem semisoliden auf Methylcellulose basierendem Medium über 14 Tage kultiviert (n=6). Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (sowohl BFU-E als auch CFU-GM) von siRNA-transfizierten Zellen sind signifikant reduziert, verglichen mit mock-transfizierten Zellen ($p<0,05$).*

Humane Stammzellen, die am Tag 0 mit co-siRNA transfiziert wurden, bildeten 23 ± 15 BFU-E und 28 ± 6 CFU-GM. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der BFU-E und CFU-GM, die aus siRNA-transfizierten Zellen hervorgingen, signifikant reduziert. Sie bildeten 13 ± 8 BFU-E ($p<0,05$) und 20 ± 6 CFU-GM ($p<0,05$). Mock-transfizierte humane Stammzellen bildeten 20 ± 16 BFU-E und 25 ± 10 CFU-GM koloniebildende Einheiten, vergleichbar mit den Ergebnissen für co-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 24).

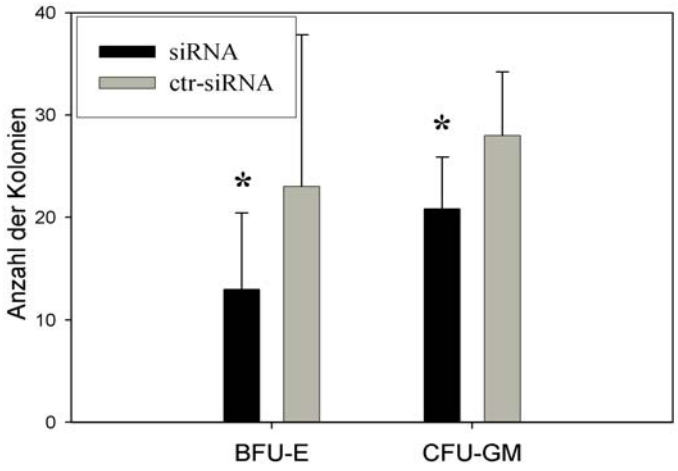

Abb. 24: Hämatopoetische Kurzzeitkulturen. *Statistische Auswertung der BFU-E und CFU-GM. Transfizierte CD34+ Stammzellen wurden in einem semisoliden auf Methylcellulose basierendem Medium über 14 Tage kultiviert (n=6). Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (sowohl BFU-E als auch CFU-GM) von siRNA-transfizierten Zellen sind signifikant reduziert, verglichen mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen ($p<0,05$).*

Die ADAR1 Hemmung mit spezifischer siRNA führte zu einer verminderten Anzahl von BFU-E und CFU-GM-koloniebildenden Einheiten, so dass von einem Einfluss der ADAR1 Defizienz auf das Wachstums- und Differenzierungspotential hämatopoetischer Stammzellen auszugehen ist.

6.8 Genexpressionsanalysen während der Erythropoese

Die terminale Ausdifferenzierung erythrozytärer Zellen und insbesondere die Entkernung von Normoblasten ist ein besonderer Vorgang, der mit pro- und antiapoptotischen Regulationsmechanismen in Verbindung gebracht wird. Für die Genexpressionsanalyse verschiedener in der humanen Apoptose involvierter Gene wurde der „human apoptosis-

GEArray“ (Fa. SuperArray) als Screeningmethode verwendet, um festzustellen, welche Gene exprimiert werden (genaue Auflistung der untersuchten Gene im Anhang 10.2).

6.8.1 Genexpressionsanalyse von transfizierten, ADAR1 defizienten humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Die Genexpressionsanalyse des „human apoptosis-GEArray“ (Fa. SuperArray) wurde verwendet, um festzustellen, ob die ADAR1-Defizienz einen Einfluss auf die Expression dieser Gene zeigt. Die RNA wurde 20 Stunden nach der Transfektion isoliert. Es wurden jeweils 1000 ng RNA eingesetzt. Die Genexpressionsanalysen von transfizierten ADAR1 defizienten humanen Stammzellen zeigte ein deutliches Signal für das Gen „Human necrosis factor receptor 2“, TNFR2 (Position 71). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Stammzellen, die mit siRNA oder mit Kontroll-RNA transfiziert waren.

6.8.2 Genexpressionsanalyse von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Während der Erythropoese werden verschiedene Gene aktiviert. Es wurden jeweils 1500 ng RNA pro Membran eingesetzt. Die Auswertung der GE Array Membranen von humanen erythropoetischen Zellen am Tag 6 und Tag 13 zeigte folgendes Ergebnis:

Tag 6: Die Genexpressionsanalysen von hämatopoetischen Zellen im 3-Phasenmodell zeigte ebenfalls ein deutliches Signal für das Gen „human necrosis faktor receptor 2“, TNFR2 (Position 71). Daneben war ein etwas schwächeres Signal für das Gen „tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A“, TNFR1 (Position 70) zu erkennen.

Tag 13: Die Genexpressionsanalysen von hämatopoetischen Zellen im 3-Phasenmodell zeigte nur ein deutliches Signal für das Gen „human necrosis faktor receptor 2“, TNFR2 (Position 71).

6.9 Ergebnisse spezifischer PCR während der Erythropoese: GATA und TNF

Ausgehend von den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen, die an humanen erythropoetischen Zellen am Tag 6 und Tag 13 durchgeführt wurden, die beide Genaktivität für TNFR2, dem „human tumor necrosis factor receptor 2“, aber unterschiedliche Genaktivität bei TNFR1, dem „tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A“ zeigten, wurden anschließend spezifische PCR Analysen durchgeführt. Hierbei wurden Kandidatengene, die z.T. aus den Genexpressionsanalysen bekannt waren (TNFα, TNF-R1, TNF-R2, Bcl-xl), um bekannte Gene der erythrozytären Signaltransduktion (GATA-1 und GATA-2) ergänzt und nachfolgend detailliert untersucht. Mit verschiedenen sequenzspezifischen Primern wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der in vitro Erythropoese PCR-Analysen durchgeführt. Die GAPDH Bande zeigt, dass immer annähernd gleiche Ausgangsmengen cDNA eingesetzt wurden. Die Abbildungen 25 und 26 zeigen Agarosegele zum quantitativen Nachweis von TNFα, TNFR1 und TNFR2 und GATA-1, GATA-2 und Bcl-xl spezifischen PCR-Analysen. Der Verlauf der mRNA-Expressionsdichte über 16 Tage ist dokumentiert, K562 wurde als Modell-Zelllinie mitgeführt.

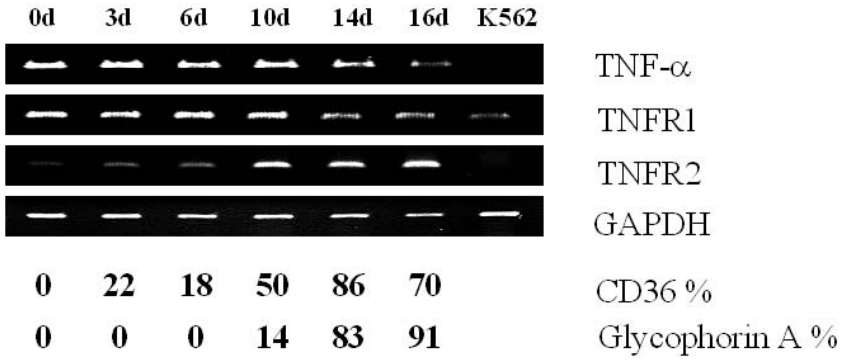

Abb. 25: Expression von TNF-R 1 und 2 und TNF-α mRNA während der Erythropoese. *Auswertung der spezifischen PCR-Analysen auf Agarosegelen. Normalisiert auf gleiche GAPDH Konzentrationen. Im Vergleich ist der Anteil der CD36 und GPA positiven Zellen aufgeführt.*

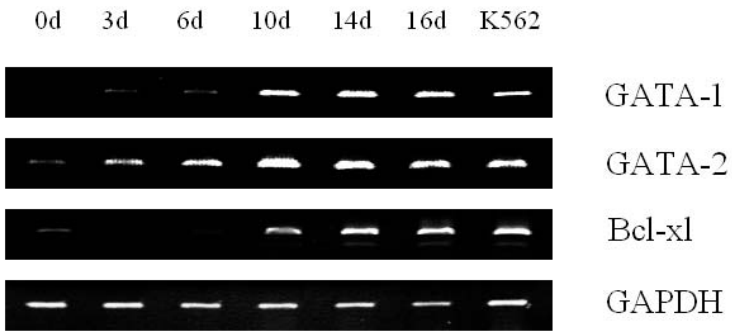

Abb. 26: Expression von GATA-1, GATA-2 und Bcl-xl mRNA während der Erythropoese. *Auswertung der spezifischen PCR-Analysen auf Agarosegelen. Normalisiert auf gleiche GAPDH Konzentrationen.*

7 DISKUSSION

Die „RNA-abhängigen Adenosin-Deaminasen“, kurz ADAR, katalysieren in doppelsträngiger RNA (dsRNA) die Umwandlung von Adenosinen zu Inosinen. In Säugetieren wurde dieses RNA Editing zuerst im ZNS beschrieben (9). Wenn das Inosin während der Translation als Guanosin interpretiert wird, kann das RNA Editing zu einem funktional veränderten Protein führen (59). Es liegen drei verschiedene Formen ADAR1-3 vor. Im Laufe ihrer Erforschung wurden diesen ADAR-Enzymen mehrere wichtige biologische Funktionen zugeschrieben. ADAR sind in vielen Geweben hoch exprimiert, insbesondere im ZNS und in der Leber (3). In Säugetieren werden ADAR in vielen Geweben, z. B. Herz, Muskel, Niere, Lunge und Pankreas (45) auch außerhalb des ZNS und der Leber exprimiert. Bei der Suche nach weiteren Substraten, deren mRNA das Ziel eines A zu I Editing ist, wurde das Editing der HDV RNA in der Leber (57, 80) und der prä-mRNA des Glutamatrezeptor im ZNS beschrieben (8). Neueste Studien untersuchten ADAR Level in Hirntumoren. Es wird vermutet, dass ein vermindertes Adenosin zu Inosin Editing in diesen Tumoren in der Pathogenese von Krebs eine wichtige Rolle spielt (77).

