- Aus dem Institut für Transfusionsmedizin -

der Universität zu Lübeck

Direktor: PD Dr. med. S. Görg

In-vitro Erythropoese aus humanen CD34-positiven Stammzellen unter Hypoxieeinfluss

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Julika Ribbat

aus Hamburg

Lübeck 2008

1.Berichterstatter: PD Dr. med. Peter Schlenke

2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.03.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III
Tabellenverzeichnis IV
Abkürzungsverzeichnis V

1. EINLEITUNG 1

1.1. Entwicklung von Erythrozyten aus hämatopoetischen Stammzellen 1

1.2. Regulation der Erythropoese 3
1.2.1. Wachstumsfaktoren 3
1.2.2. Oberflächenantigene 4

1.3. Knochenmarknische 6

1.4. Sauerstoffmangel und Erythropoese 8

1.5. In-vitro Erythropoese 10

1.6. Fragestellung 13

2. METHODEN UND MATERIALIEN 15

2.1. Überblick über die Methodik 15

2.2. Gewinnung der CD34-positiven Zellen 15
2.2.1. Patientenmaterial 15
2.2.2. Vorbereitung des tiefgefrorenen Präparates 16
2.2.3. Isolierung der mononukleären Zellen 16
2.2.4. Selektion der CD34-positiven Zellen 17

2.3. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität 18

2.4. Flüssigkultur 18

2.5. Semisolide Kultur 19

2.6. Durchflusszytometrie 19
2.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie 19
2.6.2. Fluoreszenzfärbung spezifischer Oberflächenmerkmale 20

2.7. Lichtmikroskopische Beurteilung 21
2.7.1. Anfertigung der Objektträger 21
2.7.2. Neutrale Benzidinfärbung 21
2.7.3. Pappenheimfärbung 22

2.8. Statistische Auswertung 22

3. ERGEBNISSE 23

3.1. Proliferation erythropoetischer Progenitorzellen 23

3.2. Vitalität erythropoetischer Progenitorzellen 25

3.3. Differenzierung erythropoetischer Progenitorzellen 26

3.3.1. Lichtmikroskopische Auswertung 26

3.3.2. Durchflusszytometrische Auswertung 28

3.3.3. Semisolide Kurzzeitkultur 32

4. DISKUSSION 34

4.1. Proliferation und Vitalität 36

4.2. Differenzierung 40

4.3. Knochenmarknische und Sauerstoffmangel 47

4.4. Ausblick 51

4.4.1. Mögliche Folgeversuche 51

4.4.2. Mögliche Anwendungen 53

5. ZUSAMMENFASSUNG 55

6. LITERATURVERZEICHNIS 57

6.1. Originalarbeiten 57

6.2. Bücher 63

6.3. Zeitungsartikel und Internetquellen 64

7. ANHANG 65

7.1. Wertetabellen 65

7.2. Poster 69

8. DANKSAGUNG 70

9. LEBENSLAUF 71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese. 1

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellen der Erythropoese. 2

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Eisenstoffwechsels mit Berücksichtigung der Erythropoese 6

Abbildung 4: Schematische Darstellung der erythroblastischen Insel. 8

Abbildung 5: Luftdrucke in verschiedenen Höhenlagen 10

Abbildung 6: Hämatopoetische Kolonien. a) CFU-GEMM; b) BFU-E; c) CFU-GM. 11

Abbildung 7: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation (MACS). 17

Abbildung 8: Proliferation bei Normoxie 23

Abbildung 9: Proliferation bei Hypoxie. 24

Abbildung 10: Vitalität. 25

Abbildung 11: Prozentuale Anteile von Progenitor- und differenzierten Zellen (milde Hypoxie). 26

Abbildung 12: Entwicklungsverzögerung bei milder Hypoxie. 27

Abbildung 13: Prozentuale Anteile von Progenitor- und differenzierten Zellen (starke Hypoxie). 27

Abbildung 15: Anteil der CD34-positiven Zellen 28

Abbildung 16: Anteil der GPA-positive Zellen. 29

Abbildung 17: Anteil der CD36-positiven Zellen. 30

Abbildung 18: Anteil der CD71-positiven Zellen. 31

Abbildung 19: Semisolide Kurzzeitkulturen unter milder Hypoxie und Normoxie (je n=6). 32

Abbildung 20: Semisolide Kurzzeitkulturen unter starker Hypoxie und Normoxie (je n=6). 33

Abbildung 21: Graphische Darstellung der Erythropoese. (Eigene Übersetzung; © Graphic Pulse) 34

Abbildung 22: Expressionsverlauf der einzelnen Oberflächenmarker 46

Abbildung 23: Sauerstoff der eythropoetischen Insel nach dem modifizierten Krogh'schen Modell. 49

Abbildung 24: Schematische Darstellung des Sauerstoffgradienten im Knochenmark. 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf des 2-Phasenmodells zur in-vitro Erythropoese 15

Tabelle 2: Patienten 16

Tabelle 3: Zytokine des Zweiphasenmodells 18

Tabelle 4: Übersicht über Antikörper der Fluoreszenzfärbung 20

Tabelle 5: Literaturübersicht zum Proliferationsverhalten von Stammzellen 38

Tabelle 6: Literaturübersicht zur Expression von Oberflächenantigenen während der Erythropoese. 45

Wertetabelle 1: Kumulative Zellzahl [x 10^6/ml]; Mittelwerte 65

Wertetabelle 2: Vitalität [%]; Mittelwerte 65

Wertetabelle 3: Lichtmikroskopische Zusammensetzung [%].Mittelwerte. 66

Wertetabelle 4: CD34-positive Zellen [%] 67

Wertetabelle 5: Glykophorin-A positive Zellen [%] 67

Wertetabelle 6: CD36-positive Zellen [%] 67

Wertetabelle 7: CD71-positive Zellen [%] 67

Wertetabelle 8: Semisolide Kurzzeitkulturen [Anzahl der Kolonien] 68

Abkürzungsverzeichnis

BFU-E	Burst Forming Unit – Erythroid
BSA	Bovine Serum Albumine
CD	Cluster of Differentiation
CFU-E	Colony Forming Unit – Erythroid
CFU-GEMM	Colony Forming Unit – Granulo-, Erythro-, Mono-, Megakaryocytes
CFU-GM	Colony Forming Unit – Granulocytes, Macrophages
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPA	GPA
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IMDM	Isocove's Modified Dulbecco's Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
SCF	Stem Cell Factor
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
2-ME	2-Mercaptoethanol

1. Einleitung

1.1. Entwicklung von Erythrozyten aus hämatopoetischen Stammzellen

Wie alle peripheren Blutzellen entwickeln sich Erythrozyten nach der Geburt aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Diese besitzen einerseits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und nach mehreren Zellteilungen andererseits die Fähigkeit zur Bildung von liniendeterminierten hämatopoetischen Vorläuferzellen. Von diesen unreifen Vorläuferzellen der Hauptzelllinien des Knochenmarks ist eine Differenzierung zu Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten oder Makrophagen und Megakaryozyten möglich (Abbildung 1).

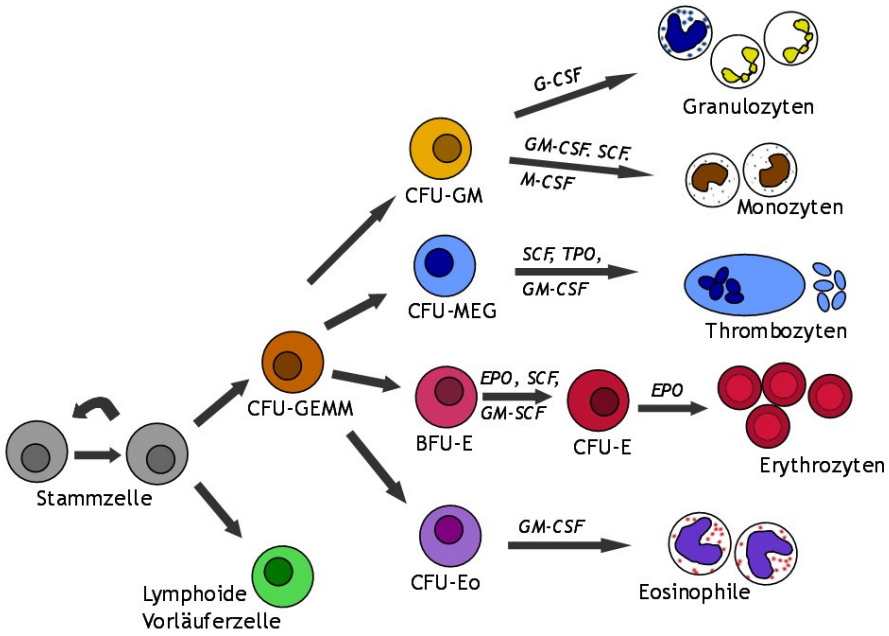


Abbildung 1: *Schematische Darstellung der Hämatopoese. Differenzierungsmöglichkeiten zu unterschiedlichen Zellreihen aus einer pluripotenten Stammzelle. Erläuterungen siehe Text.* *(© Lodish et al., 2004)*

Bestimmte hämatopoetische Vorläuferzellen werden im Kulturmedium als koloniebildende Einheiten (engl. colony forming units – CFU) bezeichnet und haben entsprechend ihrer Unreife die Eigenschaft, besonders „gemischte" Kolonien auszubilden. Nach dem Akronym der differenzierten „Zielzellen" ist hierfür die Abkürzung CFU-GEMM üblich (Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten, Megakaryozyten). Reifere und spezialisiertere Vorläuferzellen werden entsprechend als z. B. CFU-GM (Granulozyten und Monozyten) und CFU-E (Erythrozyten) benannt (Hoffbrand et al., 1989)

(*Abbildung 1*). Unter BFU-E (engl. burst forming unit) versteht man eine frühe, der CFU-E vorangehende erythropoetische Progenitorzelle (Moliterno et al., 2000). Diese frühen erythroiden Vorläuferzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch klonales Wachstum „rote", hämoglobinsynthetisierende Kolonien bilden.

Unter Erythropoese versteht man den kontrollierten Prozess, den pluripotente Stammzellen durchlaufen, um zu reifen Erythrozyten zu differenzieren. Sie durchlaufen dabei verschiedene Entwicklungsstadien, in denen sie sich vermehren und auf charakteristische Weise ausdifferenzieren (*Abbildung 2*; *Abbildung 21*).

Die früheste Vorläuferzelle der Erythropoese ist der Proerythroblast, der etwa zehnmal so groß ist wie ein Erythrozyt. Im Laufe der weiteren Entwicklung erfolgt eine Reduktion der Zell- und Kerngröße und eine Erhöhung der Kerndichte (Maggakis-Kelemen et al., 2003). Zudem wird das Zytoplasma basophiler, da die Proteinbiosynthese zunimmt und folglich der Gehalt an Ribosomen steigt. In diesem Stadium spricht man vom basophilen Erythroblasten. Es folgt der polychromatische Erythroblast. Sein Zytoplasma enthält weniger Ribosomen und Mitochondrien (Kie et al., 2003); dies geht mit einem Basophilieverlust einher. Durch den Beginn der Hämoglobinsynthese wird das Zytoplasma gleichzeitig eosinophil. Diese Eigenschaft wird durch das Beiwort „polychromatisch" beschrieben. Der Hämoglobingehalt steigt im Verlauf weiter an. Im Normoblast überwiegt dann die eosinophile Färbbarkeit. Dieser stößt den mittlerweile pyknotisch gewordenen Zellkern aus und wandert als Retikulozyt aus dem Knochenmark ins periphere Blut. In seinem Zytoplasma befinden sich noch ribosomale RNA und netzförmig angeordnete Ribosomen, die zur Hämoglobinsynthese fähig sind (Kie et al., 2003). Abbildung 2 zeigt die Zellen der Erythropoese.

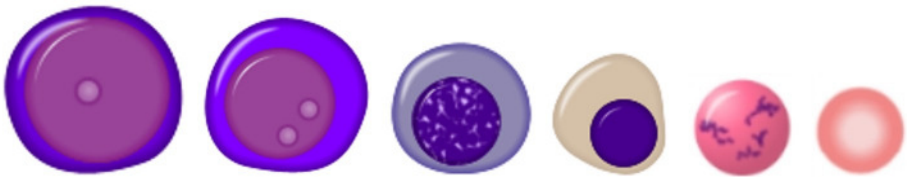


Abbildung 2: *Schematische Darstellung der Zellen der Erythropoese.*
V. l. n. r.: Proerythroblast, basophiler Erythroblast, polychromatischer Erythroblast, Normoblast, Retikulozyt, Erythrozyt. (© A. Rad, 2006)

Nach Abbau der vernliebenen Zellorganellen entsteht der reife Erythrozyt. Dieser hat eine flache, runde, bikonkave Form mit einem Randdurchmesser von 2 µm. Der Zelldurchmesser der einzelnen Erythrozyten ist beim Gesunden normalverteilt um den Wert von 7,5 µm (Price-Jones-Kurve). Erythrozyten lassen sich leicht durch äußere Krafteinwirkung verformen und können somit auch

Gefäße mit einem Durchmessen unter 7,5 µm passieren. Mit ca. 99 Volumenprozent stellen Erythrozyten den größten Anteil am Gesamtzellvolumen des Blutes und sind für den kontinuierlichen Transport der Atemgase im Körper verantwortlich. Während Sauerstoff hauptsächlich über das intraerythrozytäre Hämoglobin transportiert wird, wird Kohlendioxid (CO_2) zum größten Teil physikalisch im Plasma gelöst.

Eine aktuelle Studie postuliert, dass es sich bei den ausgestoßenen Kernen um eine kurzlebige Zellpopulation der sog. „Pyrenozyten" handelt. Charakteristika eines Pyrenozyten sind ein stark verdichteter Kern und ein sehr hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis (McGrath et al., 2008).

1.2. Regulation der Erythropoese

1.2.1. Wachstumsfaktoren

Die Reifungsprozesse der Erythropoese werden durch zahlreiche Wachstumsfaktoren gesteuert, von denen nur wenige bekannt sind. Von besonderer Bedeutung sind Erythropoetin (EPO), Stammzellfaktor (SCF) und insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1) (Muta et al., 1994). Weiterhin beeinflussen auch andere Faktoren, wie Insulin, Glukokortikoide und Östrogen, die Entwicklung roter Vorläuferzellen (Moliterno et al., 2000).

Das Überleben und die Differenzierung der erythropoetischen Zellen sind abhängig von EPO, dessen Rezeptorexpression während der Entwicklung zunimmt (Jelinek und Prchal, 2004). EPO ist ein etwa 30 kD schweres Glykoprotein, das in den peritubulären Interstitiumzellen der Nieren beim Erwachsenen, bzw. in den fetalen Hepatozyten synthetisiert wird. Die EPO-Produktion wird durch den Sauerstoffpartialdruck reguliert. Die Funktion von EPO besteht vor allem darin, erythropoetische Zellen vor Apoptose zu schützen und ihre Überlebenszeit zu verlängern, indem es antiapoptotische Proteine aktiviert (Fisher et al., 2003; Dolznig et al., 2002). Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass EPO die Hämoglobinsynthese stimuliert und eine wichtige Rolle bei der terminalen Differenzierung spielt (Motoyama et al., 1999).

Während EPO die Apoptose in den Zellen hemmt und insbesondere für die Differenzierung der Zellen benötigt wird (*Abbildung 1*), ist SCF durch Förderung der DNA-Synthese ein entscheidender Faktor für die Proliferation der Vorläuferzellen, wobei er zusätzlich deren Differenzierung verzögert (Muta et al., 1995; Daniels und Green, 2000). Synonyme für SCF sind Mast Cell Growth Factor und c-Kit-Ligand. SCF ist ein Protein aus 248 Aminosäuren, wird hauptsächlich von Knochenmarkstromazellen produziert und wirkt parakrin. SCF steigert die Proliferation hämatopoeti-

scher Vorläuferzellen aller Knochenmarklinien, besonders in Kombination mit anderen Faktoren, (Smith et al., 2001). EPO wirkt synergistisch mit den Wachstumsfaktoren SCF und IGF-1 fördernd auf die Proliferation und Reifung erythroider Vorläuferzellen (Fisher 2003).

Das Peptidhormon Insulin wird in Abhängigkeit vom Glukosespiegel im Blut in den Langehanszellen des Pankreas gebildet. Insulin besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren, die in zwei Peptidketten angeordnet sind. Neben den Blutzucker senkenden Wirkungen wirkt Insulin als Transkriptionsfaktor durch Apoptoseverhinderung und als Wachstumshormon durch Stimulation der Zellproliferation. Insulin induziert die terminale Differenzierung. Der IGF-1 ist eines der IGF-Polypeptide, deren Aminosäuresequenz der von Insulin sehr ähnlich ist. Dieser Faktor wird nach Stimulation durch Wachstumshormon in der Leber endokrin gebildet. Wie Insulin agiert auch IGF als Wachstumshormon. Bei der Erythropoese ist IGF-1 wichtig für Proliferation und Differenzierung, indem er die Kernkondensation und die Enukleation fördert. Details über ihre unterschiedlichen Wirkungen von Insulin und IGF-1 sind derzeit noch nicht bekannt (Muta et al., 1994; Miyagawa et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass Insulin und IGF-1 in gleichzeitiger Gegenwart von EPO einen direkten Einfluss auf das Wachstum von CFU-E haben (Sawada et al., 1989).

Dexamethason ist ein synthetisches Cortisonderivat mit hoher glukokortikoider Potenz und ohne mineralokortikoide Restwirkung. Cortison wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert. Zu den Wirkungen der Glukokortikoide zählen – neben vielen anderen – die Entzündungshemmung und Immunsuppression. Bezüglich der Erythropoese haben Glukokortikoide wie Dexamethason einen positiven Einfluss auf Proliferation und Aufrechterhaltung der koloniebildenden Eigenschaften erythropoetischer Vorläuferzellen, während sie die Differenzierung eher behindern (Moliterno et al., 2000; Von Lindern et al., 1999).

1.2.2. **Oberflächenantigene**

Erythropoetische Vorläuferzellen koexprimieren Antigene, von denen einige für unterschiedliche Entwicklungsstadien charakteristisch sind. Die Oberflächenexpression dieser Antigene kann mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

Hämatopoetische Stammzellen tragen das CD34-Antigen, ein Glykoprotein von 115 kD, das in den 1980er Jahren erstmals beschrieben wurde (z. B. Loken et al., 1987; Allen et al., 1984). Die Gesamtpopulation der hämatopoetischen CD34-exprimierenden Zellen ist sehr heterogen. Frühe, pluripotente Stammzellen mit der Fähigkeit, alle Formen reifer Blutzellen zu bilden, stellen nur einen kleinen Teil der CD34-positiven Zellen dar. Den größeren Anteil bilden reifere, liniendeterminierte Vorläuferzellen, die in ihrer Entwicklung bereits auf eine bestimmte Zelllinie, wie z. B. die

lymphatische oder myeloische Reihe, beschränkt sind. Diese liniendeterminierten Vorläuferzellen koexprimieren charakteristische Antigene, wie z. B. CD33 bei der myeloischen Reihe (Simmons und Seed, 1988). CD34 ist außerdem auf endothelialen Zellen (Fina et al., 1990) und auf Vorläuferzellen des Knochenmarkstromas zu finden (Simmons und Torok-Storb, 1991). Bis heute ist die Funktion weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass die Präsenz von CD34 auf hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige Rolle für die Retention dieser Stammzellen in der Knochenmarknische (Stammzellenpool) spielt. Mit dieser Hypothese steht die Beobachtung in Einklang, dass hämatopoetische Vorläuferzellen mit zunehmender Differenzierung die CD34-Antigen-Expression verlieren. Reife Blutzellen verlassen die Knochenmarknische und wandern in die Zirkulation (Narayan et al., 2005). Zusammenfassend spricht vieles für dafür, dass CD34 als Adhäsionsmolekül fungiert.

CD36 (Synonym Glykoprotein IV) ist ein 88 kD schweres, glykosyliertes Membranprotein, das zur Scavenger-Rezeptor-Familie gehört. Scavenger-Rezeptoren sorgen für die Aufnahme von Cholesterin in Makrophagen, und als solcher spielt CD36 unter anderem bei der Entstehung von Atherosklerose eine Rolle (Febbraio et al., 2000). Außer auf Makrophagen ist CD36 auf zahlreichen anderen Körperzellen vorhanden, z. B. Thrombozyten. Auf Zellen der Erythropoese dient CD36 als ein früher Marker für CFU-E-bildende Zellen und heranreifende erythroide Vorläuferzellen (Cipolleschi et al., 1997).

Der Transferrinrezeptor CD71 kommt in hoher Dichte auf eisenverwertenden Zellen, wie den blutbildenden Zellen des Knochenmarks, vor. CD71 sorgt für die zelluläre Aufnahme von Eisen (*Abbildung 3*). CD71 bindet eisenbeladenes Transferrin, und der Ligand-Rezeptor-Komplex wird via Endozytose aufgenommen. Während das Eisen intrazellulär verbleibt, werden Transferrin und CD71 zurück an die Zelloberfläche verbracht, wo das Transferrin den Rezeptor wieder verlässt. In der Erythropoese ist CD71 ein Marker für Proliferation. Er ist in hoher Konzentration auf erythropoetischen Vorläuferzellen vorhanden. Auf Retikulozyten und Erythrozyten ist er nicht mehr nachweisbar (Daniels et al., 2000).

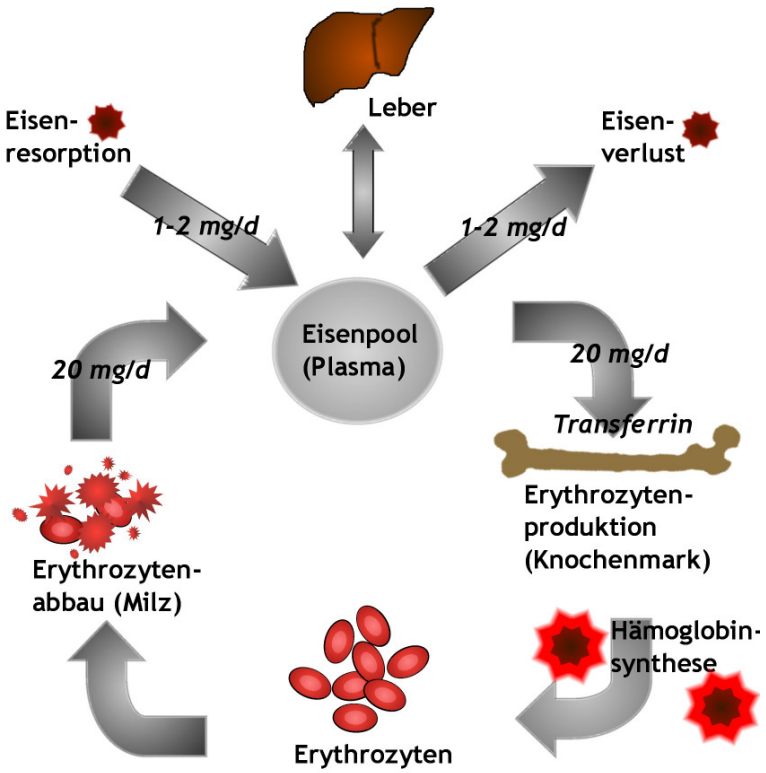


Abbildung 3: *Schematische Darstellung des Eisenstoffwechsels mit Berücksichtigung der Erythropoese*

Glykophorine sind transmembranäre Oberflächenproteine der Erythrozytenmembran, die die negative Oberflächenladung der Erythrozytenmembran bewirken. Die Kohlehydratstrukturen von GPA und B sind antigene Eigenschaften des MN-Blutgruppen-Systems (Palacajornsuk, 2007). GPA besteht aus 131 Aminosäuren und eignet sich gut zur Analyse erythropoetischer Vorläuferzellen, weil es für die Zellen der roten Reihe spezifisch und in hoher Konzentration auf ihrer Oberfläche vorhanden ist (De Isla et al., 2003). Mit fortschreitender Ausreifung nimmt die Anzahl von GPA-Proteinen auf der Oberfläche zu, bis nahezu alle Zellen positiv für GPA sind (Narayan et al., 2005). Welche Funktionen GPA ausübt, ist noch unbekannt.

1.3. Knochenmarknische

Die adulte Hämatopoese findet im Knochenmark langer Röhrenknochen sowie kurzer und platter Knochen (z. B. Sternum, Beckenknochen) statt. Das Knochenmarkgerüst besteht aus zellulärem Stroma und extrazellulärer Matrix. Es wird von venösen Sinus durchzogen, deren Ausläufer radiär verlaufen. Das Knochenmarkstroma besteht aus Knochentrabekeln mit Osteoblasten und -klasten sowie aus retikulärem Bindegewebe mit Fibroblasten, kollagenen Fasern oder auch Fettzellen und

Makrophagen. Unter den fibroblastoiden Zellen werden auch sogenannte „mesenchymale Stammzellen“ vermutet. Zum Teil werden von diesen Zellen extrazelluläre Matrixproteine (z. B Kollagen, Laminin und Fibronektin) gebildet und Wachstumsfaktoren (z. B. SCF) sezerniert.