Die essentielle Bedeutung eines intakten ADAR1 Enzyms in Säugetieren zeigten die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Wang, die erstmals die Auswirkungen von ADAR1 Defizienz im Mausmodell untersuchten. Ein inkompletter Knock-out des ADAR1 Gens generierte chimäre ADAR1-defiziente Mäuse mit einer etwa um die Hälfte verminderten ADAR1 Expression, die bereits vor dem 14. Embryonaltag verstarben (105). Die ADAR1 defizienten Mäuse zeigten neben Schädigungen der Leber auch schwere Störungen in der Blutbildung, vor allem der Erythropoese. Die Zellen zeigten ungewöhnliches Proliferations- und Differenzierungsverhalten. Gewöhnlich sinken die Anteile der kernhaltigen Blutzellen im peripheren Blut der Mäuseembryonen während der embryonalen Reifung und nach dem Embryonaltag 16,5 kann man keine kernhaltigen erythrozytären Vorläuferzellen mehr finden. Die peripheren Blutzellen der chimären Embryos zeigten hingegen am Embryonaltag 13,5 noch über 90% kernhaltige Zellen. Zu diesem Zeitpunkt verlagert sich bei der Maus die Erythropoese vom Dottersack in die fetale Leber. Die Autoren postulierten die Wichtigkeit des ADAR1 Expressionslevels, welcher eine kritische Größe für die embryonale Erythropoese in der Leber darstellen könnte. Die Frage, ob die Defekte primär die erythropoetischen

Vorläuferzellen selbst betreffen oder das umgebende Leberparenchym die Erythropoese negativ beeinflusst, konnten die Autoren nicht hinreichend klären.
Ausgehend von den Ergebnissen im Mausmodell wurde in dieser vorliegenden Dissertation die Funktion von ADAR1 für die Entwicklung unreifer erythropoetischer Vorläuferzellen während der Erythropoese beim Menschen näher untersucht. Um den Einfluss von ADAR1 auf primäre Zellen im humanen System untersuchen zu können, war es zunächst nötig ein geeignetes in-vitro Erythropoesemodell zu etablieren. Hierzu wurden die kürzlich publizierten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (21) und die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen in-vitro Erythropoesemodellen (69, 73) berücksichtigt.

7.1 Humanes in vitro Erythropoesemodell

Das vorrangige Ziel war hierbei die Etablierung einer Zellkulturtechnik, bei der eingebrachte humane CD34+ Stammzellen die verschiedenen Stadien der humanen Erythropoese durchlaufen und möglichst gut und effizient zu Erythrozyten ausdifferenzieren. Zur Optimierung bereits zuvor publizierter Flüssigkulturen wurden diese modifiziert und nachfolgend vergleichend gegenüber gestellt. Beide Modelle verwenden das gleiche Basismedium, unterscheiden sich aber in der Zugabe der zur Proliferation und Zelldifferenzierung notwendigen Zytokinzusätze. Wie im Ergebnisteil ausführlich dargestellt, erzeugen beide Modelle aus unreifen CD34+ Stammzellen am Ende der Kultur ausdifferenzierte rote Blutzellen. Die ausgesäten Stammzellen differenzieren in vitro stadiengerecht und zeigen die unterschiedlichen Reifestadien der Erythropoese wie basophiler Erythroblast, polychromatischer Erythroblast, oxyphiler Normoblast bis zum ausgereiften, hämoglobinreichen, entkernten Retikulozyten. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Differenzierung konnte nicht nachgewiesen werden. Durchflusszytometrische Analysen zur Expression von Oberflächenmarkern, (CD45, GPA, CD36) stimmten mit der morphologischen Beurteilung des Ausreifungsgrades der erythropoetischen Zellen weitgehend überein. Glykophorin A, ein Marker später erythropoetischer Zellen, wird am Ende der Kultur von nahezu allen Zellen exprimiert. Der Anteil von Zellen, die nicht der erythropoetischen Zellreihe angehörten, sank unter 5%.
Das 3-Phasenmodell bietet im Vergleich zum 2-Phasenmodell für die nachfolgenden Versuche zur Bedeutung von ADAR einige Vorteile. Man erreicht eine größere Zellvermehrung der

initial in das Modell eingebrachten Zellen. Die Zytokine im Medium der zweiten (SCF + EPO) und dritten Phase (EPO) der Kultur sind vergleichbar mit dem 2-Phasenmodell, so dass die höhere Proliferationsrate in der ersten Phase induziert wird, in der die Zellen nicht dem Einfluss von EPO unterliegen, sondern durch SCF, TPO und Flt3-L stimuliert werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass sich das 3-Phasenmodell über einen längeren Zeitraum erstreckt. Dies erlaubt den Zellen nach der Transfektion eine längere Erholungsphase und zudem können Entwicklungsverzögerungen der Zellen besser berücksichtigt werden. Ein besonderes Augenmerk ist auf die Verwendung von FCS als Medienzusatz zu richten. Einerseits enthält FCS eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, ohne die humane Zellen in vitro häufig nur unzureichend wachsen, andererseits wird heutzutage gern auf den Zusatz von FCS verzichtet, um die Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren oder Kombinationen von Wachstumsfaktoren ohne den „Störfaktor FCS“ besser untersuchen zu können. FCS enthält verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Vitamine in von Charge zu Charge schwankenden Konzentrationen. Der größte Nachteil bei der Verwendung von serumhaltigen Medien ist, dass man nie perfekt standardisierte Kultivierungsbedingungen erreicht. Wir verwendeten in unseren Versuchen eine vorgetestete FCS-Charge für einen bestmöglichsten Versuchsaufbau. Serumfreie Medien haben den Vorteil, dass alle Bestandteile genau definiert sind, andererseits wird häufig dabei beobachtet, dass sogenannte „serumfreie Zellkulturen“ in Abhängigkeit zu den zu untersuchenden Zellen nicht optimal proliferieren und differenzieren. Die serumfreien Kulturen von Neildez-Nguyen et al. (69) zeigten zwar eine relativ hohe Proliferationsrate; die terminale Enukleation blieb jedoch aus. Bestimmte Faktoren im FCS scheinen demzufolge für die Ausschleusung der Kerne und damit für die terminale Differenzierung von Normoblasten zu Retikulozyten verantwortlich zu sein.

In diesem Zusammenhang werden apoptose-ähnliche Mechanismen angenommen, die für die Entkernung zuständig sind (29, 72, 95, 111). Apoptose (22, 44), programmierter Zelltod, beschreibt ein in eukaryontischen Zellen angelegtes Selbstzerstörungsprogramm, durch das einzelne Zellen ohne Belastung des Gesamtorganismus beseitigt werden. Apoptose umfasst eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen. Die Zellen schrumpfen und das Chromatin kondensiert, welches dann zumeist in der Peripherie des Zellkerns aggregiert. Die DNA wird durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen gespalten. Die Zellmembranstabilität geht verloren und Ausstülpungen der Zelle werden beobachtet. Es

kommt zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Apoptose ist ein essentieller Mechanismus zur Zelleliminierung in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen und kann als Gegenspieler der Proliferation angesehen werden. Erythrozyten gehören zu den kernlosen Zellen des menschlichen Organismus, die im Zuge ihrer Reifung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen einen Großteil ihrer Zellorganellen, wie Zellkern, Mitochondrien und Ribosomen verlieren. Während ihres Alterungsprozesses nimmt das zelluläre Volumen ab. Auch der Erythrozyt schrumpft als Folge einer fortschreitenden Freisetzung von Mikrovesikeln aus der Zellmembran. Das Zytoskelett wird abgebaut und die Form verändert sich von ursprünglich diskoid zu sphärozyt. Der Verlust der asymmetrischen Lipidverteilung im Bereich der Zellmembran führt zu einer Freilegung von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Dies dient wie in anderen Zellen als Signal zur Entfernung der Zellen aus dem Blutkreislauf durch Makrophagen (16), so dass die Lebenszeit der Erythrozyten auf ca. 120 Tage beschränkt ist. Ähnliche Veränderungen der Zellarchitektur werden auch in kernhaltigen Zellen während des apoptotischen Zelltodes beobachtet. Dies könnte auf mögliche Parallelen zwischen der Alterung kernloser Erythrozyten und der Apoptose kernhaltiger Zellen hinweisen.

Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung und Differenzierung von erythrozytären Vorläuferzellen durch Caspase-abhängige Apoptose reguliert werden. Erythropoetin wirkt über Induktion der antiapoptotische Proteine Bcl-2 und Bcl-xL (29, 66). Es gibt Hinweise, dass Caspasen zur terminalen Differenzierung von Erythrozyten benötigt werden (11, 95). Caspasen werden während der Differenzierung von Erythroblasten vorübergehend aktiviert und spalten bestimmte Proteine, ohne dabei den Tod der Zellen zu verursachen. Wahrscheinlich spielen sie bei der Chromatinkondensation und der Enukleation eine wichtige Rolle und tragen zur Regulierung der Erythropoese und zur Differenzierung der erythrozytären Vorläuferzellen bei. Krauss et al. untersuchten den Einfluss von Caspasen während der Enukleation von Erythroblasten, Linsenepithel und Keratinozyten. Aktivierte Caspase spielt eine Rolle während der frühen Phase der Erythropoese, aber sie fanden keinen Beweis für eine umfassende Aktivierung von klassischen apoptotischen Mechanismen während der terminalen erythroiden Differenzierung. Es wurden keine Caspase-abhängigen Spaltungen in den Kernstrukturen gefunden (48).

Apoptose und die Ausschleusung des Kerns während der terminalen Differenzierung zeigen allerdings viele Ähnlichkeiten (43). Der „tumor growth factor-ß“ (TGF-ß) scheint ebenso Einfluss auf die terminale Enukleation zu haben und diese zu fördern, während die Proliferation von frühen erythrozytären Vorläuferzellen gehemmt wird (110, 112).