Das Knochenmarkstroma bietet das Umfeld für die Hämatopoese, deren Stamm- und Vorläuferzellen darin eingebettet sind. Sowohl für die „Steady-State“ Hämatopoese als auch für die stressinduzierte Hämatopoese ist die Regulation durch das Knochenmarkstroma wichtig. Nährstoffe und Blutgase liegen hier dem Bedarf der Zellen entsprechend vor, und Wachstums- und Differenzierungsfaktoren können an Stromabestandteile binden. In dieser Mikroumgebung findet die Blutbildung der drei Zelllinien – Erythropoese, Granulopoese, Megakaryopoese – statt.

Bisher ist noch weitgehend unverstanden, in welcher anatomischen Anordnung es möglich ist, dass hämatopoetische Stammzellen ihren Stammzellcharakter bewahren können, während hämatopoetische Vorläuferzellen der unterschiedlichen Blutreihen parallel dazu differenzieren und reifen. Schofield postulierte 1978, dass es im Knochenmarkstroma physiologisch und funktionell voneinander getrennte Abschnitte gibt, in denen diese einzelnen Entwicklungsschritte stattfinden. Diese „Nischen“ ermöglichen die zeitgleiche Erhaltung sehr unreifer pluripotenter Stamm- und Vorläuferzellen mit ihren koloniebildenden Eigenschaften einerseits (vgl. *Abbildung 1*) und die Differenzierung determinierter Vorläuferzellen andererseits auf kleinstem Raum.

Anatomisch lassen sich sog. „erythroblastische Inseln“ nachweisen. Dabei handelt es sich um erythroide Vorläuferzellen, die sich in diversen Entwicklungsstadien um Makrophagen gruppieren (Moliterno et al., 2000; Maggakis-Kelemen et al., 2003). Elektronenmikroskopisch imponiert der zentrale Makrophage mit sternförmigen Ausläufern und Aushöhlungen der Zelloberfläche, die einen engen Kontakt mit den Vorläuferzellen ermöglichen (Sasaki et al., 1993). Diese ordnen sich entsprechend ihrem Reifungsgrad um die Makrophagen an: Undifferenzierte frühe Stadien liegen zentral nahe dem Makrophagen. Mit zunehmender Reifung und Differenzierung nimmt auch die Entfernung vom zentralen Makrophagen zu (Bernard, 1991) (*Abbildung 4*). Erythroblastische Inseln sind zwar anatomisch beschrieben, in ihrer funktionellen Bedeutung jedoch nicht ganz verstanden.

Einige Autoren postulieren, dass zentrale Makrophagen beispielsweise durch Zell-Zell-Kontakte oder parakrine Funktionen direkten Einfluss auf rote Vorläuferzellen nehmen, indem sie Differenzierung, Proliferation und Entkernung fördern (Hanspal und Hanspal, 1994; Hanspal et al., 1998). In jüngeren Studien konnten gezeigt werden, dass primitive Erythroblasten, die aus erythroblastischen Inseln isoliert wurden, in der Lage waren, neue erythroblastische Inseln herzustellen, indem sie sich an andere Makrophagen der fetalen Leber bzw. des adulten Knochenmarks anlagerten. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass primitive Erythroblasten mit Makrophagen interagieren können (McGrath et al., 2008). Als Beispiel für die Botenstoffe der erythroblastischen

Insel sei hier auf das sog. auf „Eryhtroblasten-Makrophagen-Protein“ (EMP) verwiesen. Die Studie von Soni et al. deutete darauf hin, dass EMP sowohl für die Bildung von erythroblastischen Inseln notwendig ist, als auch die Enukleation bewirkt (Soni et al., 2006).

Andere Gruppen dagegen vermuten, dass Makrophagen eine wichtige Rolle nach erfolgter Differenzierung und Enukleation spielen, indem sie die ausgestoßenen Kerne phagozytieren. Dabei wird Phosphatidylserin, das apoptotischen Zellen als Phagozytosebotenstoff dient, als Signalstoff der Phagozytosevorgangs angenommen (Yoshida et al., 2005). Ferner gibt es Studien, die besagen, dass Makrophagen die Enukleation nicht fördern können und stattdessen koloniebildende Eigenschaften der CFU-E aufrecht erhalten (Spike et al., 2007).

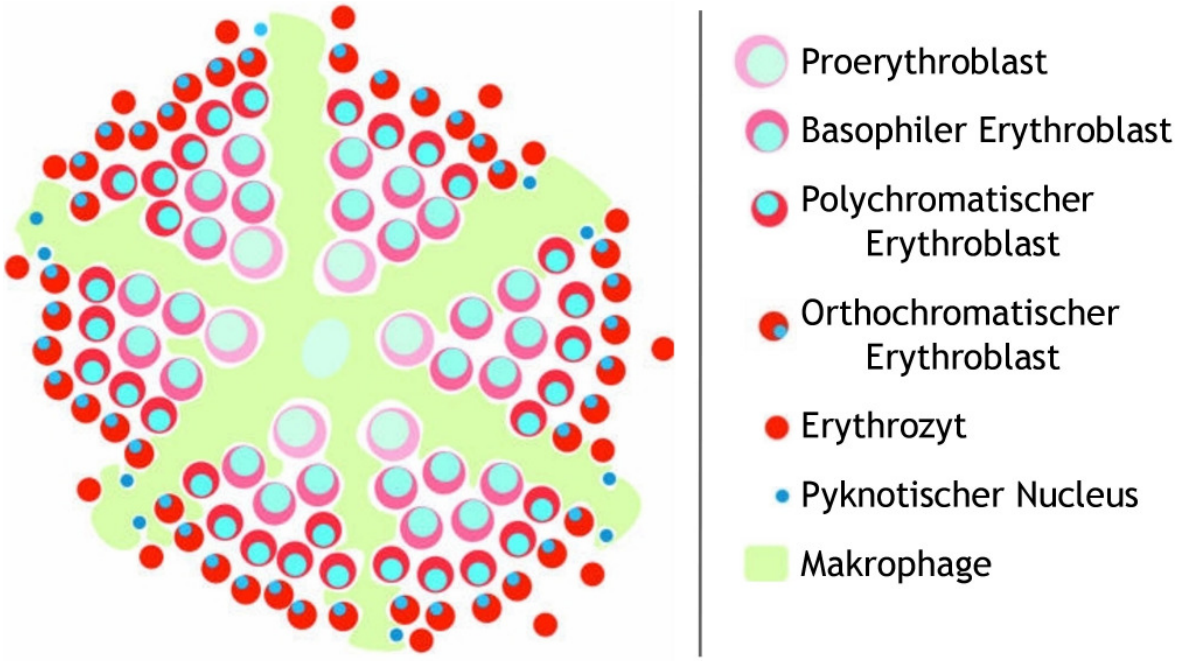


***Abbildung 4**: Schematische Darstellung der erythroblastischen Insel.*
© 2002 European Molecular Biology Organization (Quelle: Whyatt und Grosveld, 2002)

1.4. Sauerstoffmangel und Erythropoese

Hält ein Mensch sich in einer sauerstoffarmen Umgebung auf, wie sie in Höhenlagen vorherrscht, so wird die Erythropoese durch eine gesteigerte EPO-Produktion der Nieren gesteigert. Die Anzahl der – reifen und unreifen – erythroiden Zellen wächst, und der Hämoglobingehalt des Blutes nimmt zu. Somit stehen mehr Sauerstoffträger zur Verfügung, um den geringen Sauerstoffgehalt der Einatemluft besser nutzen zu können. Diesen Effekt nutzen beispielsweise Sportler beim Höhentraining. Auch endogene Ursachen des Sauerstoffmangels wie respiratorische Insuffizienz führen EPO-vermittelt zu einer vermehrten Erythropoese. In einer jüngeren Untersuchung wurde von einer Ver-

änderung der erythroblastischen Inseln in Hypoxie berichtet. Es wurde postuliert, dass Zellen bereits im Stadium des Erythroblasten von den Makrophagen dissoziieren und anschließend schneller und unbeeinflusst differenzieren, sodass die hinterlassene „Lücke“ in der erythroblastischen Insel schneller wieder aufgefüllt werden kann. Mehr rote Zellen verlassen das Knochenmark und stehen als Sauerstoffträger zur Verfügung (Spike et al., 2007).

Eine Sauerstoffmangelatmosphäre, die die Zellen unmittelbar umgibt, beeinflusst sie ohne EPO als Vermittler. Es ist bekannt, dass der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1α) eine wichtige Rolle bei der zellulären Reaktion auf Hypoxie spielt. HIF-1α ist der Hauptregulator der O_2-abhängigen Genexpression, der kontinuierlich synthetisiert, jedoch unter normoxischen Bedingungen umgehend wieder abgebaut wird. Unter hypoxischen Bedingungen unterbleibt dieser Abbau, sodass HIF-1α in den Zellkern wandert und nach Heterodimerisierung mit HIF-1β die Zielgene aktivieren kann. Unter anderem wird so die Synthese von Transferrin und seinem Rezeptor gesteigert, sodass mehr Eisen zur Hämsynthese zur Verfügung steht. HIF-1α ist bereits wenige Sekunden nach Eintreten einer Hypoxie vorhanden, und nach Erhöhung des Sauerstoffgehalts zur Normoxie innerhalb von Minuten nicht mehr bachweisbar (Heinicke et al., 2002).

Im Vergleich zu peripherem Blut herrscht im Knochenmark ein Sauerstoffmangel. Der Sauerstoffpartialdruck und die -sättigung sind im Knochenmark geringer als im peripheren Blut. Dabei gilt es zu beachten, dass die relative Konzentration eines Gases bei unterschiedlich hohen Partialdrücken zwar gleich ist, der absolute Gasanteil bei erniedrigtem Partialdruck jedoch absinkt. So liegt bei erniedrigtem Partialdruck und normaler Sättigung dennoch weniger Sauerstoff vor als bei normalem Druck, so zum Beispiel in Höhenlagen (*Abbildung 5*). Durch Blutgasanalysen des menschlichen Knochenmarks ließ sich ein Sauerstoffpartialdruck von etwa 50 mmHg ermitteln (Tondevold et al., 1979; Ishikawa und Ito, 1988; Harrison et al., 2002). Dieser liegt deutlich unter dem Parialdruck venösen Blutes (80-95 mmHg in Bezug auf die Patienten der o. g. Studien). Auch die Sauerstoffsättigung ist mit 87% in Knochenmark geringer als 99% im peripheren Blut (Harrisson et al., 2002).

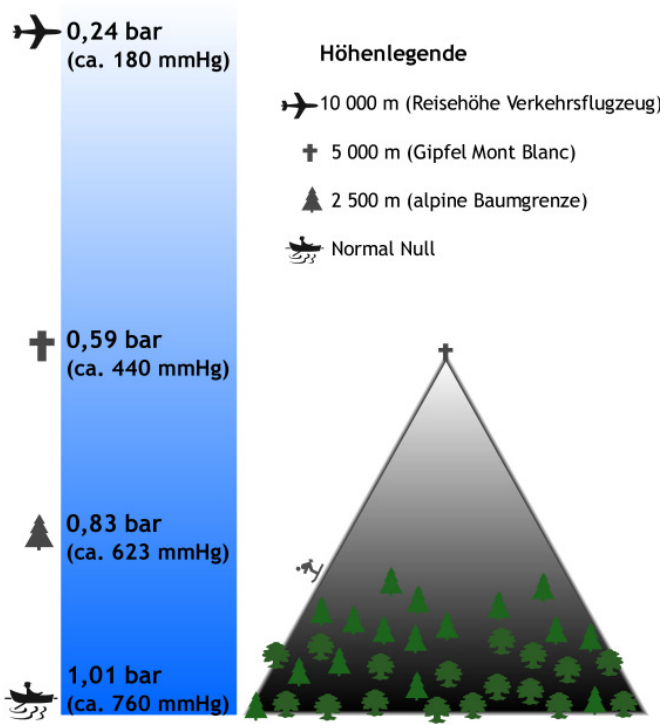


Abbildung 5: *Luftdrucke in verschiedenen Höhenlagen*

Bislang ist wenig bekannt über den Einfluss von Sauerstoffmangel auf die Hämatopoese, insbesondere auf die Erythropoese. In Untersuchungen zur Granulopoese konnte gezeigt werden, dass die Proliferation einer Stammzellkultur bei 5% Hypoxie gegenüber Luftsauerstoff (21%) gesteigert ist (Hevehan et al., 2000). Untersuchungen zur Erythropoese zeigten, dass in sehr starker Hypoxie (0,1% O_2) die Apoptoserate gegenüber Luftsauerstoff nicht erhöht ist, und dass eine Rückkehr in die G_0-Phase ohne Beeinträchtigung der funktionellen Kapazität möglich ist (Hermitte et al., 2006). Bei moderater Hypoxie (3% O_2) hingegen konnte eine Expansion differenzierter Zellen neben dem Erhalt undifferenzierter Stammzellen gezeigt werden (Ivanovic et al., 2004). In den beiden genannten Arbeiten wurde – wie in vielen anderen auch – auf humane Stammzellen aus Nabelschnurblut zurückgegriffen. Andere wiederum nutzen Stammzellen aus humanem Knochenmark und konnten zeigen, dass Überleben und Selbsterneuerung der Stammzellen bei 1,5% O_2 gefördert wird (Danet et al., 2003).

1.5. In-vitro Erythropoese

Hämatopoetische Stammzellen und deren nachgeordnete Vorläuferzellen lassen sich mit unterschiedlichen Methoden kultivieren und nachweisen.

In älteren Versuchen, die eine in-vitro Erythropoese zu etablieren als Ziel hatten, wurde auf semisolide Kulturansätze auf Basis von Methylzellulose zurückgegriffen. Mononukleäre Zellen aus

peripherem Blut oder Knochenmark wurden unter Zugabe von Wachstumsfaktoren bei 37°C bebrütet. Nach ca. 14 Tagen konnten reife Blutzellkolonien mikroskopisch festgestellt werden, die sich aus den Vorläuferzellen ableiteten. Diese Methodik geht zurück auf Fauser und Messner (1978), die „granuloerythrozytische" Kolonien aus humanen, pluripotenten Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs in-vitro kultivierten. Zuvor konnten ähnliche Kolonieformen lediglich aus murinen Stammzellen kultiviert werden (Hara und Ogawa, 1978; Johnson und Metcalf, 1977).

Unter diesen semisoliden Kulturbedingungen entstanden erythropoetische Vorläuferzellen nur in sehr geringer Zellzahl, die nachfolgende Untersuchungen zu Forschungszwecken erschwerten. Darüber hinaus gelang es in diesen Experimenten nicht, die terminale Ausdifferenzierung samt Enukleation zu erreichen (Narayan et al., 2005). Ferner war die Möglichkeit, die unterschiedlichen Einflüsse einzelner Wachstumsfaktoren zu ermitteln, deutlich begrenzt. Lichtmikroskopisch wurden die Anzahl der Kolonien (z. B. CFU-E, BFU-E) gezählt, um das Proliferations- und Differenzierungsverhalten zu beurteilen (*Abbildung 6*). Diese spätere Ausreifung wurde zunächst anhand der durch Hämoglobinsynthese entstandenen roten Färbung von Kolonien mikroskopisch festgestellt, bevor dann Ausstriche der Kolonien mit Benzidin gefärbt oder immunfluoreszierende Antisera aufgebracht wurden (Fauser und Messner, 1978). Später fanden zur weiteren Analyse beispielsweise Elektrophoreseverfahren Anwendung (Weinberg et al., 1995; Ishikawa und Ito, 1988).

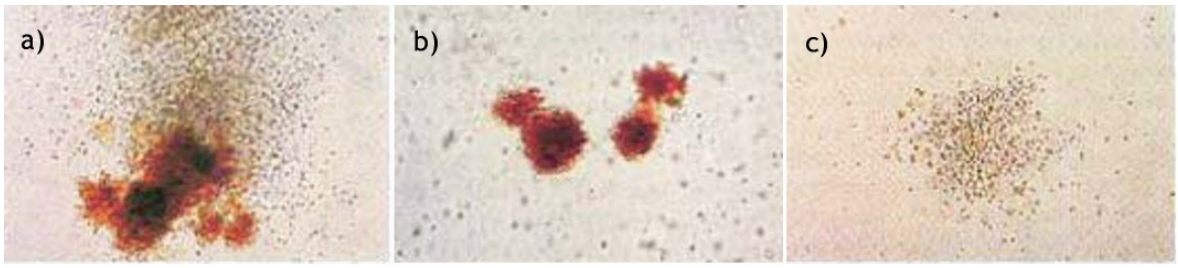


Abbildung 6: *Hämatopoetische Kolonien. a) CFU-GEMM; b) BFU-E; c) CFU-GM.*
(Quelle: Klinker und Weißinger, 2004)

Jüngere Modelle zur in-vitro Erythropoese nutzen Flüssigkulturen mit Suspensionszellen, denen unterschiedliche Zytokine oder Wachstumsfaktoren zugesetzt werden. Zu beliebigen Zeitpunkten konnten Zellen zu Analysezwecken entnommen werden, z. B. für durchflusszytometrische Untersuchungen oder zum Anfertigen und Färben von Zellen auf Objektträgern. Bei CD34-positiven, humanen Nabelschnurzellen konnten in Mehrphasenmodellen erstmalig hohe Proliferationsraten und mit Einschränkung auch die terminale Differenzierung einschließlich Enukleation gezeigt werden.

Panzenböck et al. (1998) gelang erstmals die Etablierung einer EPO- und SCF-abhängigen in-vitro Erythropoesekultur. Hierzu wurden humane Stammzellen aus unterschiedlichen Quellen unter-

sucht: Nabelschnurblut, Blutstammzellen, Knochenmarkaspirat. Zur Anreicherung der Stammzellen wurde eine Ficoll-Dichtegradientzentrifugation durchgeführt. Zur Beurteilung der liniendeterminierten Differenzierung wurden bestimmte Oberflächenantigene sowie der Hämoglobingehalt der kultivierten Zellen untersucht. Es konnten ein logarithmisches Wachstum der Zellen festgestellt sowie eine eingeschränkte terminale Differenzierung erythropoetischer Vorläuferzellen erreicht werden. Jedoch war die Gesamtproliferation aufgrund des zu geringen Anteils hämatopoetischer Zellen im Ausgangsmaterial (< 1%) nicht zufrieden stellend. Bezüglich wachstumsfördernder Zytokine wurde festgestellt, dass EPO und SCF sich synergistisch zueinander verhalten. Der weitere Zusatz von IGF-1 und Steroidhormonen vermochte die EPO- und SCF-induzierte DNA-Synthese noch weiter zu steigern, wohingegen andere Faktoren (Epidermal Growth Factor (EGF), Interleukin-3 (IL-3), GM-CSF) keine weitere Steigerung bewirkten. Diese Beobachtungen deckten sich mit denen von Rezeptoruntersuchungen, die eine Expression von EPO-, SCF-, IGF-1- und Insulinrezeptoren, nicht jedoch von EGF, IL-3 und GM-SCF auf den erythroiden Vorläuferzellen ergaben. Das Wachstum der Stammzellen war ferner abhängig von Dexamethason und Östrogen, durch welche die Rate an Spontandifferenzierungen signifikant gesenkt wurde.

Besonders wichtig war die Beobachtung von Panzenböck et al., dass die terminale Differenzierung zu kernlosen Erythrozyten (2 – 10% aller erythropoetischen Vorläuferzellen) nur erreicht werden konnte, wenn die Vorläuferzellen nur mit EPO und Insulin weiter inkubiert wurden. Solche Vorläuferzellen, die im Medium mit SCF, EPO, IGF-1 und Steroidhormonen belassen wurden, differenzierten nicht aus.

Neildez-Nguyen et al. (2002) entwickelten ein sechzehntägiges Dreiphasenmodell, in welches sie CD34-positive, humane Stammzellen aus Nabelschnurblut einbrachten. Zur Isolierung der Zellen wurden ebenfalls eine Ficoll-Dichtegradientzentrifugation sowie eine immunmagnetische Aufreinigung von CD34-positiven Zellen durchgeführt. Zunächst wurde die Expansion unreifer Stammzellen mit den Zusätzen FMS-like Tyrosinkinase-3 Ligand (Flt3-L), SCF und Thrombopoetin angestrebt. In der zweiten Phase wurden Zytokine (SCF, EPO und IFG-1) eingesetzt, um die Erythropoese zu fördern. In der letzten Phase sollten EPO und IGF-1 die terminale Differenzierung ermöglichen. Zwar konnten mit dieser Methodik eine hohe Proliferation und eine Differenzierung in eine vorwiegend erythroide Population in-vitro erreicht werden; jedoch blieben die terminale Differenzierung und Enukleation aus. Erst nach Injektion der in-vitro generierten erythropoetischen Vorläuferzellen in ein NOD/SCID-Mausmodell konnte nun in-vivo eine terminale Differenzierung zu reifen und kernlosen Erythozyten beobachtet werden.

Giarratana et al. stellten 2005 ihre Aufsehen erregenden Ergebnisse zur Kokultivierung von Stammzellen unterschiedlicher Herkunft vor. Auch hier wurden die CD34-positiven Zielzellen durch

immunmagnetische Aufreinigung gewonnen. Nach einer initialen achttägigen Flüssigkultur der Stammzellen mit Hydrocortison, SCF und EPO sowie zusätzlich IL-3 ab Tag 4, folgte eine Kokultivierung der erythroiden Vorläuferzellen mit adhärenten Knochenmarkstromazellen in zunächst EPO-haltigem (3 Tage) und anschließend zytokinfreiem (bis zu 10 Tage) Medium, wodurch die Mikroumgebung des Knochenmarks nachgebildet werden sollte. Dies führte zur terminalen Differenzierung einschließlich Enukleation. In einem weiteren Schritt wurden die an Tag 15 in-vitro entstandenen Zellen in NOD/SCID Mäuse injiziert. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die hergestellten roten Blutkörperchen humanen Ursprungs normale Funktionen und Lebensdauer in der Maus aufwiesen. Diese wegweisenden Erkenntnisse aus der Pariser Arbeitsgruppe um Luc Douay wurden unter anderem in der Tagespresse diskutiert und bildeten die Grundlage für die Vision, künftig Blutprodukte aus Stammzellen züchten zu können. Ein Verfahren zur Massenproduktion analog zur publizierten Methodik sollte der nächste Schritt zur Verwirklichung dieser Vision in Richtung „Roter Saft aus dem Labor“ sein (Süddeutsche Zeitung, 27.01.2005).

1.6. **Fragestellung**

Das Ziel, in-vitro terminal ausdifferenzierte Erythrozyten unter möglichst physiologischen Bedingungen zu produzieren, verfolgen weltweit mehrere Arbeitsgruppen. Hierbei ist die Erforschung der Knochenmarknische, in der die Hämatopoese stattfindet von grundlegender Bedeutung ist.

Eine etablierte in-vitro Erythropoese ist ein wichtiges Instrument um die Biologie hämatopoetischer Stamm- und liniendeterminierter Vorläuferzellenzellen zu untersuchen. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, die Wirkungen exogener Einflüsse auf die Entwicklung von Stammzellen zu beobachten und so die Mikroumgebung der Knochenmarknische genauer zu ergründen und deren Physiologie Schritt für Schritt abzubilden. Bei der Optimierung der in-vitro Erythropoese wurde bislang das Augenmerk vorwiegend auf Zytokine und Wachstumsfaktoren gerichtet, denen wichtige Schlüsselfunktionen zur Differenzierung und Proliferation nachgewiesen werden konnten. Vor kurzem wurden hierzu die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe veröffentlicht (Dorn et al., 2008).

Für ein besseres Verständnis der Hämatopoese und Ruhe- bzw. Stressbedingungen ist die Architektur der Mikroumgebung im Knochenmark von großer Bedeutung. Das Modell der Nischen liefert bislang eine gute Erklärungsmöglichkeit für zeitgleiche Proliferation und Differenzierung von liniendeterminierten Vorläuferzellen einerseits und Stammzellselbsterneuerung andererseits. Erst kürzlich ist der Sauerstoffgehalt im Gewebe (hier Knochenmark) ins Bewusstsein gerückt. Hierbei sind insbesondere unterschiedlich starke Hypoxieausprägungen im Knochenmark von Interesse. Im

Bereich der Knochenmarksinusoide, wo die kernlosen Retikulozyten via transendothelialer Migration in die Blutzirkulation eintreten, ist der Sauerstoffmangel weniger stark ausgeprägt, als in den sinusfernen Arealen. Die Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Erythropoese unter besonderer Beachtung der terminalen Enukleation und der Zusammenhang von Hypoxie und Knochenmarknische sind derzeit Gegenstand der Forschung und der vorliegenden Doktorarbeit.