Neben der morphologischen Beurteilung von Zytospinpräparaten und der durchfluss-zytometrischen Beurteilung der verschiedenen Reifungsgrade der erythropoetischen Zellstadien konnte die regelhafte Entwicklung der erythropoetischen Zellen in unserem Modell durch die Bestimmung der AB0 und Rhesuseigenschaften der Zellen gezeigt werden. Das AB0-Blutgruppensystem ist das am längsten bekannte und auch gleichzeitig das wichtigste System der Erythrozyten. Es wurde bereits 1901 von Landsteiner beschrieben. Je nach Vorhandensein oder Fehlen der Antigene A und B werden die Blutgruppen als A, B, AB oder 0 bezeichnet. Die Merkmale des AB0-Systems werden kodominant nach den Mendelschen Regeln vererbt. Das Rhesus-System, 1940 von Landsteiner und Wiener entdeckt, stellt auf Grund seiner Antigeneigenschaften das zweitwichtigste Antigen-System der Erythrozyten dar. Nach 18 Tagen zeigten die in das 3-Phasenmodell eingebrachten und expandierten humanen Stammzellen tatsächlich die dem Spender entsprechenden AB0 und Rhesuseigenschaften im verwendeten Testsystem. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Arbeiten, die für diverse Blutgruppensysteme ihr erstmaliges Auftreten in Abhängigkeit zum Reifegrad der erythropoetischen Zellen untersucht haben (17, 103). Arbeitsgruppen, die den Pathomechanismen von Noroviren untersuchten, stellten auch fest, dass die Noroviren über spezifische Kohlenhydrate, die in AB0 und Lewis Blutgruppenantigenen vorkommen, an Epithelzellen binden (40, 60). Die Expression von Blutgruppenantigenen nimmt hier ebenfalls mit dem Reifungsgrad dieser Epithelzellen zu und ermöglicht erst die Infektion mit Noroviren. Darüber hinaus ist bekannt, dass bestimmte Blutgruppensysteme wie das Kell-System bereits sehr früh in der Hämatopoese exprimiert werden und Antikörper gegen das Kell-Antigen bekanntermaßen die Erythropoese inhibieren (92).

Die hier verwendeten Erythropoesemodelle bringen nach zellmorphologischen und blutgruppen-serologischen Kriterien reife Erythrozyten hervor. In wie weit ex-vivo generierte rote Blutzellen in der Lage sind - gemäß ihrer physiologischen Bedeutung – unmittelbar nach Transfusion Sauerstoff zu den Geweben zu transportieren, ist nicht hinreichend untersucht. In diesem Zusammenhang wird auch die ex vivo Erzeugung von vollständig gereiften roten

Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen im industriellen Maßstab als Ersatz für Bluttransfusionen diskutiert (27).
Geeignete in-vitro Erythropoesemodelle, in denen der Einfluss von ADAR1 auf primäre Zellen im humanen System untersucht werden konnte, standen somit zur Verfügung.
Erschwerend war die Tatsache, dass primäre humane Stammzellen nur in einem sehr begrenzten Umfang zur Verfügung standen und die Stammzellen nicht von gesunden Probanden oder aus Nabelschnurblut stammten, sondern von Patienten nach einer Hochdosis-Chemotherapie. Die Qualität, Proliferation- und Differenzierungsfähigkeit dieser Stammzellen ist zum Teil durch das Alter der Patienten und die Vorbehandlung eingeschränkt. Grundsätzlich bleibt die Fähigkeit zur hämatopoetischen Regeneration im Knochenmark in gesunden Menschen zeitlebens erhalten. Aber auch die Stammzellen scheinen einem Alterungsprozess zu unterliegen. Untersuchungen zeigen, dass es auch in frühen hämatopoetischen Stammzellen mit zunehmendem replikativem Alter zu Verkürzungen der chromosomalen Telomere kommt, was letzlich die Lebensspanne einer Zelle in vitro und in vivo limitiert (2). Die adulte Stammzelle altert somit auch, und dies kann sowohl zu qualitativen als auch zu quantitativen Einbußen führen und ihre Möglichkeit zur Selbsterneuerung und auch ihr Reifungspotential betreffen (101).

7.2 ADAR1 m-RNA Expression während der Erythropoese

Mittels einer spezifischen ADAR1 real time PCR (35) konnte eine relative Quantifizierung der ADAR1-S und -L mRNA Expression in den humanen CD34+ Stammzellen, erythrozytären Vorläuferzellen und der Modellzelllinie K562 durchgeführt werden. Wir konnten erstmalig zeigen, dass man sowohl in humanen Stammzellen als auch in erythropoetischen Vorläuferzellen ADAR1 mRNA findet. Die Leberkarzinomzelllinie Huh7 ist dafür bekannt, konstitutiv hohe ADAR1 Level zu exprimieren (107). Ebenso exprimieren humane mononukleäre Zellen ADAR1. Der Vergleich der ADAR1 mRNA Level ergab, dass die CD34+ Stammzellen und alle Stadien der erythrozytären Zellen aus den Erythropoese-modellen ADAR1 mRNA in einem signifikanten Umfang exprimierten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stadien festgestellt werden.
Die Tatsache, dass die erythozytären Zellen eine 2- bis 10fach höhere ADAR1 mRNA Expression als in Huh7 oder in humanen mononukleären Zellen zeigten, lässt vermuten, dass

ADAR1 vermutlich eine relevante Rolle während der Erythropoese spielt und für die Reifung konstitutiv vorhanden sein muss.

7.3 Transfektion primärer hämatopoetischer Stammzellen

Zur Untersuchung der Funktion von ADAR1 in der humanen Erythropoese sollte die ADAR1 Genexpression von primären hämatopoetischen Stammzellen gehemmt werden. Primäre humane Stammzellen gelten als schwer transfizierbar, so dass zunächst unterschiedliche Transfektionsmethoden ausgetestet wurden.

Kronenwett et al. transfizierten primäre humane hämatopoetische Zellen (49). Hierfür verwendeten sie FITC-konjugierte asODN, die sie mittels kationischer Lipide (DOTAP und DOSPER) in die Zellen transfizierten. Verglichen mit der Aufnahme der asODN aus dem Medium ohne Transfektionsreagenz, erreichten sie eine 30 bis 800fache Steigerung der asODN Aufnahme. Absolute Transfektionsraten sind nicht angegeben und der Einsatz von asODN zum gezielten Abschalten von Genen wird in der Studie erwähnt aber wird nicht weiter untersucht Um die Transfektionseffizienz unterschiedlicher Transfektionsmethoden besser vergleichen zu können, wurde für diese Arbeit ein Reportergen verwendet. Das Gen für das Green Fluorescent Protein (GFP) wurde in die Zellen transfiziert und kann leicht mit dem Fluoreszenzmikroskop oder am FACS nachgewiesen werden. Das GFP ist ein Protein der Qualle Aequoria victoria, das bei entsprechender Anregung grün fluoresziert. Der Vorteil liegt darin, dass kein Substratumsatz notwendig ist, um das Gen nachzuweisen, sondern das Genprodukt selbst ist ein fluoreszierender Farbstoff.

Die Transfektion der primären hämatopoetischen Stammzellen mit verschiedenen liposomalen Transfektionsreagenzien (Dosper, Dotap, Jet Pei) war sehr uneffizient, auch wenn andere Publikationen einen erfolgreichen Gentransfer in humane CD34+ hämatopoetische Zellen mittels liposomaler Transfektionsreagenzien beschrieben haben (10, 49). Effiziente Transfektionsergebnisse wurden schließlich mit der Nucleofector™ Technologie der Firma Amaxa erreicht, ein Transfektionssystem, welches zelltypspezifische Transfektionsreagenzien mit einem für primäre CD34+ Zellen optimierten Elektroporationsverfahren kombiniert (31, 32, 51). Damit konnte in der vorliegenden Arbeit eine Transfektionseffizienz der Zellen von 78 ± 2% für K562 und 67 ± 4% für CD34+ Stammzellen erreicht werden (FACS Analyse nach 24 Stunden in Kultur).

Die Verwendung von asODN gegen ADAR1, die in der humanen Leberkarzinomzelllinie Huh7 zur Hemmung der ADAR1 Expression erfolgreich eingesetzt wurden (36), erbrachten in den primären hämatopoetischen CD34+ Stammzellen keinen ausreichenden Hemmeffekt, da diese Zellen wahrscheinlich verglichen mit der Zelllinie Huh7 eine deutlich höhere ADAR1 mRNA Konzentration haben. Aus diesem Grund wurde der Ansatz, die ADAR1 Expression mit asODN gegen ADAR1 zu hemmen, nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurde nun eine relativ neue Technik unter Verwendung von siRNA erprobt. Die Verwendung spezifischer siRNA gegen ADAR1-S und ADAR1-L erzielte eine zufriedenstellende Hemmung. Erstmals konnte die ADAR1 mRNA Expression in den CD34+ Stammzellen auf 38,7 ± 10,8% Restaktivität und in der humanen Modellzelllinie K562 auf 24,8 ± 6,9% Restaktivität gesenkt werden. In einer Studie wurde diese siRNA bereits erfolgreich zur Hemmung von ADAR1 in Huh7 eingesetzt und die Sequenz veröffentlicht (107). Die chimären Mäuse hatten eine vergleichbare, um die Hälfte reduzierte ADAR1-Expression, die in diesem Tiermodell bereits zu dramatischen Effekten und dem Fruchttod der Mäuseembryonen führte (105). Auf dieser Basis erschien die erzielte Hemmung im humanen Erythropoesemodell als ausreichend, um Auswirkungen einer ADAR1 Defizienz zu untersuchen.