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse anderer Gruppen wurde ein Zweiphasenmodell einer in-vitro Erythropoese aus humanen CD34-positiven Stammzellen etabliert, mit dem kernlose, hämoglobinhaltige und somit terminal differenzierte, rote Blutkörperchen hergestellt werden konnten. Hierbei wurde bei der Zusammensetzung des Kulturmediums besonders auf solche Zytokine (EPO, SCF, IGF-1) geachtet, deren fördernde und synergistische Wirkungen auf die erythroide Differenzierung und Proliferation bekannt waren.

Von der eigenen Arbeitsgruppe wird die Hypothese eines O_2-Gradienten im Knochenmark favorisiert. Hierbei verweilen nicht-zellzyklusaktive, pluripotente Stammzellen in Knochenmarknischen mit ausgeprägter Hypoxie, währenddessen erythropoetische Vorläuferzellen entlang eines O_2-Gradienten ausreifen.

Für die vorliegende Arbeit sollte der Einfluss von starkem bzw. schwachem Sauerstoffmangel (1% O_2, bzw. 5% O_2, jeweils versus 20% O_2) auf die Erythropoese untersucht werden, um den physiologischen Bedingungen im Knochenmark näher zu kommen. Dazu wurde zunächst ein in-vitro Erythropoesemodell unter normoxischen Standardbedingungen optimiert. Es folgte ein Transfer desselben Modells in eine sauerstoffarme Umgebung, welche die Regulation der Hypoxie erlaubte. Nachfolgend wurden Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von Stammzellen und erythropoetischen Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen vorgenommen, indem Vitalität und Zellzahl bestimmt und mit den Werten der normoxischen Standardkultur verglichen wurden. Ebenso wurden Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten von Stammzellen zu erythropoetischen Vorläuferzellen und reifen Erythrozyten einschließlich kernloser Retikulozyten unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Durchflusszytometrisch wurde die Expression charakteristischer Oberflächenantigene CD34 (Stammzellcharakter), CD71 (Eisenumsatz und Proliferation) sowie CD36 und GPA (erythropoetische Differenzierung) bestimmt. Lichtmikroskopisch wurde die erythropoetische Differenzierung morphologisch und anhand der Hämoglobinsynthese verfolgt.

2. Methoden und Materialien

2.1. Überblick über die Methodik

Die tiefgefrorenen CD34-positiven Stammzellen wurden in zwei Schritten isoliert und über 16 Tage in einer Zwei-Phasen-Flüssigkultur kultiviert. Die Suspensionszellen wurden alle 96 Stunden untersucht: Bestimmung von Zellzahl und Vitalität, Durchflusszytometrie, semisolide Kurzzeitkultur, Objektträger für Benzidin- und Pappenheimfärbung. *Tabelle 1* zeigt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf.

Kulturtag	Untersuchungen
0	• kontrolliertes Auftauen und Verdünnung • Ficoll-Aufreinigung der mononukleären Zellen • Lagerung über Nacht bei 4°C
1	• immunmagnetische MACS-Aufreinigung • Start der in-vitro Kultivierung im 2-Phasenmodell
1, 5, 9, 13	• Bestimmung von Zellzahl und Vitalität • Durchflusszytometrische Untersuchungen • semisolide Kurzzeitkultur • Objektträger für Benzidin- und Pappenheimfärbung
16	• Bestimmung von Zellzahl und Vitalität • Durchflusszytometrische Untersuchungen • Objektträger für Benzidin- und Pappenheimfärbung • Ende der Flüssigkultur

Tabelle 1: *Zeitlicher Ablauf des 2-Phasenmodells zur in-vitro Erythropoese*

2.2. Gewinnung der CD34-positiven Zellen

2.2.1. Patientenmaterial

Humane Stammzellen wurden im Rahmen einer autologen Transplantation zu therapeutischem Zweck gesammelt. Patienten wurden über den Forschungszweck aufgeklärt. Ein positives Votum der Ethikkommission zur in-vitro Erythropoese lag vor (AZ 04-088, 16.08.04).

In dieser Studie wurden humane Stammzellen von 12 Patienten verwendet, bei denen am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKS-H) Campus Lübeck autologe Stammzellen zur Therapie der Grundkrankheiten gewonnen wurden. Das Durchschnittsalter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Stammzellgewinnung bei 42 Jahren. Die onkologischen Grundkrankheiten sind in *Tabelle 1* aufgeführt. In sechs Experimenten wurden 1% O_2 mit 20% O_2 verglichen, in sechs weiteren 5% O_2 mit 20% O_2.

Versuchsgruppe	Alter	Geschlecht	Diagnose
1% vs. 20% O_2	30	m	akute myeloische Leukämie
	40	w	Mammakarzinom
	46	w	Plasmozytom
	27	m	hochmalignes Non-Hodgkin Lymphom
	29	m	Sarkom
	49	m	malignes Schwannom
5% vs. 20% O_2	30	m	akute myeloische Leukämie
	40	w	Mammakarzinom
	59	m	Plasmozytom
	37	w	Morbus Hodgkin
	66	m	Plasmozytom
	48	m	Ewing-Sarkom

***Tabelle 2**: Patienten*

Zur Stammzellmobilisierung erhielten die Patienten G-CSF (Neupogen©, Amgen Manufacturing, Thousand Oaks, USA). Die Stammzellapheresen wurden mit dem Zellseparator Amicus Crescendo (Baxter, München, Deutschland) durchgeführt. Die gewonnenen Apheresepräparate wurden in Stickstoff bei -196°C gelagert.

2.2.2. **Vorbereitung des tiefgefrorenen Präparates**

Das Leukapheresepräparat wurde mit dem Trockentemperiersystem SAHARA-TSC (Transmed-Gruppe, Wünnenberg, Deutschland) von der Lagertemperatur kontrolliert auf 0°C aufgetaut. Anschließend wurde das Präparat in Portionen zu je 10 ml aufgeteilt. Jede Portion wurde vorsichtig mit folgenden Medien versetzt: 20 ml Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) mit 2% Fetalem Kälberserum (FCS, PAA-Laboratories, Pasching, Österreich), 1% L-Glutamin (Cambrex Bio Science) 1% Penicillin-Streptomycin (Cambrex Bio Science) und 5% Natriumcitrat (Baxter, Maurepas, Frankreich), 20 ml IMDM.

Anschließend wurden die Röhrchen bei 20°C und 1210 rpm 10 Minuten zentrifugiert (Varifuge 3.2RS, Heraeus Sepatch, Hanau, Deutschland) und der Überstand abgenommen (sog. „Waschen" der Zellen). Nach einem zweiten Waschvorgang wurden die Zellen zunächst in je 35 ml IMDM mit den oben genannten Zusätzen und je 15 ml reinem IMDM und nach erneutem Waschen in je 25 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Medium (PBS, PAA-Laboratories) resuspendiert.

2.2.3. **Isolierung der mononukleären Zellen**

Es folgte die Selektion der mononukleären Zellen mittels Standardgradient Ficoll-Hypaque (PAA-Laboratories), wobei die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 auf das Lymphozytenseparationsmedium

geschichtet und bei 15°C und 1710 rpm 20 Minuten zentrifugiert (Haraeus Varifuge 3.2RS) wurde. Die Zellschicht der Interphase wurde entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS mit 0,5% Bovinem Serumalbumin (BSA, Fraktion V, Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) über Nacht bei 4°C gelagert.

2.2.4. **Selektion der CD34-positiven Zellen**

Um die CD34-positiven Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen am nächsten Tag mit einer immunmagnetischen Methode, der so genannten „Magnetic Cell Sorter"-Säule der Größe LS (MACS, LS-Coloumn, Miltenyi Biotecs, Bergisch Gladbach, Deutschland) und dem dazugehörigen Isolierungskit (CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi) isoliert. Bei einer solchen MACS-Zellisolierung werden Zellen einer Suspension mit Hilfe ihrer Oberflächenmerkmale aufgereinigt, im Falle von Stammzellen mit anti-CD34 Antikörpern. Diese Antikörper sind mit eisenhaltigen, magnetischen Partikeln – sog. „Microbeads" – gekoppelt, die eine Isolierung mittels Magnetfeld ermöglichen. Die Suspension wurde auf eine Auftrennungssäule aus Stahlwolle gegeben, die magnetisiert wurde. Die markierten, CD34-positiven Zellen blieben in der Säule hängen, während die unmarkierten Zellen durch die Säule hindurchflossen. Nach Entfernung des Magneten konnten die Zielzellen aus der Stahlwollematrix hinausgespült werden (*Abbildung 7*). Die Reinheit an CD34-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie erfasst und lag bei 98 ± 2% (n=12).

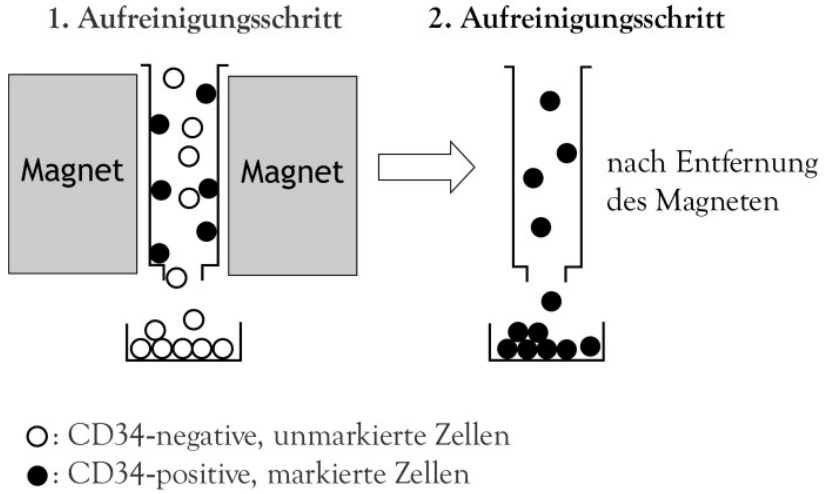


***Abbildung 7**: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation (MACS).*
Die magnetisch markierten Zielzellen (schwarz) bleiben im 1. Schritt in der magnetischen Stahlwolle hängen, während die unmarkierten Zellen (weiß) hindurchfließen. Im 2. Schritt, nach Entfernung des Magneten, verlieren die markierten Zellen ihren Halt und können herausgespült werden.

2.3. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zellzahl und Vitalität wurden in der Neubauer Zählkammer in der 1:1-Vitalblaufärbung bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau (Trypan Blue 0,4%, Sigma Aldrich, München, Deutschland) vermischt, und die vitalen und nicht-vitalen Zellen in der L-Form unter dem Lichtmikroskop (Diaplan Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgezählt und Zellzahl und Vitalität berechnet.

2.4. Flüssigkultur

Die Zellen wurden unter Verwendung vom „Basismedium" in einer Dichte von 0,5 x 10^6 /ml eingestellt. Dieses bestand aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cambrex Bio Science) mit 15% FCS, 1% BSA, 15% Wasser (Aqua ad injectabile, Braun, Melsungen, Deutschland), 1,9 mmol/l Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1 mmol/l β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 0,128 mg/ml Transferrin (Sigma-Aldrich) und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin. Das Basismedium wurde je nach Versuchsansatz und -tag um die in *Tabelle 3* aufgeführten Zytokine ergänzt. Die in der ersten Phase zugesetzten Zytokine sollten die Proliferation fördern, die in der zweiten Phase zugesetzten die Differenzierung begünstigen. Sie werden nachfolgend vereinfacht „Proliferations-" und „Differenzierungsmedium" genannt.

Untersuchungstag	**Zusätze zum Basismedium**	
1 - 8	*„Proliferationsmedium"*:	
	• EPO: 1 U/ml	(R&D-Systems, Wiesbaden)
	• SCF: 100 ng/ml	(Strathmann, Hamburg, Deutschland)
	• IGF-1: 40 ng/ml	(long R3, Sigma-Aldrich)
	• Dexamethason: 10^{-6} mol/l	(Sigma-Aldrich)
	• β-Estradiol: 10^{-6} mol/l	(Sigma-Aldrich)
9 - 16	*„Differenzierungsmedium"*	
	• Erythropoetin: 1 U/ml	(R&D-Systems)
	• Insulin: 1 µg/ml	(Sigma-Aldrich)

***Tabelle 3**: Zytokine des Zweiphasenmodells*

Anschließend wurden die Zellen in Sechslochplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 2 ml pro Vertiefung in Kultur gebracht und alle 96 Stunden einem Mediumswechsel unterzogen und untersucht (*Tabelle 1*).

Um den Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Erythropoese zu untersuchen, wurden die Sechslochplatten in verschiedene Sauerstoffumgebungen gebracht. In sechs Versuchen wurden die Zellen in einem speziellen Hypoxiebrutschrank (Incubator C42, Labotect, Göttingen, Deutschland)

mit 1% Sauerstoff („starke Hypoxie"), 5% Kohlenstoffdioxid und 94% Stickstoff als Verdrängungsgas (Air Liquide, Krefeld, Deutschland) kultiviert, und in weiteren sechs Versuchen im gleichen Brutschrank mit 5% Sauerstoff („milde Hypoxie"), 5% Kohlenstoffdioxid und 90% Stickstoff. Zur Kontrolle wurden jeweils Zellen aus dem selben Aufreinigungsprozess unter normoxischen Standardbedingungen (Brutschrank 3336, Labotect) bei 20% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid mitgeführt.

2.5. Semisolide Kultur

In einer Konzentration von 500 CD34-positiven Zellen / 100 µl DMEM wurden je 100 µl Zellsuspension mit je 1 ml Methylzellulose (Methocult GF H 4435, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) in Petrischalen für Gewebekultur (35 x 10 mm, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) vermischt und über 14 Tage bei 37°C in Luftsauerstoff mit 5% Kohlenstoffdioxid und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es wurden jeweils 3 Ansätze vorbereitet. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Unterschieden wurde zwischen BFU-E, CFU-E und CFU-GM. Aus den Ergebnissen der Dreifachansätze wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

2.6. Durchflusszytometrie

2.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein optisches Messsystem, das der Analyse und Darstellung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen dient. Um Zellen mit einem bestimmten Merkmal zu charakterisieren, werden sie mit einem fluoreszierenden Antikörper inkubiert, der spezifisch an dieses Merkmal bindet. Anschließend wird die Zellsuspension vom Gerät angesaugt. Hierbei werden die Zellen perlschnurartig zu einem Analysepunkt geleitet, wo sie von einem Laserstrahl „beleuchtet" werden. Markierte Zellen absorbieren dieses energiereiche Licht und leuchten kurz auf, sog. „Fluoreszenz". Durch einen Analog-Digital-Wandler werden die Lichtimpulse abhängig von ihrer Fläche und Länge einem vom 1024 Kanälen zugeordnet. Die Anzahl von Impulsen in jedem Kanal lässt sich mittels Häufigkeitsverteilungen darstellen. Durch Antikörper mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima (z. B. R-Phycoerythrin (PE) 578 nm, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) 525 nm) werden Lichtsignale mit unterschiedlichen Wellenlängen abgegeben.

Die durch Teilerspiegel umgelenkten Lichtsignale werden als Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) bezeichnet und lassen auf die Granularität der Zellen schließen, wohingegen die nicht abge-

lenkten Signale Vorwärtsstreulicht (FSC = forward angle scatter) genannt werden und Hinweise auf die Zellgröße geben. In einem Koordinatensystem lassen sich FSC und SSC gegeneinander darstellen, so dass sich Aussagen über Granularität und Größe der Zellen in bestimmten Populationen treffen lassen.

Alle Messungen wurden mit den Geräten Epics XL oder FC500 (beide Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) durchgeführt.

2.6.2. **Fluoreszenzfärbung spezifischer Oberflächenmerkmale**

Nach immunmagnetischer Aufreinigung lagen zu >95 % CD34-positive Zellen vor. Diese in ihrem Reifungsgrad heterogene Population kann unter Verwendung zusätzlicher Oberflächenantigene besser charakterisiert und die Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen kann besser verfolgt werden (Daniels und Green, 2000). Unterschiedliche Reifungsstadien wurden bestimmt: CD34 als Marker für hämatopoetische Stammzellen, CD36 und GPA als Marker für unterschiedlich weit fortgeschrittene Differenzierung erythropoetischer Zellen und der Transferrinrezeptor CD71 als erythropoetischer Proliferationsmarker.

Zur Untersuchung wurden jeweils 100 µl Zellsuspension mit je 10 µl fluorochrommarkierten Antikörpern versetzt, wie in *Tabelle 4* aufgeführt (CD34 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), Isotyp IgG1 FITC (Biocarta, Hamburg, Deutschland), Isotyp IgG1 PE (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), CD71 FITC (DAKO, Hamburg, Deutschland), GPA FITC (BioCarta), CD36 FITC (Biocarta)). Anschließend wurde 15 Minuten bei 4°C inkubiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Dann folgte die Messung.

CD34 PE	+	Isotyp IgG1 FITC
Isotyp IgG1 PE	+	Isotyp IgG1 FITC
CD34 PE	+	CD71 FITC
CD34 PE	+	GPA FITC
CD34 PE	+	CD36 FITC

Tabelle 4: *Übersicht über Antikörper der Fluoreszenzfärbung*

2.7. Lichtmikroskopische Beurteilung

2.7.1. Anfertigung der Objektträger

An den Untersuchungstagen wurden je 50 000 Zellen in 250 µl PBS mit 0,2% BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg, Deutschland) mit der Zytospinzentrifuge (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific, Waltham USA) auf einen Objektträger verbracht, indem bei mittlerer Beschleunigung 10 Minuten bei 400 rpm zentrifugiert wurde.

2.7.2. Neutrale Benzidinfärbung

Die vorbereiteten Objektträger wurden zunächst fünf Minuten in Methanol (J. T. Baker, Deventer, Holland) fixiert und anschließend wie folgt in Färbeküvetten inkubiert:

90 Sekunden: 1% Dimethoxybenzidin (o-Dianisidine, Sigma-Aldrich) in Methanol

90 Sekunden: 1% Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich) in 50% Ethanol (J. T. Baker) und 50% Aqua bidest

30 Sekunden: Aqua bidest

Anschließend wurden die Objektträger mit dem Färbeset Diff-Quick (Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) gemäß Anleitung gefärbt:

Fünfmal je 1 Sekunde: Diff-Quick-Fixierlösung

Fünfmal je 1 Sekunde: Färbelösung 1

Fünfmal je 1 Sekunde: Färbelösung 2

Schließlich wurden sie mit Aqua bidest gespült und luftgetrocknet. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die benzidinpositiven Zellen in polychromatische Erythroblasten, Normoblasten und Retikulozyten unterschieden. Den genannten Stadien ist die Hämoglobinsynthese gemein. Durch die Färbung erscheint das Hämoglobin mikroskopisch gelblich, sodass sie dadurch von früheren Stadien abgegrenzt werden können. Polychromatische Erythroblasten weisen im Vergleich zu Normoblasten einen größeren und aufgelockerten Kern auf. In Normoblasten ist der Kern randständig und kompakt. Retikulozyten sind kernlos.

2.7.3. **Pappenheimfärbung**

Die Objektträger wurden gemäß folgendem Protokoll gefärbt:

5 Minuten	Methanol
4 Minuten	May-Grünwald-Lösung, anschl. mit Aqua bidest spülen
15 Minuten	Giemsa-Gebrauchslösung, anschl. mit Aqua bidest spülen und lufttrocknen

2.8. Statistische Auswertung

Unterschiede in der Zellzahl sowie im prozentualen Anteil der vitalen Zellen, der einzelnen Vorläuferstufen und der Oberflächenmarker zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen wurden zunächst mit dem Kruskal-Wallis-H-Test auf Normalverteilung geprüft und anschließend mit dem Wilcoxon-Test für normal verteilte, abhängige Stichproben berechnet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Für alle durchgeführten Teste wurde die SPSS-Software (Version 12.0) benutzt. P-Werte $<0,05$ galten als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Proliferation erythropoetischer Progenitorzellen

Die immunmagnetische Aufreinigung führte zu einer Reinheit an CD34-positiven Zellen von >95 %. Die hämatopoetischen Stammzellen wurden in Flüssigkultur gebracht. Die Proliferation wurde in drei verschiedenen Ansätzen (1, 5 und 20 % O_2) vergleichend untersucht.

Nach der Aufreinigung wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,5 x 10^6/ml in Kultur gebracht. Nach 96 Stunden war die Zellzahl in allen drei Ansätzen nahezu unverändert (etwa 0,4 x 10^6/ml).

Insgesamt wurden 12 Kontrollversuche in 20% Sauerstoff durchgeführt. Ab Tag 9 nahm die Zellzahl zu bis zu einer Gesamtzellzahl von 7,5 ± 4,4 x 10^6/ml am Ende der Flüssigkultur, entsprechend einer Vermehrung um den Faktor 14 (*Abbildung 8*; *Wertetabelle 1*). Die höchste kumulative Zellzahl einer einzelnen Zellkultur lag bei 16,5 x 10^6/ml, das entspricht einer Zellvermehrung um das 33-fache; die niedrigste lag bei 3,2 x 10^6/ml (6-fach).

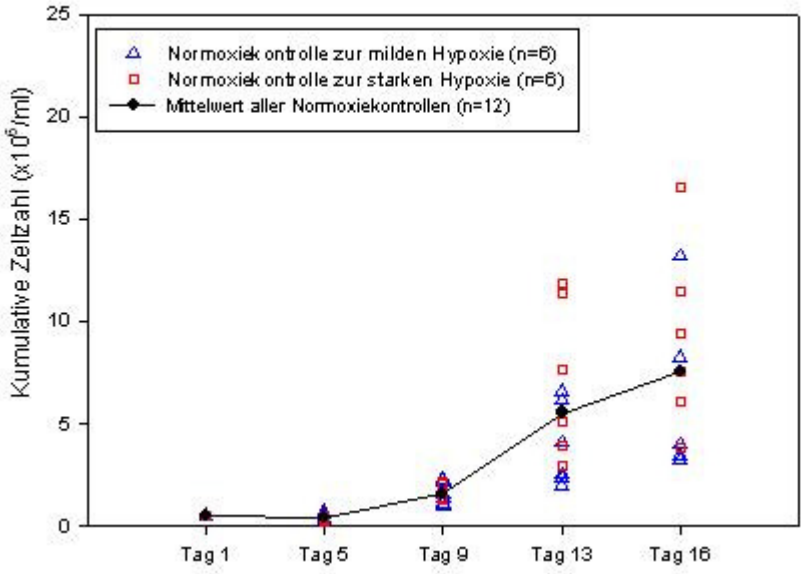


Abbildung 8: *Proliferation bei Normoxie*

In milder Hypoxie (5 % O_2) stieg die Anzahl der Zellen kontinuierlich an (*Abbildung 9a*, *Wertetabelle 1*). Die höchste Zellzahl konnte unter milder Hypoxie festgestellt werden: 14,6 ± 9,0 x 10^6/ml an Tag 16, entsprechend einer mittleren Vermehrung um das 29-fache. Die höchste Proliferation einer einzelnen Flüssigkultur betrug 28,5 x 10^6/ml (56-fache Zunahme**)** die schlechteste 6,3 x 10^6/ml (12-fach). Im Vergleich zu den Kontrollversuchen zeigte sich bei milder Hypoxie eine insgesamt 2-fach höhere Proliferation ($p < 0,05$).

In starker Hypoxie (1 % O_2) waren die Proliferationsraten niedriger als unter Normoxie. An den ersten Tagen stagnierte die Zellzahl, um dann auf nur 2,6 x 10^6/ml an Tag 16 zuzunehmen (*Abbildung 9b*, *Wertetabelle 1*). Das entspricht einer Zunahme um den Faktor 5. Die höchste Zellzahl eines Einzelversuchs an Tag 16 zeigte sich mit einer Zunahme um das 10,2-fache auf 5,1 x 10^6/ml, die niedrigste mit einer 2-fachen Zunahme auf 1,4 x 10^6/ml. Insgesamt lag die Proliferation bei starker Hypoxie 3,5-fach niedriger als bei Normoxie.

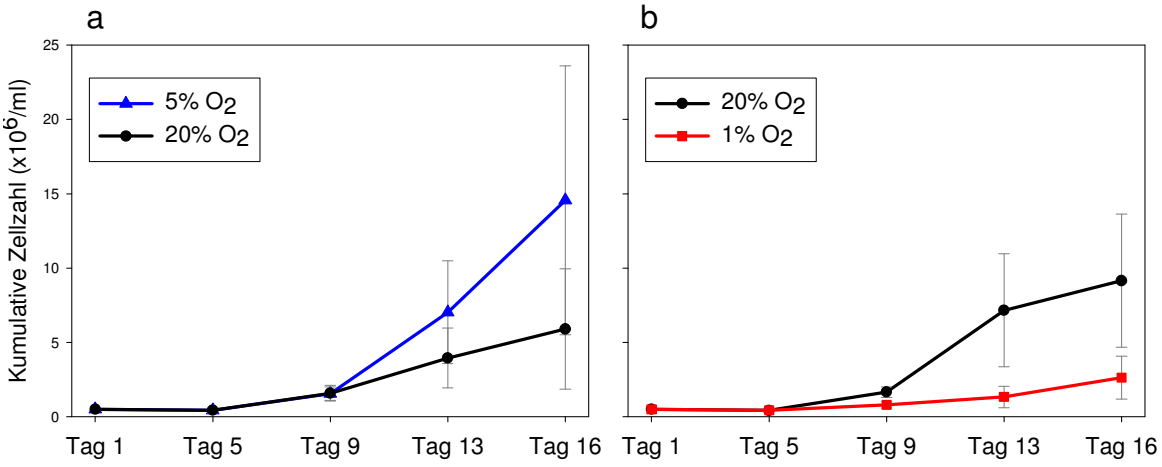


Abbildung 9: *Proliferation bei Hypoxie.*
a*: Milde Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6).* ***b****: starke Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6).*

3.2. Vitalität erythropoetischer Progenitorzellen

Der Anteil vitaler Zellen nach der Aufreinigung betrug 97,7 ± 1,2 %. An Tag 5 war in allen drei Versuchsreihen ein Abfall der Vitalität auf etwa 70 % zu verzeichnen. Anschließend stiegen die Werte wieder an (*Wertetabelle 2*). Ab Tag 9 konnte im Vergleich zur Normoxie in der milden Hypoxie eine höhere Vitalität (86,8 ± 4,7 % versus 78 ± 13,5 %) beobachtet werden (*Abbildung 10a*). Die Unterschiede an den Tagen 9, 13 und 16 waren jeweils statistisch signifikant. In starker Hypoxie wurden im Vergleich zur Normoxie geringere Vitalitätswerte festgestellt. An den Tagen 5, 13 und 16 stagnierte die Vitalität bei ca. 70 % (im Vergleich zu ca. 80 % in Normoxie) (*Abbildung 10b*). Auch diese Unterschiede waren statistisch signifikant.

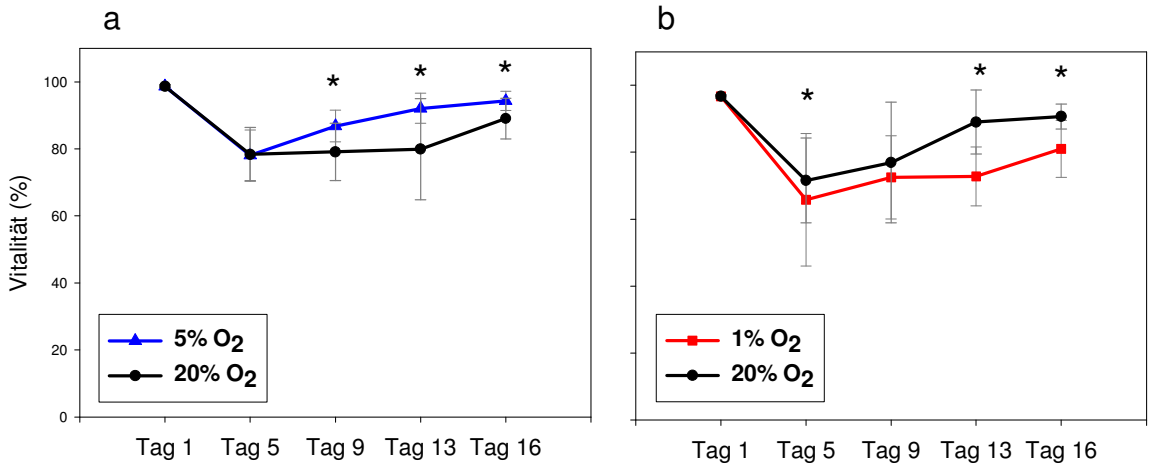


Abbildung 10: *Vitalität.*
a*: Milde Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6).* ***b****: starke Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6) .* *******: Unterschied statistisch signifikant (P <0,05).*

3.3. Differenzierung erythropoetischer Progenitorzellen

3.3.1. Lichtmikroskopische Auswertung

Grundsätzlich konnte in allen drei Ansätzen (1, 5 und 20 % O_2) humane Erythropoese induziert werden. Die ursprünglich an Tag 1 eingebrachten hämatopoetischen CD34-positiven Zellen differenzierten weitgehend (> 90 %) in erythropoetische Vorläuferzellen. An Tag 5 nahm die Anzahl der Stammzellen ab, und an Tag 9 konnten polychromatische Erythroblasten und Normoblasten beobachtet werden. An Tag 13 dominierten polychromatische Erythroblasten, Normoblasten und Retikulozyten das Zellbild. Am Ende des Beobachtungszeitraumes konnten in allen drei Versuchsansätzen terminal differenzierte Zellen bestimmt werden und frühe Entwicklungsstadien konnten nicht mehr nachgewiesen werden (*Abbildung 11*, *Abbildung 13*, *Wertetabelle 3*).

In den normoxischen Kontrollversuchen zur milden und starken Hypoxie konnten an Tag 9 noch überwiegend Stammzellen und polychromatische Erythroblasten gezählt werden. An Tag 13 waren polychromatische Erythroblasten und Normoblasten in der Mehrzahl und Stammzellen kaum noch vorhanden. Am letzten Tag imponierte ein Bild aus Normoblasten und Retikulozyten (*Abbildung 11a, Abbildung 13a).*

Bei milder Hypoxie zeigte sich ein verzögerter Verlauf der Ausreifung. An Tag 9 waren im Vergleich zur Normoxie mehr Stammzellen vorhanden und an Tag 13 mehr polychromatische Erythroblasten und weniger Normoblasten. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant. An Tag 16 zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Zusammensetzung mehr; kernlose Retikulozyten waren ebenso nachweisbar (*Abbildung 11b*, *Abbildung 12*).

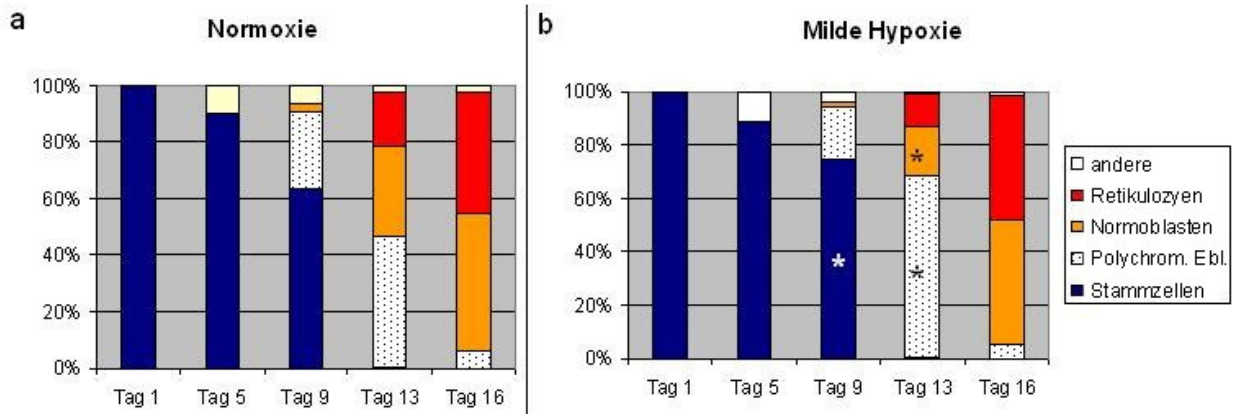


Abbildung 11: *Prozentuale Anteile von Progenitor- und differenzierten Zellen (milde Hypoxie).*
a: *in normoxischer Kontrollreihe zur milden Hypoxie (n=6).* ***b:*** *in milder Hypoxie (n=6).*
★: *Unterschiede statistisch signifikant (P <0,05).*

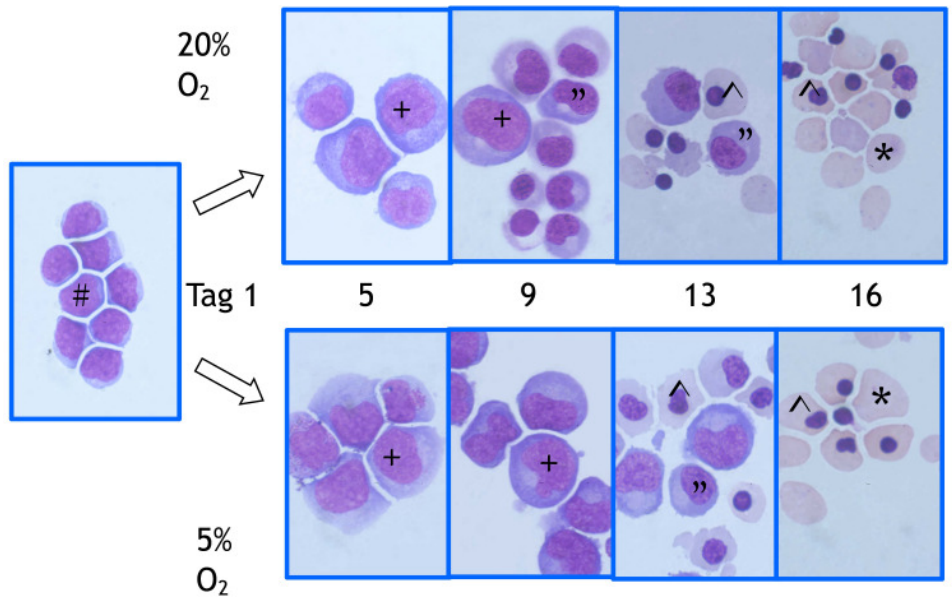


***Abbildung 12**: Entwicklungsverzögerung bei milder Hypoxie.*
*# Stammzelle, + basophiler Erythroblast, " polychromatischer Erythroblast, ^ Normoblast, * Retikulozyt. Weitere Erläuterungen siehe Kapitel 3.3.1.*

In starker Hypoxie ergaben sich erst gegen Ende des Beobachtungszeitraumes Unterschiede zur Normoxie. An den ersten 13 Tagen war die zelluläre Zusammensetzung nicht wesentlich verschieden zur Normoxie. An Tag 16 konnten bezüglich der Frequenz an Normoblasten und Retikulozyten jeweils signifikant höhere Anteile als in Normoxie festgestellt werden.

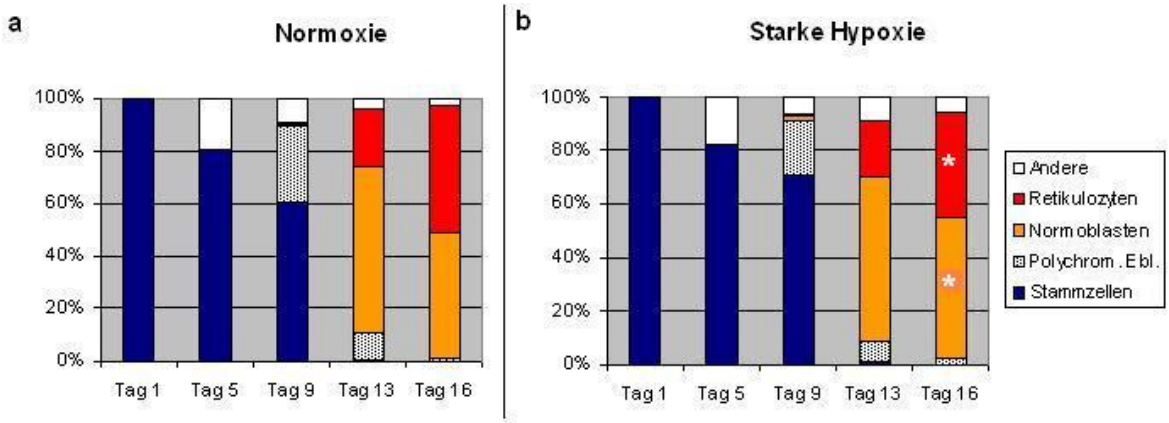


***Abbildung 13:** Prozentuale Anteile von Progenitor- und differenzierten Zellen (starke Hypoxie).*
***a:** in normoxischer Kontrollreihe zur starken Hypoxie (n=6). **b:** in starker Hypoxie (n=6). ★: Unterschiede statistisch signifikant (P <0,05).*

3.3.2. **Durchflusszytometrische Auswertung**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression bestimmter Oberflächenmarker auf den Vorläuferzellen gemessen.

Nach der Aufreinigung waren 98,5 ± 1,6 % der Zellen CD34-positiv. Unter Kultivierung verloren die hämatopoetischen Stammzellen ihr charakteristisches CD34-Antigen (*Wertetabelle 4*). Dies ist ein Indiz für die einsetzende Differenzierung. Der Abfall von CD34 verlief in Normoxie und milder Hypoxie nahezu identisch. In den ersten fünf Tagen fand nur ein geringer Verlust statt, an den folgenden Untersuchungstagen wurden stets größere Verluste festgestellt. (*Abbildung 15a*). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der ebenfalls beobachteten Verzögerung in der Proliferation.

In starker Hypoxie konnte ein verzögerter Verlust von CD34 beobachtet werden. An Tag 9 waren signifikant mehr Zellen noch CD34 positiv als in Normoxie. Am Ende der Versuche waren sowohl in milder und starker Hypoxie als auch in Normoxie alle Zellen CD34-negativ (Abbildung 15*b*). Auch hier muss ein Zusammenhang zum Wachstumsverhalten unter starker Hypoxie gesehen werden.

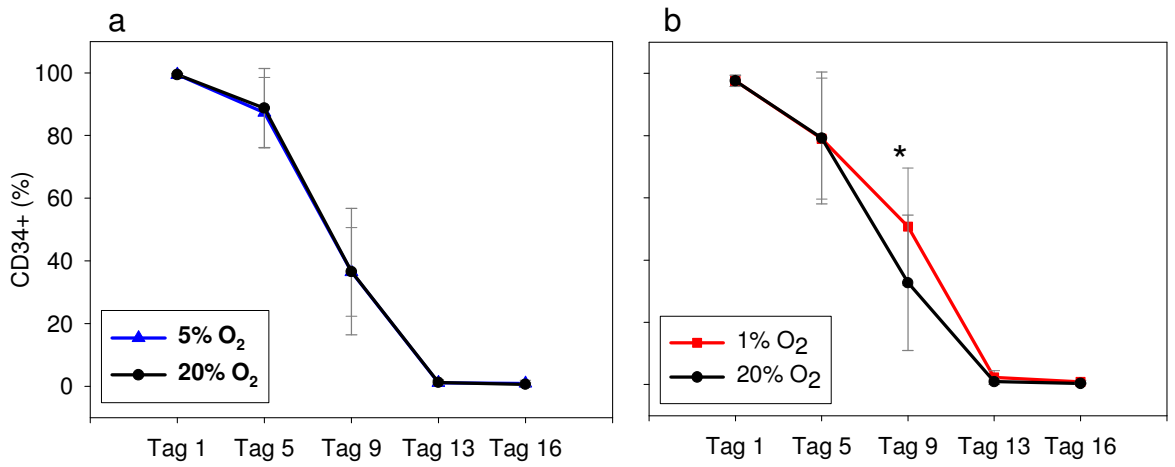


***Abbildung 15**: Anteil der CD34-positiven Zellen*
***a**: milde Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6). **b**: starke Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6).*
★: Unterschiede statistisch signifikant (P <0,05).

Humane CD34-positive hämatopoetische Stammzellen tragen nach Mobilisierung ins periphere Blut kein GPA. Mit zunehmender Differenzierung in die erythropoetische Reihe nimmt die GPA-Expression kontinuierlich zu.

In den drei untersuchten Ansätzen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der GPA-Expression festgestellt werden. Nach einem initial geringem Anstieg an Tag 5, trugen an Tag 13 – fünf Tage nach Beginn der Differenzierungsphase mit EPO und Insulin – bereits ca. 96 % GPA (*Abbildung 16*). An Tag 16 lagen ca. 98 % GPA-positive Zellen vor. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden hypoxischen Ansätze und dem normoxischen Ansatz.

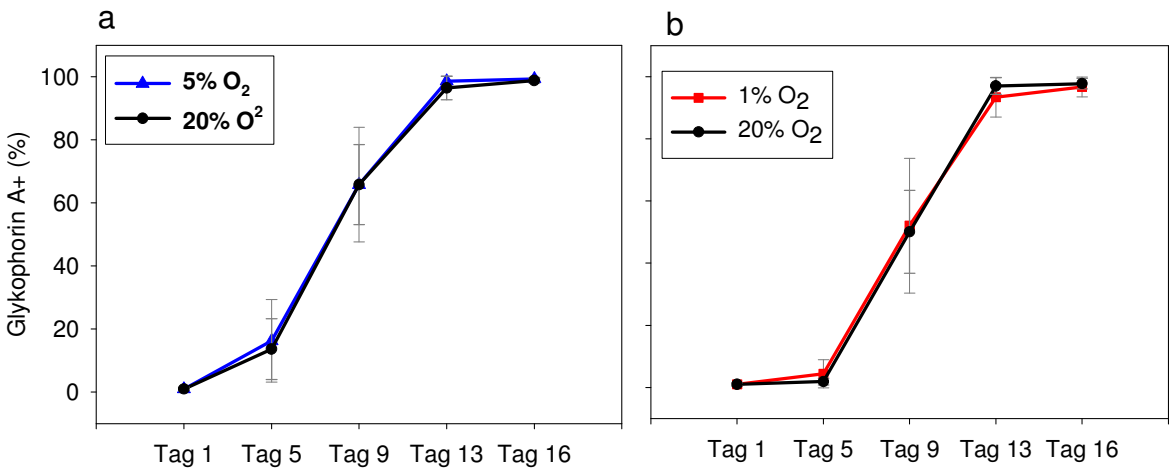


Abbildung 16: *Anteil der GPA-positive Zellen.*
a: *milde Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6).* ***b:*** *starke Hypoxie und normoxische Kontrolle (n=6).*

CD34-positive Stammzellen zeigen nach G-CSF-Mobilisation eine basale Expression von CD36. Mit Wechsel von der Proliferations- in die Differenzierungsphase wurden in allen drei Ansätzen Maximalwerte > 80 % erreicht. Das entsprach an Tag 9 vorwiegend den Stadien der Proerythroblasten und polychromatischen Erythroblasten (vgl. *Abbildung 11*). Mit zunehmender Ausdifferenzierung ging dann die CD36-Expression verloren. Am Ende der Kulturzeit trugen nur noch etwa ein Viertel das CD36-Antigen (*Wertetabelle 6*). Normoblasten und Retikulozyten sind vorwiegend negativ für das Antigen CD36.

Im Vergleich zwischen Normoxie und milder Hypoxie ergaben sich signifikante Unterschiede. Die maximale CD36-Expression an Tag 9 war in Hypoxie höher als in Normoxie, und auch an Tag 13 waren mehr von den in Hypoxie kultivierten Zellen noch positiv für CD36 (*Abbildung 17a*).

In starker Hypoxie verhielt sich die Expression von CD36 jedoch ähnlich wie in der normoxischen Kontrolle (*Abbildung 17b*).

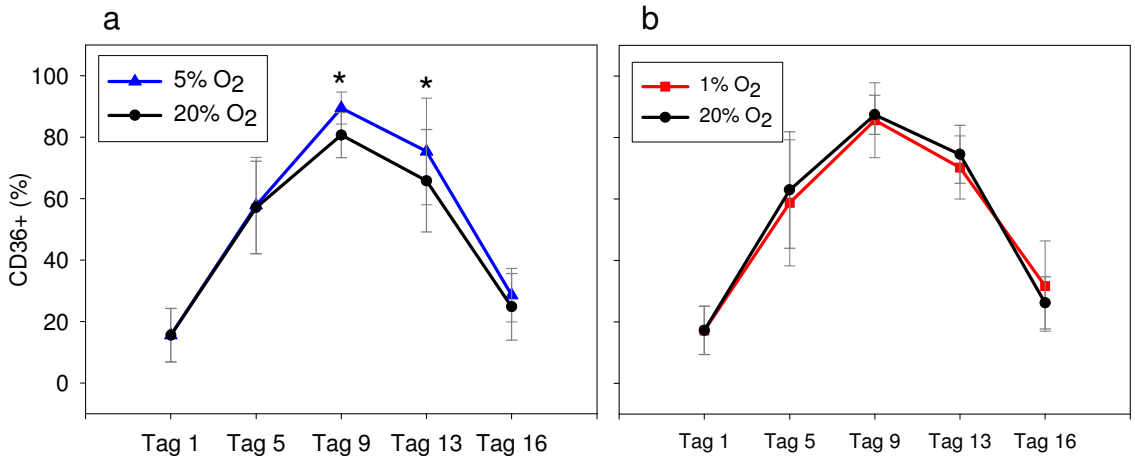


***Abbildung 17**: Anteil der CD36-positiven Zellen.*
***a:** milde Hypoxie und normoxischer Kontrolle (n=6). **b**: starke Hypoxie und normoxischer Kontrolle (n=6)*
**: Unterschiede statistisch signifikant (P <0,05).*

Der Transferrinrezeptor CD71 wird als Marker für hohen Eisenumsatz in der Erythropoese von proliferierenden Zellen besonders stark exprimiert.

Die Expressionskurve hat einen parabelartigen Verlauf mit geringen Werten initial und gegen Ende der Kulturzeit. Dazwischen spiegelt der hohe Anteil CD71-positiver Zellen die hohe Proliferation der Zellen wieder. Auf Retikulozyten und Erythrozyten ist CD71 per definitionem nicht mehr zu beobachten. In allen drei Ansätzen konnten an Tag 9 Maximalwerte um 88 % CD71-exprimierender Zellen beobachtet werden (*Wertetabelle 7*).

In milder Hypoxie trugen an den Tagen 9 und 13 mehr Zellen das CD71-Antigen als in Normoxie (ca. 90 % vs. 80 %, bzw. 80 % vs. 76 %; *Abbildung 18a*). Diese signifikanten Unterschiede stehen im Einklang mit den beobachteten höheren Proliferationswerten der milden Hypoxie. In starker Hypoxie konnten bezüglich der CD71-Expression keine signifikanten Unterschiede zur Normoxie beobachtet werden (*Abbildung 18b*).

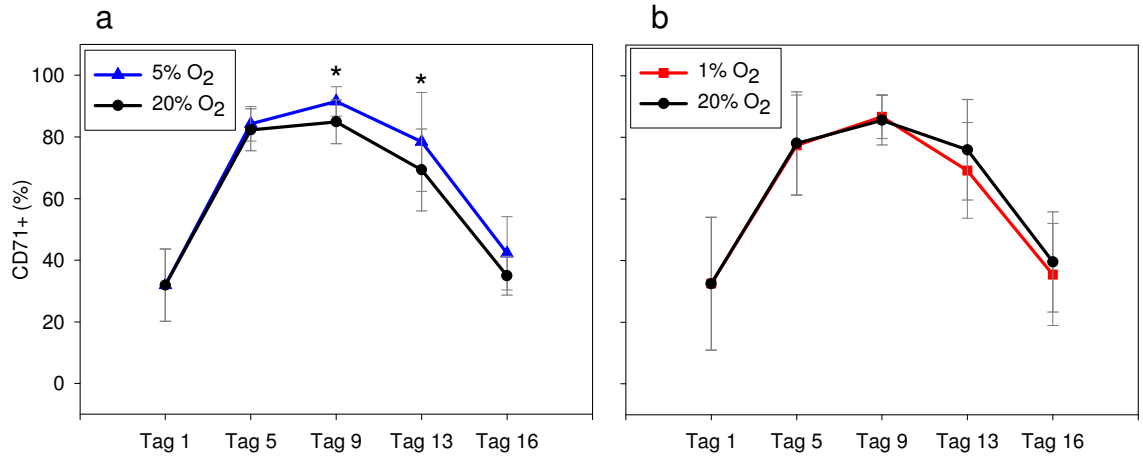


***Abbildung 18**: Anteil der CD71-positiven Zellen.*
***a**: milde Hypoxie und normoxischer Kontrolle (n=6). **b:** starke Hypoxie und normoxischer Kontrolle (n=6)*
**: Unterschiede statistisch signifikant (P <0,05).*

3.3.3. **Semisolide Kurzzeitkultur**

Humane Stammzellen können auf semisoliden Medien wie Methylzellulose oder Agar-Agar ausgesät werden. Aufgrund der hohen Konsistenz können sie hier – im Gegensatz zur Flüssigkultur – Kolonien bilden. Das morphologische Charakteristikum dabei ist, dass alle differenzierten Zellen einer Kolonie Tochterzellen einer ursprünglich an Tag 1 ausgesäten Stamm- bzw. liniendeterminierten Vorläuferzelle sind.