Das ADAR1 Protein war in den durchgeführten Immunoblots in deutlich geringerer Konzentration nachweisbar, so dass man von einer signifikanten Expressionshemmung über mindestens 96 Stunden ausgehen kann. Eine mehrfache Transfektion, z. B. alle 96 Stunden, war auf Grund der relativ hohen Zelltoxizität der Nucleofection nicht möglich. Die Vitalität der Zellen wurde mit dem Zellmembranfarbstoff Trypanblau gemessen. Die Vitalität sank von >95% vor der Transfektion auf ca. 50% 24 Stunden nach der Transfektion. Die sinkende Vitalität nach der Transfektion ist ein Effekt, der auf die Toxizität der Transfektionsmethode zurückzuführen ist, da dieser Effekt sowohl die Stammzellen mit siRNA gegen ADAR1 als auch die Stammzellen mit Mock-Transfektion bzw. Kontoll-siRNA betraf. Aus diesem Grund waren unsere Untersuchungen auf eine einmalige initiale Transfektion der hämatopoetischen CD34+ Stammzellen direkt nach der Aufreinigung limitiert, bevor die Stammzellen in die entsprechenden Erythropoesemodelle und Kurzzeitkulturen eingebracht wurden. Andere Studien zeigten, dass dieses methodische Vorgehen bei dem Ausschalten anderer Gene

(Caspase 3) in den hämatopoetischen Stammzellen mittels siRNA und Nucleofection zu einem Ausbleiben der Enukleation führte (11).
Die RNAi Technik ist eine extrem effiziente Methode bei der Abschaltung von Genen. Die Verwendung von siRNA zeigte beispielsweise bei der Herunterregulierung des VR1 (vanilloid receptor subtyp1) eine bis zu 1000-fach höhere Effizienz im Vergleich zum Einsatz von asODN (33). Trotzdem scheint es einige virale und zelluläre Faktoren zu geben, die die Effizienz dieser Technik beeinträchtigen. So identifizierte eine Studie ADAR1 selbst als einen zellulären Faktor, der die Effizienz von siRNA in Säugern limitiert, indem es zu einer direkten Interaktion mit der siRNA kommt, wodurch das Potential der siRNA reduziert wurde (109).

7.4 Proliferation und Differenzierung von ADAR1 defizienten, humanen CD34+ Stammzellen

Die transfizierten CD34+ Stammzellen wurden in die optimierten Erythropoesemodelle eingebracht und über 16 Tage (2-Phasenmodell) oder bis zu 21 Tage (3-Phasenmodell) kultiviert. Die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der Zellen wurden während der Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht und die mit siRNA behandelten Zellen mit mock-transfizierten bzw. Kontroll-siRNA transfizierten Zellen verglichen. Die Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren oder auch andere Einflüsse der Zellkultur können z. B. hemmende Effekte der siRNA auf die humane Erythropoese kompensieren bzw. maskieren. Aus diesem Grund wurden die Versuche in zwei unterschiedlichen Flüssigkulturmodellen (2-Phasen- und 3-Phasenmodell) mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und Kultivierungsdauer durchgeführt. Dadurch konnten die spezifischen und unspezifischen Einflüsse der jeweiligen Zellkultivierung besser Berücksichtigung finden. Zur Beurteilung der Proliferation und der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen während der erythropoetischen Entwicklung wurden die Zellzahl, Vitalität und die Expression der Oberflächenmoleküle CD36, CD45 und GPA zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur gemessen. Überraschenderweise fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen mit initial gehemmter ADAR1-Expression und den Kontrollen. Ebenfalls zeigte die morphologische Beurteilung der hämatopoetischen Zellen auf Zytospin-Präparaten, dass die

Ausreifung der Stammzellen zu „späten“ Zellen der Erythropoese sowohl in den mit siRNA behandelten Zellen als auch in den Kontrollen vergleichbar waren.

Die transiente Expressionshemmung von ADAR1 in CD34+ Stammzellen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erythropoetische Zellentwicklung in den verwendeten Langzeitflüssigkulturen. Welchen Einfluss ADAR1 auf späte erythropoetische Vorläuferzellen hat und ob eine Hemmung der ADAR1-Expression in späteren Reifungsstufen einen Effekt zeigen würde, lässt sich durch unsere Ergebnisse nicht beantworten. Die transiente, auf ca. 4 Tage begrenzte Hemmwirkung der ADAR1-Expression in Stammzellen mit der spezifischen siRNA, die mittels Nucleofection in die Zellen gelangte, erlaubt keine stringenten Rückschlüsse auf spätere Erythropoesestadien. Hierfür könnten weiterführende Experimente mit aufgereinigten Subpopulationen (CD36+/GPA+ und CD36-/GPA++) von Interesse sein. Darüber hinaus lässt sich nicht mit aller Sicherheit ausschließen, dass die verbleibende ADAR1 Konzentration in den Stammzellen für eine biologische Wirksamkeit im Rahmen der Erythropoese ausreicht, so dass Defekte nicht offensichtlich sichtbar werden.

7.5 Koloniebildung von ADAR1 defizienten humanen CD34+ Stammzellen

Um den Einfluss der ADAR1 Hemmung auf das Wachstum und klonogene Potential der hämatopoetischen Stammzellen zu untersuchen, wurden Klonogenitätsassays durchgeführt. Dazu wurden die Stammzellen direkt nach der Transfektion in konstanter Zahl aus der Flüssigkultur entnommen und in die semisoliden Kurzzeitkulturen mit definierten Wachstumsfaktoren eingebracht. Nach 14 Tagen wurden die koloniebildenden Einheiten, die BFU-E und CFU-GM, unter dem Lichtmikroskop ausgewertet (88). Eine Vielzahl an Zytokinen fördert nicht nur exklusiv die Erythropoese, sondern alle hämatopoetischen Reihen in diesen Kurzzeitkulturen. Hier konnten wir erstmals für die humane Hämatopoese nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und ADAR1-siRNA-behandelten Zellen bestand ($p<0,05$). Dabei zeigten die Kontrollen (mock- und Kontroll-siRNA transfizierte Zellen) vergleichbare Werte. Hieraus kann man schlussfolgern, dass die siRNA keine unspezifischen Effekte in den Zellen hervorruft.

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten, sowohl der CFU-GM als auch der BFU-E, bei den mit spezifischer ADAR1 siRNA behandelten Zellen, war signifikant vermindert,

verglichen mit den beiden Kontrollen (Kontroll-siRNA und mock-behandelte Zellen) ($p<0,05$). Hierbei konnte die Klonogenität der hämatopoetischen Stammzellen ohne Transfektion nicht als Bezugswert verwendet werden und eignete sich nicht als Kontrolle, um die Auswirkung von ADAR1 Defizienz, vermittelt durch spezifische ADAR1-siRNA, zu untersuchen. Die Toxizität der Transfektion hatte auch einen starken Einfluss auf die Anzahl der Kolonien im Klonogenitätsassay, so dass der Vergleich dieser unbehandelten Zellen mit transfizierten ADAR1 defizienten Zellen falsche Ergebnisse liefern würde. Die Vergleichszellen müssen den gleichen toxischen Einflüssen der Transfektion ausgesetzt werden (mock-Kontrolle) und zusätzlich müssen unspezifische Effekte von siRNA (Kontroll-siRNA) ausgeschlossen werden. Diese Effekte konnten ausgeschlossen werden, da transfizierte Zellen vergleichbare Werte zeigen.

Hierzu passen die Ergebnisse von Hartner et al. (34), der in seinem ADAR1-Knock-Out Mausmodell mit defektem ADAR1-Gen zeigen konnte, dass ADAR1 Defizienz in der Maus zu hämatopoetischen Defekten und zu einem intrauterinen Tod der ADAR1-defizienten Mäuseembryonen führt. Die Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen aus der Leber, dem Dottersack und dem peripheren Blut der ADAR1-defizienten Mäuseembryonen (E11,5) in einem Klonogenitätsassay ergab eine drastische Reduktion der Anzahl der BFU-E, CFU-E und CFU-GM verglichen zu Kontrollmäuseembryonen. Die hämatopoetischen Defekte umfassten damit sowohl erythroide wie auch myeloide Progenitorzellen, die ein drastisch reduziertes, aber noch vorhandenes Potential hatten, in vitro Kolonien zu bilden. Das Differenzierungspotential der hämatopoetischen Zellreihen war allerdings nicht beeinträchtigt. Unter anderem waren zahlreiche zirkulierende primitive Erythrozyten in diesen ADAR1-defizienten Embryonen ausgebildet. Diese waren morphologisch unauffällig und es konnten keine weiteren Defekte außerhalb der fötalen Leber in ADAR1-defizienten Embryonen beobachtet werden.

Die von uns durchgeführten Klonogenitätsassays im humanen System erbrachten interessanterweise ein ähnliches Ergebnis. ADAR1 defiziente humane Stammzellen zeigten auch eine signifikante ($p<0,05$) Reduktion der Anzahl der BFU-E und CFU-GM, verglichen mit Kontrollen (Kontroll-siRNA und mock-behandelte Zellen), wenn auch die Reduzierung verständlicherweise nicht so drastisch wie im Knock-Out-Mausmodell war. Neuere Studien

der Arbeitsgruppe konnten auch nicht hinreichend erklären, warum ADAR1 Defizienz im Mausmodell nicht mit Leben und einer normalen Entwicklung vereinbar ist (81).
Auch die Arbeitsgruppe von Wang et al. erzeugte schließlich ADAR1-Knock-Out-Mäuse mit einem vollkommen defekten ADAR1-Gen (106). Diese Mäuseembryonen starben ebenfalls embryonal in der mittleren Phase der Tragzeit. Auffällig war, genauso wie bei den chimären Mäusen (105), dass es zu einer Anämie, einer Störung der Erythropoese und einer Degeneration des Lebergewebes gekommen war. Während der fetalen Entwicklung der Erythropoese im Dottersack findet auch in den ADAR1-Knock-Out-Mäusen eine normale Ausreifung der erythropoetischen Progenitorzellen statt. Das heißt, dass die hämatopoetischen Stammzellen ADAR1-defizienter Mäuse eigentlich zu normaler erythropoetischer Ausreifung befähigt sind. Die Störung der erythropoetischen Entwicklung trat erst bei der Verlagerung der Erythropoese vom Dottersack in die Leber auf. Die Autoren vermuten, dass das umgebende „microenvironment“ der Leber eine entscheidende Rolle spielt und die Störung der Hämatopoese der ADAR1-defizienten Mäuseembryonen nicht unbedingt in den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen selbst begründet ist. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Seeburg und unsere Ergebnisse, die zumindest einen direkten Einfluss der ADAR1 Defizienz auf das klonogene Potential der Vorläuferzellen zeigen konnten.

7.6 Genexpressionsanalysen von humanen erythrozytären Zellen

Die Genexpressionsanalyse verschiedener in der humanen Apoptose involvierter Gene zeigte keinen Einfluss von ADAR1 Defizienz auf die Expression dieser Gene. Ein deutliches Signal konnte nur für TNFR2 sowohl bei ADAR1 defizienten als auch mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gezeigt werden. Genexpressionsanalysen während der Erythropoese, d.h. am Tag 6 und Tag 13, zeigten wieder eine deutliche Genaktivität von TNFR2. Interessanterweise erhält man am Tag 6 auch eine etwas schwächere Genaktivität von TNFR1, die am Tag 13 nicht mehr zu detektieren ist.
Die transiente Expression von TNFR1 in der frühen Phase der erythrozytären Differenzierung und die Expression von TNFR2 während der gesamten Differenzierung - ausgehend von CD34+ humanen Stammzellen - wurde ebenfalls von Xiao et al. beschrieben (108). Die

unterschiedliche Expression der TNF-Rezeptoren ist demnach abhängig von dem Reifungsgrad der Zellen und impliziert eine unterschiedliche Sensitivität für TNF-α in den verschiedenen Stadien der erythrozytären Vorläuferzellen.
Das TNF-α-Gen codiert für ein multifunktionales proinflammatorisches Zytokin. Dieses Zytokin wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert. TNF-α kann an diese über TNFR1 und TNFR2 binden; hierbei handelt sich um einen autokrinen und parakrinen positiven Feedback-Mechanismus. Das Zytokin spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Differenzierung, Zellproliferation, Apoptose und vielen anderen biologischen Prozessen insbesondere im Rahmen von Entzündungen. Ausgehend von unseren Genexpressions-Ergebnissen wurden spezifische PCR-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse konnten bestätigt werden. Die Konzentration von TNFR1-mRNA wird mit zunehmender Ausreifung der Erythropoese deutlich schwächer, dagegen steigt zu dieser Zeit die TNFR2-mRNA Konzentration an. Die Konzentration von TNF-α-mRNA war an allen Tagen konstitutiv sichtbar. Eine Sekretion von TNF-α in den Kulturüberstand war im ELISA nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Entweder ist das verwendete Testsystem nicht sensitiv genug oder es findet keine Translation von TNF-α-mRNA statt.

Es wurden weitere Kandidatengene, Bcl-xl aber auch ergänzt um bekannte Gene der Signaltransduktion, GATA-1 und GATA-2, detailliert untersucht. Mit verschiedenen sequenzspezifischen Primern wurden zu unterschiedlichen Zeiten während der Erythropoese PCR-Analysen durchgeführt. Der Transkriptionsfaktor GATA-1 ist essentiell für eine normale Erythropoese. Erythropoetin, welches das wichtigste Zytokin fur die humane Erythropoese darstellt, aktiviert den Transkriptionsfaktor GATA1. GATA-1 wiederum induziert die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xl (30). Die spezifischen PCR-Analysen zeigten, dass während der Erythropoese spätestens ab Tag 10 alle untersuchten Kandidatengene deutlich vorhanden waren. Über den letzten Schritt der terminalen Differenzierun, die Enukleation, ist noch sehr wenig bekannt (48). Kandidatengene, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei diesem biologischen Vorgang spielen, d.h. Gene, die durch ihre Hoch- oder Runterregulation den Prozess der Enukleation induzieren, konnten nicht identifiziert werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass es hinsichtlich der humanen Hämatopoese in ADAR1 defizienten Zellen Übereinstimmungen mit den Ergebnissen aus den ADAR1-Knock-Out-Mäusen (34) gibt. Die ADAR1 Defizienz vermindert die Anzahl der hämatopoetischen Progenitorzellen, die Kolonien vom Typ CFU-GM und BFU-E, ausbilden.

Wie wir erstmalig im humanen System zeigen konnten, beeinflusst ADAR1 nicht die weitere Ausdifferenzierung entlang der erythropoetischen Zellreihe.

Es ist notwendig weitere Strategien zu entwickeln, mit denen eine stabile, andauernde Hemmung von ADAR1 in den humanen erythropoetischen Zellen erreicht wird. Das könnte bedeutend sein, wenn in zukünftigen Experimenten der Einfluss der ADAR1 Hemmung auf die terminale Enukleation der Normoblasten genauer untersucht würde. Hierzu werden derzeitig stabile „Gen-Silencing“ Methoden etabliert.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mitglieder der ADAR (Adenosine deaminase acting on RNA) Familie katalysieren die hydrolytische Deaminierung von Adenosin zu Inosin in doppelsträngiger RNA. In Säugern wurden bis jetzt drei Mitglieder der ADAR-Genfamilie identifiziert. ADAR1 wird in vielen Geweben exprimiert und spielt eine Rolle bei der viralen Abwehr. Die genaue biologische Funktion von ADAR1 im Menschen ist aber weitestgehend unbekannt. Ausgehend von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Wang, die Störungen der Blutbildung, vor allem Reifungs- und Bildungsstörung der Erythrozyten in ADAR1-defizienten Mäusen beschrieben, wurde in dieser Arbeit die bislang unbekannte Auswirkung einer Hemmung der ADAR1 Expression in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen auf die regelhafte Ausreifung und Differenzierung während der humanen Erythropoese untersucht.

Die humane Erythropoese wird durch ein komplexes Netzwerk, bestehend aus zellulären Elementen der Knochenmarknische einerseits und aus verschiedenen Wachstumsfaktoren andererseits, reguliert. Hierbei sind insbesondere Stammzellfaktor, Erythropoetin und Insulin-like growth factor I wichtige Faktoren für die Erythropoese.

In der hier vorgelegten Dissertationsschrift wurden primäre humane hämatopoetische Stammzellen in zwei Flüssig-Zellkulturmodelle eingebracht, die sich hinsichtlich Dauer und verwendeter Wachstumsfaktoren unterschieden. Die regelhafte Ausreifung der Stammzellen entsprechend der in vivo Situation über alle Stadien der Erythropoese bis zum entkernten Retikulozyten wurde untersucht. Eine spezifische realtime RT-PCR ermöglichte eine relative Quantifizierung der ADAR1-mRNA in den humanen Stammzellen und erythropoetischen Vorläuferzellen. Ein effizienter Transfer von spezifischer „short interfering RNA“ (siRNA) in die humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurde mittels Nukleofection erreicht, eine speziell für schwer-transfizierbare Primärzellen entwickelte Technologie. Der Transfer der ADAR1 spezifischen siRNA führte zur signifikanten Inhibition der Genexpression von ADAR1 in den humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, so dass die Bedeutung des Enzyms für die Reifung humaner hämatopoetischer Stammzellen zu terminal differenzierten Retikulozyten untersucht werden konnte.

Es wurde gezeigt, dass primäre humane hämatopoetische Stammzellen in den Flüssigkulturen alle Stadien der Erythropoese abbilden und am Ende die Kultur überwiegend aus

Normoblasten und terminal entkernten Retikulozyten bestehen. Hämatopoetische Stammzellen und erythroide Zellen exprimieren konstitutiv bzw. während der Erythropoese ADAR1 in einer relevanten Menge ohne erkennbare stadienspezifische Schwankungen. Die Transfektion von spezifischer ADAR1 siRNA in hämatopoetische Stammzellen führte zu einer transienten Hemmung von ADAR1. Während der Ausreifung in den Flüssigkulturen zeigte sich jedoch überraschenderweise kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen bezüglich Proliferation, Morphologie und Expression verschiedener Oberflächenmarker (CD34, CD45, CD36, GPA). Trotz der ADAR1 Inhibition mittels siRNA waren die Zellen in der Lage, sich von der Stammzelle zum Normoblasten und entkernten Retikulozyten zu entwickeln.

Darüber hinaus wurden Genexpressionsanalysen an erythropoetischen Vorläuferzellen, die aus untransfizierten und transfizierten Stammzellen hervorgegangen waren, durchgeführt. Die Expression von Apoptose- und Zellzyklus- spezifischen Genen wurde durch ADAR1 Defizienz nicht signifikant beeinflusst.

Im Gegensatz zu den Flüssigkulturen konnten in Klonogenitätsassays, in denen die Fähigkeit der transfizierten Stammzellen zur Koloniebildung untersucht wurde, ein Einfluß der ADAR1 Defizienz gezeigt werden. Das Potential, koloniebildende Einheiten (BFU-E und CFU-GM) auszubilden, war in diesen transfizierten Stammzellen gegenüber den Kontrollzellen signifikant vermindert ($p<0,05$). Diese Beobachtung betraf somit sowohl erythroide als auch myeloide Vorläuferzellen. Die Hemmung der ADAR1 Expression scheint somit eher das frühe Stammzellkompartiment mit einem myeloischen und erythropoetischen Entwicklungspotential zu betreffen als exklusiv die Ausreifung der Erythropoese zu beeinflussen.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Akashi K, He X, Chen J, Iwasaki H, Niu C, Steenhard B, Zhang J, Haug J, Li L: Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. Blood 101: 383-389, 2003.

2. Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, Weissman IL: Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. Blood 102: 517-520, 2003.

3. Bass BL: RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. Trends Biochem Sci 22: 157-162, 1997.

4. Bass BL, Weintraub H: A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. Cell 48: 607-613, 1987.

5. Bass BL, Weintraub H: An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. Cell 55: 1089-1098, 1988.

6. Benne R, van den BJ, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC: Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. Cell 46: 819-826, 1986.

7. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE: Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 5320-5325, 1997.

8. Brusa R, Zimmermann F, Koh DS, Feldmeyer D, Gass P, Seeburg PH, Sprengel R: Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. Science 270: 1677-1680, 1995.

9. Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB: Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. Nature 387: 303-308, 1997.

10. Byk G, Dubertret C, Escriou V, Frederic M, Jaslin G, Rangara R, Pitard B, Crouzet J, Wils P, Schwartz B, Scherman D: Synthesis, activity, and structure--activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer. J Med Chem 41: 229-235, 1998.

11. Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M: Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. Blood 103: 4310-4316, 2004.

12. Casey JL, Gerin JL: Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. J Virol 69: 7593-7600, 1995.

13. Chasis JA, Mohandas N: Red blood cell glycophorins. Blood 80: 1869-1879, 1992.

14. Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC, Nishikura K: A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. RNA 6: 755-767, 2000.