An den Untersuchungstagen 1, 5, 9 und 13 wurden semisolide Kurzzeitkulturen angefertigt, die jeweils 14 Tage später abgelesen wurden. Zwischen den drei untersuchten Ansätzen (1, 5 und 20 % O_2) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. An Tag 1 waren in der „heterogenen" Stammzellpopulation – nach immunmagnetsicher Aufreinigung über das CD34-Antigen – ungefähr gleich viele hämatopoetische Vorläuferzellen mit myeloischem und erythrozytärem Differenzierungspotential vorhanden. Die Frequenz der Koloniebildung lag bei ca. 20 % aller eingebrachter CD34-positiven Zellen. In den semisoliden Kulturen des ersten Versuchstages lagen etwa gleich viele BFU-E-Kolonien und CFU-GM-Kolonien vor. Die Anzahl der CFU-E-Kolonien war vernachlässigbar klein (*Wertetabelle 8*).

Im Verlauf zeigten sowohl die milde Hypoxie (5% O_2) als auch die entsprechende Normoxiekontrolle einen geringen Anstieg der BFU-E-Kolonien, während die CFU-GM-Kolonien rückläufig waren. Die semisoliden Kulturen von erythropoetischen Vorläuferzellen, die den Flüssigkulturen an den Tagen 9 und 13 entnommen wurden, zeigten deutlich weniger Wachstum aller Kolonien (*Abbildung 19*).

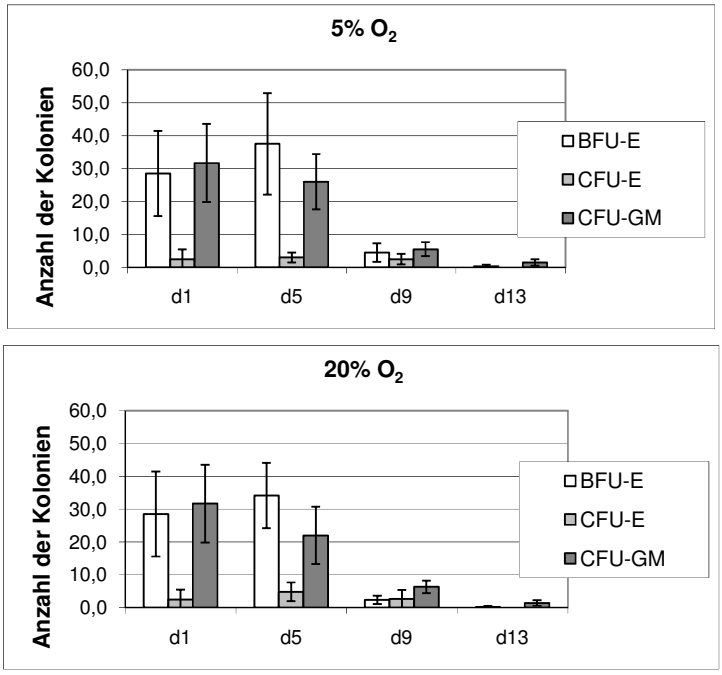


Abbildung 19: *Semisolide Kurzzeitkulturen unter milder Hypoxie und Normoxie (je n=6).*

In der starken Hypoxie (1% O_2) und in den normoxischen Kontrollversuchen zeigten sich in den semisoliden Kulturen von Tag 5 ein geringer Anstieg der CFU-GM-Kolonien, während die anderen Kolonien zurückgingen. In den Kulturen der folgenden Tage konnte eine Abnahme jeglichen Koloniewachstums festgestellt werden (*Abbildung 20*).

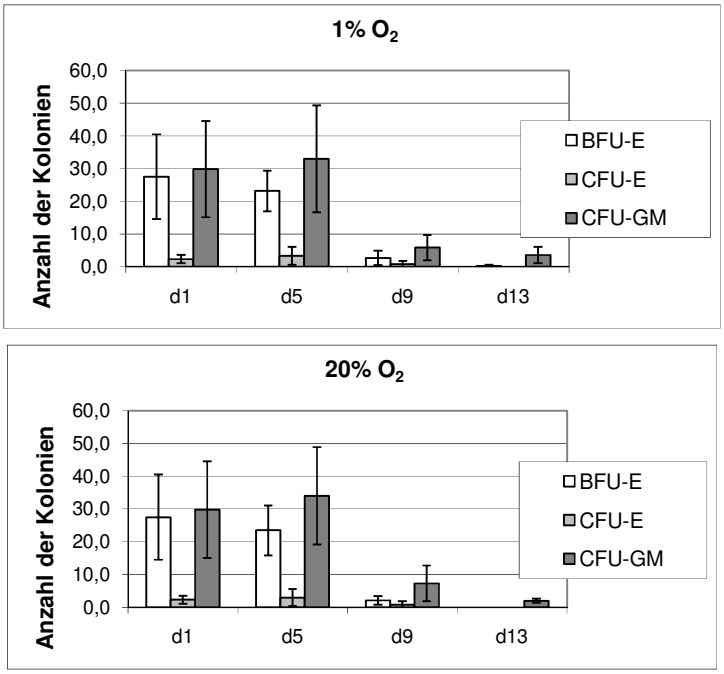


***Abbildung 20**: Semisolide Kurzzeitkulturen unter starker Hypoxie und Normoxie (je n=6).*

4. Diskussion

Die adulte Hämatopoese findet in Knochenmarknischen statt, in denen undifferenzierte Stammzellen zu terminal differenzierten Blutzellen der megakaryozytären, myeloischen, lymphatischen oder erythropoetischen heranreifen (vgl. *Abbildung 1*). Unter Erythropoese versteht man jenen kontrollierten Prozess, den diese Stammzellen durchlaufen, um zu reifen Erythrozyten zu differenzieren. Dabei beginnt im Stadium des polychromatischen Erythroblasten die Hämoglobinproduktion. Die Größe der Zelle und des Nukleus' wird im weiteren Verlauf reduziert, die Zellorganellen abgebaut und die Kerndichte erhöht, bis der Kern vom Normoblasten schließlich ausgestoßen wird und der Retikulozyt entsteht. (vgl. *Abbildung 21*, *Abbildung 2)*.

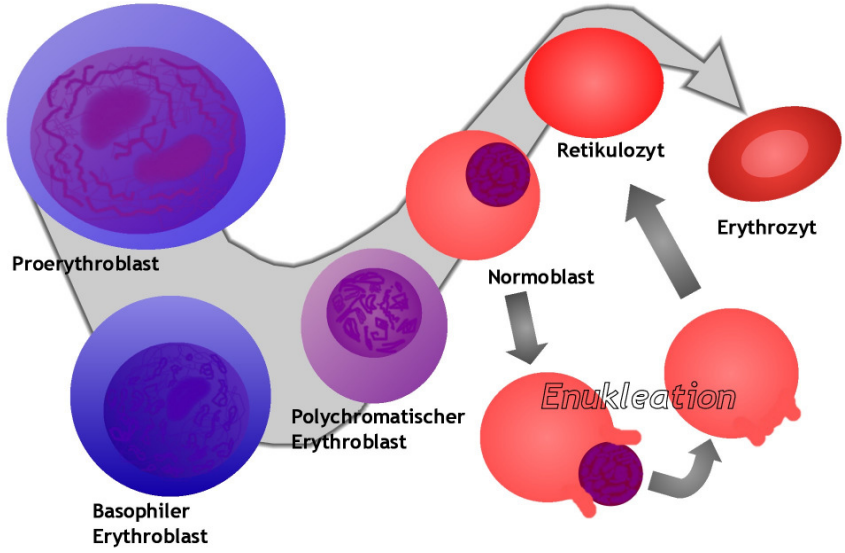


Abbildung 21: *Graphische Darstellung der Erythropoese. (Eigene Übersetzung; © Graphic Pulse)*

Während der Erythropoese eines adulten Organismus befinden sich die unterschiedlich weit differenzierten Vorläuferzellen in charakteristischen erythropoetischen Inseln. Diese zeichnen sich durch einen charakteristischen Aufbau aus: Zentral befindet sich ein Makrophage, der besonders bei dem in der menschlichen Physiologie einzigartigen Vorgang der Enukleation eine wichtige Rolle spielt. Um diesen herum gruppieren sich die erythropoetischen Vorläuferzellen ihren Stadien entsprechend, sodass unreifere Stadien zentral in Makrophagennähe, reifere Vorläufer jedoch peripher zu finden sind (vgl. *Abbildung 4*). Die Differenzierungsvorgänge werden durch zahlreiche Wachstumsfaktoren, von denen EPO, SCF und IGF-1 von besonderer Bedeutung sind, reguliert. Zeitgleich befinden sich auf engstem Raum andere Stammzellen, die ruhen und nicht differenzieren.

Diese parallel ablaufenden, scheinbar konträren Abläufe in unmittelbarer Nachbarschaft werden durch Knochenmarknischen ermöglicht, die physiologisch und funktionell getrennte Räume darstellen. Im Vergleich zu Luftsauerstoff liegt im Knochenmark ein Sauerstoffmangel unterschiedlicher Ausprägung vor, der die Mikroumgebung ebenfalls prägt. Die Ausprägung des Sauerstoffmangels hat hierbei unterschiedliche Einflüsse auf die Erythropoese.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von starker (1 % O_2) und milder (5 % O_2) Hypoxie im Vergleich zu 20 % Luftsauerstoff auf ein in-vitro Erythropoesemodell untersucht. In vorangegangenen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein modifiziertes Dreiphasenmodell nach Neildez-Nguyen et al. (2002) mit einem ebenfalls modifizierten Zweiphasenmodell nach Panzenböck et al. (1998) in Normoxie miteinander verglichen (Dorn et al., 2008). Mit humanen, CD34-positiven peripheren Blutstammzellen als Ausgangsmaterial konnte gezeigt werden, dass mit beiden Modellen terminal differenzierte, kernlose rote Blutzellen hergestellt werden können. Obgleich im Dreiphasenmodell höhere Proliferationsraten erzeugt werden konnten, wurde das Zweiphasenmodell – aufgrund seiner höheren Homogenität an erythroiden Zellen, seiner kürzeren Kulturdauer und den geringeren Zytokinzugaben – bevorzugt und fand auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung.

4.1. Proliferation und Vitalität

Bezüglich Proliferation und Vitalität konnte festgestellt werden, dass sich die kumulative Zellzahl und die Anteile vitaler Zellen in den drei Ansätzen unterschiedlich verhielten. Lediglich nach den ersten 96 Stunden war in allen drei Ansätzen keine signifikante Veränderung der eingebrachten Stammzellen zu verzeichnen. Insgesamt ließ sich in der Normoxie als Referenzreihe eine zufrieden stellende Proliferation um den Faktor 14 erreichen. In starker Hypoxie (1% O_2) proliferierten die Zellen lediglich um das 5-fache, in milder Hypoxie (5% O_2) hingegen um das 29-fache. Bezüglich der Vitalität verhielt es sich ähnlich: In Normoxie bestanden die Kulturen zu 80% aus vitalen Zellen, in starker Hypoxie waren es nur 70%, in milder Hypoxie jedoch 90%.

Diese Feststellungen erlauben zunächst die Aussage, dass eine in-vitro Erythropoese aus peripheren Blutstammzellen möglich ist und zu einer ausreichenden Proliferation führt. Dabei stellt 20 % Sauerstoff – wie er in normaler Atemluft und in gewöhnlichen Brutschränken vorherrscht – nicht die optimalen Kulturbedingung dar. Noch weniger geeignet ist die starke Hypoxie. Vielmehr bietet die milde Hypoxie die beste der hier untersuchten Kulturbedingungen. Bei letzterer war sowohl das Proliferationsverhalten als auch die Vitalität der Zellen am höchsten. Folglich regte der milde Sauerstoffmangel die Stamm- und Vorläuferzellen zur Proliferation an und bot ihnen von den drei untersuchten Ansätzen die besten Überlebensbedingungen.

In der Literatur werden ähnliche Beobachtungen bezüglich der Verminderung vitaler Zellen in den ersten Tagen der in-vitro Kultivierung beschrieben. Hermitte et al. (2006) untersuchten humane CD34-positive Nabelschnurblutstammzellen in einem serumfreien Kulturmedium bei 0,1% O_2, 3% O_2 und 20% O_2 bezüglich der Wirkung von Interleukin-3 (IL-3). In allen drei Ansätzen wurde unabhängig vom O_2-Gehalt nach 72 Stunden serumfreier, IL-3-haltiger Kultur die gleiche Zelltodrate (ca. 40%) beobachtet. Dies ist evtl. zusätzlich darauf zurückzuführen, dass allen Kulturansätzen (serumfrei) ein wichtiger Überlebensfaktor fehlte. Die Flüssigkultur unter nahezu anoxischen Bedingungen (0,1% O_2) hatte keine gesteigerte Apoptoserate zur Folge; die Stammzellen verharrten in der G0-Phase, die die Ruhephase der „Steady-State“ Hämatopoese darstellt, ohne sichtbare Beeinträchtigung der funktionellen Kapazität.

Auch bei der Untersuchung muriner Stammzellen wurden initiale Zellverluste beschrieben. Ivanovic et al. (2000) untersuchten murine Knochenmarkstammzellen, die sie in einem serumhaltigen Kulturmedium unter Zusatz von IL-3, IL-6, G-CSF und SCF fünf bis acht Tage lang in Hypoxie kultivierten. Obgleich – im Vergleich zur eigenen Arbeit – von Ivanovic at al. Zellen anderen Ursprungs in einem andersartigen Medium mit unterschiedlichen Zytokinen untersucht wurden, wurde

quantitativ ein vergleichbarer Rückgang vitaler Zellen (ca. 50%) nach fünf Tagen beschrieben. Genauso verhielt es sich in der Zeit nach dieser initialen Zellreduktion: Drei Tage später lag die Anzahl vitaler Zellen über der Anzahl der an Tag 1 eingesetzten Zellen. Als Erklärung dieses initialen Schwundes kann postuliert werden, dass sich einige Zellen durch den Wechsel von der natürlichen Mikroumgebung in die In-vitro Zellkultur nicht ausreichend adaptieren und so eine Selektion stattfindet. Dies gilt insbesondere für liniendeterminierte Vorläuferzellen der myeloischen Reihe, die unter den Bedingungen einer optimalen Erythropoese zugrunde gehen. Der in-vitro Erythropoesekultur lieg demzufolge eine Population besonders „widerstandsfähiger" bzw. unreifer CD34-positiver Zellen zu Grunde.

Cipolleschi et al. (1993) untersuchten das Wachstumsverhalten von murinen Knochenmarkstammzellen in sechstägiger in-vitro Kultur bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (1 – 18% O_2). Bei 3% O_2 entsprach die Proliferation derjenigen bei 20% O_2. Bei Sauerstoffkonzentrationen, die darunter lagen, wurde hingegen ein Zellverlust, bei solchen > 3% O_2 ein vermehrtes Wachstum gegenüber Luftsauerstoff festgestellt. In weiteren Versuchen der gleichen Gruppe (Ivanovic et al., 2000) wurde festgestellt, dass die Zellkultur bei 1% O_2 nach achttägiger Kulturzeit annähernd so viele Zellen enthielt, wie zu Beginn eingesetzt worden waren. In der Kontrollreihe bei Luftsauerstoff war die Ausgangszellzahl jedoch nach nur fünf Tagen bereits überschritten (*Tabelle 5*). Ebenso wurde berichtet, dass der Stammzellcharakter bei 20% O_2 früher verloren ging, während diejenigen Zellen, die bei ca. 1% O_2 (Ivanovic et al., 2002) kultiviert wurden, ihr Potential zur Koloniebildung behielten. Dazu ging in 1%-Hypoxie die Zellteilung CD34-positiver Zellen einher mit einer Zunahme der koloniebildenden Eigenschaften, aber die numerische Expansion der sich teilenden CD34-positiven Zellen wurde unterdrückt. Erklärt wurde dies damit, dass die bei den Zellteilungen entstehenden, weiter differenzierten Vorläuferzellen einen höheren O_2-Bedarf haben, so dass diese in der Hypoxiekultur vermehrt absterben. Aus diesen an murinen Zellen gewonnen Erkenntnissen wurde geschlossen, dass niedrige Sauerstoffkonzentrationen – wie sie im Knochenmark vorliegen – an der Regulation der Hämatopoese beteiligt sind, indem die Selbsterneuerung pluripotenter Stammzellen begünstigt wird, nicht jedoch die erythropoetische Differenzierung. Letztere wurde durch die starke Hypoxie eher behindert.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Aussagen, die auf Versuchen mit murinen Zellen beruhen, für Zellen humanen Ursprungs bestätigt werden. Bei 1% O_2 waren sowohl die Proliferation als auch die Vitalität der kultivierten Stamm- und erythroiden Vorläuferzellen gegenüber Luftsauerstoff vermindert, während die genannten Parameter bei 5% O_2 die Werte bei Luftsauerstoff übertrafen

(Tabelle 5). Eine Bestätigung der eigenen Proliferationsergebnisse findet sich bei Narayan et al. (2005), die ebenfalls mit Zellen menschlichen Ursprungs arbeiteten. Bei der Untersuchung humaner CD34-positiver Stammzellen aus alternativen Quellen – Nabelschnurblut, fetaler Leber und adultem Knochenmark – wurde in 5%-iger Hypoxie eine bessere Proliferation gegenüber 20% O_2 beschrieben. Der ausgeprägte Erhalt des koloniebildenden Stammzellcharakters bei 1% O_2 nach 8 Tagen (Ivanovic et al., 2000) konnte in der eigenen Arbeit zwar nicht mit gesteigerter Koloniebildung gezeigt werden. Nach 9 Tagen waren jedoch mehr Zellen vorhanden, die das stammzellcharakteristische Oberflächenantigen CD34 trugen (vgl. Kapitel 4.2).

Hypoxie	Proliferation	Quelle
1% O_2	↘	• *vorliegende Arbeit (Ribbat)* • Cipolleschi et al., 1993 • Cipolleschi et al., 2000 • Ivanovic et al., 2000 • Ivanovic et al., 2002
3% O_2	↔	• Ivanovic et al., 2004 • Cipolleschi et al., 1993
5% O_2	↗	• *vorliegende Arbeit (Ribbat)* • Narayan et al., 2005

***Tabelle 5**: Literaturübersicht zum Proliferationsverhalten von Stammzellen in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt. ↘: Abnahme. ↔: keine Veränderung. ↗: Zunahme.*

Mit humanen Stammzellen aus der Nabelschnur versuchten Ivanovic et al. (2004), diejenige Sauerstoffkonzentration zu finden, bei der die Stammzellen unter Beibehaltung ihres Stammzellcharakter optimal proliferieren. Humane CD34-positive Stammzellen aus Nabelschnurblut wurden in siebentägiger, serumfreier in-vitro Kultur unter Zusatz von SCF, Megakakaryozytenwachstums- und -entwicklungsfaktor (megacaryocyte growth and development factor, MGDF) und G-CSF kultiviert. Die Ergebnisse, die zunächst an murinen Zellen beobachtet worden waren, konnten damit für humane Zellen bestätigt werden: Bei 3% O_2 wurde die gleiche Expansionsrate der koloniebildenden Zellen festgestellt wie bei 20% O_2 (Tabelle 5), die Proliferation der CD34-positiven Zellen blieb davon unbeeinflusst.

Bevor die Eigenschaften unreifer erythropoetischer Stamm- und Vorläuferzellen anhand von Flüssigkulturen untersucht wurden, wurde auf semisolide Kulturmedien zurückgegriffen (vgl. Kapitel 1.5). Von Ishikawa und Ito (1988) konnte im semisoliden Kulturansatz bei 7% Sauerstoff ein Proliferationsanstieg der „koloniebildenden Zellen“ gegenüber Luftsauerstoff gezeigt werden. Mit Zellen aus humanem Knochenmarkaspirat wurde nach 21 Tagen eine höhere Kolonieanzahl erythro- und myelo-

poetischer Kolonien festgestellt. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Kolonien. Hierbei wurden alle Zellen nach Entnahme aus ihren jeweiligen hypoxischen Suspensionskulturen im semisoliden Zellkultursystem unter standardisierten Kulturbedingungen (also 20% O_2) weiterkultiviert. Es sollte die Frequenz der Koloniebildung in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad verglichen werden.

In der Literatur finden sich einige Arbeiten, in denen die Auswirkung der Hypoxie auf die primäre Koloniebildung untersucht wurde. Insbesondere zur Erythropoese wurden Unterschiede zwischen Hypoxie und Normoxie festgestellt. Bei 5% O_2 wurden eine größere Kolonieanzahl mit gesteigertem Koloniewachstum und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber EPO festgestellt (Rich und Kubanek, 1982; Koller et al., 1992; Weinberg et al., 1995).

4.2. Differenzierung

Unter den normoxischen Verhältnissen der Standardkultur zur Gewinnung erythropoetischer Zellen zeigte sich ein dem Reifungsgrad entsprechend charakteristisches Expressionsprofil der Oberflächenantigene.

Das Glykoprotein CD34 charakterisiert hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, die entweder noch pluripotent oder schon in ihrer Entwicklung bereits auf eine bestimmte Zelllinie, wie z. B. die erythropoetische Reihe, beschränkt sind. Im Laufe der liniendeterminierten Differenzierung verlieren die Zellen das CD34-Antigen zunehmend, so dass terminal differenzierte Erythrozyten ohne CD34 auf ihrer Oberfläche in die Blutzirkulation eintreten. Es wird vermutet, dass CD34 Adhäsionseigenschaften hat und an der Retention der unreifen Stammzellen im Knochenmark beteiligt ist. Auch in der vorliegenden Arbeit fand ein vollständiger Verlust des Stammzellmerkmals CD34 während der in-vitro Erythropoese statt (vgl. *Abbildung 15*).

GPA eignet sich gut zur Analyse erythropoetischer Vorläuferzellen. Dieses transmembranöse Oberflächenprotein stellt eine antigene Eigenschaft des MN-Blutgruppensystems dar und ist spezifisch für die rote Reihe. Mit fortschreitender Ausreifung nimmt die GPA-Expression zu, bis nahezu alle Zellen positiv für GPA sind, wie in der eigenen Arbeit gezeigt werden konnte (vgl. *Abbildung 16*). Der GPA-Marker eignet sich somit gut für die Bestimmung der Reinheit der erythropoetischen Kultur.

Die jeweilige Expression von CD36 und CD71 nahm im Verlauf – einer glockenartigen Kurvenform entsprechend – erst zu und dann wieder ab (*Abbildung 17*, *Abbildung 18*). Das Mitglied der Scavenger-Rezeptor-Familie CD36 (GP IV) ist in Bezug auf die Erythropoese ein früher Marker für heranreifenden Vorläuferzellen der Erythropoese. Auf anderen Zellen spielen Scavenger-Rezeptoren z. B. eine Rolle beider Entstehung von Atherosklerose. Der Transferrinrezeptor CD71 sorgt für die zelluläre Aufnahme von Eisen und wird von eisenverwertenden, zellzyklusaktiven Zellen exprimiert. Während der Erythropoese ist CD71 auf Vorläuferzellen, nicht jedoch auf Zellen, die das Stadium des Retikulozyten passiert haben, vorhanden. Es ist ein Marker für proliferierende, DNA synthetisierende Zellen.

In milder Hypoxie waren die Anteile der CD36-positiven und der CD71-positiven Zellen an den Tagen 9 und 12 gesteigert; die Expression von CD34 und GPA entsprach der jeweiligen bei Normoxie. In starker Hypoxie lag eine verzögerte Reduktion der CD34-Expression vor; die restlichen Oberflächenmarker (CD36, CD71, GPA) unterschieden sich in ihrer Expression nicht von der normoxischen Kontrolle. *Tabelle 6* fasst den Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturdaten bezüglich Oberflächenantigenen zusammen.

Nach der Aufreinigung lag ein sehr hoher Anteil an CD34-positiven Zellen vor (98%). Lichtmikroskopisch konnte dieser durchflusszytometrischen Beobachtung ein ebenso hoher Anteil hämatopoetischer Stammzellen zugeordnet werden. Dieser Wert entsprach der Reinheit der Zielzellen und bestätigte die Qualität der immunmagnetischen Aufreinigung. Nach 16 Tagen in-vitro Kultur waren CD34-Oberflächenantigene in allen drei Ansätzen kaum noch nachweisbar, was einem Verlust von Zellen mit Stammzellcharakter entspricht.

Kie et al. (2003) untersuchten Änderungen der Ultrastruktur während der Erythropoese elektronenmikroskopisch. Vergleichend dazu kamen durchflusszytometrische Analysen zur phänotypischen Charakterisierung zum Einsatz. Dazu wurde eine in-vitro Erythropoese mit EPO, FLT-3-Ligand, SCF, G-CSF, IL-3 und IL-11 unter Normoxie durchgeführt. So konnte ebenfalls ein CD34-Verlust während erythroiden Differenzierung, die in ihrem Verlauf elektronenmikroskopisch dokumentiert wurde, festgestellt werden.