15. Chen SH, Habib G, Yang CY, Gu ZW, Lee BR, Weng SA, Silberman SR, Cai SJ, Deslypere JP, Rosseneu M, .: Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. Science 238: 363-366, 1987.

16. Connor J, Pak CC, Schroit AJ: Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. J Biol Chem 269: 2399-2404, 1994.

17. Daniels G, Green C: Expression of red cell surface antigens during erythropoiesis. Vox Sang 78 Suppl 2: 149-153, 2000.

18. Desterro JM, Keegan LP, Lafarga M, Berciano MT, O'Connell M, Carmo-Fonseca M: Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. J Cell Sci 116: 1805-1818, 2003.

19. Dexter TM, Heyworth CM, Spooncer E, Ponting IL: The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 327: 85-98, 1990.

20. Dolznig H, Habermann B, Stangl K, Deiner EM, Moriggl R, Beug H, Mullner EW: Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. Curr Biol 12: 1076-1085, 2002.

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

22. Eichhorst ST, Krammer PH: Apoptose. Edited by D Ganten, K Ruckpaul. Grundlagen der Molekularen Medizin. Springer, 2003, pp. 181-212.

23. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-498, 2001.

24. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-811, 1998.

25. Fire AZ: Gene silencing by double-stranded RNA. Cell Death Differ 14: 1998-2012, 2007.

26. George CX, Samuel CE: Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 4621-4626, 1999.

27. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L: Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol 23: 69-74, 2005.

28. Greaves M, Robinson J, Delia D, Sutherland R, Newman R, Sieff C: Mapping cell surface antigen expression of haemopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies. Ciba Found Symp 84: 109-129, 1981.

29. Gregoli PA, Bondurant MC: The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. Blood 90: 630-640, 1997.

30. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ: GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. Blood 94: 87-96, 1999.

31. Greiner J, Wiehe J, Wiesneth M, Zwaka TP, Prill T, Schwarz K, Bienek-Ziolkowski M, Schmitt M, Döhner H, Hombach V, Torzewski J: Transient Genetic Labelling of Human CD34-Positive Hematopoietic Stem Cells Using Nucleofection. Transfus Med Hemother 31: 136-141, 2004.

32. Gresch O, Engel FB, Nesic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G, Lun K: New non-viral method for gene transfer into primary cells. Methods 33: 151-163, 2004.

33. Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J: Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-

methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. Nucleic Acids Res 31: 3185-3193, 2003.

34. Hartner JC, Schmittwolf C, Kispert A, Muller AM, Higuchi M, Seeburg PH: Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1. J Biol Chem 279: 4894-4902, 2004.

35. Hartwig D, Schoeneich L, Greeve J, Schutte C, Dorn I, Kirchner H, Hennig H: Interferon-alpha stimulation of liver cells enhances hepatitis delta virus RNA editing in early infection. J Hepatol 41: 667-672, 2004.

36. Hartwig D, Schutte C, Warnecke J, Dorn I, Hennig H, Kirchner H, Schlenke P: The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon-alpha-stimulated host cells. J Viral Hepat 13: 150-157, 2006.

37. Herbert A, Alfken J, Kim YG, Mian IS, Nishikura K, Rich A: A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 8421-8426, 1997.

38. Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L: Zytokine und ihre Netzwerke. Edited by GA Holländer. Immunologie. ElsevierGmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2006, pp. 147-182.

39. Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T: Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. Genes Dev 11: 774-785, 1997.

40. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK: Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. Trends Microbiol 12: 279-287, 2004.

41. Jayan GC, Casey JL: Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression. J Virol 76: 12399-12404, 2002.

42. Keegan LP, Gallo A, O'Connell MA: The many roles of an RNA editor. Nat Rev Genet 2: 869-878, 2001.

43. Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A: Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. Blood 82: 2340-2352, 1993.

44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257, 1972.

45. Kim U, Wang Y, Sanford T, Zeng Y, Nishikura K: Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 11457-11461, 1994.

46. Kohler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH: Determinants of Ca2+ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. Neuron 10: 491-500, 1993.

47. Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K, Weissman IL: Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. Nature 407: 383-386, 2000.

48. Krauss SW, Lo AJ, Short SA, Koury MJ, Mohandas N, Chasis JA: Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins. Blood 106: 2200-2205, 2005.

49. Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M, Sczakiel G, Haas R: Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. Blood 91: 852-862, 1998.

50. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.

51. Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM: Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. Stem Cells 22: 531-543, 2004.

52. Lee F: Growth factors controlling the development of hemopoietic cells. Prog Clin Biol Res 352: 385-390, 1990.

53. Lee LG, Connell CR, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res 21: 3761-3766, 1993.

54. Lehmann KA, Bass BL: Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. Biochemistry 39: 12875-12884, 2000.

55. Lehmann KA, Bass BL: The importance of internal loops within RNA substrates of ADAR1. J Mol Biol 291: 1-13, 1999.

56. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408, 2001.

57. Luo GX, Chao M, Hsieh SY, Sureau C, Nishikura K, Taylor J: A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA. J Virol 64: 1021-1027, 1990.

58. Maas S, Patt S, Schrey M, Rich A: Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 14687-14692, 2001.

59. Maas S, Rich A, Nishikura K: A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. J Biol Chem 278: 1391-1394, 2003.

60. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le PJ: Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. Gastroenterology 122: 1967-1977, 2002.

61. McCulloch EA, Till JE: The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. Radiat Res 13: 115-125, 1960.

62. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Higuchi M, Seeburg PH: RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family. J Biol Chem 271: 31795-31798, 1996.

63. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Seeburg PH, Higuchi M: A mammalian RNA editing enzyme. Nature 379: 460-464, 1996.

64. Miyagawa S, Kobayashi M, Konishi N, Sato T, Ueda K: Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. Br J Haematol 109: 555-562, 2000.

65. Moliterno AR, Spivak JL: Erythropoiesis. Edited by KC Anderson, PM Ness. Scientific Basis of Transfusion Medicine 2nd edition. WB Saunders Co, Philadelphia, 2000, pp. 1-12.

66. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T: bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. J Exp Med 189: 1691-1698, 1999.

67. Murray LJ, Young JC, Osborne LJ, Luens KM, Scollay R, Hill BL: Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. Exp Hematol 27: 1019-1028, 1999.

68. Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Wickrema A: Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. J Clin Invest 94: 34-43, 1994.

69. Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, Kobari L, Thierry D, Douay L: Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. Nat Biotechnol 20: 467-472, 2002.

70. O'Connell MA, Krause S, Higuchi M, Hsuan JJ, Totty NF, Jenny A, Keller W: Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. Mol Cell Biol 15: 1389-1397, 1995.

71. Ogawa M: Hematopoiesis. J Allergy Clin Immunol 94: 645-650, 1994.

72. Ohneda K, Yamamoto M: Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. Acta Haematol 108: 237-245, 2002.

73. Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M: Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. Blood 92: 3658-3668, 1998.

74. Patterson JB, Samuel CE: Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. Mol Cell Biol 15: 5376-5388, 1995.

75. Patterson JB, Thomis DC, Hans SL, Samuel CE: Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. Virology 210: 508-511, 1995.

76. Paul MS, Bass BL: Inosine exists in mRNA at tissue-specific levels and is most abundant in brain mRNA. EMBO J 17: 1120-1127, 1998.

77. Paz N, Levanon EY, Amariglio N, Heimberger AB, Ram Z, Constantini S, Barbash ZS, Adamsky K, Safran M, Hirschberg A, Krupsky M, Ben-Dov I, Cazacu S, Mikkelsen T, Brodie C, Eisenberg E, Rechavi G: Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. Genome Res 17: 1586-1595, 2007.

78. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR: Taschenatlas der Immunologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.

79. Polson AG, Bass BL: Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase. EMBO J 13: 5701-5711, 1994.

80. Polson AG, Bass BL, Casey JL: RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. Nature 380: 454-456, 1996.

81. Riedmann EM, Schopoff S, Hartner JC, Jantsch MF: Specificity of ADAR-mediated RNA editing in newly identified targets. RNA 14: 1110-1118, 2008.

82. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989.

83. Scicchitano MS, McFarland DC, Tierney LA, Narayanan PK, Schwartz LW: In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression. Exp Hematol 31: 760-769, 2003.

84. Scott J: A place in the world for RNA editing. Cell 81: 833-836, 1995.

85. Seeburg PH, Hartner J: Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. Curr Opin Neurobiol 13: 279-283, 2003.

86. Seeburg PH, Higuchi M, Sprengel R: RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. Brain Res Brain Res Rev 26: 217-229, 1998.

87. Sennikov SV, Injelevskaya TV, Krysov SV, Silkov AN, Kovinev IB, Dyachkova NJ, Zenkov AN, Loseva MI, Kozlov VA: Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen+ and glycophorin A+ cells from human bone marrow. BMC Cell Biol 5: 39, 2004.

88. Sheikhzadeh S, Hammers HJ, Hartwig D, Kirchner H, Schlenke P: Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow cytometry-based standardization of short-term culture assays. J Hematother Stem Cell Res 10: 881-885, 2001.

89. Simmons PJ, Torok-Storb B: CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. Blood 78: 2848-2853, 1991.

90. Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH: RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. Cell 67: 11-19, 1991.

91. Sommer B, Monyer H, Wisden W, Verdoorn TA, Burnashev N, Sprengel R, Sakmann B, Seeburg PH: Glutamate-gated ion channels in the brain. Genetic mechanism for generating molecular and functional diversity. Arzneimittelforschung 42: 209-210, 1992.

92. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ: The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. Blood 93: 4425-4435, 1999.

93. Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M: Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 4515-4519, 1981.

94. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y, Makino K, Taniguchi S, Inaba S, Kondo S, Tanaka T, Akashi K, Minamishima I, .: Cytotoxic drug and cytotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. Bone Marrow Transplant 10: 215-220, 1992.

95. Testa U: Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. Leukemia 18: 1176-1199, 2004.

96. Thomas JO, Kornberg RD: An octamer of histones in chromatin and free in solution. Proc Natl Acad Sci U S A 72: 2626-2630, 1975.

97. Timmons L, Fire A: Specific interference by ingested dsRNA. Nature 395: 854, 1998.

98. Timmons L, Tabara H, Mello CC, Fire AZ: Inducible systemic RNA silencing in Caenorhabditis elegans. Mol Biol Cell 14: 2972-2983, 2003.