In milder Hypoxie konnte in der eigenen Arbeit kein signifikanter Unterschied der CD34-positiven Zellen zu 20% O_2 festgestellt werden. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzierten entlang der roten Reihe zu kernlosen, CD34-negativen roten Zellen.

In starker Hypoxie lagen an Tag 9 signifikant mehr CD34-positive Zellen als in Normoxie vor (*Abbildung 15b*). Mikroskopisch stellte sich eine dahingehende Veränderung sowohl in milder als auch in starker Hypoxie in Form eines erhöhten Anteils von Stammzellen an Tag 9 dar. Ferner stand diese Beobachtung des verzögerten Verlustes des Stammmerkmals bei 1% O_2 mit der niedrigeren Proliferation im Einklang, da sich teilende Zellen im Rahmen der weiteren Differenzierung ihr CD34-Antigen verlieren. Die Proliferationsunterschiede fanden sich auch in der Transferrinrezeptorexpression (CD71) wieder, die den zellulären Eisenumsatz anzeigt und in der Erythropoese mit der Proliferation korreliert. Entsprechend der gesteigerten Proliferation in milder Hypoxie (*Abbildung 9a*) wurde CD71 dort vermehrt exprimiert (*Abbildung 18a*), in starker Hypoxie bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zur normoxischen Kontrolle (*Abbildung 18b*).

Ein indirekter Hinweis für die länger bestehende Unreifheit bei starker Hypoxie ergab sich aus dem Expressionsmuster des Oberflächenantigens CD36. Als früher Marker für CFU-E-bildende Zellen und heranreifende erythroide Vorläuferzellen (Cipolleschi et al., 1997) wurde er in starker Hypoxie ebenso stark exprimiert wie in Normoxie, während in milder Hypoxie eine weniger stark ausgeprägte Expression auffiel (Abbildung 17). Diese Konstellation spricht für ein kürzeres Vorhandensein koloniebildender Zellen in milder Hypoxie, während die CD36-Expression in starker Hypoxie der bei Normoxie entspricht und somit höher liegt.

Cipolleschi et al. (1997) beschrieben bei ihren Untersuchungen von humanen CD34-positiven Nabelschnurblutstammzellen ebenfalls, dass der prozentuale Anteil CD34-positiver Zellen nach 7 Tagen bei 1%iger Hypoxie signifikant höher sei (n=3). Die Schlussfolgerungen der genannten Arbeitsgruppe, dass starke Hypoxie die Festlegung („commitment“) der Stammzellen zur erythroiden Differenzierung hemmt und ihr unreifes Profil erhält, passen zu den eigenen Ergebnissen: Das Stammzellmerkmal CD34 blieb in starker Hypoxie länger erhalten, und die Stammzellen behielten sich eine linienspezifische Differenzierung vor. Analog zu den eigenen Ergebnissen gibt es Hinweise, dass CD34 auf hämatopoetischen Stammzellen unter stark hypoxischen Bedingungen (1% O_2) länger und stärker exprimiert wird. De La Grange et al. (2006) kamen bei ihren Untersuchungen der mRNA-Prozessierung und Expression von des CD34-Antigens zu diesen Ergebnissen und folgerten ebenso, dass eine starke Hypoxie dem besseren Erhalt von Stammzellen dient.

In unseren Experimenten wurden in milder Hypoxie größere Proliferationsraten mit einer doppelt so hohen kumulativen Zellzahl am Ende des Beobachtungszeitraumes bei gleichguter terminaler Differenzierung festgestellt.

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei der Granulopoese beschrieben. Der hetereogene Aufbau des Knochenmarks aus ausgedehnten Sinusnetzwerken und metabolisch hochaktiven Progenitorzellen, die das extravaskuläre Gewebe dazwischen ausfüllen, gab Hevehan et al. (2000) Grund zur Annahme, dass neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren auch ein pH- und ein Sauerstoffgradient bei der Differenzierung hämatopoetischer Zellen – hier in Bezug auf die Granulopoese – mitwirken. Sie untersuchten eine in-vitro Granulopoese mit den Zytokinen SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF bezüglich der Auswirkungen von unterschiedlichen pH-Werte und Sauerstoffmangel. Eine milde Hypoxie (5% O_2) wirkte auch auf die Granulopoese wachstumsstimulierend. Außerdem wurde die Proliferation und Differenzierung bei niedrigen pH-Werten beschleunigt (pH 7,07 – 7,21).

In den drei für diese Arbeit untersuchten Ansätzen stieg der Anteil des Erythropoese spezifischen Differenzierungsmarkers GPA im Verlauf der Zellkultur an. GPA war hierbei als Marker der späten, erythroiden Differenzierung nach 16 Tagen auf nahezu allen Zellen vorhanden war. Es gelang sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie, eine homogene Differenzierung zu terminal ausdifferenzierten Erythrozyten zu erreichen. Dabei konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei untersuchten Sauerstoffkonzentrationen festgestellt werden.

Die vorliegenden Resultate, dass aus Stammzellen hämoglobinhaltige, kernlose rote Blutkörperchen hergestellt werden konnten, basieren auf Flüssigkulturen unter Zusatz von unter anderem EPO, SCF

und IGF-1. Frühere Ergebnisse anderer Gruppen mit anderer Methodik finden durch uns Bestätigung.

Okumura et al. (1992) untersuchten die Expressionsfolge von Oberflächenantigenen während der Erythropoese. Dazu verwendeten sie humane Stammzellen aus Nabelschnurblut, die sie in einer semisoliden Kultur auf Methylzellulosebasis kultivierten. Zur Analyse kamen immunhistochemische Färbungen der Tochtergenerationen zur Anwendung. Dabei zeigte sich eine GPA-Expression, die – analog zur eigenen Arbeit – von 0% GPA-positiver Zellen zu Beginn der Kultur auf 100% GPA-positive Zellen zum Ende der Kultur anstieg. Mit dem gleichen Analyseverfahren wie in der vorliegenden Arbeit stellten Narayan et al. (2005) einen GPA-Anstieg fest. Bei ihren Untersuchungen humaner CD34-positiver Stammzellen aus alternativen Quellen konnte gezeigt werden, dass sowohl in Normoxie als auch bei 5% O_2 die Expression von GPA mit fortschreitender Differenzierung zunimmt. Außerdem wurde berichtet, dass die Differenzierung gegenüber Luftsauerstoff bei 5% O_2 um durchschnittlich 3 Tage beschleunigt war.

Von der vorliegenden Untersuchung abweichende Beobachtungen bezüglich GPA-Expression in Normoxie ergaben sich in den durchflusszytometrischen Untersuchungen humaner, CD34-positiver Nabelschnurblutzellen von Kie et al. (2003), die den Verlauf der Erythropoese elektronenmikroskopisch und durchflusszytometrisch dokumentierten. In der genannten Untersuchung wurde zwar auch ein Anstieg der GPA-Expression mit einem Plateau an den Tagen 9 bis 16 festgestellt, jedoch lag dieses Plateau bei niedrigeren Werten (um 50% GPA-positive Zellen) und fiel zudem ab Tag 17 wieder ab.

Der ebenfalls untersuchte Marker für erythropoetische Differenzierung CD36 hingegen nahm nach einer maximalen Expression an Tag 9 wieder ab. Als Marker für CFU-Es und heranreifende erythroide Vorläuferzellen (Cipolleschi et al. 1997) spiegelt der CD36-Verlauf den Reifungsprozess wieder. In milder Hypoxie lagen an den Tagen 9 und 13 mehr CD36-positive Zellen vor (*Abbildung 17*). Dieser signifikante Unterschied spricht für einen höheren Anteil unreifer Vorläuferzellen in der zweiten Phase der milden Hypoxie. Die durchflusszytometrischen Daten wurden durch die morphologische Beurteilung bestätigt. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass an den genannten Tagen signifikant mehr unreife Zellen vorlagen (Stammzellen, bzw. polychromatische Erythroblasten).

Die immunhistochemischen Färbungen von Methylzellulosekulturen (Okumura et al., 1992) zeigten ebenfalls einen vorübergehenden Anstieg von CD36, der jedoch quantitativ von den eigenen Beobachtungen abweicht: Auf initial 0% folgte ein Anstieg auf 90-100% an den Tagen 4 bis 9 und darauf ein Abfall bis 55% an Tag 14 (Ende des Beobachtungszeitraumes). Als ursächlich für diese quantitativen Unterschiede können die verschiedenen Kulturmedien (Flüssig- vs. semisolide Kultur)

und Untersuchungsmethoden (Durchflusszytometrie vs. Immunhistochemie) angesehen werden. Dennoch ist der qualitative Verlauf der CD36-Expression ähnlich. Als Marker für unreife erythroide Vorläuferzellen wird CD36 sowohl von Stammzellen als auch von reifen Blutzellen nicht maßgeblich exprimiert, während die intermediär vorhandenen Reifungsstadien zu einem hohen Anteil CD36 exprimieren.

Die hohe Expression des Transferrinrezeptors CD71 an den Tagen 5, 9 und 13 deutet auf eine hohe Proliferationsrate an diesen Tagen hin, die verhältnismäßig geringe Expression am ersten Tag (Stammzellpool) sowie am letzten Tag (hauptsächlich Normoblasten und Retikulozyten) dagegen deutete auf niedrigere Proliferationsraten hin. Diese Beobachtung deckt sich mit der Anzahl und dem Differenzierungsgrad der Zellen: Die Stammzellen vermehrten sich in den ersten 96 Stunden nicht (Zellzahl blieb konstant), und in den letzten 96 Stunden lagen überwiegend späte erythroide Zellen vor, die die Fähigkeit zur Zellteilung verloren hatten. In Zusammenschau mit der lichtmikroskopischen Auswertung ergab sich, dass die Abnahme von CD71 in der zweiten Phase mit der Zunahme der kernlosen roten Zellen einherging. Retikulozyten verlieren das CD71-Antigen und andere Anteile ihrer Plasmamembran (Okumura et al., 1992).

In milder Hypoxie lagen an den Tagen 9 und 13 signifikant mehr CD71-positive Zellen vor als in Normoxie (*Abbildung 18*). Dieser Unterschied an CD71-positiven Zellen weist auf eine höhere Proliferation bei milder Hypoxie hin. Auch die höhere Zellzahl spiegelt dies wider. Nach Ende der Flüssigkultur war in milder Hypoxie – einer höheren Zellteilungsrate entsprechend – eine signifikant höhere Gesamtzellzahl produziert worden.

Ähnliche Daten zur Normoxie lieferten Okumura et al. (1992) und Kie et al. (2003), die immunhistochemisch an Zellen einer semisoliden Kultur bzw. durchflusszytometrisch an einer Flüssigzellkultur ebenfalls eine vorübergehende CD71-Expression zeigten. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der milden Hypoxie finden sich bei Narayan et al. (2005), die ebenfalls CD34-positive humane Stammzellen – allerdings aus fetalem Lebergewebe, Nabelschnurblut und adultem Knochenmark – in einer Flüssigkultur bei 5% O_2 untersuchten. Der Anteil CD71-positiver Zellen war an Tag 6 bei 5% O_2 etwa doppelt so groß wie in Normoxie. Interessanterweise lag dieser Wert an Tag 16 in Hypoxie unter dem als in Normoxie, was durch die um etwa drei Tage beschleunigte Reifung erklärt wurde: Die frühere terminale Differenzierung bei 5% O_2 ging mit einem Verlust der Fähigkeit zur Proliferation einher.

Tabelle 6 fasst den Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturdaten bezüglich Oberflächenantigenen zusammen.

Forschungsgruppe	CD34	GPA	CD36	CD71	Beobachtungs-zeitraum
vorliegende Arbeit	↘	↗	↷	↷	16 Tage
Maggakis-Kelemen et al. (1993)	↘	↘		↘	8 Tage
Okumura et al. (1992)		↗	↷	↷	14 Tage
Narayan et al. (2005)	↘	↗		↷	15 Tage
Kie et al. (2003)	↘	↷		↷	19 Tage

***Tabelle 6**: Literaturübersicht zur Expression von Oberflächenantigenen während der Erythropoese. ↗: Zunahme. ↘: Abnahme. ↷: erst Zu- dann Abnahme. Weitere Erläuterungen s. Text.*

Die starke Hypoxie hat zwar einen negativen Einfluss auf die Zellzahl, jedoch nicht auf das Differenzierungspotential der hämatopoetischen Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stammzellen auch bei 1% Sauerstoff zu kernlosen roten Blutkörperchen ausreifen, wenn auch in geringerer Anzahl. Dies ergänzt eine Studie aus dem Jahr 2000, in der Stammzellen, die nach siebentägiger hypoxischer Kultur (1% O_2) in eine Normoxie überführt wurden, nachfolgend eine optimale Proliferationskinetik erreichten (Cipolleschi et al., 2000).

Unter milder Hypoxie lagen im Vergleich zur Normoxie mehr CD34-positive Zellen vor, und obgleich die Weiterentwicklung verzögert war, waren am Ende der Flüssigkultur stets große Anteile kernloser Zellen festzustellen. Um CD34-positive Stammzellen längerfristig in einem Status der Ruhe ohne Differenzierung zu „konservieren", ist eine noch stärkere Hypoxie von 0,1% O_2 Voraussetzung. Dabei ruhen die Stammzellen in der G0-Phase ohne ihre funktionelle Kapazität einzubüßen (Hermitte et al., 2006).

Der Anstieg der Expression von CD36, CD71 und GPA fand im von Scicchitano et al. untersuchten Modell in etwa zeitgleich statt (Scicchitano et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit war der Anstieg von GPA gegenüber dem von CD71 und CD36 um 96 Stunden verzögert. Ergänzend kann hinzugefügt werden, dass sich die maximale Expressionsrate von CD71 (an Tag 5) und CD36 (an Tag 9) unterscheiden, und dass GPA ab Tag 13 zu nahezu 100% exprimiert wird. Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit lassen sich nutzen, um den Entwicklungsstand erythroider Vorläuferzellen beurteilen zu können. Anhand der exprimierten Oberflächenmarker und ihres Koexpressionsmusters lässt sich eine Kategorisierung analog zu morphologischen Kriterien erreichen (Abbildung 22).

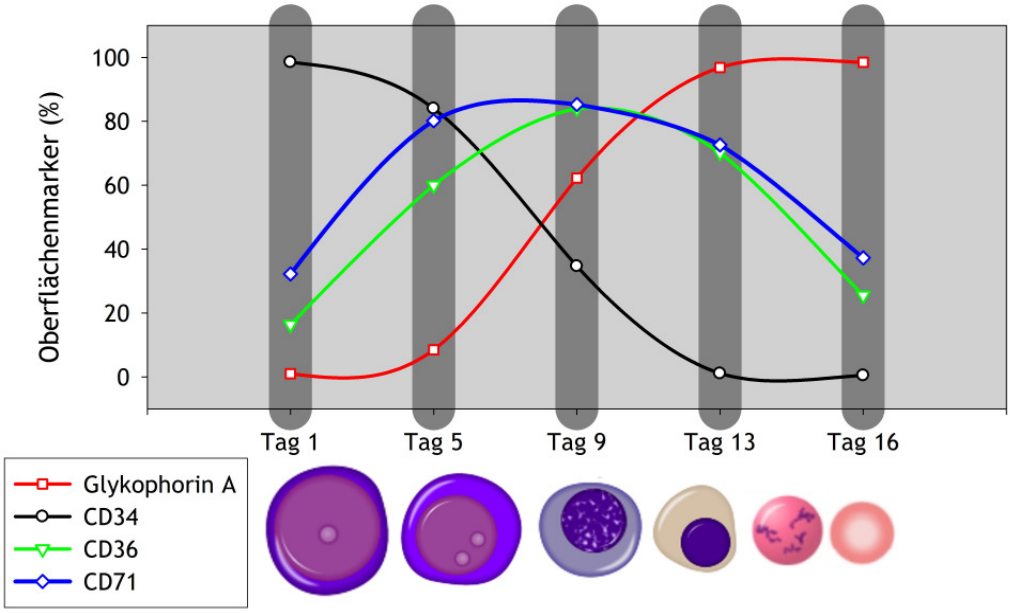


Abbildung 22: *Expressionsverlauf der einzelnen Oberflächenmarker*
An jedem der Untersuchungstage wiesen die Zellen eine charakteristische Kombination der untersuchten Oberflächenmarker auf. Die schematisch angedeuteten Entwicklungsstadien zeigen den ungefähren Entwicklungsstatus an den jeweiligen Tagen (Legende hierzu siehe Abbildung 2).

4.3. Knochenmarknische und Sauerstoffmangel

Die Erythropoese findet in den Knochenmarknischen langer Röhrenknochen statt, indem sich erythroblastische Inseln bilden. Zentrum dieser Inseln sind Makrophagen, um die sich erythroide Vorläuferzellen ihrem Reifungsgrad nach anordnen (Abbildung 4). Dieser Dissertationsschrift liegt die Hypothese zugrunde, dass der Prozess der Erythropoese im humanen Knochenmark einem O_2-Gradienten folgt. Hierbei liegen ruhende pluripotente Stammzellen in Regionen des Knochenmarkstromas mit stark hypoxischen bis anoxischen Bedingungen, während erythroide Vorläuferzellen sich in Regionen befinden, in denen der Sauerstoffmangel nicht ganz so stark ausgeprägt ist. Durch seine unterschiedlich starke Ausprägung ist dieser O_2-Gradient an der Funktionalität der Nischen beteiligt und stellt eine physiologische Komponente der unmittelbaren Umgebung der Stammzellen dar (sog. „Mikroumgebung"), die den Stammzellerhalt, die Proliferation und die Differenzierung reguliert (Cipolleschi 2000, Ivanovic 2000). Auch in anderen Geweben konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffmangel im Sinne eines Gradienten unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Im murinen Mesenteriumgewebe nimmt der Sauerstoffpartialdruck in einem Abstand von 30 µm von einem Blutgefäß um etwa 16 mmHg ab, in größeren Abständen sogar noch mehr (Yaegashi et al., 1996). Dementsprechend ist anzunehmen, dass es sich bei den Sinusgefäßen des Knochenmarks ähnlich verhält. Der Sauerstoffgehalt nimmt mit zunehmendem Abstand vom Sinus ab.

Die stark hypoxischen Knochenmarkabschnitte sind besonders für die langfristige „Deponierung" pluripotenter Stammzellen geeignet. Sie sind gut an eine sauerstoffarme Umgebung adaptiert (Danet et al., 2003). Der längere Erhalt des Stammzellcharakters konnte auch mit den eigenen Ergebnissen gezeigt werden: Zusammen mit anderen biologisch wirksamen Molekülen ist eine starke Hypoxie eine Schlüsseleigenschaft für den Erhalt und die Selbsterneuerung undifferenzierter Stammzellen (Cipolleschi et al., 1993 und 2000). Chow et al. (2001) nehmen an, dass die beinahe anoxische Mikroumgebung der Stammzellen dazu dient, membranschädigende Sauerstoffradikale von den lebenswichtigen und wohlmöglich in der Anzahl begrenzten pluripotenten Stammzellen (sog. „Stammzellpool") fernzuhalten.

Im murinen Knochenmark konnte gezeigt werden, dass sich Vorläuferzellen nach ihrem Differenzierungsstadium anordnen: Im perivaskulären Spalt der Sinus befinden sich reife Retikulo- und Erythrozyten. Daneben liegen die Makrophagen der erythroblastischen Inseln mit Vorläuferzellen ebenfalls nahe der Sinus (Notsu et al., 2007). Nach den Erkenntnissen von Ivanovic et al. (2004) kann hier ein

O_2-Gehalt von ca. 3% angenommen werden. Die unreifen pluripotenten Stammzellen sind am sinusfernsten angesiedelt, wo weniger Sauerstoff vorliegt (Lord et al. 1992).

Auch Stamm- und Progenitorzellen des humanen Knochenmarks sind entlang eines Sauerstoffgradienten angeordnet, wie bereits Danet et al. (2003) vermuteten. Sie setzten sehr unreife Lin-CD34+CD38- Stammzellen, die von gesunden Probanden mittels Knochenmarkaspiration gewonnen wurden, ein, um diese während einer viertägigen Flüssigkultur bei 1,5% O_2 und 20% O_2 zu untersuchen. Auf diese Stammzellquelle wurde zurückgegriffen, weil Knochenmarkstammzellen in-vivo der physiologischen hypoxischen Mikroumgebung ausgesetzt sind und somit als verlässlicheres Modell gegenüber Stammzellen anderer Herkunft – z. B. peripheres Blut, Nabelschnur – angesehen wurden. Nach viertägiger Kultur wurde eine signifikante Zunahme der unreifen Stammzellen gegenüber der zu Beginn eingesetzten Zellzahl und im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe beobachtet. Auch das Vorhandensein von HIF-1α wurde untersucht, und HIF-1α war, wie zuvor von Heinike et al. (2002) beschrieben, nur in Hypoxie nachweisbar, in Normoxie hingegen nicht. Der kontinuierlich synthetisierte HIF-1α wird unter normoxischen Bedingungen sofort abgebaut, was unter Hypoxie unterbleibt, so dass er in den Zellkern wandern und seine Zielgene aktivieren kann.

Diese Beobachtungen, werden durch das sog. „Modifizierte Krogh'sche Modell" mathematisch untermauert. Dem Krogh'schen Modell liegt ein zylindrisches Gewebsstück mit einer im Zentrum verlaufenden Kapillare zugrunde, von der aus der Sauerstoff in die Peripherie diffundiert (Krogh, 1919). Es bildete die Grundlage für August Kroghs Forschungen zum Blut- und Sauerstoffaustausch der Muskulatur, die durch den Nobelpreis für Medizin 1920 für die Entdeckung des kapillarmotorischen Regulationsmechanismus des Muskels gewürdigt wurde. Dieses Rechenmodell wurde von Chow et al. (2001) auf das Knochenmark übertragen und modifiziert. Basierend auf biophysikalischen Daten hämatopoetischer Stammzellen und auf die Knochenmarkphysiologie wurde ein modellhafter Gewebezylinder entwickelt, der zunächst aus granulopoetischen Vorläuferzellen bestand und in einem zweiten Schritt um erythropoetische Inseln ergänzt wurde. Durch die darauf basierenden Berechnungen und Simulationen ließen sich zu den beteiligten Zellen Aussagen machen, die trotz des Modellcharakters den Beobachtungen der Realität nahekommen. So befinden sich die meisten erythropoetischen Vorläuferzellen in Hypoxie und sind umso weiter von den Sinus entfernt, je unreifer sie sind. Die Sauerstoffverteilung der erythroblastischen Insel – ausgehend von einem zentralen Makrophagen, um den sich eine innere Schicht erythroider Vorläuferzellen und eine äußere Schicht reifer Erythrozyten gruppieren – wurde ebenfalls berechnet. Es wurde ein Modell der erythropoetischen Insel konstruiert, in dem der zentrale Makrophage dem niedrigsten und die peripheren, reifen Erythrozyten einem höheren Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt sind (*Abbildung 23*). Ferner wurde

berechnet, dass der Sauerstoffbedarf der am weitesten peripher gelegenen Zellen die Sauerstoffverteilung mehr beeinflusst, als der Verbrauch der sinusnahen Zellen (Chow et al., 2001 a, b). Der minimale Sauerstoffbedarf der Stammzellen scheint also von größerer Bedeutung für die Sauerstoffverteilung als der relativ hohe Verbrauch der differenzierten Zellen.

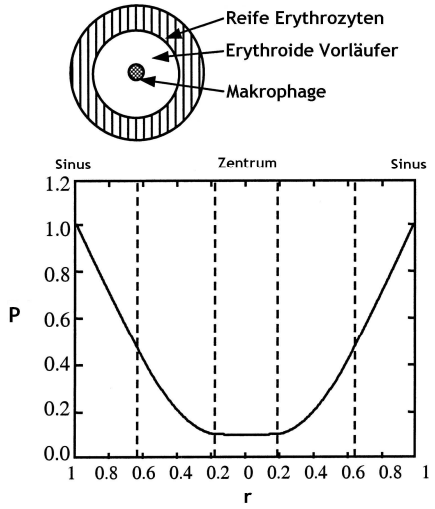


***Abbildung 23**: Sauerstoff der eythropoetischen Insel nach dem modifizierten Krogh'schen Modell. P = O_2-Partialdruck, r = Radius (Chow et al. II, 2001; eigene Übersetzung).*

Die Arbeitsgruppe um Cipolleschi und Ivanovic berichteten bereits, dass in Regionen mit verschieden starken Sauerstoffmangelzuständen unterschiedliche Reifungsprozesse stattfinden, so dass der O_2-Gradient ein wichtiger funktioneller „Bestandteil" (Regelgröße) der Knochenmarknischen darstellt (Cipolleschi et al., 1993; Ivanovic et al., 2004).

Zusammenfassend ergibt sich, dass starker Sauerstoffmangel dem Überleben primitiver pluripotenter Stammzellen dient, während mildere Hypoxie einen vorteilhaften Einfluss auf die Differenzierung liniendeterminierter Zellen hat. Für die humane Erythropoese postulieren wir folgendes Modell:

In sauerstoffärmsten bis nahezu anoxischen Gebieten der Knochenmarknischen ruhen und selbsterneuern sich die Stammzellen. Bei einem minimalen Anstieg des Sauerstoffgehaltes differenziert die Stammzelle in eine liniendeterminierte Zelle („commitment") und beginnt weiter zu differenzieren. Sie wandert entlang des Sauerstoffgradienten und proliferiert zunehmend mit steigendem Sauerstoffgehalt. Auch die erythroide Differenzierung in der erythroblastischen Insel folgt dem O_2-Gradienten.

Übertragen auf die erythroblastischen Inseln (vgl. *Abbildung 4*) würde dies bedeuten, dass im Zentrum, wo sich die liniendeterminierten erythropoetischen Vorläuferzellen befinden, die kleinstmögliche Sauerstoffkonzentration herrscht. Mit zunehmender Entfernung in der Peripherie der erythroblastischen Inseln steigt der Sauerstoffgehalt, und die erythroiden Zellen differenzieren zu-

nehmend, bis sie den Status des Normoblasten erreicht haben. In dieser relativ sauerstoffreichen Umgebung nahe der Sinusoide stoßen sie ihre Zellkerne aus, die von den Makrophagen entsorgt werden. Als Retikulozyten verlassen sie nun das Knochenmark und treten durch transendotheliale Migration ins Blutsystem ein.

In *Abbildung 24* ist dieses Modell schematisch dargestellt:

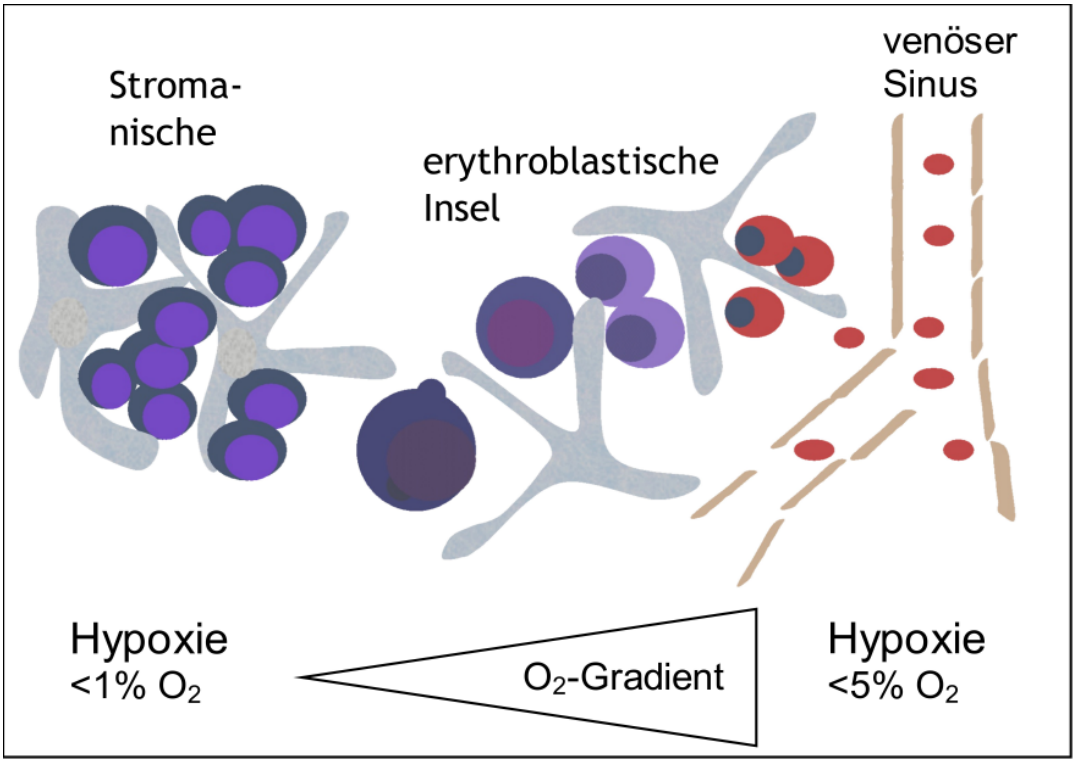


Abbildung 24: *Schematische Darstellung des Sauerstoffgradienten im Knochenmark.*
Die Stammzellen ruhen in starker Hypoxie in sinusfernen Stromanischen, und reifen entlang des Sauerstoffgradienten. Während dieser Differenzierung gruppieren sich die erythropoetischen Vorläuferzellen in etwas sauerstoffreicheren erythroblastischn Inseln um Makrophagen herum, die besonders für die Enukleation eine wichtige Rolle spielen. Sinusnah herrscht eine mildere Hypoxie. Kernlose Retikulozyten treten über die venösen Sinusoide in die Blutbahn ein.

4.4. Ausblick

4.4.1. Mögliche Folgeversuche

Weinberg et al. formulierten in ihrem 1995 erschienenen Artikel: „Air is potentially toxic, and … the positive components of low oxygen need to be understood…".

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die milde Hypoxie (5% O_2) gegenüber Luftsauerstoff positive Auswirkungen auf die in-vitro Erythropoese bezüglich Proliferation und Differenzierung hat. Auch bei in-vitro Kulturen anderer Zellreihen wurden ähnliche Effekte aufgezeigt. Roy et al. etablierten 2003 eine in-vitro Kultur, in die sie Fibroblasten erwachsener Mäuseventrikel einbrachten und diese bei 3%, 5% und 21% O_2 kultivierten. Dabei zeigten sie, dass bei Luftsauerstoff – den sie in Bezug zum physiologisch im Gewebe vorherrschenden Sauerstoffmangel als „Hyperoxie" bezeichneten – ein reversibler Wachstumsarrest eintrat. Folglich wurde postuliert, dass der Wechsel von physiologischer Hypoxie in-vivo hinein in die „Hyperoxie" in-vitro keinesfalls unbemerkt an den Zellen vorübergeht. Die dadurch ausgelöste Diskussion über die Optimierung von in-vitro Zellkulturen durch Sauerstoffkontrolle wurde auch von der Tagespresse wahrgenommen. Unter der Überschrift „Oft zuviel Sauerstoff in Zellkulturen" wurde auch auf forschungspolitische Aspekte hingewiesen: „Angesichts der immensen Forschungsgelder, die in Untersuchungen an Zellkulturen fließen, und der oft weitreichenden Bedeutung der Ereignisse sollte … künftig besser auf den Einfluss des Sauerstoffs geachtet werden." (Frankfurter Allgemeine Zeitung, 29.01.2003).

Cipolleschi et al. untersuchten bereits 2002 murine Knochenmarkstammzellen in Luftsauerstoff und 1%iger Sauerstoffatmosphäre mit einem Wechsel der Sauerstoffumgebung während der Kultur. Dieser Wechsel sollte dem physiologisch postulierten O_2-Gradienten nahekommen. Dabei stellte sich heraus, dass diejenigen Zellen am besten proliferierten, die an Tag 7 aus der hypoxischen in die normoxische Umgebung umgesiedelt wurden. Basierend auf unseren eigenen Ergebnissen könnte in künftigen Flüssigkulturexperimenten untersucht werden, ob sich eine höhere Proliferationsrate erzielen ließe, wenn in Hypoxie gewachsene Zellen nach einiger Zeit in einer Atmosphäre mit höherem Sauerstoffgehalt weiterkultiviert würden, oder der Sauerstoffgehalt im Brutschrank stufenweise zunehmen würde. Zudem ließen sich durch eine solche stufenweise Steigerung des O_2-Gehaltes präzisere Aussagen zur Reifung der erythropoetischen Zellen entlang des Sauerstoffgradienten treffen.

Neben den Erkenntnissen zu Änderungen des Sauerstoffgehaltes gibt es auch Hinweise darauf, dass Änderungen der zelluläre Zusammensetzung von Flüssigkulturen der humanen Erythropoese diese positiv beeinflussen können. Um noch physiologischere Konditionen der in-vitro Erythropoese zu

ermöglichen, wäre der Einsatz von Makrophagen als akzessorische Zellen in Flüssigkulturen der humanen Erythropoese denkbar. Rich et al. (1986) untersuchten vor mehr als zwanzig Jahren den Einfluss von Hypoxie (2%, 3,5% und 5% O_2) auf eine in-vitro Erythropoese auf Methylzellulosebasis, in die sie Knochenmarkstammzellen adulter Mäuse einbrachten. Damals beschrieben sie eine hypoxieabhängige „EPO-Produktion" durch Makrophagen in Kokultur mit erythropoetischen Vorläuferzellen. Sie postulierten, dass Makrophagen die Fähigkeit zur Regulation von Wachstumsfaktoren hätten: Makrophagen besitzen einen „Sauerstoffsensor", und abhängig vom O_2-Gehalt sind sie in der Lage, EPO und andere Wachstumsfaktoren auszuschütten. In jüngeren Untersuchungen ergaben sich zwar Hinweise auf Mitwirkung von Makrophagen bei der EPO-Produktion (Baciu et al., 2000), eine Stellungnahme, ob Makrophagen den Sauerstoffgehalt bestimmen können, ist nach aktueller Datenlage jedoch nicht möglich. Wie Jacobson et al. 1957 erstmals nachweisen konnten, ist die Niere des adulten Organismus Hauptproduktionsstätte von EPO. Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass EPO in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck im Gewebe produziert wird, welcher wiederum von Parametern wie der Hämoglobinkonzentration, dem arteriellem Sauerstoffparialdruck und der O_2-Affinität des Hämoglobin abhängt (Jelkmann, 2007). Legt man die Studie von Rich et al. (1986) zugrunde, könnte postuliert werden, dass den sauerstoffsensiblen Makrophagen die Feinabstimmung der EPO-Versorgung in der Mikroumgebung des Knochenmarks obliegt. Dabei wäre nicht der O_2-Gehalt des peripheren Blutes, der beispielsweise durch Höhenaufenthalte reduziert wird, sondern der O_2-Gehalt in der unmittelbaren Mikroumgebung ausschlaggebend. Die Kokultur von Stamm- und erythropoetischen Vorläuferzellen mit Makrophagen muss heutzutage kritisch gesehen werden, da rekombinantes EPO zur Verfügung steht und eine Ausreifung ohne Makrophagen in der Flüssigkultur erfolgt.

Hevehan et al. (2000) untersuchten die in-vitro Granulopoese aus humanen CD34-positiven Stammzellen. Da die Granulopoese im Knochenmark in Gebieten mit niedrigem Sauerstoffgehalt und niedrigem pH-Wert stattfindet, richteten sie ihr Hauptaugenmerk auf diese beiden Parameter. Sie erzielten dabei die besten Proliferationsergebnisse bei vergleichsweise saurem Medium (pH=7 bis 7,2) in 5% Hypoxie. Ein niedriger pH-Wert beschleunigte ferner die liniendeterminierte Differenzierung. Es wurde geschlussfolgert, dass der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt wichtige Rollen bei der Regulation der Hämatopoese spielten. Vergleichbare Untersuchungen in Bezug auf den pH-Wert gibt es zur Erythropoese noch nicht.

4.4.2. **Mögliche Anwendungen**

Das Angebot an Blutprodukten deckt oftmals nicht den Bedarf. Auf der Suche nach alternativen Wegen aus der Blutknappheit ist die Eigenblutspende vor elektiven Eingriffen bereits etabliert. Eine weitere – derzeit noch weitgehend theoretische – Möglichkeit könnte künftig die Herstellung von Blutkomponenten aus Stammzellen darstellen. Als Nebeneffekt wäre zudem das heute noch bestehende, minimale Restrisiko, Infektionen durch Transfusionen zu übertragen, nahezu ausgeschlossen. Nach der Entnahme von Stammzellen müssten diese in großen Bioreaktoren steril zu Erythrozyten heranreifen, um dann als „Erythrozytenkonzentrat" transfundiert zu werden. Diese Möglichkeit kann jedoch nur ernsthaft in Betracht gezogen werden, wenn extrem hohe Expansionsraten (10^6 – 10^{12}) erreicht werden und die funktionelle Integrität zweifelsfrei belegt wird.

Die Publikationen der Pariser Arbeitsgruppe um Luc Douay in der Zeitschrift „Nature Biotechnology" gaben zu vorsichtigem Optimismus Anlass. Die in-vitro generierten erythropoetischen Vorläuferzellen wurden in ein NOD/SCID-Mausmodell injiziert, wo nun in-vivo eine terminale Differenzierung zu reifen und kernlosen Erythozyten beobachtet werden konnte (Neildez-Nguyen et al., 2002). Die Qualität und Unbedenklichkeit der in-vitro gezüchteten Erythrozyten ist jedoch bislang nicht ausreichend untersucht worden.

Wenige Daten zu ex-vivo expandierten Vorläuferzellen, die klinisch angewendet wurden, stehen aus dem Bereich der Knochenmarktransplantation zur Verfügung. Sie beziehen sich vorwiegend auf die Myelosuppression.

Bereits 1999 erfolgten Vorversuche der Gruppe um Jean Moiron und Josy Reiffers. An 14 Patienten wurde die Methode etabliert und auf Sicherheit und Durchführbarkeit geprüft. Plasmozytompatienten erhielten nach einer Hochdosis-Chemotherapie eine Mischung aus in-vitro expandierten und unmanipulierten autologen CD34-positiven Zellen. Bei diesen Patienten dauerte die Neutropenie deutlich kürzer an als bei solchen, die nicht-expandierte, autologe CD34-potitive Stammzellen erhielten (Reiffers et al., 1999). Diese Versuche wurden an einem größeren Patientenkollektiv fortgeführt und erweitert (Boiron et al., 2006). Verglichen wurden dabei Plasmozytompatienten, die entweder die bereits etablierte Kombination aus in-vitro expandierten und unmanipulierten Zellen erhielten oder lediglich in-vitro expandierte Zellen. Auch hier wurde in beiden Gruppen eine Reduktion der Neutropeniedauer festgestellt.

Paquette et al. (2000) erzielten bei ihren Versuchen an Brustkrebspatienten ähnliche Resultate. Auch hier wurden nach einer Hochdosis-Chemotherapie in-vitro kultivierte CD34-positive Zellen zusammen mit unmanipulierten CD34-positiven Zellen transfundiert und mit historischen Daten verglichen. Ergänzend zu der in Frankreich beobachteten Verkürzung der Neutropeniedauer berich-

teten die amerikanischen Kollegen eine ebenso signifikante Verkürzung der Thrombopeniedauer und einen geringeren Bedarf an Erythrozytenkonzentraten (Paquette et al., 2000).

Ein anderes mögliches Anwendungsgebiet für ein optimiertes Erythropoesemodell liegt im Bereich der Infektiologie bei intraerythrozytären Parasiten. Ein in-vitro Erythropoesemodell bietet Wirtszellen für Plasmodien an, was weitere Untersuchungen zur Patophysiologie des Erregers möglich macht. Eine fortdauernde in-vitro Kultur von Plasmodien war bis Ende letzten Jahres nicht möglich. Erste Versuche wurden unternommen, in denen humane hämatopoetische Stammzellen in ein in-vitro Erythropoesemodell eingebracht wurden. Nach Infektion mit Plasmodium vivax konnten die Kulturen bis 85 Tage lang erhalten werden. Von besonderem Interesse war, dass Plasmodium vivax bereits in noch kernhaltige Vorläuferzellen (Erythroblasten) einzudringen vermochte. Die Tatsache, dass Erythroblasten in-vivo im Knochenmark vorliegen, gab Anlass zur Annahme, dass eine Infektion des Knochenmarks mit Plasmodium vivax möglich ist und mit der Zerstörung der erythropoetischen Vorläuferzellen einhergehen kann (Panichakul et al., 2007). Die in-vitro Erythropoese in Hypoxie bietet nun für weitere Untersuchungen zum Verhalten der Parasiten gegenüber erythropoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark physiologischere Bedingungen als in Normoxie.

5. Zusammenfassung

Die humane Hämatopoese findet im adulten Organismus im Knochenmark statt. Unter Hämatopoese versteht man den Prozess, in dessen Verlauf unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen hämatopoetische Stammzellen über zahlreiche Zwischenstufen zu reifen Blutzellen ausdifferenzieren. Hierfür ist ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen und zellulären Elementen in der Mikroumgebung des Knochenmarkstromas (Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte) erforderlich. Untersuchungen zur Bedeutung von extrazellulären Matrixproteinen und aus mesenchymalen Stammzellen bestehenden Stromalayern auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Hämatopoese sind Gegenstand der aktuellen Forschung unserer Arbeitsgruppe. Im Rahmen dieser Dissertation stand die humane Erythropoese im Vordergrund. Erythropoetin, Stammzellfaktor und Insulinähnlicher Wachstumsfaktor sind für diesen komplexen Reifungsprozess die wichtigsten Schlüsselzytokine. Es gibt Hinweise, dass in-vivo auch der O_2-Gehalt in der Mikroumgebung von Stammzellen, sprich in der sog. Knochenmark-Nische, eine wichtige Einflussgröße für die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen bzw. Differenzierung von erythropoetischen Vorläuferzellen darstellt.

Wir etablierten und optimierten ein in-vitro Erythropoesemodell, in dem – ausgehend von humanen CD34-positiven Stammzellen – alle Entwicklungsstadien der Erythropoese durchlaufen wurden, bis nach zirka zweiwöchiger Kultivierung terminal differenzierte und entkernte rote Blutkörperchen (Retikulozyten) entstanden waren. Dieses unter normoxischen Standardbedingungen etablierte Zellkulturmodell wurde dann in eine sauerstoffarme Umgebung (1% O_2 bzw. 5% O_2) transferiert, um dem Einfluss der Hypoxie auf die Regulation der erythropoetischen Ausreifung detailliert zu untersuchen. Hierfür wurden an zu unterschiedlichen Untersuchungstagen entnommenen erythropoetischen Vorläuferzellen Analysen zum Proliferations- und Differenzierungsverhalten unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt.

Entsprechend unserer Fragestellung nach dem Einfluss der Hypoxie auf die in-vitro Erythropoese konnten wir zeigen, dass nach 16 Tagen in allen drei untersuchten Ansätzen terminal differenzierte, rote Blutkörperchen generiert worden waren. Bei 5% O_2 (milde Hypoxie) war die Differenzierung am Tag 9 leicht verzögert, jedoch war am Ende der Flüssigkultur kein signifikanter Unterschied zur normoxischen Kontrolle festzustellen. Bei 1% O_2 (starke Hypoxie) hingegen trat die erythropoetische Differenzierung verzögert ein, sodass nach 16 Tagen vermehrt kernhaltige Normoblasten zu Lasten ausgereifter Retikulozyten vorlagen. Darüber hinaus verursachte starke Hypoxie eine Stagnation der Proliferationsrate, wohingegen Umgebungsbedingungen mit milder Hypoxie die

Expansion erythropoetischer Zellen erlaubte. Hiermit steht unsere Beobachtung im Einklang, dass hämatopoetische Vorläuferzellen, die in starker Hypoxie nicht in den Zellzyklus eintreten, ihr CD34 Antigen länger exprimieren, während die kultivierten Vorläuferzellen in milder Hypoxie als Ausdruck ihrer aktiven DNA Replikation eine gesteigerte Expression des Transferrinrezeptors CD71 aufweisen.

Zusammenfassend stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit der Eingangshypothese einer speziellen Knochenmarknische für die humane Erythropoese.

Wir postulieren folgendes Nischenmodell: In sauerstoffärmsten bis nahezu anoxischen Gebieten der Knochenmarknische ruhen pluripotente hämatopoetische Stammzellen. Bei einem geringfügigen Anstieg des O_2-Gehaltes und gleichzeitiger Stimulation durch Wachstumsfaktoren, die vom Knochenmarkstroma sezerniert werden, differenzieren diese Stammzellen zu liniendeterminierten Vorläuferzellen („committment"). Speziell für die Erythropoese erfolgt die weitere Ausreifung unter dem Einfluss von Erythropoetin entlang eines O_2-Gradienten. In den sich ausbildenden erythroblastären Inseln „wandern" die Zellen entlang dieses O_2-Gradienten und differenzieren unter kontinuierlich steigendem Sauerstoffgehalt zunehmend aus. In der relativ sauerstoffreichen Umgebung nahe der Knochenmark-Sinusoide stoßen die Normoblasten ihren bereits pyknotischen Kern aus und werden zu Retikulozyten. Die ausgestoßenen Kerne bzw. Pyrenozyten werden von Makrophagen entsorgt. Die Retikulozyten verlassen nun das Knochenmark und treten durch transendotheliale Migration in die Blutzirkulation über.

6. Literaturverzeichnis

6.1. Originalarbeiten

Allen TD, Simons PJ, Dexter TM: Haematopoietic microenvironments in vitro – which cells are involved? Blood Cells 10 (2-3), 467-71 (1984).

Baciu I, Oprisiu C, Derevenco P, Vasile V, Muresan A, Hriscu M, Chis I: The brain and other sites of erythropoietin production. Rom J Physiol 34 (1-4), 3-14 (2002)

Bernard J: The erythroblastic island: past and future. Blood Cells 17 (1), 5-10 (1991)

Boiron J-M, Dazey B, Cailliot C, Launay B, Attal M, Mazurier F, McNiece IK, Ivanovic Z, Caraux J, Marit G, Reiffers J: Large-scale expansion and transplantation of CD34+ hematopoietic cells: in vitro and in vivo confirmation of neutropenia abrogation related to the expansion process without impairment of the long-term engraftment capacity. Transfusion 46, 1934-42 (2006)

Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET: Modeling pO_2 distributions in the bone marrow hematopoietic compartment, II. modified Kroghian models. Biophys J 81, 685-96 (2001a)

Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET: Modeling pO_2 distributions in the bone marrow hematopoietic compartment, I. Krogh's model. Biophys J 81, 675-84 (2001 b)

Cipolleschi MG, D'Ippolito G, Bernabei PA, Caporale R, Nannini R, Mariani M, Fabbiani M, Rossi-Ferrini P, Olivotto M, Dello Sbarba P: Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. Exp Hematol 25 (11), 1187-94 (1997)

Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z, Praloran V, olivotto M, Dello Sbarba P: The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. Leukemia 14 (4), 735-39 (2000)

Cipolleschi MG, Sbarba PD, Olivotto M: The role of Hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood 82 (7), 2031-37 (1993)

Danet GH, Pan Y, Luongo J, Bonnet DA, Simon MC: Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. J Clin Invest 112, 126-35 (2003)

Daniels G, Green C: Expression of red cell surface antigens during erythropoesis. Vox Sang 78 (suppl 2), 149-53 (2000)

de Isla NG, Riquelme BD, Rasia RJ, Valverde JR, Stoltz JF: Quantification of glycophorin A and glycophorin B on normal human RBCs by flow cytometry. Tranfusion 43 (8), 1145-52 (2003)

De La Grange PB, Barthe C, Lippert E, Hermitte F, Belloc F, Lacombe F, Ivanovic Z, Praloran V: Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the cd34 gene. J Cell Biochem 97, 135-44 (2006)

Dolznig H, Habermann B, Stangl K, Deiner EM, Morrigl R, Beug H, Müllner EW: Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X (L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. Curr Biol 12(13), 1076-85 (2002).

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 48; 1122-1132 (2008)

Fauser AA, Messner HA: Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. Blood 52 (6), 1243-48 (1978).

Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hjjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against etherosclerotic lesion development in mice. J Clin Invest 105 (8), 1049-56 (2000)

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Graeves MF: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. Blood 75 (12), 2417-26 (1990)

Fisher JW: Erythropoetin: physiology and pharmacology update. Exp Biol Med 228 (1), 1-14 (2003)

Giarratana M-C, kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcmsn H, Douay L: Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol 23 , 69-74 (2005)

Hanspal M, Hanspal JS: The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30kD heparin-binding protein is involved in this contact. Blood 84, 3494-504 (1994)

Hanspal M, Smockova Y, Uong Q: Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. Blood 92 (8), 2940-50 (1998)

Hara H, Ogawa M: Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages, and megacaryocytes. Am J Hematol 4(1), 23-23 (1978)

Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P: Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. Blood 99 (1), 394 (2002)

Heinicke K, Hofer T, Wenger RH, Gassmann M: Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel. Dtsch Z Sportmed 10, 270-276 (2002)

Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z: Very low O2 concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. Stem Cells 24, 65-73 (2006)

Hevehan DL, Papoutsakis ET, Miller WM: Physiologically significant effects of pH and oxygen on granulopoiesis. Exp Hematol 28 (3), 276-75 (2000)

Ishikawa Y, Ito T: Kinetics of heatopoietic stem cells in a hypoxic culture. Eur J Haematol, 126-29 (1988)

Ivanovic Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, Cipolleschi MG, Rovida E, Milenkovic P, Praloran V, Dello Sbarba P: Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. Br J Haematology 108 (2), 424-29 (2000)

Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P: Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow. Exp Hematol 30 (1), 67-73 (2002)

Ivanovic Z, Hermitte F, de la Grange PB, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, Vezon G, Praloran V: Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of commited progenitors at low O2-concentration (3%). Stem Cells 22 (5), 716-24 (2004)

Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L: Role of the kidney in erythropoiesis. Nature 50, 633-34 (1957)

Jelinek J, Prchal JT: Oxygen-dependent regulation of erythropiesis. Methods Enzymol 381, 201-10 (2004)

Jelkmann W: Erythropoetin after a century of research: younger than ever. Eur J Haematol 78 (3), 183-205 (2007)

Johnson GR, Metcalf D: Pure and mixed erythroid colony formation in vitrostimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. Proc Natl Acad Sci USA 74 (9), 3879-82 (1977)

Kie JH, Jung YH, Woo SY, Ryu KH, Park HY, Chung WS, Seoh JY: Ultrastructural and phenotypic analysis of in vitro erythropoesis from human cord blood CD34+ cells. Ann Hematol 82 (5), 278-83 (2003)

Klinker E, Weißinger F: Forum „Hämatotherapie": Autologe Stammzelltransplantation. Bayerisches Ärzteblatt 2, 118-20 (2004)

Krogh A: The number and distribution of capillaries in muscels with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. J Physiol 52, (409-415) 1919

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow catomerty analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. Blood 70 (5), 1316-24 (1987).

Maggakis-Kelemen C, Bork M, Kayser P, Biselli M, Artmann GM: Biological and mechanical quality of red blood cells cultured from human umbilical cord blood stem cells. Med Biol Eng Comput 41 (3), 350-56 (2003)

McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP, Palis J: Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus. Blood 111 (4), 2409-17 (2008)

Miyagawa SI, 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 Haematology 109 , 555-62 (2000)

Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes as the end of maturation. J Exp Med 198 (11), 1691-98 (1999).

Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Dai CH: Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progentior cells while stimulating proliferation. Blood 86 (2), 572-80 (1995)

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

Narayan AD, Ersek A, Campbell TA, Colon DM, Pixley JS, Zanjani ED: The effect of hypoxia and stem cell factor source on haemoglobin switching. Br J Haematology 128 (4), 562-70 (2005)

Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoun 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 (5), 476-72 (2002)

Notsu E, Sonoda Y, Sasaki K: A histological and three-dimensional reconstruction of F4/80-positive reticular cells and macrophages at the onset of murine bone marrow hematopoiesis. Kaibogaku Zasshi 82 (2), 53-60 (2007)

Okumura N, Tsuji K, Nakahata T: Changes in cell surface antigens expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. Blood 80, 642-650 (1992)

Palacajornsuk P: Review: molecular basis of MNS blood group variants. Immunohematol 22 (4), 171-82 (2006)

Panichakul T, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Cui L, Udomsangpetch R: Production of erythropoietic cells in vivo for continuous culture of Plasmodium vivax. Int J Parasitol 37 (14), 1551-57 (2007)

Panzenböck B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M: Growth and differentiation of human stem cell factor / erythropoetin-dependant erythroid progenitor cells in vitro. Blood 92, 3658-68 (1998)

Paquette RL, Dergham ST, Karpf E, Wang H-J, Slamon DJ, Souza L, Glaspy JA: Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce poststransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia patients with breast cancer. Blood 96, 2385-90 (2000)

Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron J-M: Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. Lancet 354:, 1092-93 (1999)

Rich IN, Kubanek B: The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoetic cells in vitro. Br J Haematol, 579-88 (1982)

Rich IN: A role of the macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone-marrow-derived macrophages in vitro. Exp Hematolog 14 (8), 746-51 (1986)

Roy S, Khanna S, Bickerstaff AA, Subramanian SV, Atalay M, Bierl M, Pendyala S, Levy D, Sharma N, Venojarvi M, Strauch A, Orosz CG, Sen CK: Oxygen Sensing by Primary Cardiac Fibroblasts. Circ Res 92, 264-71 (2003)

Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M, Itano C: Scavenger macrophages and central macrophages of erythroblastic islands in liver hematopoiesis of the fetal and early postnatal mouse: a semithin light- and electron-microscopic study. Acta Anat (Basel) 147 (2), 75-82 (1993)

Sawada K, Krantz SB, Dessypris EN, Koury ST, Sawyer ST: Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. J Clin Invest 83, 1701-09 (1989)

Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cells and the haematopoietic stem cells - a hypothesis. Blood Cells 4, 7-25 (1978)

Scicchitano MS, Mc Farland 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, 760-69 (2003)

Simmons D, Seed B: Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. J. Immunol 141, 2797-2800 (1988).

Simmons PJ, Torok-Storb B: CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. Blood 78 (11), 2848-53 (1991)

Smith MA, Court EL, Smith JG: Stem cell factor: laboratory and clinical aspects. Blood Rev 15 (4), 191-97 (2001)

Soni S, Bala S, Gwynn B, Sahr KE, Peters LL, Hanspal M: Absence of erythroblast macrophage protein (emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. J Biol Chem 281 (29), 20181-89 (2006)

Spike BT, Dibling BC, Macleod KF: Hypoxic stress underlies defects in erythroblastic islands in the Rb-null mouse. Blood 110 (6), 2173-81 (2007)

Tondevold E, Eriksen J, Jansen E: Observations on long bone medullary pressures in relation to arterial PO2, PCO2 and the pH in the anaesthesized dog. Acta Orthop Scand 50, 645-51 (1979)

Von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, Löwenberg B, Beug H: The gucocorticoid receptor cooperates with the erythopoetin receptor and c-kit to enhance ad sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood 94 (2), 550-59 (1999)

Weinberg RS, Acosta R, Knobloch ME, Garber M, Alter BP: Low oxygen enhances sickle and normal erythropoesis and fetal hemoglobin synthesis in vitro. Hemolobin 19 (5), 263-75 (1995)

Whyatt D, Grosveld F: Cell-nonautonomous function of the retinoblastoma tumor suppressor protein: new interpretations of old phenotypes. EMBO Rep. 3 (2), 130-35 (2002)

Yaegashi K, Itoh T, Kosaka T, Fukushima H, MorimotoT: Diffusivity of oxygen in microvascular beds as determined from PO_2 distribution maps. Am J Physiol 270, 1390-97 (1996)

Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S: Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. Nature 437 (7059), 754-48 (2005)

6.2. Bücher

Hoffbrand AV, Pettit JR, Schmidt RW: Normale Hämatopoese und Blutbildung. In: Sandoz Atlas Klinische Hämatologie. Gower Medical Publishing, London, New York Kapitel 1, 2-31 (1989)

Lodish H, Berk A, Matsudairs P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. Cell Birth, Lineage, and Death. In: Molecular Cell Biology. W. H. Freeman and Company, New York. 900-904 (2004)

Lord BI. The architecture of bone marrow cell populations. In: Concise review in clinical and experimental haematology (ed. by M. Murphy, Jr). AlphaMed Press, Dayton, Ohio. 225-34 (1992)

Moliterno AR, Spivak JL: Erythropoesis. In: The scientific basis of transfusion medicine (eds) Anderson and Ness P, WB Saunders Co, Philadelphia. Chapter I, 1-12 (2000)

6.3. **Zeitungsartikel und Internetquellen**

Ohne Autor: Oft zuviel Sauerstoff in Zellkulturen. Frankfurter Allgemeine Zeitung, 29.01.2003

Rad A: Hematopoiesis (human) diagram. (http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Hematopoiesis_%28 human %29_diagram.png). Tag des letzten Zugriffs 25.09.2008, erstellt 2006

Will B: Lebenssaft aus dem Labor – Im Brutschrank gezüchtete Erythrozyten könnten Blutspenden in Zukunft überflüssig machen. Süddeutsche Zeitung, 27.01.2005

7. Anhang

7.1. Wertetabellen

Wertetabelle 1: *Kumulative Zellzahl [x 10^6/ml]; Mittelwerte*

	Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie	0,5	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,4	5,5 ± 3,4	7,5 ± 4,4
Hypoxie 5%	0,5	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,5	7,0 ± 3,5	14,6 ± 9,0
Hypoxie 1%	0,5	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,7	2,6± 1,4

Wertetabelle 2*: Vitalität [%]; Mittelwerte*

	Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie	97,7 ± 1,2	74,9 ± 10,7	78 ± 13,5	84,5 ± 13	89,4 ± 4,7
Hypoxie 5%	99 ± 0,2	78,08 ± 7,5	86,8 ± 4,7	91,1 ± 4,5	94,31 ± 2,9
Hypoxie 1%	96,7 ± 0,5	65,8 ± 19,8	72,5 ± 12,4	72,8 ± 8,8	81 ± 8,5

Wertetabelle 3: *Lichtmikroskopische Zusammensetzung [%].Mittelwerte.*
Polychr. Ebl. = polychromatische Erythroblasten.

		Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie *(Kontrolle zu 5% Hypoxie)*	Stammzellen	99,0	90,2 ± 6,0	63,9 ± 25,8	0,4 ± 0,3	0
	Polychr. Ebl.	0	0	27,0 ± 26,3	46,4 ± 14,3	6,0 ± 5,5
	Normoblasten	0	0	2,8 ± 3,5	32,0 ± 13,3	48,4 ± 14,7
	Retikulozyten	0	0	0,13	19,0 ± 18,4	43,5 ± 16,6
	andere	1,0	9,9 ± 6,0	6,3 ± 6,1	2,3 ± 2,0	2,1 ± 1,6
5% Hypoxie	Stammzellen	99,0	88,7 ± 6,6	74,4 ± 19,9	0,8 ± 0,6	0
	Polychr. Ebl.		0	19,7 ± 19,7	67,6 ± 12,4	4,8 ± 3,3
	Normoblasten	0	0	1,8 ± 2	18,4 ± 8,1	47,2 ± 12,5
	Retikulozyten	0	0	0,3 ± 0,5	12,7 ± 7,4	47 ± 14,3
	andere	1,0	11,3 ± 6,6	3,7 ± 3,0	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,5

		Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie *(Kontrolle zu 1% Hypoxie)*	Stammzellen	99,0	80,1 ± 15,1	60,8 ± 16,0	0,4 ± 0,6	0,1 ± 0,2
	Polychr. Ebl.	0	0	28,3 ± 14,0	10,5 ± 9,6	1,3 ± 1,0
	Normoblasten	0	0	1,2 ± 2,8	63,1 ± 7,5	47,6 ± 6,4
	Retikulozyten	0	0	0,7 ± 1,5	21,8 ± 11,1	48,1 ± 6,2
	andere	1,0	19,9 ± 15,1	9,0 ± 6,6	4,3 ± 1,9	2,8 ± 2,0
1% Hypoxie	Stammzellen	99,0	81,9 ± 14,6	70,8 ± 12,2	0,9 ± 0,7	0
	Polychr. Ebl.	0	0	20,3 ± 12,4	7,6 ± 3,1	2,1 ± 1,3
	Normoblasten	0	0	2,1 ± 3,4	61,5 ± 8,9	52,8 ± 4,8
	Retikulozyten	0	0	0,5 ± 0,9	21,4 ± 6,1	39,2 ± 4,7
	andere	1,0	6,3 ± 14,6	6,3 ± 7,6	8,5 ± 6,0	5,8 ± 4,7

***Wertetabelle 4**: CD34-positive Zellen [%]*

	Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie	98,5 ± 1,6	84 ± 17,3	34,7 ± 20,1	1,1 ± 0,8	0,5 ± 0,4
Hypoxie 5%	98,5 ± 1,6	87,3 ± 11,2	36,5 ± 14,1	1,1 ± 1	0,8 ± 1,1
Hypoxie 1%	98,5 ± 1,6	79 ± 19,4	50,8 ± 18,8	2,3 ± 2,2	0,9 ± 0,5

***Wertetabelle 5**: Glykophorin-A positive Zellen [%]*

	Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie	1,0 ± 0,6	8,5 ± 8,6	62,2 ± 15,3	96,9 ± 3,0	98,5 ± 1,2
Hypoxie 5%	1,0 ± 0,6	16,3 ± 13,1	65,8 ± 18,2	98,6 ± 1,5	99,4 ± 0,4
Hypoxie 1%	1,0 ± 0,6	4,4 ± 4,6	52,1 ± 21,7	93,4 ± 6,4	96,7 ± 3,2

***Wertetabelle 6**: CD36-positive Zellen [%]*

	Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie	15,5 ± 8,7	60 ± 16,6	84 ± 7,4	70,1 ± 13,7	25,5 ± 9,3
Hypoxie 5%	15,5 ± 8,7	57,8 ± 15,7	89,4 ± 5,2	75,3 ± 17,4	28,6 ± 8,7
Hypoxie 1%	15,5 ± 8,7	58,8 ± 20,5	85,6 ± 12,2	70,2 ± 10,3	31,7 ± 14,7

***Wertetabelle 7**: CD71-positive Zellen [%]*

	Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13	Tag 16
Normoxie	32,2 ± 16,6	80,2 ± 12,3	85,2 ± 7,3	72,6 ± 14,6	37,3 ± 12,0
Hypoxie 5%	32,2 ± 16.6	84,2 ± 5,6	91,5 ± 4,8	78,4 ± 16,1	42,2 ± 11,9
Hypoxie 1%	32,2 ± 16,6	77,5 ± 16,	86,7 ± 7,1	69,2 ± 15,6	35,5 ± 16,6

Wertetabelle 8: *Semisolide Kurzzeitkulturen [Anzahl der Kolonien]*

		Tag 1	Tag 5	Tag 9	Tag 13
Normoxie *(Kontrolle zu 5% Hypoxie)*	BFU-E	28,5 ± 13,0	34,2 ± 9,9	2,3 ± 1,2	0,2 ± 0,4
	CFU-E	2,5 ± 3,0	4,8 ± 2,9	2,7 ± 2,7	0
	CFU-GM	31,7 ± 11,9	22,0 ± 8,7	6,3 ± 1,9	1,4 ± 0,8
5% Hypoxie	BFU-E	28,5 ± 13,0	37,5 ± 15,4	4,5 ± 2,8	0,3 ± 0,5
	CFU-E	2,5 ± 3,0	3,0 ± 1,5	2,5 ± 1,6	0
	CFU-GM	31,7 ± 11,9	26,0 ± 8,4	5,5 ± 2,1	1,5 ± 1,0
Normoxie *(Kontrolle zu 1% Hypoxie)*	BFU-E	27,5 ± 13,0	23,5 ± 7,6	2,2 ± 1,3	0
	CFU-E	2,3 ± 1,2	3,0 ± 2,6	0,8 ± 1,1	0
	CFU-GM	29,8 ± 14,	34,0 ± 14,8	7,3 ± 5,4	2,0 ± 2,0
1% Hypoxie	BFU-E	27,5 ± 13,0	23,2 ± 6,2	2,7 ± 2,2	0,2 ± 0,4
	CFU-E	2,3 ± 1,2	3,3 ± 2,7	0,8 ± 0,9	0
	CFU-GM	29,8 ± 14,7	33,0 ± 16,4	5,8 ± 3,9	3,6 ± 2,5

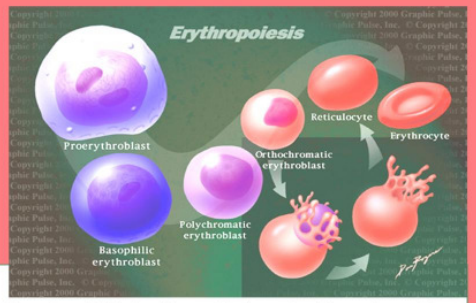
Aus Stammzellen werden rote Blutkörperchen...

J. Ribbat, I. Dorn, P. Lazar-Karsten, B. Driller, H. Kirchner, P. Schlenke
Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität zu Lübeck

... mit nur ganz wenig Sauerstoff

I. Der Hintergrund

Im Knochenmark findet die Blutbildung statt. Dort herrscht ein Sauerstoffmangel, der unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Um künstlich „im Reagenzglas" rote Blutkörperchen herzustellen, benutzten wir bislang nur Brutschränke mit einer Luftfüllung. Wir wollten nun herausfinden, was in einem Brutschrank ohne Sauerstoff passiert, wenn man aus Blutstammzellen (sog. „CD34-positive Zellen") künstlich rote Blutkörperchen herstellt.



Erythropoiese (www.graphicpulse.com)

Aus Stammzellen entwickeln sich rote Blutkörperchen: Im Verlauf werden die Zellen immer kleiner, der Kern schrumpft und wird immer dichter. Das Besondere an dieser „roten Reihe" ist, dass der Zellkern am Ende ausgestoßen wird und es so zur typischen kernlosen, scheibchenförmigen Form der roten Blutkörperchen kommt.

II. Die Versuche

Die Stammzellen stammten von Krebspatienten, bei denen zur Behandlung eine Stammzelleigenspende geplant war. Die Patienten waren mit Forschung an ihren Zellen einverstanden.

Mit einem Medikament wurden Stammzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf ausgeschwemmt und isoliert. Diese CD34-positiven Stammzellen wurden in verschiedenen Nährflüssigkeiten über 16 Tage hin kultiviert. Die Nährmedien enthielten verschiedene Zusätze (z. B. Stammzellfaktor, Erythropoietin („EPO") und Insulin), die die Zellen zur Vermehrung und Weiterentwicklung anregen sollten.

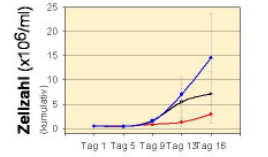
Es wurden verschiedene Sauerstoffkonzentrationen ausprobiert: starker Sauerstoffmangel (1% O_2) und milder Mangel (5% O_2). In einem Kontrollbrutschrank herrschte der normale Luftsauerstoff (20% O_2).

Alle 96 Stunden wurden die Zellen unterm Mikroskop und mit einem Zellsortierer („FACS") untersucht. Dazu wurden Leuchtstoffe an bestimmten Eiweißen auf der Zelloberfläche angebracht,sodass der Zellsortierer verschieden „leuchtende" Zellen voneinander unterscheiden konnte.

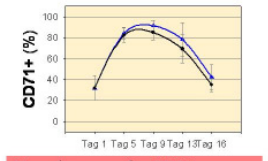
III. Die Ergebnisse

Mikroskop: Im Vergleich zu Luftsauerstoff hatte die Zellzahl nach 16 Tagen in milder Hypoxie um das 2,4-fache zu- und in starker Hypoxie um das 3,5-fache abgenommen. Außerdem waren bei starker Hypoxie an den Tagen 9 und 12 mehr unreife als reife Entwicklungsstadien zu beobachten, jedoch waren am Ende der Flüssigkultur in allen drei Ansätzen anteilig etwa gleichviele rote Blutkörperchen vorhanden.

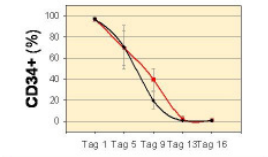
FACS-Zellsortierer: In milder Hypoxie wiesen an den Tagen 9 und 13 mehr Zellen das Vermehrungsmerkmal CD71 auf als in Luftsauerstoff. Das Stammzellmerkmal CD34 war bei starker Hypoxie länger vorhanden.



Zellzahl im Verlauf



Vermehrungsmarker CD71



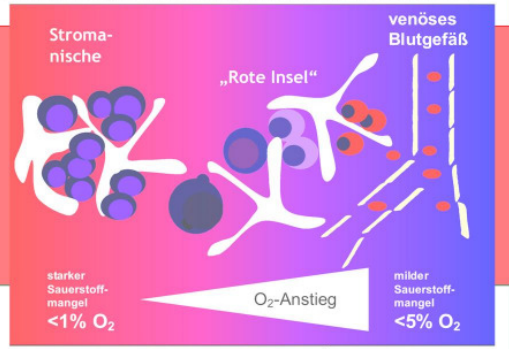
Stammzellmarker CD34

IV. Schlussfolgerungen und Diskussion

In milder Hypoxie entstehen deutlich mehr rote Zellen als in Luftsauerstoff, und in Luftsauerstoff wiederum mehr als in starker Hypoxie. Außerdem vermehren sich die Zellen in milder Hypoxie schneller, wohingegen in starker Hypoxie länger Stammzellen nachweisbar sind. In starker Hypoxie ist die Entwicklung zwar verzögert, jedoch ist das „ Endergebnis: rotes Blutkörperchen" davon nicht beeinträchtigt.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen lassen sich Aussagen über die Zusammenhänge zwischen Sauerstoffmangel und Blutentwicklung treffen:

Die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen im Knochenmark haben einen Einfluss auf die Vermehrung und die Entwicklung von Stammzellen zu reifen roten Blutkörperchen. Bei sehr wenig Sauerstoff (<1% O_2) bleiben Stammzellen erhalten: Sie befinden sich in einem Ruhemodus, in dem sie sich nicht teilen und nicht weiterentwickeln[1,2,3]. Bei etwas mehr Sauerstoff (<5% O_2) entwickeln sich Stammzellen schneller zu fertigen rote Blutkörperchen und es entstehen mehr von ihnen[4,5].



Knochenmark (Schema)

Es wird angenommen, dass es im Knochenmark „Nischen"[6] gibt, in denen Stammzellen in starkem Sauerstoffmangel ruhen[3] und sich selbst erneuern.

Dann entwickeln sie sich entlang einem Sauerstoffanstieg. Unterschiedliche Reifungsstadien gruppieren sich in „Roten Inseln", wo sie auch ihren Kern verlieren[7]. Als kernlose rote Zellen wandern sie dann zur relativ sauerstoffreichen Umgebung (5% O_2) der venösen Knochenmarksgefäße, von wo sie in den Blutkreislauf eintreten.

Angegebene Zahlenwerte sind Mittelwerte.
In Kurven sind Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

Literaturhinweise:
1. Ivanovic et al, 2000 und 2002
2. Cipolleschi et al, 1993 und 2000
3. Danet et al, 2003
4. Ivanovic et al, 2004
5. Narayan et al, 2005
6. Schofield, 1978
7. Lord et al, 1992

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Peter Schlenke für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung. Seine wissenschaftliche Anleitung und die konstruktive Zusammenarbeit waren mir stets eine große und wertvolle Hilfe. Ebenso danke ich Frau Dr. med. Isabel Dorn für ihre kompetente und freundliche Beratung und Unterstützung. Mit beiden konnte ich jederzeit aktuelle Daten, Änderungsvorschläge und Manuskriptversionen gründlich diskutieren, um anschließend mit konkreten Vor- und Ratschlägen weiter zu arbeiten.

Birgit Driller danke ich, dass sie mich im Labor „angelernt" hat, und dass sie mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat hilfsbereit zur Seite stand. Ich werde immer gerne an ihre freundliche, fachkundige und geduldige Anleitung meiner ersten Schritte im Labor zurückdenken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Holger Kirchner bedanke ich mich dafür, dass er mir die Durchführung der Experimente an seinem Institut ermöglichte und dass ich die Einrichtungen des ehemaligen Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin nutzen durfte. Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die mir bei wissenschaftlichen Fragestellungen weiterhalfen, für die gute Zusammenarbeit.

Nicht vergessen möchte ich Petra Korritke, Stefanie Boie, Ulrich Lindner, Pamela Lazar-Karsten und Gisa Meyer – ihnen gilt mein Dank für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre im Labor.

Allen genanten danke ich ferner für das gute Forum im Rahmen der wöchentlichen institutsinternen Doktorandenseminare, bei denen ich sowohl als Zuhörerin als auch als Referentin viele Anregungen bekam.

Dem Hämatologielabor der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck danke ich für die Anfertigung der Pappenheim-Färbungen.

Meiner lieben Freundin Anna Boye möchte für das geduldige Korrekturlesen des Manuskriptes danken. Ferner gilt ihr, Katja Vetters und meinem Freund Christian Idel herzlicher Dank für ihre Hilfsbereitschaft, als die Arbeit in den letzten Zügen lag. Dank euch hatte ich auch für den Endspurt noch genügend Sauerstoff …

Nicht minder herzlich danke ich meinen Eltern, meinen Familien und meinem Freund Christian Idel für ihre Rücksichtnahme auf meine Zellen, meine Zeilen und mich, wenn ich nächtens oder sonntäglich im Labor oder am Schreibtisch saß und diverse Verabredungen verschoben werden mussten.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- & Zuname	Julika Ribbat
Geburtsdatum & -ort	30.12.1981 in Hamburg

Studium

10 / 2001 – 11 / 2007	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck

Doktorarbeit

2004 – 2006	Einarbeitung und experimenteller Teil am ehemaligen Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck
seit 2007	Schriftliche Ausarbeitung

Veröffentlichungen

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 48; 1122-1132 (2008)

Ribbat J, Dorn I, Lazar-Karsten P, Driller B, Kirchner H, Schlenke P. Aus Stammzellen werden rote Blutkörperchen ... mit nur ganz wenig Sauerstoff. Posterausstellung am Ersten Lübecker Doktorandentag (2007)

Lübeck, im September 2008 _____

Julika Ribbat