99. Towbin H, Gordon J: Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. J Immunol Methods 72: 313-340, 1984.

100. urran-Schleinitz T, Imbert AM, Humeau L, Bardin F, Charbord P, Chabannon C: Early progenitor cells from human mobilized peripheral blood express low levels of the flt3 receptor, but exhibit various biological responses to flt3-L. Br J Haematol 106: 357-367, 1999.

101. Van ZG, Liang Y: The role of stem cells in aging. Exp Hematol 31: 659-672, 2003.

102. von LM, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, Lowenberg B, Beug H: The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood 94: 550-559, 1999.

103. Wada H, Suda T, Miura Y, Kajii E, Ikemoto S, Yawata Y: Expression of major blood group antigens on human erythroid cells in a two phase liquid culture system. Blood 75: 505-511, 1990.

104. Wagner RW, Yoo C, Wrabetz L, Kamholz J, Buchhalter J, Hassan NF, Khalili K, Kim SU, Perussia B, McMorris FA, .: Double-stranded RNA unwinding and modifying activity is detected ubiquitously in primary tissues and cell lines. Mol Cell Biol 10: 5586-5590, 1990.

105. Wang Q, Khillan J, Gadue P, Nishikura K: Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. Science 290: 1765-1768, 2000.

106. Wang Q, Miyakoda M, Yang W, Khillan J, Stachura DL, Weiss MJ, Nishikura K: Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene. J Biol Chem 279: 4952-4961, 2004.

107. Wong SK, Lazinski DW: Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15118-15123, 2002.

108. Xiao W, Koizumi K, Nishio M, Endo T, Osawa M, Fujimoto K, Sato I, Sakai T, Koike T, Sawada K: Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. Exp Hematol 30: 1238-1247, 2002.

109. Yang W, Wang Q, Howell KL, Lee JT, Cho DS, Murray JM, Nishikura K: ADAR1 RNA deaminase limits short interfering RNA efficacy in mammalian cells. J Biol Chem 280: 3946-3953, 2005.

110. Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, Freyssinier JM, Rouyer-Fessard P, Cramer E, Guichard J, Varet B, Hermine O: Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. Exp Hematol 28: 885-894, 2000.

111. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O: Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. J Exp Med 193: 247-254, 2001.

112. Zermati Y, Varet B, Hermine O: TGF-beta1 drives and accelerates erythroid differentiation in the epo-dependent UT-7 cell line even in the absence of erythropoietin. Exp Hematol 28: 256-266, 2000.

10 ANHANG

10.1 Ethikkommission

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Holger Kirchner

Dr. I. Dorn, Dr. D. Hartwig
Dipl. Biol. S. Boie
PD Dr. P. Schlenke

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein
Ratzeburger Allee 160 · D-23538 Lübeck

Aufklärungsbogen zur Forschungsstudie „Erythropoese"

Betrifft: Entnahme von überschüssigen Stammzelle

Liebe Patientin, Lieber Patient,

bei Ihnen sollen Blut-Stammzellen gesammelt werden. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, sich zu allen Zellen ihres Blutes zu differenzieren (rote und weiße Blutkörperchen und Blutplättchen). Nachdem Sie in den nächsten Monaten zur Behandlung Ihrer Grunderkrankung eine Hochdosis-Chemotherapie erhalten haben, sollen Ihnen die gesammelten Stammzellen zurück gegeben werden. Sie sollen dazu beitragen, dass sich Ihr Blutbild möglichst schnell erholt. Die optimale Dosis an Stammzellen, die zu Ihrer Genesung benötigt wird, wurde in der Knochenmarktransplantationssitzung des UK-SH aufgrund aktueller Studienergebnisse festgelegt. Allerdings kann erst nach Beendigung der Zellsammlung festgestellt werden, wie viele Stammzellen tatsächlich gesammelt wurden. Häufig aind mehr Zellen vorhanden, als für die Transplantation benötigt werden. Von diesen Zellen ist kein zusätzlicher Therapieerfolg zu erwarten.

Wir möchten Sie hiermit bitten, die überschüssigen Stammzellen für die Forschung benutzen zu dürfen. Es handelt sich um ein Projekt im Rahmen der Grundlagenforschung. Ihre Zellen sollen dazu verwendet werden, die Entwicklung der roten Blutkörperchen beim Menschen näher zu untersuchen. Hierzu werden die Stammzellen im Brutschrank über 14-21 Tage zu reifen roten Blutkörperchen kultiviert. Um die Regulation dieser Zellreifung besser zu verstehen, sollen die Zellen zunächst unter verschiedenen Kulturbedingungen gehalten werden (z.B. unterschiedliche Wachstumsfaktoren, Sauerstoffgehalt). Außerdem sollen Gene untersucht werden, die möglicherweise an der Entwicklung der roten Blutkörperchen beteiligt sind.
Selbstverständlich erhalten Sie in jedem Falle Ihre optimale Transplantatdosis. Somit ist die Nutzung überschüssiger Stammzellen zu Forschungszwecken nicht mit einem erhöhten Risiko für Sie verbunden. Weiterhin möchten wir Sie darauf hinweisen, dass die Studie pseudo-anonymisiert durchgeführt wird. Dies bedeutet, dass die Herkunft Ihrer Zellen für Dritte nicht ersichtlich ist und auch die Ergebnisse anonymisiert dokumentiert werden. Die entnommenen Zellen werden ausschließlich für die dargestellten Versuche verwendet und verbleiben im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Luebeck. Eine Weitergabe an Dritte außerhalb des UK-SH ist nicht vorgesehen. Sämtliches Material wird nach Beendigung der Studie verworfen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt ebenfalls an unserem Institut. Spätere Kontakte zu Ihnen aufgrund der Ergebnisse bzw. für weitere Untersuchungen sind ebenfalls nicht vorgesehen.
Falls Sie weitere Fragen zu unserer Studie haben, stehen wir Ihnen natürlich jederzeit gern zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Isabel Dorn

Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Schlenke
Institut für Immunologie und Transfusionswesen

im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3020
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

Datum: 16.08.2004
Aktenzeichen:
(immer angeben !) 04-088

nachrichtlich:
Herr Prof. Kirchner
Direktor des Institutes für Immunologie und Transfusionswesen

Sitzung der Ethik-Kommission am 10. August 2004
Antragsteller: Herr Dr. Schlenke / Herr Prof. Kirchner
Titel: In vitro Erythropoese induziert aus CD34+ humanen Stammzellen

Sehr geehrter Herr Dr. Schlenke,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach folgender Ergänzung keine Bedenken: Die Kommission bittet um die Erläuterung des Ausdruckes „pseudo-anonymisiert" im dritten Absatz der Aufklärung.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den
weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Mitglied der Ethik-Kommission und Sitzungsleiter

anwesende Kommissionsmitglieder: 8

- ☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe (Sozialmedizin)
- Prof. Dr. F. Hohagen (Psychiatrie)
- ☒ Prof. Dr. Dominiak (Pharmakologie)
- ☒ Frau H. Müller (Pflege)
- Prof. Wessel (Kinderchirurgie)
- Herr Schneider (Vors. Richter am Landgericht Lübeck)
- Prof. Schwarzer
- Herr Prof. Dr. H. L. Fehm (Medizinische Klinik I)
- ☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader (Plastische Chirurgie)
- ☒ Herr Dr. Schultz (Pädiatrie)
- ☒ Herr D. Sinan

10.2 Proteinarray

GEArray Q Series Human Apoptosis Gene Array

HS-002 gene table

Position	UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name
1	Hs.77579	NM_001160	APAF1	Apoptotic protease activating factor	Apaf-1
2	Hs.71869	NM_013258	ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	Asc
3	Hs.194382	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM
4	Hs.76366	U66879	BAD	BCL2-antagonist of cell death	bad
5	Hs.93213	AA923639	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	bak
6	Hs.159428	L22474	BAX	BCL2-associated X protein	bax
7	Hs.193516	NM_003921	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	bcl-10/HuE10
8	Hs.79241	M14745	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	bcl-2
9	Hs.227817	NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1	bfl-1
10	Hs.305890	Z23115	BCL2L1	BCL2-like 1	bcl-x
11	Hs.202657	AF032458	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	bimL
12	Hs.75244	U59747	BCL2L2	BCL2-like 2	bcl-w
13	Hs.155419	U34584	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	bik
14	Hs.79019	NM_004536	BIRC1	Baculoviral IAP repeat-containing 1	NAIP/BIRC1
15	Hs.289107	U45879/U37547	BIRC2	Inhibitor of apoptosis protein 2	IAP-2
16	Hs.127799	U37546	BIRC3	Inhibitor of apoptosis protein 1	IAP-1
17	Hs.172777	NM_001167	BIRC4	X-linked IAP	API3/XIAP
18	Hs.1578	U75285	BIRC5	Apoptosis inhibitor 4 (survivin)	survivin (API4)
19	Hs.250646	AF265555	BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6	Apollon/Bruce
20	Hs.2243	Z33998	BLK	B lymphoid tyrosine kinase	blk
21	Hs.79428	AF002697	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3	Nip3
22	Hs.307355	AF089746	BOK	BCL2-related ovarian killer	Bok/Mtd
23	Hs.2490	M87507	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	caspase-1 (ICE)
24	Hs.5353	U60519	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	caspase-10 (mch4)
25	Hs.137587	NM_003723	CASP13	Caspase 13, apoptosis-related cysteine protease	caspase 13
26	Hs.248226	NM_012114	CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine protease	caspase 14
27	Hs.108131	U13021	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	caspase-2
28	Hs.74552	NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	caspase-3 (cpp32)
29	Hs.74122	U28014	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	caspase 4(Ich-2)
30	Hs.3257	U28015	CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	caspase-5
31	Hs.3280	U20537	CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	caspase-6 (mch2)
32	Hs.9216	U67320	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	caspase-7 (mch 3)
33	Hs.19949	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	caspase 8 (FLICE)
34	Hs.122843	AF154415	CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	Flash
35	Hs.100641	U60521	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	caspase 9 (Mch6)
36	Hs.195175	AF010127	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASPER
37	Hs.20295	AF016582	CHEK1	CHK1 (checkpoint, S.pombe) homolog	chk1
38	Hs.249129	NM_001279	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	CIDE-A
39	Hs.288835	NM_014430	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	CIDE-B
40	Hs.155566	NM_003805	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD
41	Hs.129208	NM_014326	DAPK2	Death-associated protein kinase 2	DAP-kinase 2

GEArray Q Series Human Apoptosis Gene Array

Position	UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name
42	Hs.105658	NM_004401	DFFA	DNA fragment factor-45	DFFA
43	Hs.133089	NM_004402	DFFB	DNA fragmentation factor, 40 kD, beta subunit	DFF40 (CAD)
44	Hs.86131	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD
45	Hs.80409	M60974	GADD45A	DNA-damage-inducible transcript 1	GADD45
46	Hs.87247	NM_003806	HRK	Harakiri, BCL2-interacting protein (contains only BH3 domain)	HRK
47	Hs.152983	NM_004507	HUS1	HUS1 (S. pombe) checkpoint homolog	Hus1
48	Hs.168159	AF173003	LOC51283	Apoptosis regulator	bar
49	Hs.36	D12614	LTA	Lymphotoxin-alpha (TNF superfamily, member 1)	TNF-b/Lta
50	Hs.890	NM_002341	LTB	Lymphotoxine-beta	LT-b
51	Hs.1116	L04270	LTBR	Homo sapiens lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3(LTBR)	LTbR
52	Hs.86386	L08246	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL-1
53	Hs.170027	Z12020	MDM2	Mouse double minute 2, human homolog of; p53-binding protein	mdm2
54	Hs.82116	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	MyD88
55	Hs.19405	NM_006092	NOD1	Caspase recruitment domain 4	Nod/CARD4
56	Hs.278439	AF043244	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	Nop30
57	Hs.74368	X69910	P63	H.sapiens p63 mRNA for transmembrane protein	p63
58	Hs.146329	NM_007194	RAD53	Protein kinase Chk2	chk2 (RAD53)
59	Hs.296327	U50062	RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIP
60	Hs.103755	AF078530	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Cardiac/Rip2
61	Hs.1608	L07493	RPA3	Replication protein A3 (14kD)	rpa
62	Hs.146847	U59863	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	TANK (I-TRAF)
63	Hs.241570	X01394	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNFa
64	Hs.249190	U90875	TNFRSF10A	Human cytotoxic ligand TRAIL receptor mRNA	TRAIL-R
65	Hs.51233	AF016266	TNFRSF10B	Homo sapiens TRAIL receptor 2	Trail Receptor (DR5)
66	Hs.119684	AF016267	TNFRSF10C	Homo sapiens TRAIL receptor 3 mRNA	TRAIL-R3 (DcR1)
67	Hs.129844	AF021232	TNFRSF10D	Homo sapiens TRAIL-R4-A (TRAIL-R4) mRNA	TRAIL-R4 (DcR2)
68	Hs.180338	U74611	TNFRSF12	TRAMP/Apo-3/DDR3	DR3 (Apo3)
69	Hs.279899	U81232	TNFRSF14	Human tumor necrosis factor receptor-like gene 2 (TR2) mRNA,	TNFRSF14
70	Hs.159	M33294	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFR1
71	Hs.256278	NM_001066	TNFRSF1B	Human tumor necrosis factor receptor 2	TNFR2 (TNFSF1B)
72	Hs.129780	X75962	TNFRSF4	H.sapiens mRNA for OX40 homologue	OX40 (TNFRSF4)
73	Hs.25648	NM_001250	TNFRSF5	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	CD40 (NGFR)
74	Hs.82359	X63717	TNFRSF6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	Fas (Apo-1) (CD95)
75	Hs.180841	M63928	TNFRSF7	CD27 receptor	CD27
76	Hs.1314	NM_001243	TNFRSF8	CD30 ligand receptor	CD30
77	Hs.73895	U03397	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	TNFRSF9
78	Hs.83429	U37518	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TRAIL
79	Hs.115770	AF19047	TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	TNFSF11(TRANCE)
80	Hs.26401	AF055872	TNFSF12	Homo sapiens Apo3/DR3 ligand (APO3L) mRNA	TNFSF12/APO3L

GEArray Q Series Human Apoptosis Gene Array

Position	UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name
81	Hs.54673	NM_003808	TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	TNFSF13 (April)
82	Hs.129708	AF036581	TNFSF14	Homo sapiens tumor necrosis factor superfamily member LIGHT mRNA	TNFSF14/HVEM-L
83	Hs.181097	D90224	TNFSF4	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated g	TNFSF4/OX40L
84	Hs.652	L07414	TNFSF5	CD40 ligand	CD40L/CD154
85	Hs.2007	U08137	TNFSF6	Ligand for Fas	Fas ligand
86	Hs.99899	L08096	TNFSF7	CD27 ligand/CD70 antigen	CD27L (CD70)
87	Hs.1313	L09753	TNFSF8	CD30 ligand	CD30L
88	Hs.1524	U03398	TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	TNFSF9/4-1BB
89	Hs.1846	M14694	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	p53
90	Hs.2134	NM_005658	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	TRAF1
91	Hs.200526	U12597	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	TRAF2
92	Hs.297660	NM_003300	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	TRAF3/CRAF1
93	Hs.8375	AF082185	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	TRAF-4
94	Hs.29736	AB000509	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5
95	Hs.90957	NM_004620	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	TRAF6
96	Hs.21254	U77845	TRIP	TRAF interacting protein	Trip
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
100	Blank	Blank	Blank	Blank	0
101	Blank	Blank	Blank	Blank	0
102	Blank	Blank	Blank	Blank	0
103	Hs.169476	M33197	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
104	Hs.169476	M33197	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
105	Hs.182937	NM-021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	cyclophilin A
106	Hs.182937	NM-021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	cyclophilin A
107	Hs.182937	NM-021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	cyclophilin A
108	Hs.182937	NM-021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	cyclophilin A
109	Hs.119122	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a(23 Kda highly basic protein)	RPL13A
110	Hs.119122	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a(23 Kda highly basic protein)	RPL13A
111	Hs.288065	X00355	ACTB	Beta Actin	b-actin
112	Hs.288066	X00356	ACTB	Beta Actin	b-actin

11 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. P. Schlenke für die Überlassung des Themas, die freundliche und kompetente Betreuung, sowie für Rat und Unterstützung während der gesamten Erstellung der Dissertation.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. Hartwig und Frau Dr. med Isabel Dorn danke ich für die jederzeit gewährte wissenschaftliche konstruktive Unterstützung vor allem bezüglich ADAR1.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Kirchner, der jederzeit diese Dissertation gefördert hat, für seine Unterstützung und sein wissenschaftliches Interesse.

Ein besonderer Dank gilt Petra Langenstrassen und Birgit Driller für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die mir stets mit ihrem umfangreichen methodischen Wissen und Können hilfreich zur Seite standen.

Ich danke PD. Dr. rer. nat. Jürgen Luhm für die freundliche Unterstützung bei den Arbeiten mit radioaktivem Material, die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und seine konstruktiven Anregungen.

Meinen Kollegen Pamela Lazar-Karsten, Ulrich Lindner , Doreen Finke, Katharina Randers, Julika Ribbat, Jochen Behrends, Alexander Unmack und Christian Karsten danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die hilfreiche Unterstützung während der gemeinsamen Zeit.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin möchte ich mich für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt bedanken.

12 PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen:

- Dorn I, Lazar-Karsten P, Boie S, Ribbat J, Hartwig D, Driller B, et al. In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. Transfusion 2008 Feb 21.

- Stefanie Boie, Dirk Hartwig, Peter Schlenke, Petra Langenstrassen, Jürgen Luhm, Holger Kirchner, Isabel Dorn (2008), Effects of ADAR1 inhibition on erythroid maturation of primary human hematopoietic stem cells, in Vorbereitung

Kongressbeiträge:

- Posterbeitrag beim ISEH Hamburg 2007, Titel: “Effects of ADAR1 inhibition on erythroid maturation of primary human hematopoietic stem cells”

13 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Stefanie Boie
Anschrift	Danziger Str. 36, 23564 Lübeck
Geburtsdatum/-ort	12.10.1967 in Oldenburg / OH
Familienstand	verheiratet mit Aine Boie seit 07/94
	3 Kinder: 10/95, 05/97, 06/99
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1973-1986	gemeinbildende Schulen in Lübeck
	Abschluss: Abitur

Berufsausbildung / - beschäftigung

09/86-09/88	Ausbildung zur medizin. techn. Laboratoriumsassistentin (MTLA) an der MTA-Schule in Lübeck. Abschluss: MTLA (Note: gut)
11/88-10/89	Arbeitgeber: Universitätskrankenhaus Eppendorf in HH Tätigkeit: MTLA in der klinischen und experimentellen Endokrinologie

Hochschulstudium

10/89-09/95	10/89-03/92: Studium der Biologie an der Georg-August Universität in Göttingen. (Vordiplom)
04/92-09/95	Hauptstudium an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel
08/94-09/95	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Kirchner in der Immunologie an der medizinischen Universität zu Lübeck. Thema: „Klonierung des *mycoplasma arthritides* Superantigen (MAS) Gens“ Abschluss: Diplombiologin (Note: sehr gut)

Studienbegleitende Tätigkeiten / Familienzeit

02/94-04/94	Arbeitgeber: Medizinische Universität zu Lübeck Tätigkeit: MTLA in der Immunologie
04/96-02/99	Studium der Humanmedizin an der medizinischen Universität zu Lübeck (Exmatrikulation mit der Geburt des 3. Kindes)
seit 2000	u. a. Mitarbeit im Elternbeirat und Elternvertretung, homöopathischer Kurs, KECK-Seminar

Naturwissenschaftliche Tätigkeit

07/02-07/03	Arbeitgeber: Gemeinschaftspraxis Dr. Lippelt und Partner Tätigkeiten: Labor Akkreditierung, Aufbau eines Qualität-Management-Systems, Online Anbindung von Geräten, Validierung und Einführung neuer Tests für die Serologie und das Automatenlabor.

Promotion

Seit 01/2004	Anfertigung der Dissertation am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck