

Aus der III. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

**In vitro Expansion hämatopoetischer Stammzellen aus
MDS-Patienten zur Verbesserung des präklinischen
Xenograftmodells**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Polina Timiriasova

aus
Kasan
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Daniel Nowak

1 INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
2 EINLEITUNG	8
2.1 Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen	8
2.2 Expansion von HSCs.....	8
2.3 Mesenchymale Stammzellen.....	11
2.4 Myelodysplastisches Syndrom	12
2.4.1 Definition und Epidemiologie	12
2.4.2 Pathogenese.....	13
2.4.3 Klinisches Erscheinungsbild	14
2.4.4 Klassifikation und Prognose	15
2.4.5 MDS-Modelle	17
2.4.6 MDS-Xenograftmodelle	17
2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	19
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Materialien	20
3.2 Zellkultur und Primärzell-Isolation von CD34-positiven Zellen	25
3.2.1 Patienten und Kontrollproben	25
3.2.2 Isolation monokleärer hämatopoetischer Zellen.....	26
3.2.3 Isolation CD34-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen	26
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	27
3.2.5 Kryokonsevirung von Zellen	28
3.2.6 Auftauen von CD34-positiven HSCs und MSCs.....	29
3.2.7 Auftauen von MNCs für die MACS-Isolation.....	29
3.2.8 Zellkultur von CD34-positiven HSCs	29
3.2.9 Ernten von CD34-positiven HSCs und Vorbereitung auf die HSCT	31
3.2.10 Durchflusszytometrie	31
3.2.11 CFU-Assay	33

3.3	MSCs.....	34
3.3.1	Isolierung von MSCs aus Knochenmark.....	34
3.3.2	Zellkultur von MSCs.....	34
3.3.3	Passagieren und Ernten von MSCs.....	35
3.4	Tierexperimentelle Methoden	36
3.4.1	Versuchstiere.....	36
3.4.2	Sublethale Konditionierung vor der Xenotransplantation	36
3.4.3	Vorbereitung der Zellen für die Transplantation	37
3.4.4	Betäubungsverfahren	37
3.4.5	Intrafemorale Injektion	38
3.4.6	Knochenmarkpunktion.....	38
3.4.7	Tötung der Versuchstiere	39
3.4.8	Isolation von Zellen aus dem Knochenmark.....	39
3.4.9	Durchflusszytometrie und Zellsorting.....	39
3.4.10	Sekundäre Transplantation.....	41
3.5	Statistische Auswertung	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	<i>In vitro</i> Expansion hämatopoetischer Stammzellen aus MDS-Knochenmark ..	42
4.1.1	Fördernder Effekt des Flt-3-L.....	48
4.1.2	Kein Einfluss von Angptl5 mit IGFBP2 auf die Zellexpansion	49
4.1.3	Keine Verbesserung der Zellexpansion durch Zusatz von UM171	50
4.1.4	Keine Verbesserung der Zellexpansion durch Zusatz von Polyvinylalkohol 52	
4.1.5	Erhaltung des Stammzellcharakters während der Kultivierung von HSCs 53	
4.2	NSG Xenograft Transplantationsassay	61
4.2.1	Primäre Transplantation	61
4.2.2	Serielle Transplantation in sekundäre Empfängermäuse	71
5	DISKUSSION	73
5.1	MDS initiiierende Zellen	73
5.2	Flt-3-L ist essenziell für die Expansion von hämatopoetischen Stammzellen aus MDS-Patienten	73
5.3	Der ungeklärte Einfluss von Angptl5 und IGFBP2 auf die hämatopoetische Stammzellen aus MDS-Proben <i>in vitro</i>	74
5.4	Der negative Einfluss von UM171 auf die <i>in vitro</i> Expansion von hämatopoetischen Stammzellen aus MDS-Proben.....	76

5.5	Fehlender Einfluss von PVA auf die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen aus MDS-Proben <i>in vitro</i>	78
5.6	Unterschiedliche Expansionsfähigkeiten der Zellen.....	79
5.7	Weitere potenzielle Gründe für die schlechte Expansionsfähigkeit der MDS-HSCs und Vorschlag einer anderen Zellkulturmethode	80
5.8	Identifizierung der hämatopoetischen Progenitorzellen.....	81
5.8.1	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Oberflächenphänotyp.....	81
5.8.2	CFU-Assay	82
5.9	Fehlende molekulargenetische Charakterisierung	82
5.10	Unterschiedliche Engraftmentraten	83
5.11	Ausgewählte Tiere.....	83
5.12	Notwendigkeit der weiteren Optimierung des MDS-Xenomodells.....	84
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	86
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
8	TABELLENVERZEICHNIS	89
9	LITERATURVERZEICHNIS	90
10	TABELLARISCHER ANHANG	102
11	LEBENS LAUF	107
12	DANKSAGUNG	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AML	akute myeloische Leukämie
Angptl-5	Angiopoietin-like 5
ANOVA	Varianzanalyse (von engl. one way analysis of variance)
APC	Allophycocyanin
ASXL1	Additional sex combslike1
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (engl. Cluster of differentiation)
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
del (5q)	Deletion des langen Arms von Chromosom 5
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
EPO	Erythropoetin
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence activated cell sorting)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. fibroblast growth factor)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Flt-3	Rezeptortyrosinkinase "Fms-like tyrosine kinase 3"
Flt-3-L	Ligand der FMS-ähnliche Tyrosinkinase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
hBMLS	humanisierte Knochenmark-ähnliche Strukturmodellen (engl. humanized bone marrow-like structure), humanisierte Knochenmark-ähnliche Strukturmodellen (engl. humanized bone marrow-like structure)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IPSS-R	Revised International prognostic scoring system
KMP	Knochenmarkpunktion
LT-HSC	Langzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle (engl. long term repopulating hematopoietic stem cells)
MACS	magnetaktivierte Zellsortierung (engl. magnetic activated cell sorting)
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl. Macrophage colony-stimulating factor)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-RS	MDS mit Ringsideroblasten
Mpl	myeloproliferatives Leukämieprotein
MSC	Mesenchymale Stromazelle
NSG	NOD.Cg-Prkdcid I12rgtm1Wjl/Szj
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PDX	Patienten-abgeleitetes Xenograft -Modell (engl. patient derived xenograft)

PE	<i>Phycoerythrin</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PVA	<i>Polyvinylalkohol</i>
RARS	<i>refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten</i>
RCMD ..	<i>Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (engl. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia)</i>
RPMI	<i>Medium "Roswell Park Memorial Institute Medium"</i>
SCF	<i>Stammzelleffaktor (engl. stem cell factor)</i>
SEM	<i>Standardfehler des Mittelwerts (engl. standard error of mean)</i>
SIRP α	<i>Signal regulatorisches alpha-Protein</i>
SPRED1	<i>Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1</i>
SRC	<i>SCID-Repopulationszellen</i>
SSC-A	<i>Seitwärtsstreulicht</i>
SZT	<i>Stammzelltransplantation</i>
TIRAP	<i>domänenhaltiges Protein des Toll/IL-1 Rezeptors</i>
t-MDS	<i>therapieassoziiertes myelodysplastisches Syndrom</i>
tMDS	<i>therapieassoziierte MDS</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>
TPO	<i>Thrombopoetin</i>
WHO-Klassifikation	<i>Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation</i>

2 EINLEITUNG

2.1 Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoese beschreibt die Proliferation und Differenzierung von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) zum zellulären Bestandteil des Blutes. Ab dem siebten Monat der Fetalentwicklung erfolgt sie hauptsächlich im Knochenmark. Im Unterschied zu Säuglingen und Neugeborenen, bei denen die myeloide Hämatopoese in nahezu allen Knochen stattfindet, beteiligen sich an der Hämatopoese im Erwachsenenalter vor allem die langen Röhrenknochen und die flachen Knochen des Beckens, des Kopfes, der Rippen und der Wirbelkörper. Bei Störungen der myeloiden Hämatopoese, z. B. im Rahmen proliferativer Erkrankungen, kann es zu extramedullärer Hämatopoese kommen. Sie findet genauso wie die hepatische Hämatopoese in der Fetalentwicklung vor dem siebten Monat vor allem in der Leber und Milz statt. (Teufel et al., 2008)

HSCs sind multipotente Ursprungszellen der Hämatopoese, die aus dem Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut gewonnen werden können. Sie können sich selbsterneuern oder sich in alle Linien des hämatopoetischen Systems differenzieren. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung ist für die Homöostase von entscheidender Bedeutung, weil die Lebensdauer reifer Blutzellen sehr kurz ist (Pazianos et al., 2003).

Zur Identifikation der HSCs werden Expressionsmuster von Oberflächenantigenen, „Cluster of Differentiation“ (CD-Antigene) verwendet. Die Oberflächenantigene CD34 und CD133 stellen Marker der frühen Stammzellen des hämatopoetischen Systems dar. Linien-determinierte Zellen weisen eine Expression von Oberflächenmarkern wie CD3, CD38, CD30, CD33, CD71, CD41, CD61, CD117 auf. Die Oberflächenmarker CD34 und CD133 gehen mit der Differenzierung der HSC verloren (Julius M. Cruse, 2004; Velten et al., 2017).

2.2 Expansion von HSCs

Eine effiziente Expansion von HSCs könnte in vielen klinischen und wissenschaftlichen Bereichen Anwendungen finden. Aus diesem Grund versuchen zahlreiche Arbeitsgruppen seit mehr als 20 Jahren unter Erhalt der Pluripotenz der HSCs ihre Zellzahl in Kultur zu erhöhen (Fares et al., 2017; Nishimura et al., 2019; Wilkinson et al., 2019; Zhang et al., 2008). Im Rahmen einer Stammzelltransplantation (SZT) würde die Expansion von HSCs eine Transplantation von einer höheren Zellzahl erlauben, was zu einem besseren Überleben und einem besseren Engraftment dieser Zellen im Knochenmark von Rezipienten führen könnte (Paul et al., 2016). *Ex vivo* expandierte HSCs aus

menschlichem Nabelschnurblut könnten eine wichtige Zellquelle für die Anwendung beim Erwachsenen darstellen (Brunstein and Wagner, 2006).

Die am häufigsten verwendeten Agonisten für die Selbsterneuerung von HSCs sind Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in flüssigen Medien bereitgestellt werden. Zu den üblichen Komponenten dieser Medien gehören Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-3 (IL-3), Megakaryozyten-Wachstums- und Entwicklungsfaktor (MGDF), Erythropoietin (EPO), Interleukin-6 (IL-6), Thrombopoetin (TPO), Ligand der FMS-ähnlichen Tyrosinkinase 3 (Flt-3-L), kleine Moleküle wie StemRegenin-1 und UM171, aber auch andere Faktoren wie Pleiotrophin (Himburg et al., 2010; Wagner et al., 2016). In flüssigen Wachstumsmedien werden Zytokine normalerweise in Kombination mit fetalem Rinderserum, Humanserum oder Rinderserumalbumin und Insulin expandiert. Solche Kulturbedingungen können HSCs im Allgemeinen für 1 - 2 Wochen *ex vivo* aufrechterhalten (Wilkinson et al., 2020a). Eins der Probleme bei der Expansion ist allerdings die Degradation der Telomere mit nachfolgenden Proliferationszyklen, was angeblich durch Flt-3-L und TPO verhindert werden kann (Gammaitoni et al., 2004; Glimm et al., 2000). SCF und IL-6 wurde von Piacibello et al. (1998) die Aufgabe der Erhöhung des proliferativen Potenzials der HSCs und damit der Anzahl der verfügbaren HSCs zugeschrieben.

Flt-3 gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren der Klasse III, die unter anderem den SCF-Rezeptor einschließt (Tsapogas et al., 2017). Rosnet et al. (1991) und Matthews et al. (1991) zeigten, dass Flt-3 speziell durch frühe hämatopoetische Progenitoren mit Stammzellaktivität exprimiert wird, während reife Blutzellen keine Flt-3-Expression aufweisen. McKenna et al. (1995) zeigten, dass die Zugabe von Flt-3 zu humanen bestrahlen CD34⁺ Zellen die Expansion von Progenitorzellen förderte, welche vermehrt den Flt-3-Rezeptor exprimierten. Die Gruppe zeigte aber auch, dass Flt-3 keine potente Wirkung auf die Bildung von koloniebildenden Einheiten durch erythropoetisch determinierte Vorläuferzellen (CFU-E) hatte. Flt-3-L ermöglicht die Wirkung von Flt-3 und unterstützt somit die Proliferation und das Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Hannum et al., 1994; Lyman et al., 1993a).

Noch ein Agonist der HSC-Erneuerung ist der SCF, auch bekannt unter der Bezeichnung Kit-Ligand. Er ist ein essenzieller Regulator der Hämatopoese, der vor allem auf primitive hämatopoetische Vorläuferzellen wirkt (Zsebo et al., 1990). *Ex vivo* entfaltet SCF seine Wirkung auf hämatopoetische Vorläuferzellen, indem er synergistisch mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, IL-3 und Flt-3-L ihre Expansion und ihre Bildung von CFU stimuliert (Broxmeyer et al., 1991; Jacobsen et al., 1995; Lyman et al., 1993b; McNiece et al., 1991). In Mäusen führt die Deletion des Kit-Liganden oder des

Gens, das für seinen Rezeptor CD117 (Kit), kodiert, zum Verlust der Selbsterneuerungsfähigkeit von HSCs (Edling and Hallberg, 2007). Eine Deletion des negativen Regulators der CD117-Signalisierung Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1 (SPRED1) führt im Gegensatz dazu zu einer erhöhten Selbsterneuerung von HSCs (Tadokoro et al., 2018)

Weiter ist TPO ein wichtiger Agonist der HSC-Erneuerung. Eine Deletion sowohl des TPO kodierenden Gen *Thpo*, als auch des Thrombopoietin-Rezeptor kodierenden Gens *Mpl* (myeloproliferatives Leukämieprotein) führt in Mäusen zu einem reduzierten Selbsterneuerungspotenzial von HSCs (Tadokoro et al., 2018). Bereits vor mehr als 20 Jahren zeigte die Gruppe von Liu et al. (1999), dass nach Behandlungen mit TPO die Expansionskapazität von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, aus Neugeborenenblut und aus humanem Knochenmark signifikant erhöht war, was zu einer größeren Produktion von frühen Vorläuferzellen (CD34⁺CD38⁻ Zellen) und von CFUs der Granulozyten-Makrophagen- und Megakaryozyten-Linien führte.

Eine robuste *ex vivo* Expansion von humanen HSCs kann auch ein potentes kleines Molekül UM171, ein Pyrimidoindol-Derivat, auslösen. Der Mechanismus, der für diese Expansion verantwortlich ist, ist immer noch unbekannt. Kumar and Geiger (2017) spekulierten, dass UM171 entweder in die Regulation von reaktiven Sauerstoffspezies oder in die mitochondriale oder metabolische Funktion eingreifen kann, die die Selbsterneuerung und Expansion von HSCs ermöglicht. Bekannt ist, dass UM171 unabhängig vom AhR-Signalweg den Pool an primitiven HSCs erhöht (Papa et al., 2020) und dass UM171 auf murine HSCs nicht wirken kann (Boitano et al., 2010; Fares et al., 2014).

Schließlich ist die Stabilität der im Medium enthaltenen Zytokine für eine optimale HSCs-Expansion von Bedeutung. Wilkinson et al. (2020a) zeigten, dass sich humane HSCs in Anwesenheit vom synthetischen Polymer Polyvinylalkohol (PVA) dank seiner zytokinstabilisierenden Aktivität erfolgreich expandieren lassen.

In den letzten 2 Jahrzehnten haben mehrere Studien nahegelegt, dass eine HSC-Expansion *ex vivo* tatsächlich möglich sein könnte. Dies basiert auf einem besseren Verständnis der HSC-intrinsischen sowie nischenspezifischen Faktoren, die die Selbsterneuerung von HSCs *in vivo* regulieren, und die zu neuartigen, mutmaßlichen Strategien der Expansion von HSCs *ex vivo* führten. Nichtsdestotrotz werden in naher Zukunft zweifellos verschiedene Modalitäten, Strategien und Methoden für die HSC-Expansion aufkommen, und es wird spannend sein, solche Fortschritte in der Stammzellforschung zu verfolgen (Kumar and Geiger, 2017).

2.3 Mesenchymale Stammzellen

Vom mesodermalen Keimblatt stammende mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind adhärenente, Fibroblasten-ähnliche Zellen, die sich zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können und über ein Selbsterneuerungspotenzial verfügen (Baksh et al., 2004). Laut der International Society for Cellular Therapy lassen sich Zellen als MSCs bezeichnen, wenn sie folgende Kriterien vorzeigen: Adhärenz zu Plastik; Differenzierung zu Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten unter Standard *in vitro* Differenzierungsbedingungen; Expression von Oberflächenmarkern CD105, CD73, CD90 bei Nicht-Vorkommen von CD45, CD34, CD11b, CD79 alpha, CD19, HLA-DR (Dominici et al., 2006). Sie können unter anderem aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe, der Plazenta, dem Fruchtwasser, der Skelettmuskulatur, der Zahnpulpa, dem Thymus und dem peripheren Blut isoliert werden.

MSCs spielen eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Erstens bieten sie eine geeignete Mikroumgebung für die Hämatopoese, indem sie das Knochenmarksstroma bilden. Zweitens sezernieren sie Wachstumsfaktoren, Zytokine und extrazelluläre Matrix (EZM), die die Hämatopoese unterstützen. Shyu et al. (2004) und Du et al. (2013) zeigten, dass von MSCs sezernierende Wachstumsfaktoren wie der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), SCF und IL-3 für die Erhaltung des Stammzellcharakters essentiell sind. Drittens beteiligen sich die MSCs an der Regulation der Hämatopoese durch die Zell-Zell-Interaktionen mit den HSCs (Méndez-Ferrer et al., 2010). Zusammen mit hämatopoetischen Zellen stellen MSCs eine wichtige Funktionseinheit in der Hämatopoese dar, die in zahlreichen hämatologischen Neoplasien im Vordergrund steht.

Als Beispiel für pathologische Veränderungen von MSCs lässt sich einführen, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A, der leukämiehemmende Faktor und der Wachstumsfaktor Angiopoietin-like 5 (Angptl-5) in MSCs von Patienten mit einem myelodysplastische Syndrom (MDS) signifikant hochreguliert sind. In Kokultivierungsversuchen zeigte sich, dass die Hochregulierung von z. B. leukämiehemmenden Faktoren in gesunden MSCs durch den Kontakt mit MDS-HSCs im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen deutlich stärker induziert wurde (Medyouf et al., 2014). Das liefert Hinweise darauf, dass hämatopoetische Progenitorzellen die Knochenmarknische so beeinflussen, dass sie wiederum günstige Wachstumsbedingungen für die MDS-Zellen schafft. Aber auch MSCs beeinflussen ihrerseits die hämatopoetischen Progenitorzellen und treiben dadurch die MDS-Entwicklung voran. In Arbeiten von Medyouf et al. (2014) zeigte sich, dass die Kotransplantation von MSCs aus MDS-Patienten bessere Transplantationsergebnisse im Vergleich zu alterskontrollierten MSCs aus gesunden Spendern lieferten. Aus den oben

genannten Gründen stellen die Manipulation an der gestörten Knochenmarknische und Korrektur der gestörten Signalwege ein Meilenstein für die Therapie von vielen hämatologischen Neoplasien inklusive MDS dar.

2.4 Myelodysplastisches Syndrom

2.4.1 Definition und Epidemiologie

MDS ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems, die sich durch zu Panzytopenien führende Dysplasien von Blut- und Knochenmarkszellen und erhöhtes Progressionsrisiko in eine akute myeloische Leukämie (AML) auszeichnet (Pellagatti and Boulwood, 2015). Die Krankheit ist in ihrer Ausprägung, Verlauf und Prognose heterogen, was die Identifikation der genaueren Entstehungsmechanismen, die auch potentielle therapeutische Ziele darstellen würden, erschwert.

Es gibt 3 "Säulen", die eine Diagnose von MDS unterstützen. Die Absolute Voraussetzung für die Diagnose sind anhaltende und klinisch unerklärliche Zytopenien. Als nächstes spricht für MDS mit einer Ausnahme von Fällen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen das Vorhandensein von morphologischen Dysplasien der hämatopoetischen Elemente. Die dritte Säule stellen bestimmte zytogenetische und/oder molekulargenetische Hinweise auf klonale Hämatopoese dar. (Hasserjian, 2019) Allerdings ist gemäß der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO-Klassifikation) aus dem Jahr 2016 das Vorhandensein von MDS-assoziierten zytogenetischen Anomalien wie Monosomie 7, 7q-Deletion, 5q-Deletion und Isochromosom 17q, ausreichend, um die Diagnose eines MDS bei einem zytopenischen Patienten zu bestätigen, selbst wenn keine signifikante Dysplasie vorliegt (Swerdlow SH, 2017). Bei Vorliegen einer SF3B1-Mutation mit mindestens 5 % Ringsideroblasten kann die Diagnose eines MDS mit Ringsideroblasten (MDS-RS) gestellt werden, während bei Fehlen einer SF3B1-Mutation oder bei unbekanntem Mutationsstatus 15 % Ringsideroblasten erforderlich sind (Cazzola et al., 2013).

Die Inzidenz von MDS liegt bei circa 5-13/100 000 pro Jahr und betrifft vorwiegend Patienten über sechzig Jahren mit einem starken Anstieg der Erkrankungsfälle auf > 60/100 000 (Bejar and Steensma, 2014; Cazzola, 2020; Cogle, 2015; Garcia-Manero, 2012; Mufti et al., 2018; Neukirchen et al., 2011). In Anbetracht der gegenwärtigen demographischen Entwicklung wird die Relevanz von MDS in den nächsten Jahren zunehmen und eine intensive Beachtung und Auseinandersetzung ist notwendig, um schwerwiegende Folgen dieser Erkrankung zu verhindern.

2.4.2 Pathogenese

Die Pathogenese des MDS ist sehr komplex und ist noch nicht ausreichend untersucht worden. Es wird vermutet, dass es in Folge einer allmählichen Akkumulation genomischer Schäden wie chromosomaler Aberrationen, Punktmutationen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und epigenetischer Veränderungen im Verlauf zum Auswachsen MDS-typischer hämatopoetischer Klone im Knochenmark kommt. Die dadurch selektionierten malignen Stammzellen verdrängen dabei die gesunde Hämatopoese, sodass bei Aufweisen von eindeutigen Dysplasiezeichen durch mindestens 10 % der Zellen einer Zellreihe die Diagnose eines MDS gestellt werden kann (Hasserjian, 2019).

Es werden primäre von den sekundären Formen je nach Ätiologie des MDS unterschieden. Bei den primären Formen der MDS sind Keimbahnmutationen, wie die DDC41 Mutation, für das Auftreten der Erkrankung ursächlich. Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Akkumulation von zu primären MDS führenden, erworbenen Mutationen stellt die langjährige Exposition (10-20 Jahre) gegenüber benzolhaltigen Stoffen oder anderen organischen Lösungsmitteln dar, wovon Maler, Lackierer, Bedienstete von Flughäfen in Rente betroffen sein können (Awada et al., 2020).

Zu den sekundären Formen der MDS gehören unter anderem die therapieassoziierten MDS-Formen (t-MDS), die circa 10 % aller MDS-Formen ausmachen. Sie treten durchschnittlich 2 – 6 Jahre nach Chemo- und/oder Strahlentherapie auf. In diesem Zusammenhang ist die Behandlung mit Alkylantien mit einer anschließenden Bestrahlungstherapie im Rahmen von z. B. Therapie von Lymphomen und Mamma-Karzinomen als Risikofaktoren für eine MDS-Entwicklung besonders hervorzuheben (Sweeney et al., 2019). Patienten mit t-MDS weisen häufig TP53- oder PPM1D-Mutationen und einen komplexen Karyotyp auf. Diese Patienten wurden aus dem Revised International prognostic scoring system (IPSS-R) ausgeschlossen und sollten als Patienten mit sehr hohem Krankheitsrisiko betrachtet werden (Wong et al., 2015).

Insgesamt lässt sich bei 90 % aller MDS-Patienten mindestens eine der MDS-typischen Mutationen nachweisen (Zhou et al., 2012). Der Großteil der Patienten (65 %) mit MDS weisen Mutationen im Splicing-Apparat (SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2) auf, die typischerweise Treibermutationen darstellen (Papaemmanuil et al., 2013). Knapp bei der Hälfte aller Patienten (47 %) lassen sich Mutationen der DNA-Methylierungsgene (DNMT3TA, IDH1/2, TET2) finden (Delhommeau et al., 2009), knapp bei einem Drittel der Patienten (28 %) liegen Mutationen der Histon-Modifikation-Gene (ASXL1, BCOR, EZH2) vor (Haferlach et al., 2014; Nikoloski et al., 2010). Aufgrund der Überaktivierung des p38 MAPK-Signalwegs, der Signalwege des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) und des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF- β) lässt sich bei MDS eine erhöhte

Apoptoserate von Zellen feststellen (Allampallam et al., 2002; Navas et al., 2008). Eine weitere häufig beobachtete MDS-Anomalie ist die relative Abnahme der Megakaryozyten-Erythroid-Progenitorzellen, was auf einen relativen Differenzierungsstopp von myeloischen Progenitorzellen zu Megakaryozyten-Erythroid-Progenitorzellen hindeutet, obwohl die genauen molekularen Ereignisse, die zu diesem Differenzierungsstopp führen, noch nicht geklärt sind (Shastri et al., 2017).

Die Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (del (5q)) die bei ungefähr 10 - 15 % der MDS-Patienten vorliegt, stellt eine der häufigsten zytogenetischen Anomalien dar (List et al., 2018). Sie tritt vor allem bei Frauen auf, ist mit einer schweren makrozytären Anämie, normaler oder erhöhter Thrombozytenzahl mit hypolobulierten Mikromegakaryozyten und einer niedrigen Progressionsrate zur AML assoziiert (Van den Berghe et al., 1974). Aufgrund dieser typischen Merkmale wird sie in der WHO-Klassifikation 2016 als eigenständige Entität behandelt. Mit einer Ausnahme von Patienten mit Anomalien von Chromosom 7 gehören Patienten, die neben der del (5q) andere chromosomale Aberrationen aufweisen, ebenso zur WHO-Gruppe der MDS mit del (5q) (Bennett, 2016). Weiter wurde in neueren Studien gezeigt, dass neben den akkumulierten somatischen Mutationen der hämatopoetischen Progenitorzellen ihre Interaktion mit der Knochenmarksnische eine führende Rolle in der MDS-Pathogenese einnimmt. Das heißt, dass alleine genetische Schäden im Bereich des Knochenmarkstromas ausreichend sind, um einen MDS-Phänotyp zu erzeugen (Medyouf et al., 2014).

Nach einem anderen Modell der MDS-Entstehung stellt MDS eine späte Manifestation chronischer Entzündungen dar. Das Modell lässt sich durch Beobachtungen von Wilson et al. (2014) erklären: In der Studie von dieser Arbeitsgruppe hatten Patienten mit jeglichen Autoimmunerkrankungen ein erhöhtes Risiko für die MDS-Entwicklung.

Zusammenfassend zur Pathogenese vom MDS lässt sich sagen, dass die Existenz und Essenz von dysplastischen, präleukämischen Stammzellen in Maus- und Humansystemen eindeutig nachgewiesen wurden. Allerdings ist fast nichts über die molekularen Mechanismen bekannt, die zur Bildung und Progression der Erkrankung führen (Shirai et al., 2015). Dies wird ein Hauptschwerpunkt der laufenden und zukünftigen Forschung sein.

2.4.3 Klinisches Erscheinungsbild

Klinisch präsentieren sich die MDS-Patienten mit einem Leistungsabfall, erhöhter Infektanfälligkeit und Blutungen, die durch die Zytopenien aller drei Zellreihen im Blut hervorgerufen werden (Tefferi et al., 2005). Eine Bi- oder Panzytopenie liegt allerdings nur bei einem Drittel der Patienten vor (Germinig et al., 2013).

Das häufigste MDS-Symptom und die häufigste MDS-Erstmanifestation (70 - 80 %) stellt die Anämie dar. Sie macht sich durch erhöhte Müdigkeit, Blässe, Tachykardie und Dyspnoe bemerkbar. Meist zeigt sie sich als Zufallsbefund im Rahmen Routineuntersuchung beim Hausarzt (Montalban-Bravo and Garcia-Manero, 2018).

Wiederkehrende Infektionen, über die etwa ein Drittel der Patienten klagt, sind durch eine Neutropenie oder eine Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten (z. B. beeinträchtigte Chemotaxis und Abtötung von Mikroorganismen) bedingt (Boogaerts et al., 1983; Pomeroy et al., 1991).

Eine Thrombozytopenie, die bei der MDS-Erstdiagnose bei jedem zweiten festzustellen ist, bleibt meist asymptomatisch. Manchmal kommt es zu Petechien, Zahnfleischbluten und Hämatomneigung. Allerdings präsentiert sich die Erkrankung bei circa 19 % der MDS-Patienten klinisch mit schweren Blutungen (Blutung des Gastrointestinaltraktes, im Bereich der ableitenden Harnwege, in der Retina oder im Zentralnervensystem) (Neukirchen et al., 2009). In 10 - 20 % der Fälle stellen Blutungen die Todesursache der MDS-Patienten dar (Kantarjian et al., 2006; Nachtkamp et al., 2016).

2.4.4 Klassifikation und Prognose

WHO-Klassifikation 2016 und IPSS-R zusammen ermöglichen neben der Einteilung von MDS-Patienten nach Risikogruppen eine Prognosestratifizierung und Auswahl einer geeigneten Therapie (Bennett, 2016; Neukirchen et al., 2014). Für die Ermittlung der beiden Scores stehen eine Zytomorphologie, Histologie und eine Chromosomenanalyse der Zellen aus dem Blut und Knochenmark der Patienten im Mittelpunkt.

Die WHO-Klassifikation 2016 erlaubt neben der Unterteilung von MDS in verschiedenen Subtypen eine Unterscheidung zwischen reinem MDS und einer Gruppe von gemischten myelodysplastisch-myeloproliferativen Neoplasien. Es wird zwischen MDS mit Ein- und Mehrliniendysplasie, MDS mit Ringsideroblasten mit jeweils Ein- oder Mehrliniendysplasie, MDS mit del (5q), MDS mit Blastenvermehrung von 5 - 9 % und von 10 - 19 %, unklassifizierbarem MDS, MDS mit nur 1 % peripheren Blasten, MDS mit Einliniendysplasie und Panzytopenie und schließlich MDS auf der Grundlage definierender zytogenetischer Veränderungen unterschieden (Bennett, 2016). Nach der WHO-Klassifikation 2016 müssen mindestens 10 % der Zellen einer Abstammungslinie dysplastische Merkmale aufweisen, um als signifikant zu gelten (Vardiman et al., 2009). Allerdings ist keins der Dysplasiezeichen pathognomonisch für MDS, da auch Zellen von Patienten mit myeloproliferativen Syndromen, AML und anderen hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankungen ähnliche Dysplasien aufweisen können (Bain, 1996; Germing et al., 2013; Parmentier et al., 2012; Steensma, 2012). Selbst wenn bei einem

zytopenen Patienten signifikante morphologische dysplastische Veränderungen festgestellt werden, müssen die möglichen zugrundeliegenden sekundären Ursachen der Zytopenie und hämatopoetischen Dysplasie sorgfältig ausgeschlossen werden, bevor die Diagnose MDS gestellt werden kann. Am Rande sei auch erwähnt, dass der Typ der Dysplasie nicht immer mit dem Typ der Zytopenie bei MDS übereinstimmt (Germing et al., 2012; Maassen et al., 2013; Verburch et al., 2007).

Der IPSS-R dient vor allem der Abschätzung der Prognose bei MDS (Bennett, 2016; Neukirchen et al., 2014). Für ihre Ermittlung werden der medulläre Blastenanteil, zytogenetische Befunde, der Transfusionsbedarf, Blutzellwerte, der Blut-Spiegel von Laktatdehydrogenase, das Alter, das Geschlecht und Komorbiditäten herangezogen (Greenberg et al., 2012). Der IPSS-R ermöglicht die Einteilung in niedrigere (Low und Intermediate-1) und höhere (Intermediate-2 und High) Risikokategorien. Die Subtypen mit höherem Risiko sind mit höheren Blastenzahlen, einem erhöhten Risiko für eine leukämische Transformation und einem kürzeren medianen Gesamtüberleben verbunden. Während die der niedrigeren Risikokategorie zugeordneten Patienten eine mediane Überlebenswahrscheinlichkeit von 3 - 5 Jahren haben, liegt die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit zur höheren Risikokategorie gehörenden Patienten bei 1 - 2 Jahren (Greenberg et al., 2012).

Weiter wird im MDS-Prognosescore der Mutationsstatus der Patienten berücksichtigt. Mutationen von TP53, EZH2, ETV6, RUNX1 und ASXL1 werden als unabhängige Prädiktoren für ein schlechtes Überleben bei Patienten mit MDS angesehen (Bejar et al., 2011). Davon sind die Mutationen von TP53, RUNX1 und ASXL1 mit einer höheren Rückfallrate und einem geringeren Überleben nach allogener SZT bei MDS und MDS/AML assoziiert (Della Porta et al., 2016). Als ein weiteres Beispiel lässt sich die bei 20 - 30 % der MDS-Patienten auftretende SRCF2-Mutation einführen, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für einen Übergang in die Leukämie assoziiert ist (Papaemmanuil et al., 2013). Insgesamt korreliert die Anzahl der Treibermutationen mit dem medianen leukämiefreien Überleben, und eine zunehmende Anzahl von Treibermutationen verringert signifikant das Überleben (Papaemmanuil et al., 2013). Im Gegenzug wird die Mutation des Splicingsfaktors SF3B1 mit einem besseren Outcome und längerem Gesamtüberleben in Zusammenhang gebracht (Garcia-Manero and Fenaux, 2011).

Der Transfusionsbedarf wird ebenso im MDS-Score-Systemen berücksichtigt. Harnan et al. (2016) zeigten eine um 62 % gesteigerte Mortalität bei transfusionsabhängigen MDS-Patienten im Vergleich zu transfusionsunabhängigen Patienten, sowohl bei denjenigen, die bereits bei der Rekrutierung transfusionsabhängig waren, als auch bei denjenigen, die die Transfusionsabhängigkeit durch die Behandlung erreichten.

Weiter ist die LDH-Aktivität ein wichtiger prognostischer Faktor bei MDS. Die Daten von Wimazal et al. (2001) zeigen, dass eine Serum-LDH-Aktivität von ≥ 300 U/l bei MDS mit einem signifikant kürzeren Überleben und einem höheren Risiko, in eine AML zu transformieren, verbunden ist.

2.4.5 MDS-Modelle

Als Vermittler der molekularen Mechanismen bei MDS werden genomische Schäden angesehen, deren Untersuchung in transgenen Mausmodellen möglich ist. Im Rahmen der Experimente mit MDS-transgenetischen Mausmodellen wurde unter anderem mit Genen Sf3b1K700E (Obeng et al., 2016), Srsf2P95H (Kim et al., 2015), EZH2 (Mochizuki-Kashio et al., 2015), ASXL1 (Abdel-Wahab et al., 2013), U2AF1 S34F (Shirai et al., 2015) gearbeitet. Die transgenen Mausmodelle bilden ein phänotypisch MDS-ähnliches Krankheitsbild ab. Sie beruhen allerdings auf monogenen Defekten oder auf die Kombination von zwei Defekten und können aus diesem Grund die Heterogenität der MDS-Entstehung im Menschen nicht realitätsnah simulieren. Die Mehrzahl der MDS-Patienten weist multiple somatische Mutationen auf, die bei Akkumulation die klonale Evolution antreiben könnten. Die genauen funktionellen Mechanismen in Kombinationen zahlreicher Mutationen sind noch nicht aufgeklärt, auch wenn einige Paare genetischer Mutationen in Mausmodellen bereits untersucht worden sind.

2.4.6 MDS-Xenograftmodelle

Mit dem Ziel, Limitationen der monogenen Tier-Modelle zu umgehen, arbeiten zahlreiche Gruppe seit circa 20 Jahren an der Entwicklung eines Patienten-spezifischen Xenograftmodells (PDX) von MDS.

Für das Tier-Modell wurden unterschiedliche murine Stämme in verschiedenen Lebensabschnitten genommen (NOG, NSG, NSG-S, MISTRG), wobei NSG-Stämme als sehr gute Rezipienten im Vergleich zu anderen identifiziert werden konnten (Thanopoulou et al., 2004). Es wurde mit unterschiedlichen Zellen und Zellkonzentrationen sowohl aus dem Knochenmark als auch aus dem peripheren Blut experimentiert: unter anderem mit MNCs, CD3-verarmten Zellen und CD34⁺ Zellen. In diesem Zusammenhang stellten mehrere Gruppen fest, dass die T-Zell-Depletion des primären MDS-Tumors, entweder durch Behandlung mit einem humanen CD3-Antikörper oder durch physische Abtrennung, eine Voraussetzung zur Vorbeugung der Graft-versus-Host-Krankheit ist (Côme et al., 2020; Martin et al., 2010; Rouault-Pierre et al., 2017; Song et al., 2019; Wunderlich et al., 2014; Wunderlich et al., 2010). Weiter wurden die Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von MSCs aus dem Knochenmark transplantiert. Ob die Koinjektion von MSCs zu besseren Engraftmentraten führt, ist bisher nicht abschließend geklärt.

Während einige Arbeitsgruppe von einer Förderung des Engraftments bei Anwesenheit von MSCs berichteten, konnten andere Gruppen diesen Effekt nicht bestätigen (Krevvata et al., 2018; Medyouf et al., 2014; Muguruma et al., 2011; Pang et al., 2013; Rouault-Pierre et al., 2017). Für die Injektion der Zellen wurden verschiedene anatomische Stellen (intravenös, intrafemoral, intrahepatisch) getestet, wobei die höchsten Engraftmentraten bei intrafemorale Injektionen erzielt wurden (Côme et al., 2020).

Insgesamt wurden mehrere Versuche unternommen, ein robustes Xenotransplantationsmodell in immundefizienten Mäusen zu generieren, aber diese haben inkonsistente, vorübergehende und niedrige Transplantationsraten gezeigt. Außerdem ist die Unterscheidung zwischen normalen HSC und MDS-Stammzellen in murinen Knochenmark aufgrund der fehlenden Zelloberflächenmarker zur Identifizierung von MDS-HSCs und des Vorhandenseins von MDS-typischen zytogenetischen Läsionen nur bei der Hälfte der MDS-Patienten sehr schwierig (Martin et al., 2010; Medyouf et al., 2014; Muguruma et al., 2011; Thanopoulou et al., 2004). Ein hohes „Engraftment“ (über 60 %) in immundefizienten Mäusen ist aufgrund der schlechten Wachstumseigenschaften von primären MDS-Zellen nicht von jedem Patienten zu erreichen. Es wurde festgestellt, dass bei MDS mit niedrigem Risiko die Transplantation in den meisten Fällen fehlschlug, während bei MDS-Proben mit höherem Risiko bessere, aber immer noch sehr begrenzte Transplantationsraten erzielt wurden (Martin et al., 2010).

Für die weitere Entwicklung von MDS-PDX-Modellen kommen die humanisierten Knochenmark-ähnlichen Strukturmodelle (hBMLS) in Frage. hBMLS stellen mit Stromazellen besiedelten 3D-Trägergerüste dar, die s. c. in Rezipienten implantiert werden. Ihr Ansatz in Arbeiten von Abarategi et al. (2017) und Reinisch et al. (2016) beim Arbeiten mit AML-Zellen war sehr erfolgreich: hBMLS ermöglichten das Engraftment von Proben, die in das Knochenmark von immundefizienten Mäusen nicht einwachsen würden. Intravenös injizierte leukämische Zellen expandierten sich in hBMLS früher und mit höherer Frequenz als im Knochenmark von Mäusen. Schlussfolgernd bevorzugen leukämische Zellen vergleichend mit dem murinen Knochenmark die hBMLS-Nische, die eine humanisierte Version der Knochenmarks-nische darstellt (Antonelli et al., 2016; Reinisch et al., 2016). Aus oben genannten Gründen schlugen Côme et al. (2020) für die weitere Entwicklung von MDS-PDX-Modellen hBMLS vor.

Zusammenfassend wird die Erhöhung der Anzahl von MDS-PDX-Modellen uns ermöglichen, das breite genetische und phänotypische Spektrum der menschlichen MDS umfassender abzudecken und Werkzeuge zur Verfügung stellen, um wichtige Aspekte der MDS-Biologie anzugehen. Deshalb sollte an der Etablierung eines optimalen MDS-Xenograftmodells weitergearbeitet werden.

2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Xenotransplantationsmodelle mit HSCs von Patienten mit MDS in NOD.Cg-Prkdcid112rgtm1Wjl/Szj (NSG) Mäusen haben sich als vielseitige präklinische Plattform erwiesen (Medyouf et al., 2014). Allerdings ist die geringe Anzahl CD34⁺ patientenspezifischer Stammzellen, die aus Knochenmarksbiopsien von MDS-Patienten isoliert werden können, der limitierende Faktor für diese Modelle.

Effiziente Protokolle zur *in vitro* Expansion von aus Nabelschnurblut isolierten humanen HSCs wurden bereits etabliert und führten zu einer erhöhten Zellanzahl, ohne dass der Stammzellcharakter der Zellen verloren ging (Fares et al., 2014; Zhang et al., 2008; Wilkinson et al., 2018). Diese Kultivierungsbedingungen sollen in dieser Arbeit für die Expansion von HSCs von MDS-Patienten verwendet werden. Danach werden expandierte und nicht-expandierte HSCs zusammen mit patientenspezifischen MSCs transplantiert.

Durch die Expansion von Stammzellen aus MDS-Knochenmark in unterschiedlichen Kulturmedien und anschließende Xenotransplantation dieser Zellen werden in der hier vorgelegten Dissertation folgende Fragestellungen verfolgt:

1. Ist eine *in vitro* Expansion von CD34⁺ HSCs aus MDS-Knochenmark unter Erhalt ihres Stammzellcharakters möglich?
2. Mit welcher von in dieser Arbeit untersuchten Expansionsmedien lässt sich das Proliferationspotential von Stammzellen aus MDS-Knochenmark bei maximaler Hemmung des Differenzierungspotenzials steigern?
3. Sind expandierte MDS-Stammzellen in der Lage, sich im Knochenmark von Immunsuppressiven Mäusen einzunisten?
4. Inwieweit unterscheidet sich das Einnistungspotential von expandierten CD34⁺ HSCs aus MDS-Knochenmark vom Einnistungspotential von nicht-expandierten Zellen?
5. Lässt sich die Einnistung der expandierten MDS-Stammzellen im murinen Knochenmark durch die Erhöhung der transplantierten Zellen verbessern?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

Geräte:

Gerät	Hersteller
BD FACSMelody Cell Sorter	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Eismaschine	Northern Labs, Manitowoc, WI, USA
Freezing container, Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gefrierscrank -20 °C	Liebherr International, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierscrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Heiz- und Wärmeplatte	Medax GmbH, Neumünster, Deutschland
Inkubator 37 °C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Kleine Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank +4 °C	Liebherr International, Biberach an der Riß, Deutschland
Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sterilbänke	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Veterinärnästhesie-Verdampfer VIP 3000	Midmark Corporation, Dayton, OH, USA
Vi-CELL XR	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortex	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Software:

Software	Hersteller / Homepage
BD FACS Diva™ Software v 8.0.1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BioRender	https://biorender.com
FlowJo 10.4.1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
GraphPad Prism 9.0 für Mac	Graph Pad Software, SanDiego, Kalifornien, USA
Microsoft Excel 16.46 für Mac	Microsoft
Vi-CELL XR Software 2.06.2.	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Kit Systeme:

Kit	Hersteller	Katalognr.
MidiMACS Starting Kit (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-301

Antikörper:

Antikörper	Hersteller	Fluorochrom	Isotyp	Katalognr
Antihuman-CD34	BioLegend, San Diego, CA, USA	R-phycoerythrin/Cyanin 7 (PE/Cy7)	Maus IgG2ak	343615
Antihuman-CD38	BioLegend, San Diego, CA, USA	Allophycocyanin (APC)	Maus IgG1k	356605
Antihuman-CD45	BioLegend, San Diego, CA, USA	R-phycoerythrin (PE)	Maus IgG1k	304008
Antihuman-Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56)	BioLegend, San Diego, CA, USA	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Maus IgG1k	348701
Antimurin-CD45	BioLegend, San Diego, CA, USA	Allophycocyanin/Cyanin 7 (APC/Cy7)	Ratte IgG2bk	103115

Reagenzien:

Substanz	Hersteller	Katalognr.
autoMACS Running Buffer – MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-091-221
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	09830
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	09718
Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Dexapanthenol 5 %	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland	01578675
Buffer RLT Plus (220ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland	1053393
Busulfan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	B2635
Carprofen	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA	16409
CD45 Microbeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-045-801
Desinfektionsmittel Octenisept	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland	6284986
DMSO	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland	A3672,0100
DNase I, RNase-free (1 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	EN0521
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (500ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	21600010
EDTA (0,5 M)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	10458654
Fc γ -Rezeptorblocker, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-059-901
Fc γ -Rezeptorblocker, murin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092-575
Ficoll-Paque™ PREMIUM	Cytiva Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA, USA	17544202
FKS	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada	100-0179
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	88284

HEPES-Puffer (1 M)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	15630080
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland	PZN: 6497131
Methocult H4434	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada	04434
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	K305.1
OMNIFIX Heparin 10 000IE	Braun AG, Melsungen, Deutschland	PZN: 00569898
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	15140122
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	R0883
StemMACS™ MSC Expansion Media Kit XF, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-104-182
StemSpan SFEM II Medium	Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada	09655
SYTOX™ Blue Dead Cell Stain	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	S34857
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	25300062

Herstellung von RCLB:

Reagenz	Konzentration
NH ₄ CL 1,5 M	8,29 % (w/v)
NH ₄ HCO ₃ 0,1 M	0,79 % (w/v)
EDTA (0,5 M)	1 mM

Verbrauchsmaterialien:

Material	Hersteller	Katalognr.
1 ml Kryoröhrchen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland	3421457
10 ml Kunststoff-Einwegpipetten	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA	357551
100 µm Zellsieb	BD Bioscience, San Jose, CA, USA	352360
15 ml Röhrchen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	11507411
18 Gauge stumpfe Kanüle	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	305180
25 cm ² Zellkulturflaschen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	156367
5 ml Spritze	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	10012022
50 ml Röhrchen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	10788561
6-Well-Platte, Nunc	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	140675
75 cm ² Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	156499
Deckgläser 160 µm Dicke, Ø15 mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland	MZ-0030
Einmal-Insulinspritze 26 G	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	613-3835 324825
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030121023

Falcon™ Rundboden- Teströhrchen aus Polystyrol mit Schnellverschluss und Zellsieb, 5 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	10585801
Laborpipetten 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3123000020; 4925000103; 3124000083; 3124000121
Microlance Kanüle 24 G 1 0,55 x 25 mm	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	PZN: 03495574
MS Columns plus tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-122-727
Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	VT0210; VT0230; VT0240; VT0270
VI-CELL™ XR 4 VIALS	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	383721

3.2 Zellkultur und Primärzell-Isolation von CD34-positiven Zellen

3.2.1 Patienten und Kontrollproben

In dieser Arbeit wurden Zellen aus Knochenmarkaspiraten von 25 MDS-Patienten der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim verwendet. Im Rahmen der Knochenmarkpunktion (KMP) wurde mittels Yamshidi-Punktionsnadel ca. 20 ml Knochenmark aspiriert und in eine mit 10 000 IE Heparin gefüllte Spritze überführt. Das Zellmaterial wurde durch Inversion gemischt und bis zur Aufarbeitung vor Licht geschützt verpackt. Detaillierte Patientencharakteristika sind der **Tabelle A.1** im Anhang zu entnehmen.

Die Kontrollzellen der Experimente stammen aus 2 Quellen freiwilliger Spender. Es wurden 7 Hüftköpfe von mit einer Hüftkopfprothese an einem Orthopädisch-Unfallchirurgischen Zentrum der Universitätsmedizin Mannheim versorgten Patienten und 18 Nabelschnurblutproben vom Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim verwendet. Die Hüftköpfe wurden im Rahmen von geplanten therapeutischen Hüftersatzoperationen bei Patienten mit Coxarthrose entnommen. Das Bioplat wurde in PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gegeben, bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet. Vor der Aufarbeitung wurde das Material mittels chirurgischer Instrumente zerkleinert, durch einen 70 µm Nylonfilter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS nachgespült.

Es wurden grundsätzlich nur menschliche Zellen von Patienten verwendet, die für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) und Hepatitis B und C negativ getestet wurden. Alle Patienten und Spender sind zuvor in Übereinstimmung mit dem Helsinki-Protokoll aufgeklärt worden und haben ihre Zustimmung schriftlich gegeben. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Universität Heidelberg liegt vor.

3.2.2 Isolation monukleärer hämatopoetischer Zellen

Die MNCs wurden aus den bluthaltigen heparinisierten MDS-Knochenmarkaspiraten, Nabelschnurblutproben und Hüftköpfen mittels eines Ficoll-Gradienten isoliert.

Für die Isolation wurden die Dichteunterschiede der verschiedenen Populationen von Blutzellen genutzt. 15 ml der Ficoll-Paque™ PREMIUM-Lösung (Dichte: 1,077 g/ml) wurde mit der Probe, die zuvor im Verhältnis 1:1 mit PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) gemischt wurden, überschichtet und mit 1000 x g ohne Bremse bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kommen die Zellen mit dem Polymer in Kontakt. Es kommt zu einer Verklumpung der Erythrozyten sowie zu einer Dichtezunahme der Granulozyten, was die Sedimentation der beiden Zellpopulationen beschleunigt. Nach Abschluss der Zentrifugation sind dann 3 Schichten erkennbar (Gressner and Arndt, 2019). Die Erythrozyten mit Granulozyten sedimentierten aufgrund der höchsten Dichte auf den Boden des Röhrchens. Die weiß gefärbte Interphase direkt oberhalb der Ficollschicht enthielt die MNCs, die eine geringere Dichte im Vergleich zur Ficollschicht haben. Darüber lagerten sich Thrombozyten und Plasma. Nach Entfernung der oberen Plasmaschicht wurde die lymphoblastische Lymphozytensubpopulation mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die MNCs zweimal mit 50 ml Ficoll-Puffer gewaschen und bei 400 x g bei 4 °C für 5 Minuten pellettiert. Als nächstes wurde das in Lysepuffer aufgenommene Zellpellet zur osmotischen Lyse der Erythrozyten für 6 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in einem definierten PBS-Volumen aufgenommen und die Zellzahl mittels Vi-Cell Counter bestimmt.

3.2.3 Isolation CD34-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen

Die Isolation hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen beruhte auf der positiven Selektion CD34-exprimierender Zellen aus frisch aufgetauten MNCs durch eine indirekte magnetische Auftrennung mit Hilfe von an MicroBeads gekoppelten Antikörpern (CD34 Progenitor Cell Isolation Kit), durch die magnetaktivierte Zellsortierung (MACS).

Die Zellsuspension durchläuft dabei die magnetische Säule, wobei die durch die Antikörper markierten CD34⁺ Zellen in der Säule verbleiben und die nicht markierten

Zellen durch die Säule laufen. Nach Entfernung des Magneten aus der Säule können die CD34⁺ Zellen gesammelt werden.

Zuerst wurde das Pellet mit MNCs in folgender Lösung (Tabelle 1) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert:

Tabelle 1: Lösung für die magnetische Zellsortierung

Substanz	Volumen auf 1 x 10⁸ Zellen, µl
MACS-Puffer	300
Fcy-Rezeptorblocker, human	100
CD34 Microbeads, human	100

Nach der Inkubation wurde den Reaktionsröhrchen 5 ml MACS-Puffer dazugegeben, bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet gelöst und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Nach der Markierung erfolgte die Separation. Die MS-Säulen (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden in den Adapter des MidiMACS Separators eingesetzt. Nach einem Spülvorgang mit 3 ml MACS-Puffer wurde die mit den Antikörpern inkubierte Zellsuspension auf eine Säule gegeben, die sich in einem starken magnetischen Feld befand. Die unmarkierten Zellen durchliefen die Säule und wurden in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Die Säulen wurden dreimal mit 3 ml Puffer gespült, um zurückbleibende Verunreinigungen herauszuwaschen. Als nächstes wurden die Säulen aus dem MidiMACS Separator entfernt und auf ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen gesetzt. 5 ml MACS-Puffer wurde auf die Säule gegeben. Anschließend wurden die markierten Zellen mit dem dazugehörigen Stempel aus der Säule eluiert. Die markierten Zellen werden durch die magnetische Kraft zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren können. Die aufgefangene Zellsuspension enthielt die CD34⁺ Lymphozyten.

Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung wie im **Kapitel 3.2.4** beschrieben. Nach der Zellselektion wurden die CD34⁺ Zellen entweder eingefroren, in Kultur gesetzt oder sofort für die *in vivo* Experimente benutzt.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die manuelle Bestimmung der Zellzahl und Vitalität erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden Verdünnungen der Zellen mit Trypanblau hergestellt, die

zwischen 1:5 bis 1:20 (Zellen: Trypanblau) variierten, und unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellzahl wurde durch Auszählung von mindestens zwei Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zusätzlich wurde das Verhältnis von toten zu vitalen Zellen bestimmt. Lebendige Zellen erschienen im mikroskopischen Bild hell, währenddessen tote Zellen, aufgrund einer nicht intakten Zellmembran den Farbstoff aufnehmen und tiefblau erschienen.

Formel zur Berechnung der Zelldichte:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor (10000)}}{\text{Ausgezählte Quadrate}}$$

Automatische Zellzählung erfolgte mit dem ViCell Cell Counter. Dazu wurde ein ViCell Cup mit 500 µl einer Zellsuspension in Verdünnung 1:10 bis 1:20 in einen Autosampler gelegt. Im Gerät wird nach einer Mischung der Probe Trypan zugegeben und automatisch die Zellzahl und Vitalität bestimmt.

3.2.5 Kryokonsevirung von Zellen

Bis zu 5 Millionen Zellen wurden nach Abzentrifugation und Abnahme des Überstands in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Eine Übersicht der Zusammensetzung des Einfriermedium liefert die **Tabelle 2**. Die Kryoröhrchen (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) wurde in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Kühlungsrate von -1 °C/Minute) auf -80 °C abgekühlt und nach 24 Stunden bei -196 °C in flüssigen Stickstoff gelagert.

Tabelle 2: Herstellung des Einfriermediums

Einfriermedium für CD34⁺ Stammzellen	
Reagenz	Konzentration, %
RPMI 1640 Medium	60
FKS	30
DMSO	10

Einfriermedium für MSCs	
Reagenz	Konzentration, %
StemMACS™ MSC Expansionmedium, human	90
DMSO	10

3.2.6 Auftauen von CD34-positiven HSCs und MSCs

Die im flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagerten Zellen wurden mit 10 ml vorgewärmtem Auftaumedium (90 % RPMI und 10 % vom fetalen Kälberserum (FKS)) resuspendiert, in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml StemSpan-Medium resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels Vi-Cell-Counters wurden die Zellen für die Kultivierung, ggf. für die Durchflusszytometrie und den Colony-Forming-Unit-Assay (CFU-Assay) aliquotiert.

3.2.7 Auftauen von MNCs für die MACS-Isolation

Die im flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagerten MNCs wurden mit nicht-vorgewärmtem Auftaumedium, welches DNase I in einer 5:1000 Verdünnung in autoMACS-Puffer enthielt, resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation der Zellen bei 1000 x g für 5 Minuten erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Vi-Cell-Counters (siehe **Kapitel 3.2.4**). Anschließend erfolgte die Isolation CD34⁺ Zellen (siehe **Kapitel 3.2.3**).

3.2.8 Zellkultur von CD34-positiven HSCs

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Sicherheitswerkbank (Mikroflow, Biological safety cabinet, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt, soweit nicht anders vermerkt. In 6-Well-Zellkulturschalen wurden 1 x 10⁵ CD34⁺ Zellen/Well in 2 ml StemSpan

SFEM II Medium mit 6 unterschiedlichen Zytokincocktails ausgesät und für 11 – 13 Tage kultiviert. Die Medien mit Zytokinen wurden immer direkt vor dem Medienwechsel angesetzt. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Zytokincocktails ist der **Tabelle 3** zu entnehmen:

Tabelle 3: Medienzusammensetzung der 6 untersuchten Konditionen
Vor Gebrauch wurde dem Medium 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

Medium	Zusammensetzung
+ Flt-3-L/ Zytokin-Mix 1	50 ng/ml human SCF, 10 ng/ml human TPO, 10 ng/ml human FGF-1, 50 ng/ml human Flt-3-L
+ Flt-3-L/ Angptl5 + IGFBP2	50 ng/ml human SCF, 10 ng/ml human TPO, 10 ng/ml human FGF-1, 50 ng/ml human Flt-3-L, 100 ng/ml human IGFBP2, 500 ng/ml human Angptl5
- Flt-3-L/ Zytokin-Mix 1	50 ng/ml human SCF, 10 ng/ml human TPO, 10 ng/ml human FGF-1
- Flt-3-L/ +Angptl5 + IGFBP2	50 ng/ml human SCF, 10 ng/ml human TPO, 10 ng/ml human FGF-1, 100 ng/ml human IGFBP2, 500 ng/ml human Angptl5
UM171	50 ng/ml human SCF, 10 ng/ml human TPO, 10 ng/ml human FGF-1, 50 ng/ml human Flt-3-L, 35nM UM171
PVA	50 ng/ml human SCF, 10 ng/ml human TPO, 10 ng/ml human FGF-1, 50 ng/ml human Flt-3-L, 0,1 % PVA

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂, 19,7 % O₂ in einem Brutschrank (Hera cell, Heraeus, Hanau, Deutschland). Ein Medienwechsel und die Zellzahlbestimmung erfolgten alle 3 Tage. Für den Medienwechsel wurden die Zellen je in ein 15 ml Falcon aufgenommen und bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugung der Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Je 50 µl dieser Zelllösung wurde in ein mit 450 µl PBS gefüllten Vi-Cell-Cup für die Zellzahlbestimmung gegeben. Der Rest dieser Zelllösung wurde zurück in ein Well der 6-Well-Platte überführt, in dem 1 ml vorgewärmtes Medium bereits vorgelegt war.

Um das Wachstum der Zellen einzuschätzen, wurde während der Kultur in den jeweiligen Medien täglich mikroskopiert. Vor und nach der Kultivierung der Zellen erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils CD34⁺CD38⁻ Zellen mittels Durchflusszytometrie

(FACS). Außerdem wurde die Fähigkeit Kolonien zu bilden zu beiden Zeitpunkten untersucht.

3.2.9 Ernten von CD34-positiven HSCs und Vorbereitung auf die HSCT

Am Tag der Xenotransplantation wurden die expandierten Zellen in 15 ml-Tubes überführt. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Um die restlichen Zytokinen herauszuspülen erfolgte die Zugabe von 2 ml PBS, nochmaliges Zentrifugieren bei 400 x g für 5 Minuten und Abnahme des Überstands. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI Medium resuspendiert. Je 50 µl dieser Zelllösung wurde in ein mit 450 µl PBS gefüllten Vi-Cell-Cup für die Zellzahlbestimmung gegeben. Die benötigte Anzahl von Zellen wurde in 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, die jeweils 5×10^5 MSCs enthielten. Die Tubes wurden auf Eis für die anschließende intrafemorale Injektion gelagert. Der Rest der Zellen wurde für weitere Experimente nach dem im **Kapitel 3.2.5** beschriebenen Protokoll kryokonserviert.

3.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Messung von bestimmten Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen in einem Flüssigkeitsstrom. Spezifische fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper binden spezifische Antigene. Dadurch können unter anderem die Zellgröße und Granularität der markierten Zellen in einer Zellsuspension über Lichtstreuung detektiert werden.

Die durchflusszytometrischen Messungen der Zellen erfolgten mit dem FACSMelody Cell Sorter. Die in der Durchflusszytometrie für die Immunfluoreszenzbestimmung eingesetzten Farbstoffe waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Fluorochrom R-phycoerythrin/Cyanin 7 (PE/Cy7), Allophycocyanin/Cyanin 7 (APC/Cy7). Die Kombination mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichte die Untersuchung verschiedener Zelleigenschaften. (Sack, 2007).

Die Oberflächenfärbung erfolgte in 5 ml Durchflusszytometrie-Röhrchen. Zur Quantifizierung wurden 5×10^4 Zellen genommen. Bei Analyse des murinen Knochenmarksaspirats oder murinen Knochenmarks wurden alle gewonnenen Zellen zur Quantifizierung und zum nachfolgenden Zellsorting genommen. Als erstes wurde die Zellsuspension mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und mit 400 x g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zusammensetzung des FACS-Puffers ist **Tabelle 4** zu entnehmen:

Tabelle 4: Herstellung des FACS-Puffers

Reagenz	Verdünnung
PBS	-
FKS	2 %
EDTA	1 mM
Natriumazid	0,1 %

Im 100 µl Ansatz wurden die Zellen mit unterschiedlichen Antikörpern und humanem und ggf. murinem Fcγ-Rezeptorblockern aufgenommen, auf dem Vortex-Mixer vermischt und für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Verdünnung der im Ansatz verwendeten Antikörper ist der Tabelle 5 zu entnehmen:

Tabelle 5: Verwendete Mischung von Antikörpern für in vitro Experimente

Marker	Verdünnung
Antihuman-CD34-Antikörper, Fluorochrom R-phycoerythrin/Cyanin 7 (PE/Cy7), Isotyp Maus IgG2ak	1:100
Antihuman-CD38-Antikörper, Allophycocyanin (APC), Isotyp Maus IgG1κ	1:50
Antihuman-Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56), Fluorochrom Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Isotyp Maus IgG1κ; Maus IgG2bκ	1:100
Fcγ-Rezeptorblocker, human	1:20

Zusätzlich wurde zu den gefärbten Zellen ein ungefärbtes FACS-Röhrchen angelegt, welches dieselben Schritte des Protokolls ohne fluorochromgekoppelte Antikörper durchlief.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 400 x g und 4 °C sedimentiert.

Die Zellen wurden in 100 µl „Sytox blue nucleic acid stain“-Lösung, die „SYTOX™ Blue Dead Cell Stain“ in 1:2000 Verdünnung in FACS-Puffer enthielt, aufgenommen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo 10.4.1. Durch das Gaten, also der Selektion einer spezifischen Zellpopulation, konnten die unterschiedlichen Expressionen Rezeptoren bestimmt werden.

3.2.11 CFU-Assay

Der CFU-Assay diente dazu, die Fähigkeit der HSCs zur Proliferation und Differenzierung entlang der verschiedenen hämatopoetischen Linien zu beurteilen. Er enthielt ein semiviskoses Nährmedium und Wachstumsfaktoren, welche Bildung und Wachstum von Kolonien reifer Zellen ermöglicht. Diese Kolonien konnten dann ausgezählt werden.

Für den CFU-Assay wurde als Grundlage ein Methylzellulose-basiertes Medium (MethoCult H4434) genutzt. Das MethoCult-Medium (100 ml Flasche) wurde vor den Untersuchungsansätzen über Nacht bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank (2 – 8 °C) aufgetaut, danach gründlich 60 Sekunden lang geschüttelt und für 5 Minuten ruhiggestellt, damit sich eventuell gebildete Bläschen auflösen konnten. Danach wurde das MethoCult-Medium mithilfe einer sterilen Spritze und 18 G-Kanüle in sterile 15 ml-Röhrchen verteilt. Pro 15 ml Röhrchen wurden 4 ml MethoCult-Medium aliquotiert. Nach Verschluss der Röhrchen wurden diese bis zum Versuchsansatz bei -20 °C tiefgefroren.

Vor Beginn der CFU-Versuche wurde die für jedes Experiment eine benötigte Anzahl der mit MethoCult-Medium Medium („Methocult H4434“) befüllten Röhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden 15 000 frisch aufgetaute oder expandierte CD34⁺ HSCs in 400 µl PBS-Lösung aufgenommen und zu 4 ml Methocult-Medium gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen 10 Sekunden lang auf dem Vortex gut gemischt und für 5 Minuten ruhiggestellt. Anschließend wurden mithilfe einer 5 ml Spritze mit 18 Gauge stumpfen Kanüle jeweils 1 ml dieses Ansatzes in 3 Wells einer 6-Well-Platte gegeben. Die Suspension ist so aliquotiert worden, sodass die Zellkulturlöcher mit der viskosen Suspension vollständig und ohne Luftblasenbildung benetzt war und somit in jeder Zellkulturschale ein Gemisch aus 1,1 ml Zell-Methylzellulose- Wirkstoff-Suspension vorlag. Für jedes neu angefangene Zell-Methylzellulose-Röhrchen wurde eine neue sterile Spritze benutzt. Die restlichen Wells der Platte wurden mit destilliertem Wasser befüllt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Die von Vorläuferzellen gebildeten Kolonien wurden nach der Inkubation in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, 19,7 % O₂ am Tag 14 unter dem Lichtmikroskop (x 5-Vergrößerung) detektiert und manuell gezählt.

3.3 MSCs

3.3.1 Isolierung von MSCs aus Knochenmark

Zur Isolation der MSCs wurden Knochenmark-Bröckelchen aus Knochenmarksproben mithilfe eines 100 µm Zellsiebs filtriert, in eine T25-Kulturflasche in 5 ml StemMACS MSC Expansion Media XF gelegt. Nach einer sanften Schwenkung der Kulturflasche zum Zweck der ausreichenden Verteilung am Boden wurden die Knochenmark-Bröckelchen unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. MSCs besitzen die Fähigkeit zur Plastikadhärenz, sodass sie sich an den Boden der Zellkulturflasche anhaften können, was man sich für die Isolation dieser Zellen zu Nutzen machte. Nach regelmäßigem Mediumswechsel blieben aus den Knochenmark-Bröckelchen nur die plastikadhärenten MSC in der Kultur und proliferierten. Bei Konfluenz der Zellen von 80 - 90 % wurden die Zellen entweder passagiert zur weiteren Vermehrung oder kryokonserviert zum späteren Gebrauch.

3.3.2 Zellkultur von MSCs

Die MSCs wurden 2 - 3 Wochen vor der geplanten Xenotransplantation aufgetaut und in Kultur genommen. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Sicherheitswerkbank (Mikroflow, Biological safety cabinet, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Vor dem Aussäen wurden die Zellkulturflaschen mit vorgewärmten Nährmedium unter dem Sterilbank vorbereitet. Die **Tabelle 6** zeigt die Abhängigkeit des Volumens des zugesetzten Mediums von der Größe der Zellkulturflasche:

Tabelle 6: Mediummenge für die Kultur der MSCs

Größe der Flasche, cm²	Volumen des zugesetzten Mediums, ml
25	5
75	15
175	25

Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5-10 % ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (Hera cell, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Kultivierung erfolgte im StemMACS MSC-Expansionsmedium über maximal 3 Passagen. Vor Gebrauch wurde dem Medium 7 ml Supplement (StemMACS Expansion Media XF Supplement) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Der erste

Mediumwechsel erfolgte am 2. - 3. Tag nach Ansetzen der MSC-Kultur, um tote und nicht adhärenente Zellen zu eliminieren. Weitere Medienwechsel wurden alle 7 Tage durchgeführt. Beim Mediumwechsel wurden als Erstes Verunreinigungen mit Suspensionszellen oder Zelltrümmern aufgeklopft. Anschließend erfolgte das Absaugen des alten Mediums, Spülung mit 10 ml PBS und Zugabe des neuen Mediums.

3.3.3 Passagieren und Ernten von MSCs

MSCs wurden in regelmäßigen Abständen mindestens zwei Mal der Woche unter dem Lichtmikroskop untersucht und ihre Dichte in Prozent der bedeckten Fläche geschätzt. Bei einer Dichte von mehr als 80 % wurden die Zellen passagiert oder für Xenotransplantationen geerntet.

Die MSCs sind adhärenent wachsende Zellen, wodurch das alte Nährmedium problemlos entfernt werden konnte. Anschließend wurden die adhärenent gewachsenen Zellen mit sterilem PBS mehrfach vorsichtig gespült, um Reste von Medium zu entfernen, welches die Wirkung von Trypsin durch eine längere Einwirkzeit beeinträchtigt hätte, und um tote, nicht adhärenente Zelle zu entfernen. Durch Zugabe vom kalten Trypsin-EDTA (2 ml pro 75 cm² Zellkulturflasche) und anschließende Inkubation für 5 - 7 Minuten bei 37 °C kam es zu einer enzymatischen Reaktion, bei welcher es zur Lösung der Zellen vom Flaschenboden kam. Um die Lösung der stark adhärenent wachsenden Zellen zu erleichtern, wurde mit den Handflächen gegen die Zellkulturflasche leicht geklopft.

Nach einer makroskopischen Kontrolle der Ablösung der Zellen erfolgte die Unterbrechung der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von Medium mit 10 % FKS. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Falcon wurden den Flaschen 10 - 15 ml PBS zugegeben, durch leichtes Schwenken gleichmäßig über die Flaschenbodenoberfläche verteilt und ebenso in ein 50 ml Falcon überführt, um möglichst alle Zellen zu ernten. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 400 x g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet im Falle des Passagierens in 2 ml Medium, im Falle des Erntens für die Xenotransplantation in 2 ml PBS resuspendiert.

Um die gewonnenen Zellsuspension zu homogenisieren, wurden die Zellen mit einer 1000 µl Pipette resuspendiert und beim Ernten zusätzlich mithilfe eines sterilen 100 µm Zellsiebs filtriert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mithilfe eines Vi-Cell-Counters.

Die geernteten Zellen aus der ersten oder zweiten Passage wurden entweder in neue, mit Nährmedium befüllte, Zellkulturflaschen überführt oder kryokonserviert. Beim Ernten der Zellen aus der dritten oder vierten Passage für die Xenotransplantation wurde jeweils 5 x 10⁵ Zellen in 0,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Nach Zugabe von CD34⁺ HSCs zu den

MSCs wurden die EppendorfgeläÙe mit der Zellsuspension auf Eis bis zur intrafemoralen Injektion gelagert.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Versuchstiere

Für die Xenotransplantations-Experimente wurden 8 - 12 Wochen alte weibliche NSG Mäuse verwendet, die in der Tierversuchseinrichtung der Universitätsmedizin Mannheim gezüchtet oder bei Charles River Laboratories (Research Models and Services, Erkrath, Deutschland) gekauft wurde. NSG Mäuse haben auf dem bereits immundefizienten NOD/SCID Hintergrund einen zusätzlichen Immundefekt durch das Fehlen einer funktionellen Gammakette im Interleukin-2-Rezeptor und bilden keine Natürlichen Killer-Zellen mehr aus. Neuere experimentelle Ansätze mit modifizierten Techniken, wie z. B. intrafemorale oder intrahepatische Injektion primärer humaner blutbildenden Zellen in diesen sehr immundefizienten Tieren haben gezeigt, dass sich unter optimierten Bedingungen humane Zellen deutlich besser etablieren lassen als in NOD/SCID Mäusen (Agliano et al., 2008; Medyouf et al., 2014; Sanchez et al., 2009). Weibliche NSG-Mäuse zeigen ein signifikant höheres Engraftment von humanen hämatopoietischen Stammzellen (Notta et al., 2010).

Die Mäuse wurden in der Tierversuchseinrichtung der Universitätsmedizin Mannheim unter pathogenfreien Bedingungen untergebracht. Um die Einschleppung von Keimen zu verringern, wurde zwischen dem Tierraum und Flur in der Tierversuchseinrichtung ein negativer Druckgradient gehalten. Die Mäuse wurden in Standard Makrolon Käfigen des Typ II mit bis zu 3 Mäusen oder in Standard Makrolon Käfigen des Typ III mit bis zu 4 Mäusen gehalten. Die Mäuse hatten einen zertifizierten, autoklavierbaren Spieltunnel und weiche weiÙe Cellulose in Form von Labortüchern sowie Zellstofftuper (4 x 5 cm) in ihren Käfigen. Ein Käfig- und Flaschenwechsel erfolgte mindestens einmal die Woche. Mäuse hatten einen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden und erhielten autoklaviertes Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Die Durchführung jeglicher Prozeduren mit Mäusen erfolgte immer erst nach Anziehen von Arbeitskleidung und Anlegung von sauberen Handschuhen und Mundschutz. Die Versuchstiere wurden einmal in der Woche gewogen. Zur Unterscheidung der einzelnen Versuchsbedingungen wurden die Versuchstiere mittels Ohrlochung dauerhaft gekennzeichnet.

3.4.2 Sublethale Konditionierung vor der Xenotransplantation

48 und 24 Stunden vor der jeweiligen intrafemoralen Transplantation erfolgte eine sublethale Konditionierung der Versuchstiere mit einem Zytostatikum Busulfan

(25 mg/kg Körpergewicht, bei einem Körpergewicht von 20 g entspricht das einem Volumen von 100 µl) als intraperitoneale Injektion. Diese Behandlung dient der Unterstützung des Anwachsens der Tumorzellen im Knochenmark (Hayakawa et al., 2009; Robert-Richard et al., 2006).

3.4.3 Vorbereitung der Zellen für die Transplantation

Etwa 20 Minuten vor dem Eingriff wurden die auf Eis gelagerten 0,5 ml Eppendorfgläser mit den vorbereiteten Zellsuspensionen bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte unter der Sterilbank die Aufnahme der Zellen in 20 µl PBS und Überführung der zu injizierbaren Zellsuspension in 1 ml 26 G Insulinspritzen. Es wurde kontrolliert, dass es in der Spritze keine Luftblasen bleiben. Die für den Eingriff vorbereiteten Insulinspritzen mit der Zellsuspension wurden auf Eis gelagert.

3.4.4 Betäubungsverfahren

15 Minuten vor der intrafemorale Injektion oder KMP erfolgte die subkutane Applikation des Schmerzmittels Carprofen im sterilen PBS (5 mg/kg auf 100 µl Injektionsvolumen).

Die intrafemorale Injektion, KMP und Tötung fanden unter Isofluran-Narkose (2,5 % (v/v) in O₂) statt. Dafür wurde die Maus in die Induktionskammer gelegt, der Deckel fest verschlossen.

Die Gasapplikation mittels der Induktionskammer erfolgte bis Eintreffen der Sedierung. Die Sedierung trat circa 4 Minuten nach Applikationsbeginn des Inhalationsanästhetikums. Die gewünschte Ebene der Anästhesie wurde durch den Verlust des aufrichtenden Reflexes bestimmt. Anschließend wurde die narkotisierte Maus auf eine Heizplatte (Temperatur 37 °C) gelegt. Die Klammern, die die Luft zum Beatmungsrohr lenken, wurden geöffnet. Die Klemmen der Induktionskammer wurden geschlossen. Das Tier wurde auf dem Nasenkonus stabil platziert. Damit erfolgte die nachfolgende Applikation des Inhalationsanästhetikums über einen Beatmungskonus. Das Erreichen des Stadiums der chirurgischen Toleranz wurde durch den Ausfall des Zwischenzehenreflexes kontrolliert. Auf die Hornhaut der Maus wurde Augensalbe appliziert. Die Narkose dauerte in der Regel ca. 5 - 10 Minuten.

Die **Tabelle 7** liefert eine Übersicht über die von uns durchgeführten Analgesie- und Betäubung:

Tabelle 7: Betäubung und Analgesie

Eingriffe, die unter Narkose stattfinden	Wirkstoff des Betäubungsmittels und der Analgetika	Dosis des Betäubungsmittels/ der Analgetika (mg/kg)	Applikationsart des Betäubungsmittels/ der Analgetika
IF	Isofluran Carprofen	2 - 5 % 5mg/kg	Inhalationsnarkose s. c. 1 x vor IF
KMP	Isofluran Carprofen	2 - 5 % 5 mg/kg	Inhalationsnarkose s. c. 1 x vor IF
Tötung	Isofluran	2 - 5 %	Inhalationsnarkose

3.4.5 Intrafemorale Injektion

Direkt vor der Punktion erfolgte die Narkose und Sedierung der Mäuse. Nach Erreichen des Stadiums der chirurgischen Toleranz wurde die Maus vom Käfig genommen und auf eine Heizplatte (Temperatur 37 °C) gelegt. Vor der Transplantation wurde das Fell an beiden Knien rasiert und die freigelegte Haut mit Desinfektionsmittel Octenisept befeuchteter Mullkompressen desinfiziert. Unter Rotation wurde eine 26 G-Nadel auf Höhe der Patella in beide Femora eingeführt und wieder entfernt. Anschließend werden mittels einer 26 G Nadel einer Insulinspritze $1 - 3 \times 10^5$ CD34⁺ Zellen und 5×10^5 MSCs der 2. - 4. Passage in einem Volumen von 20 µl sterilem PBS pro Femur injiziert. Nach Entfernung der Nadel wird die Haut erneut desinfiziert.

Die Injektion wurde von den Versuchstieren gut vertragen und es kam zu keinen Anästhesie- oder Eingriffbedingten Todesfällen.

Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Bewertung des Allgemeinzustandes der Mäuse nach dem Score Sheet (siehe **Tabelle A.2** im Anhang).

3.4.6 Knochenmarkpunktion

12 Wochen nach der Transplantation erfolgte eine Knochenmarkpunktion (KMP).

Zunächst bereiteten wir für jedes Versuchstier ein mit circa 1 ml 10 %-iger FKS-Lösung (verdünnt in PBS) befülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß für das Auffangen des Knochenmarkmaterials vor. Direkt vor der Punktion erfolgte die Narkose und Sedierung der Mäuse. Nach Erreichen des Stadiums der chirurgischen Toleranz wurde das Fell am linken Knie rasiert und die freigelegte Haut mittels einer mit Desinfektionsmittel Octenisept befeuchteter Mullkompressen desinfiziert. 40 – 50 µl von der vorbereiteten 10 %-iger FKS-Lösung wurden mithilfe einer 5 ml Spritze mit einer 26 G Nadel aufgezogen. Die nun mit der Lösung befüllte Spritze wurde unter Rotation auf Höhe der Patella in den Oberschenkelknochen (Femur) eingeführt und es wurde circa 10 - 20 µl Knochenmark

aspiriert. Nach Entfernung der Nadel wurde die Haut erneut desinfiziert. Das Knochenmarkmaterial wurde mit dem Rest der vorbereiteten FKS-Lösung in einem Eppendorfgefäß resuspendiert und auf Eis gelagert. Nach einer Zwischenlagerung der Eppendorfgefäße mit Knochenmarkaspiraten auf Eis erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wie unter **Kapitel 3.4.9** beschrieben.

3.4.7 Tötung der Versuchstiere

24 Wochen nach der HSCT wurden die Versuche beendet, indem die Versuchstiere in Isoflurannarkose mittels terminaler Blutentnahme durch Herzpunktion und anschließender zervikaler Dislokation getötet wurden.

Direkt vor der Tötung erfolgte die Narkose und Sedierung der Mäuse. Nach Erreichen des Stadiums der chirurgischen Toleranz wurde die Maus zur terminaler Herzpunktion fixiert danach wurde die Kanüle in der Medianlinie unmittelbar hinter dem Brustbein eingeführt und unter leichter Aspiration in Richtung zum Kopf, zur linken Körperhälfte und zum Rücken hin (Richtung: kranial, lateral, dorsal) geführt.

3.4.8 Isolation von Zellen aus dem Knochenmark

Zur Isolation des Knochenmarks wurden Oberschenkelknochen, Hüftgelenk und Unterschenkelknochen beider Beine entnommen.

Nach einer vorsichtigen Präparation der Oberschenkelknochen wurden sie in 80% Ethanol 1 Minuten lang sterilisiert und zur Extraktion des Gesamtknochenmarks gemörsert. Das gemörserte Gemisch wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung. Bei einigen Proben wurde ein Teil der Zellen zum Zweck der sekundären Transplantation in PBS resuspendiert und bei -4 °C gelagert.

3.4.9 Durchflusszytometrie und Zellsorting

Für die durchflusszytometrische Analysen und das Zellsortung wurden die aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen nach dem im **Kapitel 3.2.10** aufgeführten extrazellulären Färbungsprotokoll mit der in der **Tabelle 8** aufgeführten Mischung von fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt:

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Analysen aus dem murinen Knochenmark

Marker	Verdünnung
Antihuman-CD45-Antikörper, Fluorochrom R-phycoerythrin (PE), Isotyp Maus IgG1κ	1:100
Antimurin-CD45 Antikörper, Flurochrom Allophycocyanin/Cyanin 7 (APC/Cy7), Isotyp Ratte IgG2bk	1:100
Fcy-Rezeptorblocker, human	1:20
Fcy-Rezeptorblocker, murin	1:10

Nach der Färbung wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 400 x g und 4 °C sedimentiert. Abhängig von der Zellmenge wurden zwischen 200 und 500 µl Sorting-Puffer zugegeben. Die Zusammensetzung des Sorting-Puffers ist der **Tabelle 9** zu entnehmen:

Tabelle 9: Herstellung des Sorting-Puffers

Reagenz	Verdünnung, %
HBSS	97,6
EDTA (0,5 M)	0,4
FKS	1
HEPES-Puffer (1M)	1

Vor dem Sortiervorgang mit dem BD FACSMelody Cell Sorter wurde die Zellsuspension durch eine Tube mit Filterdeckel (30 µl Aufsteckfilter) in ein neues FACS-Röhrchen überführt, um Zellaggregate und Zelladhäsionen zu minimieren. Die FACS-Röhrchen wurden dann in die Probenkammer gestellt und durchflusszytometrisch untersucht. Anschließend erfolgte das Sorting, indem die Zellen vom Sorter aufgezogen wurden. Beim Sorting durchwanderteten die Zellen einzeln, wie beim Durchflusszytometer ohne Sorter, vorerst den Mikrokanal, in welchem sie durch einen Laserstrahl angeregt wurden. Durch eine sogenannte „Micronozzle“ (Öffnung) entstanden Tropfen, in welchen sich die gefärbten Zellen befanden. Die Zellen wurden mit einer 100 µm großen Nozzle bei einer Frequenz von 2000 - 5000 Events/Sekunde gesortet.

Das Sorting-Prinzip basiert auf der elektrischen Aufladung der markierten Zellen. Durch 2 Hochspannungsplatten, welche positiv und negativ geladen sind, werden die gefärbten Zellen in die gewünschte Richtung in die entsprechenden Falcons abgelenkt.

Die gesorteten Zellen wurden in einem 1,5 ml Tube gesammelt. Anschließend wurde das Pellet in 350 μ l RLT-plus-Puffer lysiert und bei -40 °C gelagert.

3.4.10 Sekundäre Transplantation

Beim Vorliegen eines hohen Engraftments (15 - 30 %) wurde ein Teil der aus dem murinen Knochenmark isolierten Zellen für die serielle Transplantation in sekundäre Empfänger-mäuse benutzt.

Dafür wurden die sekundäre Empfänger-mäuse 48 Stunden und 24 Stunden vor der seriellen HSCT konditioniert (siehe **Kapitel 3.4.2**).

Am Tag der Tötung der primären Empfänger-mäusen wurden ihre Oberschenkelknochen für 1 Minute in einer Ethanollösung (80 % (v/v) im destillierten Wasser) sterilisiert. Das Knochenmark wurde in ein 50 ml Röhrchen mit PBS gespült und die in ihm enthaltenen Erythrozyten wurden gegebenenfalls mittels RCLB lysiert.

Für die Spülung verwendeten wir eine 5 ml Spritze mit einer 24 G Nadel. Nach einer Resuspension bestimmten wir die Zahl der aus dem Knochenmark isolierten Zellen mittels Vi-Cell-Counters. Weiter aliquotierten wir die Zellen in 0,5 ml Eppendorfgeläße und lagerten sie bei +4 °C. Anschließend erfolgte die HSCT in die sekundäre Empfänger-mäuse wie unter **Kapiteln 3.4.3, 3.4.4** und **3.4.5** beschrieben.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mithilfe der Software GraphPad Prism Version 9.0. und Excel (Microsoft) durchgeführt.

Der Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit Varianzanalyse (ANOVA), gepaartem und ungepaartem *t*-Test hergestellt.

Die statistische Auswertung für Standardkurvenberechnungen sowie quantitative Methodenvergleiche wurden mittels linearer und nichtlinearer Regressionsanalyse durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < ,05$ festgelegt. $P < ,05$ entsprach *, $p < ,01^{**}$, $p < ,001^{***}$ und $p < ,0001^{****}$.

Für die deskriptive Statistik erfolgten Berechnungen des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung, des Fehlers des Mittelwertes, des Medians, der Perzentilen, der Spannweite.

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vitro* Expansion hämatopoetischer Stammzellen aus MDS-Knochenmark

Eines der Ziele dieser Arbeit ist es, für die Optimierung des MDS-Xenotransplantationsmodells, die Anzahl CD34⁺ patientenspezifischer Stammzellen, die aus Knochenmarksbiopsien von MDS-Patienten isoliert werden können, zu erhöhen.

Dazu erfolgte zunächst die Expansion von HSCs aus Nabelschnurblut als Kontrolle und im nächsten Schritt aus MDS-Knochenmark nach dem Protokoll von Zhang et al. (2008), welches für die *in vitro* Expansion von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut etabliert wurde. Das Medium enthielt folgende Zytokine: SCF, TPO, Fibroblasen-Wachstumsfaktor-1 (FGF-1) und Flt-3-L in bestimmten Konzentrationen und entsprach in dieser Arbeit dem Medium "Zytokin-Mix 1" mit Zusatz von Flt-3-L (siehe **Tabelle 3**). Für die Kultivierung, die 11 - 13 Tage dauerte, wurde eine definierte Anzahl von Stammzellen ($1,0 \times 10^5$) genommen.

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des Expansionsverhaltens der HSCs anhand deren Wachstumskurven. Als Kontrolle untersuchten wir das Expansionsverhalten von fünf Nabelschnurblutproben mithilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit der Zellzahl als der abhängigen und dem Tag der Kultur als der unabhängigen Variablen (siehe **Abbildung 1**):

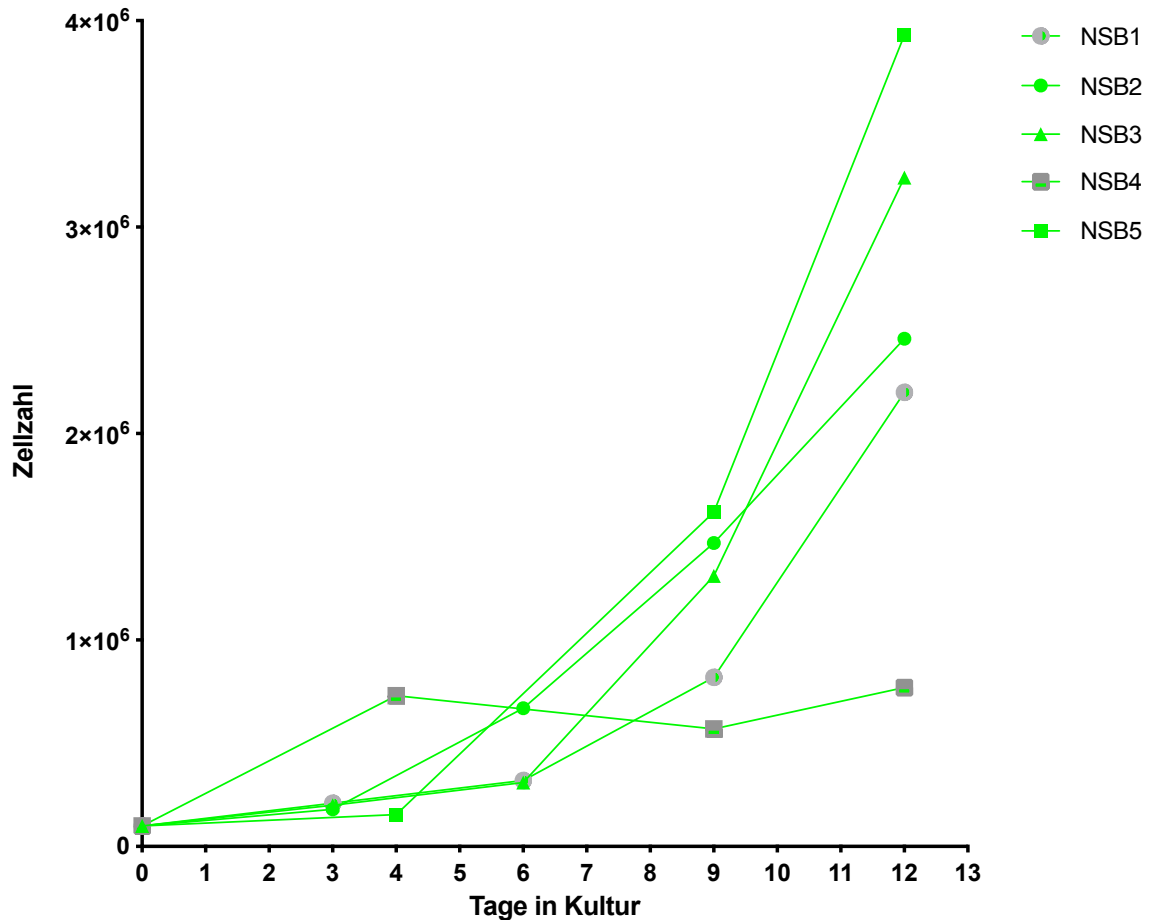


Abbildung 1: Expansion CD34⁺ HSCs aus 5 Nabelschnurblut-Proben im Medium "Zytokin-Mix 1" mit Flt-3-L

Mit Ausnahme der Zellen aus der Probe NSB4 vermehrten sich alle Zellen aus Nabelschnurblut im Medium „Zytokin-Mix 1“ mit Flt-3-L exponentiell, was anhand der nichtlinearen Regressionsanalyse mit der Zellzahl als der abhängigen und dem Tag der Kultur als der unabhängigen Variable festgestellt wurde. Einzelheiten zur Regressionsanalyse sind der Tabelle 10 zu entnehmen. **NSB**, Nabelschnurblut.

Die Analyse ergab, dass etwa 80 % der Proben Zellen mit einer exponentiellen Expansionsfähigkeit aufwiesen. Bei diesen Proben lag das Bestimmtheitsmaß R^2 (Quadrat des Korrelationskoeffizienten von Pearson) zwischen 0,98 und 0,99, die Verdopplungszeit betrug Werte zwischen 1,54 und 3,13 (inkl. 95 %-CI).

Nähere Daten zur nichtlinearen Regressionsanalyse Nabelschnurblut-Wachstumskurven sind der **Tabelle 10** zu entnehmen:

Tabelle 10: Nichtlineare Regressionsanalyse (Exponentialfunktion) der Wachstumskurven von Nabelschnurblut-HSCs
 Abhängige Variable: Zellzahl. Unabhängige Variable: Tag der Kultur. **NSB**, Nabelschnurblut.

Probe	NSB1	NSB2	NSB3	NSB4	NSB5
Ergebnisse					
<i>n</i>	5	5	5	5	5
<i>R</i> ² , Bestimmtheitsmaß	0,99	0,98	0,99	0,50	0,99
Verdopplungszeit, s	2,21	3,13	2,12	9,53	2,19
95 %-CI von Verdopplungszeit: Untergrenze, s	1,82	2,23	1,70	-∞	1,54
95 %-CI von Verdopplungszeit: Obergrenze, s	2,66	4,43	2,62	+∞	3,08
Vorliegen eines exponentiellen Wachstums	ja	ja	ja	nein	ja

Weiter erfolgte die Untersuchung von HSCs aus der Experimentalgruppe. Genauso wie bei den Kontrollen wurde anhand der Wachstumskurven das Expansionsverhalten von MDS-HSCs im Medium "Zytokin-Mix 1" mit Zusatz von Flt-3-L charakterisiert. Die Expansion der MDS-Zellen verlief in den ersten 9 - 12 Tagen bei den meisten Proben linear (siehe **Abbildung 2**).

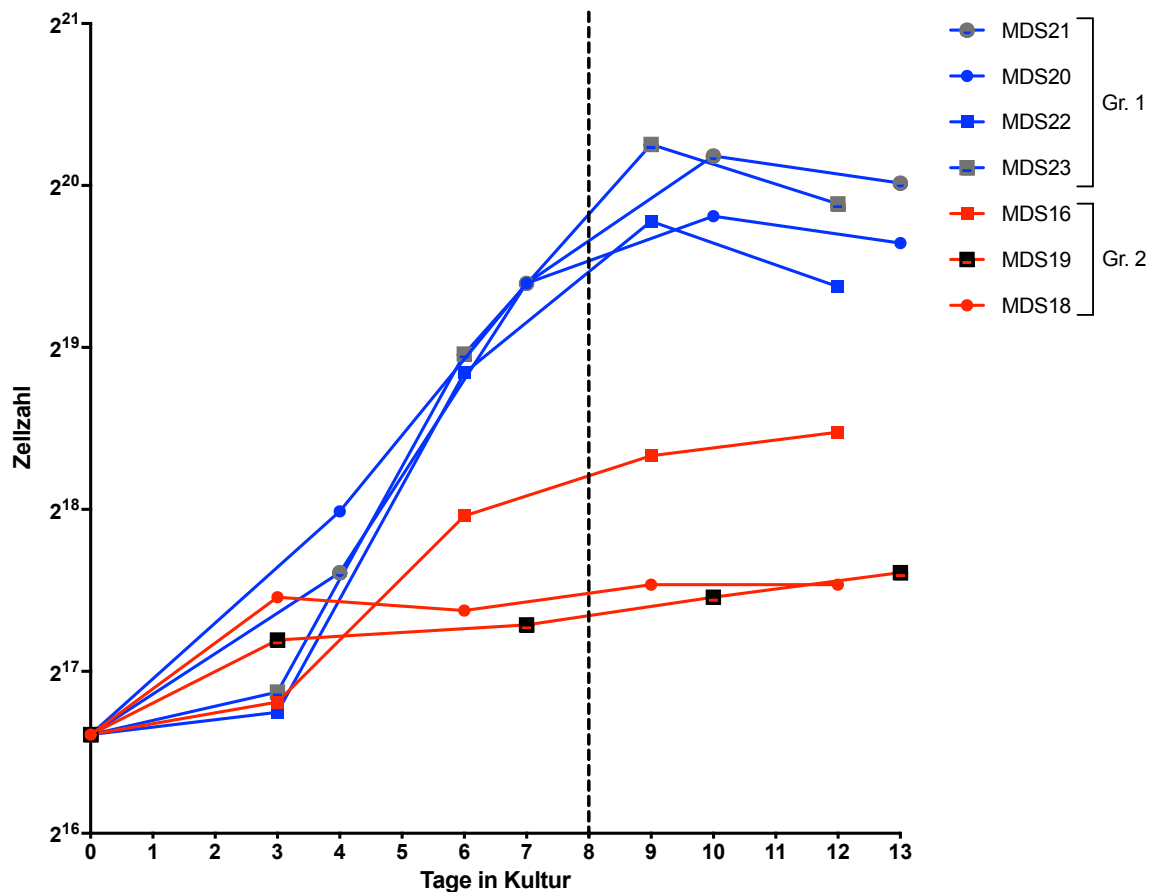


Abbildung 2: Expansion CD34⁺ HSCs aus MDS-Patienten im Medium „Zytokin-Mix 1“ mit Flt-3-L
 Wachstumskurven von 8 MDS-Proben. Am Tag 8 befinden sich die meisten Zellen im Vergleich zu Tag 11 der Kultur in der Wachstumsphase (verdeutlicht mit einer gestrichelten Linie). Mit Ausnahme von Zellen aus Proben MDS18 und MDS22 wiesen die MDS-Zellen eine lineare Expansionsfähigkeit im Medium „Zytokin-Mix 1“ mit Flt-3-L, was anhand einer Regressionsanalyse festgestellt wurde. Zellen aus zur Gruppe 1 gehörenden Proben wuchsen im Vergleich zu Zellen aus zur Gruppe 2 gehörenden Proben schneller. Die mittlere Neigung ihrer Wachstumskurven lag bei $79164,7 \pm 5608,4$ und damit betrug viel mehr als die Wachstumskurvenneigungen von Zellen aus der Gruppe 2, die Werte von kleiner 25 000 einnahmen. (Einzelheiten zur linearen Regressionsanalyse siehe Tabelle 11). Logarithmische Skalierung zur Basis 2 der Y-Achse.

MDS, Myelodysplastisches Syndrom. **Gr.**, Gruppe.

In der Regressionsanalyse war eine einfach lineare Regression mit der Zellzahl als der abhängigen und dem Tag der Kultur als der unabhängigen Variablen bei 71,4 % der MDS-Proben (5/7) signifikant. Nähere Daten zur Regressionsanalyse sind der **Tabelle 11** zu entnehmen:

Tabelle 11: Lineare Regressionsanalyse der Wachstumskurven von HSCs aus MDS-Knochenmarksproben
 Abhängige Variable: Zellzahl. Unabhängige Variable: Tag der Kultur. **MDS**, Myelodysplastisches Syndrom.

Probe \ Ergebnisse	MDS16	MDS18	MDS19	MDS20	MDS21	MDS22	MDS23
n	5	5	5	5	5	5	5
r²	,94	,63	,92	,86	,87	,77	,79
r	0,97	0,79	0,96	0,93	0,93	0,88	0,89
95 %-CI von r: Untergrenze	0,61	-0,30	0,51	0,25	0,27	-0,02	0,02
95 %-CI von r: Obergrenze	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Mittlere Steigung	24833	6333	6923	65739	90253	65000	95667
p	,01	,11	,01	,02	,02	,05	,05
Vorliegen eines linearen Wachstums	ja	nein	ja	ja	ja	nein	ja
Relative Zellzahländerung	3,65	1,9	2,0	8,2	10,6	6,8	9,7
Leukozyten im Blut, 10⁹/l	1,41	1,53	1,27	9,03	6,03	2,34	11,97
Gruppe	2			1			

Anhand der Graphik (siehe **Abbildung 2**) ließen sich die Wachstumskurven der MDS-Proben in zwei Gruppen aufteilen. Die vier oberen (blauen) Wachstumskurven gehören zur Gruppe 1. Sie haben eine mittlere Neigung von $79164,7 \pm 5608,4$ und sind damit steiler als die drei unteren Wachstumskurven, die die zweite Gruppe mit einer Neigung kleiner als 25 000 bilden. Es konnte keine Korrelation zwischen den Neigungen der MDS-Wachstumskurven und Zugehörigkeit der Patienten der jeweiligen Probe zu einer bestimmten Kategorie in der WHO-Klassifikation für MDS festgestellt werden. Es konnten keine Gemeinsamkeiten unter den Vertretern der jeweiligen Gruppen gefunden werden. Interessanterweise konnte man allerdings eine nicht-lineare Korrelation zwischen den relativen Zellzahländerungen der HSCs aus den Knochenmarksproben der MDS-Patienten und der Leukozytenzahl im Blut dieser Patienten feststellen (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,80$) (siehe **Abbildung 3**):

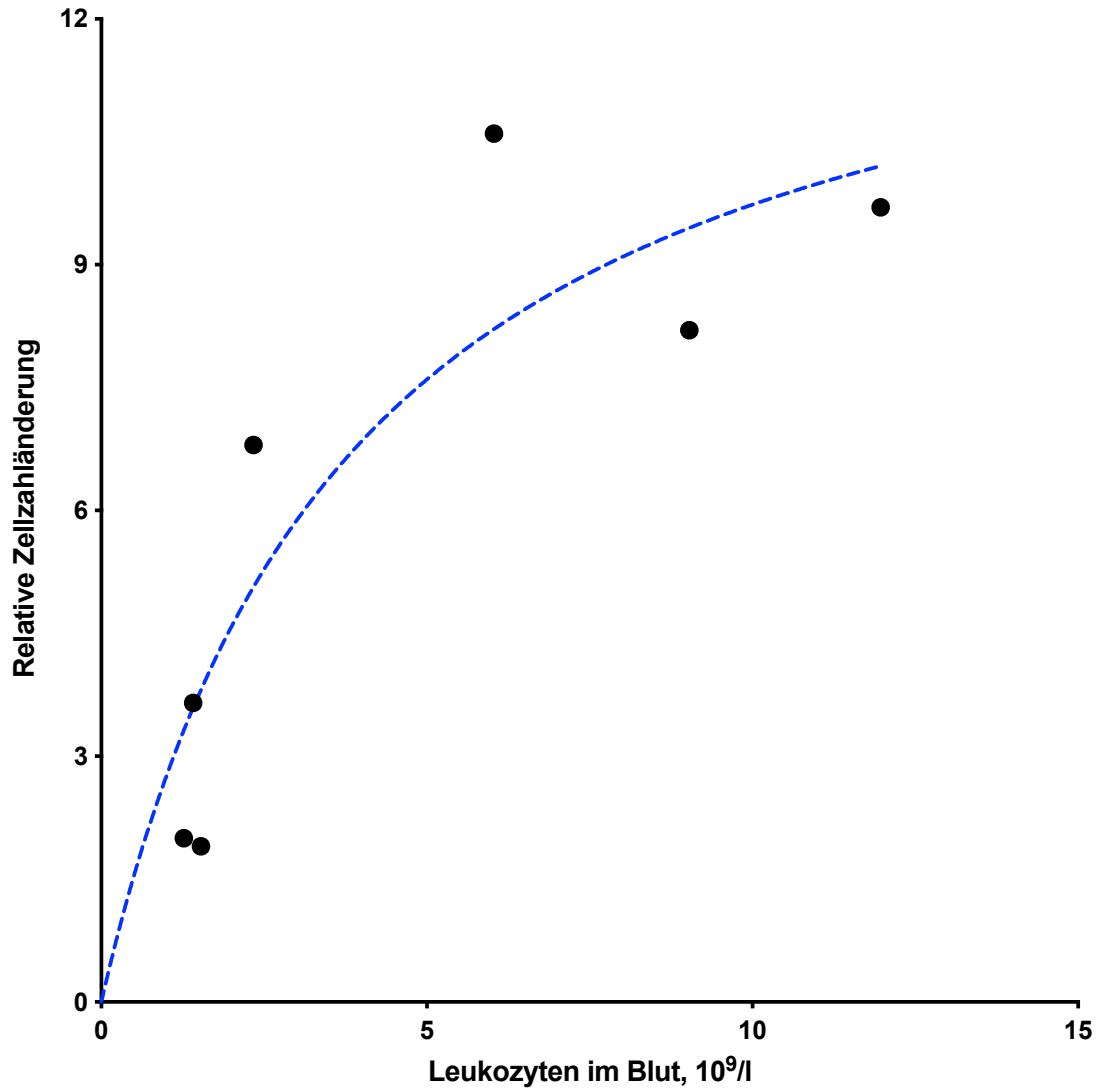


Abbildung 3: Nicht-lineare Korrelation zwischen der relativen Zellzahländerung von MDS-HSCs und der Leukozytenzahl im Blut vom jeweiligen Patienten
Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,798$. Verwendete Proben: MDS16, MDS18, MDS19, MDS20, MDS21, MDS22, MDS23.

Folgende Gleichung, die mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt wurde, beschreibt die oben beschriebene Korrelation:

$$\text{Relative Zellzahländerung} = \frac{(13,54 \pm 3,37) \times (\text{Leukozytenzahl im Blut}, \frac{10^9}{l})}{(3,91 \pm 2,35) + (\text{Leukozytenzahl im Blut}, \frac{10^9}{l})}$$

Weiter geht aus der Graphik hervor, dass die Maximalzellzahl bei allen untersuchten MDS-Proben bis spätestens Tag 11 erreicht wurde. HSCs aus Proben der Gruppe 1 erreichten ihre Maximalanzahl am Tag 9 oder 10, nachdem die Gesamtzellzahl in Kultur allmählich abnahm. An Tag 8 der Kultur befanden sich die meisten expandierenden Zellen

in der Phase der linearen Expansion. Aus diesem Grund nahmen wir für die *in vivo* Experimente 8 Tage lang in Kultur expandierte Zellen.

Beim Vergleich der Wachstumskurven von MDS- und Nabelschnurblutproben ist auffallend, dass die Expansion von Nabelschnurblutzellen schneller und effektiver im Vergleich zur Expansion von MDS-HSCs ist.

4.1.1 Fördernder Effekt des Flt-3-L

Nach der Feststellung des linearen Wachstums von MDS-HSCs im Standard-Medium „Zytokin-Mix 1“ mit Flt-3-L für die Expansion von HSCs aus Nabelschnurblut, war als Ziel die Optimierung des Mediums für HSCs von MDS-Patienten gesetzt.

Die Arbeitsgruppe von Zhang et al. (2008) beschrieb eine effiziente Expansion der HSCs aus dem Nabelschnurblut mit „Zytokin-Mix 1“ und eine signifikante Verbesserung der Engraftment-Rate im NOD/SCID-Repopulationsassay bei Zugabe von Angptl5 und IGFBP2 zum „Zytokin-Mix 1“ (Diese Zytokinmischung entspricht der Zytokinmischung „Angptl5 + IGFBP2“ in dieser Arbeit). Aus diesem Grund entschieden wir diese beiden Zytokinmischungen in unseren *in vitro* Experimenten für die Expansion von HSCs aus MDS-Knochenmark zu testen.

Wir fingen mit der Untersuchung des Flt-3-L-Einflusses auf die Expansion von MDS-HSCs an. Es wurde geprüft, ob die Zugabe des Flt-3-Liganden zu den oben aufgeführten Zytokinmischungen die 11-tägige Zellexpansion quantitativ beeinflusst.

Als Kontrolle expandierten wir bei gleichen Bedingungen HSCs aus Nabelschnurblutproben (siehe **Abbildung 4**). Wir stellten fest, dass bei Betrachtung der beiden Zytokinmischungen, „Zytokin-Mix 1“ und „Angptl5 und IGFBP2“, erhöhte sich die Zellzahl von Nabelschnurblut-HSCs bei Vorhandensein von Flt-3-L in Kultur im Durchschnitt um das 11,3-Fache (95 %-CI [7,7; 15,0]). Ohne Flt-3-L ließ sich die Zellzahl um das 5,3-Fache steigern (95 %-CI [3,6; 7,1]). In einem gepaarten doppelseitigen *t*-Test zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der erreichten Zellzahl bei Zugabe von Flt-3-L zu Kulturen um mindestens das 2-Fache ($t(13) = 3,42; p < ,01; n = 14$).

Nach dem Testen der oben beschriebenen Bedingungen für die Expansion von HSCs aus Nabelschnurblutproben wurden diese in Kulturen mit MDS-HSCs weiter untersucht (siehe **Abbildung 4**). Während der Kultivierung der HSCs von MDS-Patienten über einen Zeitraum von 11 Tagen konnten die Zellzahlen bei Vorhandensein von Flt-3-L in Kultur bis auf das 15-Fache gesteigert werden. Der Mittelwert der relativen Änderungen lag bei $5,6 \pm 4,6$. Im „Zytokin-Mix 1“ wiesen bei Anwesenheit des Flt-3-L die MDS-HSCs in einer 11-tägigen Kultur eine statistisch signifikant bessere Expansion im Vergleich zur Expansion im „Zytokin-Mix 1“ ohne Flt-3-L auf (ungepaarter doppelseitiger *t*-Test:

$t(8) = 2,90$; $p = 0,02$; $n_1 = 5$; $n_2 = 5$). Auch die Expansion von MDS-HSCs in der Zytokinmischung „Angptl5 + IGFBP2“ ließ sich durch den Zusatz des Flt-3-L zur Kultur verbessern, sodass die Mittelwertdifferenz der relativen Zellzahländerungen von $5,8 \pm 2,0$ auf $7,0 \pm 1,6$ anstieg (ungepaarter doppelseitiger t-Test: $t(8) = 4,22$; $p < ,01$; $n_1 = 5$; $n_2 = 5$).

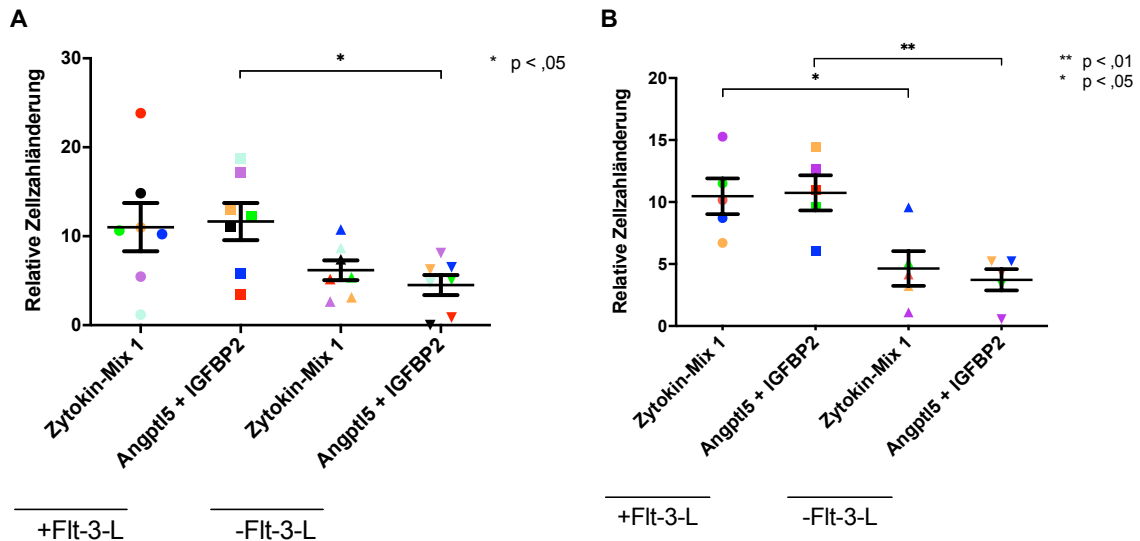


Abbildung 4: Einfluss von Flt-3-L auf die 11-tägige Expansion CD34⁺ HSCs

11-tägige Expansion der HSCs aus (A) Nabelschnurblut- ($n = 7$) und (B) MDS-Proben ($n = 5$) bei zwei Kontrollbedingungen. Vergleich der relativen Zellzahländerungen nach 11-tägiger Kultur. Figuren mit den gleichen Farben gehören zur gleichen (A) Nabelschnurblut- bzw. (B) MDS-Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern. (A) Nabelschnurblut-Proben: NSB4, NSB6, NSB7, NSB8, NSB9, NSB10, NSB11. (B) MDS-Proben: MDS6, MDS7, MDS8, MDS3 MDS9.

Insgesamt ließ sich im Medium mit Flt-3-L eine 2,5-fach bessere Expansion von MDS-HSCs im Vergleich zur Kontrolle ohne Flt-3-L erzielen. Bei Vorhandensein des Flt-3-L in Kultur erhöhte sich die Zellzahl durchschnittlich um das 10,6-Fache verglichen mit der 4,2-fachen Erhöhung ohne Flt-3-L in Kultur. Aufgrund dieser im ungepaarten doppelseitigen t-Test als statistisch signifikant eingestufte Verbesserung der Expansion ($t(18) = 5,19$; $p < ,0001$; $n_1 = 10$; $n_2 = 10$) erfolgten weitere *in vitro* Expansionsexperimente mit sowohl MDS- als auch Kontrollproben bei Zusatz von Flt-3-L.

4.1.2 Kein Einfluss von Angptl5 mit IGFBP2 auf die Zellexpansion

Mit dem Ziel der weiteren Optimierung des Kultivierungsmediums für MDS-HSCs widmeten wir unsere Aufmerksamkeit Angiopoietin-like 5 (Angptl5) und Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2), die in Arbeiten von Zhang et al. (2008) eine Verbesserung der Expansion aus Nabelschnurblut-HSCs bewirkten. Mit den folgenden Experimenten beantworteten wir die Frage, ob diese Zusätze für die *in vitro* Expansion von MDS-HSCs vorteilhaft sind.

Es zeigte es sich, dass die zusätzlichen Proteine Angptl5 und IGFBP2 im Kultivierungsmedium „Zytokin-Mix 1“ die Zellexpansion von HSCs weder aus Nabelschnurblut noch aus MDS-Knochenmark im Vergleich zur Kultur mit „Zytokin-Mix 1“ ohne Proteine positiv beeinflussten. Die Unterschiede der relativen Zellzahländerungen zwischen zwei verschiedenen Mixen haben sich unabhängig davon, ob den Medien Flt-3-L zugemischt wurde, in ungepaarten doppelseitigen *t*-Tests als nicht signifikant ergeben.

Als Kontrolle wurden Nabelschnurblut-HSCs genommen, deren Zellzahlen sich im Medium „Zytokin-Mix 1“ mit Zusatz von Flt-3-L, Angptl5 und IGFBP2 durchschnittlich um das 11,6-Fache vervielfachten. Im Medium ohne Angptl5 mit IGFBP2 konnten sich die Zellzahlen bei sonst gleichen Bedingungen um das 11-Fache erhöhen. Die statistisch nicht signifikante Differenz der oben angegeben mittleren relativen Zellzahländerungen betrug damit $0,6 \pm 3,4$. Die mittleren relativen Zellzahländerungen der MDS-HSCs in Medien ohne Flt-3-L betrug im Vergleich zu den Medien mit Flt-3-L weniger (siehe **Kapitel 4.1.1**), aber die Differenz der mittleren relativen Zellzahländerungen zwischen den beiden Gruppen betrug 1,7 (95 %-CI [0; 5,13]) und zeigte sich damit ebenso statistisch nicht signifikant.

Ähnlich den Nabelschnurblutproben erhöhten sich die Zellzahlen von MDS-HSCs in Medium „Angptl5 + IGFBP2“ mit Zusatz von Flt-3-L durchschnittlich um das 10,7-Fache (mit einem *SEM* von 1,4). Ohne Zusatz von Flt-3-L erhöhten sich die Zellzahlen im gleichen Medium durchschnittlich um das 3,7-Fache (mit einem *SEM* von 0,9). Im gepaarten doppelseitigen *t*-Test mit einem *p*-Wert von 0,77 hat sich ergeben, dass die mittlere relative Zellzahländerung in den Medien ohne Angptl5 und IGFBP2 um $0,3 \pm 1,1$ weniger betrug. Diese Differenz ist mit einem *p*-Wert von 0,77 als statistisch nicht signifikant zu werten ($t(9) = 0,30; n = 10$).

Zusammenfassend zeigt die Zugabe der Proteine Angptl5 und IGFBP2 zum Kultivierungsmedium „Zytokin-Mix 1“ keinen Einfluss auf die Zellexpansion von HSCs weder aus Nabelschnurblut noch aus MDS-Knochenmark.

4.1.3 Keine Verbesserung der Zellexpansion durch Zusatz von UM171

Die Behandlung der HSCs aus Nabelschnurblut mit einem Kleinmolekül UM171 erhöhte in Arbeiten von Fares et al. (2014) die Anzahl der Zellen und erhielt deren Stammzellcharakter. Anhand der folgenden Experimente prüften wir, ob das auch für die Zellexpansion von HSCs aus MDS-Knochenmark zutrifft.

Wir untersuchten das Kleinmolekül UM171 auf einen möglichen fördernden Effekt auf die HSCs-Expansion bei Vorhandensein des Flt-3-Liganden in Kultur. Hierzu verglichen wir zwei unterschiedliche Medien während einer 11-tägigen Kultivierung miteinander. Dem

Medium „Zytokin-Mix 1“ wurde in den Kontrollbedingungen das Lösungsmittel von UM171 DMSO und den Experimentalbedingungen UM171 zugesetzt.

Multiple ungepaarte doppelseitige *t*-Tests zeigten, dass UM171 insgesamt keinen positiven Einfluss auf die HSC-Expansion in den verwendeten Kulturmedien ausübte.

Vor dem Vergleich der unterschiedlichen Bedingungen für die Kultur der MDS-HSCs wurden diese in Kulturen mit HSCs aus Nabelschnurblut einander gegenübergestellt. In Kulturen mit Nabelschnurblut-HSCs ließ sich im Medium mit UM171 eine 1,4-fach schlechtere Expansion im Vergleich zur Kontrolle ohne UM171 feststellen (siehe **Abbildung 5**). Der Mittelwert der relativen Zellzahländerungen lag ohne UM171 in Kultur bei 59,6 (95 %-CI [51,9; 65,8]). Er sank bei Zusatz von UM171 auf 42,5 (95 %-CI [33,2; 52,8]). Diese Reduktion der erreichten Zellzahl an Tag 11 der Kultur ergab sich in dem ungepaarten doppelseitigen *t*-Test als hoch signifikant ($t(8) = 4,07$, $p < ,01$, $n_1 = 5$, $n_2 = 5$).

Der Zusatz von UM171 zur Kultur von HSCs aus Hüftköpfen beeinflusste im Unterschied zu Nabelschnurblut-HSCs kaum die Zellzahl an Tag 11 der Kultur (siehe **Abbildung 5**). Die mittlere Differenz der relativen Zellzahländerungen zwischen der Kontrollgruppe ohne UM171 und der Experimentalgruppe mit UM171 lag bei 1,0 (95 % CI [-2,3; 4,4]). Damit war der Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen statistisch nicht signifikant (gepaarter doppelseitiger *t*-Test: $t(4) = 0,86$; $n = 5$).

Anschließend wurde UM171 zu Kulturen mit MDS-HSCs gegeben (siehe **Abbildung 5**). Ähnlich wie für die Hüftkopf-Proben beobachtet führte UM171 in den untersuchten Medien zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Zellzahlen bei der Expansion von MDS-HSCs. In der Kontrollgruppe ohne Angptl5 und IGFBP2 reduzierte sich die erreichte Zellzahl bei Zusatz von UM171 im Vergleich zur Kontrolle ohne UM171 nicht signifikant um das 1,3-Fache (ungepaarter doppelseitiger *t*-Test: $t(8) = 2,24$; $p = 0,06$; $n_1 = 5$; $n_2 = 5$).

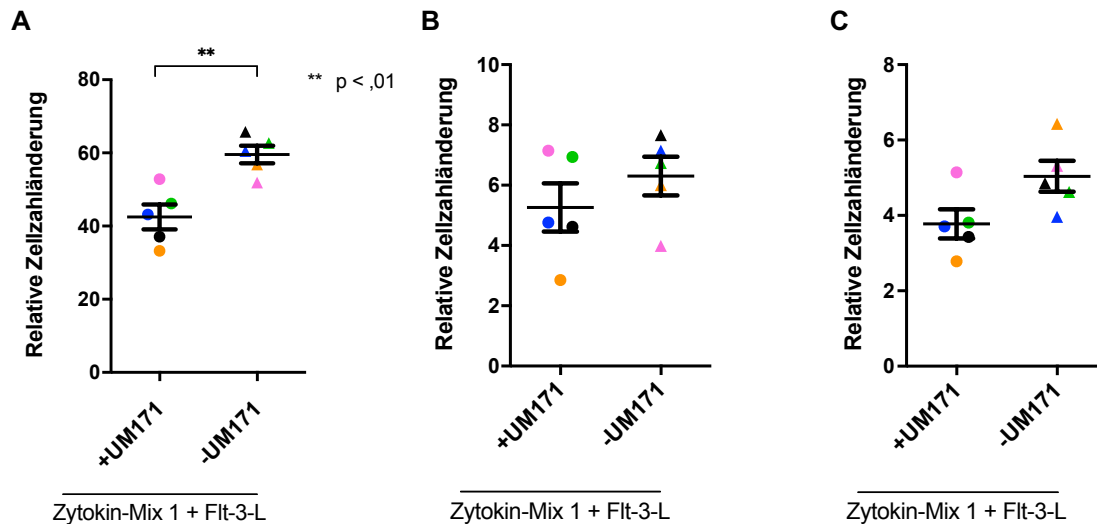


Abbildung 5: Einfluss von UM171 auf die 11-tägige Expansion CD34⁺ HSCs

(A – C) Vergleich der relativen Zellzahländerungen nach 11-tägiger Kultur von CD34⁺ HSCs aus Nabelschnurblut (A, n = 5), Hüftkopf- (B, n = 5) und MDS-Knochenmark (C, n = 5) bei 2 unterschiedlichen Kulturbedingungen, jeweils mit oder ohne Zusatz von UM171. Figuren mit den gleichen Farben gehören zur gleichen MDS-Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern. (A) NSB-Proben: NSB5, NSB12, NSB13, NSB14, NSB15. (B) Hüftkopf-Proben: HK1, HK2, HK3, HK4, HK5. (C) MDS-Proben: MDS1, MDS2, MDS3, MDS4, MDS5.

Zusammenfassend führte die Zugabe des Kleinmolekül UM171 zu 11-tätigen Kulturen von MDS-, Hüftkopf- und Nabelschnurblut-HSCs zu keiner statistisch signifikanten Verbesserung der Zellexpansion.

4.1.4 Keine Verbesserung der Zellexpansion durch Zusatz von Polyvinylalkohol

Neuste Untersuchungen von murinen HSCs identifizierten Polyvinylalkohol (PVA) als vielversprechende Medienzugabe, um murine HSCs zu expandieren und zu transplantieren (Wilkinson et al., 2019). Die Frage nach einer möglichst hohen Proliferation bei gleichzeitig geringer bzw. keiner Differenzierung von MDS-HSCs durch Behandlung mit PVA wurde anhand der folgenden Experimente beantwortet.

Die Testung von PVA erfolgte, ähnlich wie die vom Kleinmolekül UM171, bei Vorhandensein des Flt-3-Liganden in Kultur. Wir expandierten 11 Tage lang HSCs aus MDS- und Nabelschnurblutproben im Medium „Zytokin-Mix 1“ mit (Experimentalgruppe) oder ohne PVA (Kontrollgruppe).

Weder das Kleinmolekül UM171 noch die Proteine Angptl5 mit IGFBP2 übten einen positiven Einfluss auf die relativen Zellzahländerungen der expandierten HSCs aus. Aus diesem Grund verzichteten wir auf die Gruppen „UM171“ und „Angptl5 + IGFBP2“ jeweils mit oder ohne PVA-Zusatz.

Die mittlere Differenz der durch Nabelschnurblut-HSCs am Tag 11 der Kultur erreichten relativen Zellzahländerungen zwischen den Kontroll- und Experimentalgruppen lag bei 3,4

(mit einem SEM von 2,8). Im gepaarten doppelseitigen *t*-Test zeigte sich diese Differenz als nicht signifikant ($t(2) = 1,23$; $n = 3$; $p = 0,35$).

Genauso wie bei den Experimenten mit Nabelschnurblut-HSCs zeigten sich bei der Expansion von MDS-HSCs keine signifikanten Unterschiede der relativen Zelländerungen durch die Behandlung mit PVA (gepaarter doppelseitiger *t*-Test: $t(5) = 1,06$; $p = 0,34$, $n = 6$).

Die mittlere relative Zellzahländerung bei der Expansion von MDS-HSCs in PVA-Zytokinmischung lag bei 6,7 (mit einem SEM von 2,04) und betrug um $26,7 \pm 9,6$ weniger als die von Nabelschnurblut-HSCs. Dieser quantitative Unterschied in der Expansion mit Zusatz von PVA zwischen MDS- und Nabelschnurblut ergab sich in dem ungepaarten doppelseitigen *t*-Test als signifikant ($t(7) = 2,77$; $p = 0,03$; $n_1 = 6$; $n_2 = 3$).

Die **Abbildung 6** zeigt eine repräsentative Wachstumskurve MDS-HSCs in 2 unterschiedlichen Medien: „Zytokin-Mix 1“ und „PVA“.

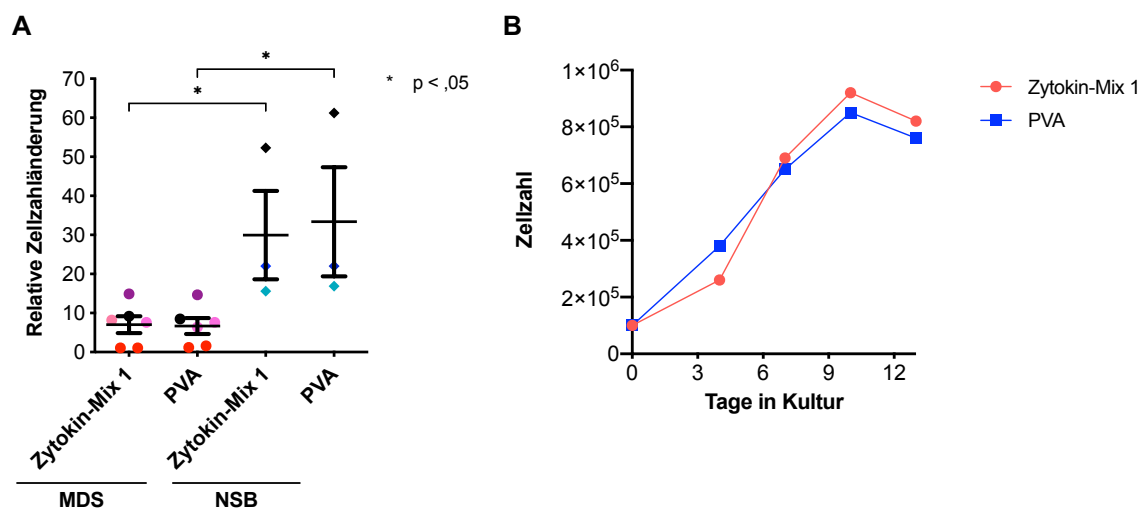


Abbildung 6: Einfluss von PVA auf Expansion $CD34^+$ HSCs

(A) Relative Zellzahländerungen nach 11-tägiger Kultur von $CD34^+$ HSCs aus MDS-Knochenmark (MDS, $n = 6$) und Nabelschnurblut (NSB, $n = 3$) im „Zytokin-Mix 1“ mit oder ohne Zusatz von PVA. Figuren mit den gleichen Farben gehören zur gleichen MDS-Probe. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern. Verwendete Proben: MDS20, MDS11, MDS12, NSB1, NSB16, NSB17. **MDS**, Myelodysplastisches Syndrom. **NSB**, Nabelschnurblut. (B) Repräsentative Wachstumskurve von $CD34^+$ HSCs aus MDS-Knochenmark (Probe MDS10) bei 2 unterschiedlichen Kulturbedingungen.

Insgesamt zeigte sich der Einfluss von PVA auf die 11-tägige Kultur von MDS- und Nabelschnurblut-HSCs im „Zytokin-Mix 1“ in multiplen *t*-Tests als statistisch nicht signifikant. Die Nabelschnurblut-HSCs expandieren dabei viel besser als die MDS-HSCs.

4.1.5 Erhaltung des Stammzellcharakters während der Kultivierung von HSCs

Durch die oben dargestellten Experimente zeigten wir die unterschiedliche quantitative Beeinflussung der HSCs-Expansion durch die Medienzusätze Flt-3-L, Angptl5 mit

IGFBP2, UM171 und PVA. Für die Optimierung des MDS-Xenotransplantationsmodells war allerdings nicht nur die hohe Proliferationsrate, sondern auch der Erhalt des Stammzellcharakters während der Kultivierung wichtig. Mit dem Ziel, die Änderung des Stammzellcharakters während der Expansion zu erfassen, führten wir und durchflusszytometrische Analysen Standard CFU-Assays vor und nach der Kultivierung der Zellen durch. Ein Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse ist in der **Abbildung 7** dargestellt:

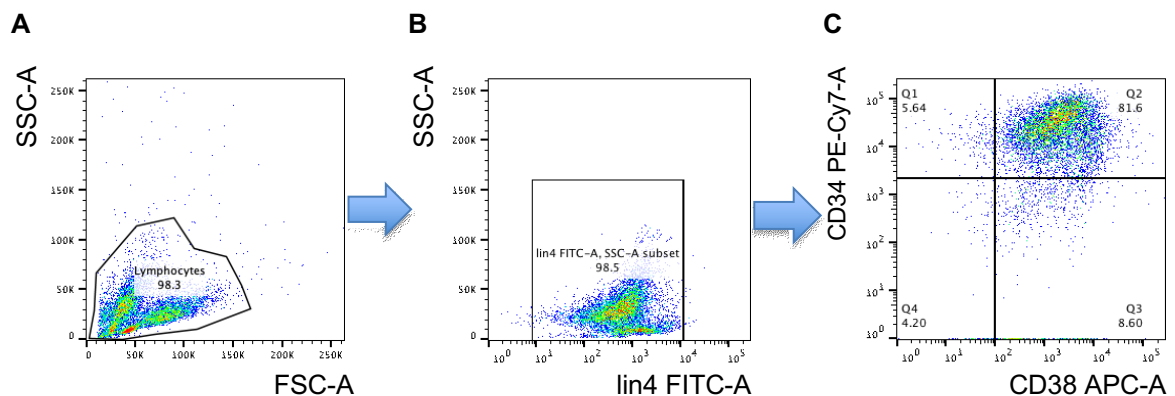


Abbildung 7: Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse der Zellen aus der MDS-Probe MDS11 vor der Expansion

(A) Darstellung von Seitwärtsstreulicht (SSC-A) gegen Vorwärtsstreulicht (FSC-A) der analysierten Zellen in einem Streudiagramm. Die ausgewählte Region in dem Streulicht-Dot-Plot definiert die Lymphozyten innerhalb aller untersuchten Zellen. **(B)** Darstellung von SSC-A gegen die lin- Markierung. Die Auswahl entspricht der Fraktion von lin- Zellen innerhalb der in (A) gezeigter Population der Lymphozyten. **(C)** Darstellung von CD34 Markierung gegen die CD38 Markierung.

In der **Abbildung 7** wurde gezeigt, wie die genaue Identifizierung der Fraktion $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ Zellen innerhalb aller analysierten Zellen mittels der Gating Strategie erfolgte. Als erstes wurde in einem Streudiagramm das Parameter Seitwärtsstreulicht (SSC-A) gegen das Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC-A) aufgetragen, in dem die Zellen anhand ihrer Größe und Granularität verteilt wurden. Hier wurden zuerst alle Zellpopulationen ausgewählt, diese entsprechen den Lymphozyten und werden in einem sogenannten „Gate“ zusammengefasst. Ein Gate stellt immer eine Region oder Auswahl von Zellen dar, die zu einer neuen Darstellung dient. Aus dem Lymphozyten Gate wurden dann die Zellen ausgewählt, die nicht differenziert sind und damit negativ für die Hauptmarker der hämatopoetischen Linien wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen, Erythrozyten und Granulozyten. Aus dieser Zellpopulation wurden dann der Anteil der CD34^+ Zellen und der CD38^- Zellen bestimmt. In den durchflusszytometrischen Analysen ergab sich eine statistisch signifikante Zunahme der $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ Zellfraktion während der 11-tägigen Expansion von HSCs aus MDS- und Nabelschnurblutproben-Proben im „Zytokin-Mix 1“ (siehe **Abbildung 8**). Bei der

Expansion von MDS-HSCs betrug sie im Schnitt $23,6 \pm 6,8$ % (gepaarter doppelseitiger t-Test: $t(10) = 3,48$; $p < ,01$; $n = 11$), bei der Kultivierung von HSCs aus Nabelschnurblut lag sie bei $25,8 \pm 5,7$ % (gepaarter doppelseitiger t-Test: $t(10) = 5,52$; $p < ,01$; $n = 11$).

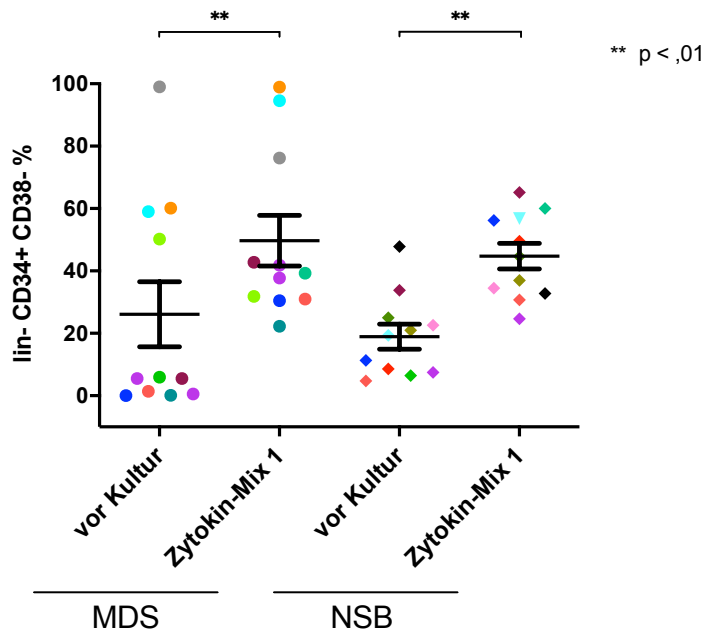


Abbildung 8: Keine signifikante Differenzierung von HSCs während der HSCs-Kultivierung

Vergleich der $lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$ Fraktion mittels durchflusszytometrischer Analysen vor und nach 11-tägigen Expansion von HSCs aus MDS-Knochenmark ($n = 11$) und Nabelschnurblut ($n = 11$) im „Zytokin-Mix 1“. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern. Figuren mit den gleichen Farben gehören zur gleichen (MDS) MDS- bzw. (NSB) Nabelschnurblut-Probe. Nabelschnurblut-Proben: NSB4, NSB6, NSB7, NSB8, NSB9, NSB10, NSB11, NSB16, NSB1, NSB18. MDS-Proben: MDS6, MDS7, MDS8, MDS3 MDS9, MDS1, MDS3, MDS4, MDS5. **MDS**, Myelodysplastisches Syndrom. **NSB**, Nabelschnurblut.

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss von Zusätzen in Zytokinmischungen auf die Änderung der $lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$ Fraktion während der Kultivierung von HSCs. Dafür teilten wir nicht-expandierende Zellen in die Kontroll- und in verschiedenen Zytokinmischungen expandierende Zellen in die Experimentalgruppen ein. Für die Expansion von Nabelschnurblut-HSCs wurden folgende Zytokinmischungen verwendet: „Zytokin-Mix 1“ und „Angptl5 + IGFBP2“ jeweils mit Flt-3-L-Zusatz. MDS-HSCs wurden mit den gleichen Zytokinmischungen wie die Nabelschnurblut-HSCs und zusätzlich mit der Zytokinmischung „UM171“ expandiert. Wir verzichteten auf UM171-Gruppen für die Durchflusszytometrie und den Standard CFU-Assay für Proben aus Nabelschnurblut, weil UM171 in HSCs-Kulturen aus Nabelschnurblut zu einer signifikanten Reduktion der am Tag 11 der Expansion erreichten Zellzahl führte (siehe **Kapitel 4.1.3**). Die Untersuchung des PVA-Einflusses auf den Stammzellcharakter von HSCs aus Nabelschnurblut und MDS-Knochenmark erfolgte separat von anderen Experimentalgruppen. Dafür wurden zwei Kontrollgruppen, die Gruppe von nicht-expandierten und von im „Zytokin-Mix 1“

expandierten Zellen, der Experimentalgruppe von im „PVA“-Medium expandierten Zellen gegenübergestellt.

Anhand der durchflusszytometrischen Analysen der Nabelschnurblut- und MDS-HSCs vor und am letzten Tag der Kultur ließ sich keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen in der Varianzanalyse (ANOVA) feststellen (Nabelschnurblut-HSCs: $F(3, 24) = 0,52$; $p = 0,67$. MDS-HSCs: $F(1,081; 3,243) = 4,71$; $p = 0,11$) (siehe **Abbildung 9**). Es zeigten sich in gepaarten doppelseitigen t -Tests keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Oberflächenproteinen CD34 und CD38 zwischen den mit „Zytokin-Mix 1“ und mit PVA expandierten Nabelschnurblut- und MDS-HSCs (Nabelschnurblut-HSCs: $t(1) = 1,044$; $p = 0,4863$; $n = 2$. MDS-HSCs: $t(4) = 0,86$; $p = 0,44$, $n = 5$). Es konnte keine Korrelation zwischen den Änderungen von CD34⁺CD38⁻ Fraktion während der Kultivierung von MDS-HSCs und Zugehörigkeit des Patienten der jeweiligen Probe zu einer bestimmten Kategorie in der WHO-Klassifikation für MDS festgestellt werden.

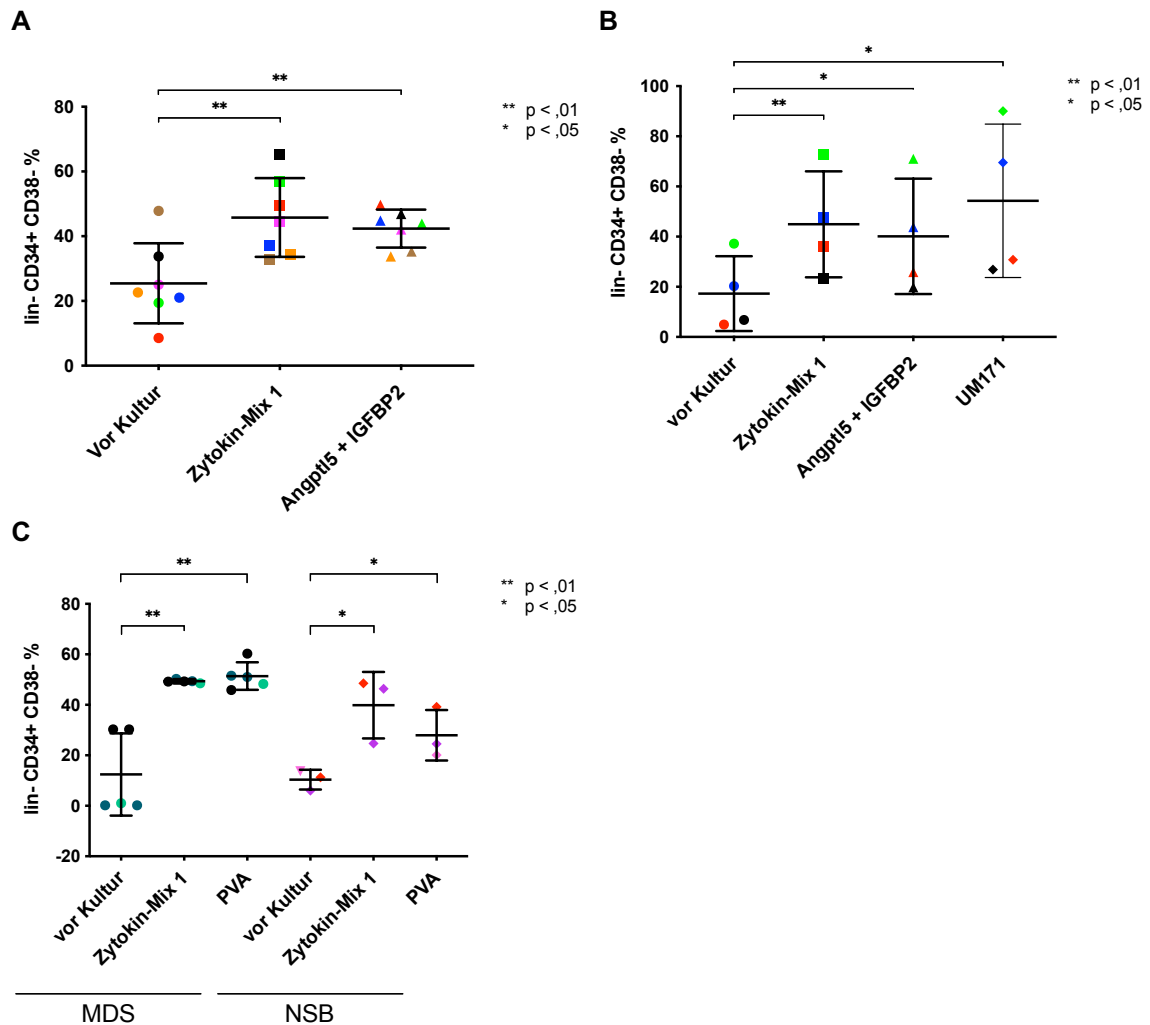


Abbildung 9: Beurteilung der Differenzierung von HSCs aus Nabelschnurblut- und MDS-Proben während der Kultivierung anhand durchflusszytometrischer Analysen

Vergleich der lin-CD34⁺CD38⁻ Fraktion in durchflusszytometrischen Analysen von HSCs aus Nabelschnurblut- (A) und MDS-Proben (B) vor und nach 11-tägiger Kultivierung bei unterschiedlichen Bedingungen. (C) Keine signifikante Differenzierung von HSCs aus MDS-Knochenmark (n = 5) und Nabelschnurblut (n = 3) während der Kultivierung in „Zytokin-Mix 1“ und „PVA“. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern. Figuren mit den gleichen Farben gehören zur gleichen (A) Nabelschnurblut- bzw. (B) MDS-Probe. (A) Nabelschnurblut-Proben: NSB4, NSB6, NSB7, NSB8, NSB9, NSB10, NSB11; (B) MDS-Proben: MDS1, MDS3, MDS4, MDS5; (C) Verwendete Proben: MDS20, MDS11, MDS12, NSB1, NSB16, NSB17.

MDS, Myelodysplastisches Syndrom. **NSB**, Nabelschnurblut.

In einem Standard CFU-Assay bei den Experimenten mit Nabelschnurblut lag die Anzahl der gebildeten Kolonien im Schnitt bei $154,6 \pm 127,4$ (siehe **Abbildung 10**). Die Variation zwischen der Anzahl gebildeter Kolonien durch verschiedene Kolonien war nicht signifikant (ANOVA-Test: $F(4, 29) = 0,25$; $p = 0,91$).

In einem Standard-CFU-Assay mit MDS-Zellen betrug die mittlere Anzahl der durch expandierte HSCs gebildeten Kolonieeinheiten pro Platte $71,8 \pm 5,3$ (siehe **Abbildung 10**). Expandierte MDS-HSCs bildeten dabei durchschnittlich um $22,6 \pm 12,1$ Kolonieeinheiten mehr als nicht-expandierte MDS-HSCs. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen von expandierten und nicht-expandierten MDS-HSCs erwies sich aber in

einem gepaarten doppelseitigen t-Test mit einem p-Wert von 0,09 als statistisch nicht signifikant ($t(11) = 1,87$; $n = 12$). Der Unterschied zwischen den untersuchten 3 Experimentalgruppen war in der Varianzanalyse (ANOVA) ebenso statistisch nicht signifikant ($F(2, 9) = 0,60$; $p = 0,57$).

Die Kolonieeinheiten aus Kulturen mit PVA-Zusatz konnten aufgrund der zu niedrigen für den Assay angesetzten Zellzahl in Standard CFU-Assays nicht statistisch mitbeurteilt werden. Die CFU-Anzahl nach der 14-tägigen Inkubation lag unter 48 und somit nicht in dem für eine korrekte statistische Analyse benötigtem Bereich zwischen 50 und 100.

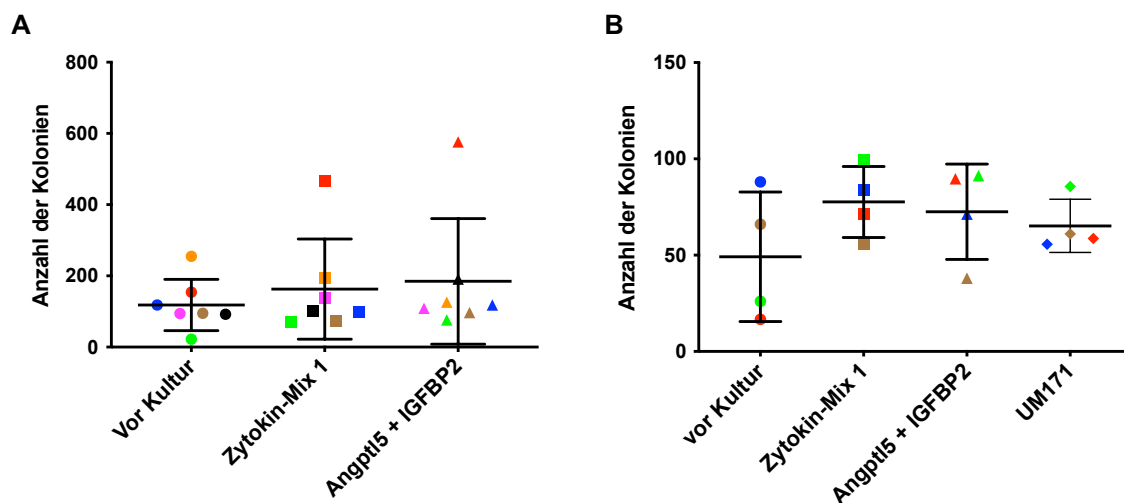


Abbildung 10: Beurteilung der Differenzierung von HSCs aus Nabelschnurblut- und MDS-Proben während der Kultivierung anhand des Standard CFU-Assay

Vergleich von CFU-Anzahl pro Platte im Standard CFU-Assay, gebildet von Nabelschnurblut- (A) und MDS-Proben (B) vor und nach 11-tägiger Kultivierung bei unterschiedlichen Bedingungen.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern. Figuren mit den gleichen Farben gehören zur gleichen (A) Nabelschnurblut- bzw. (B) MDS-Probe. Nabelschnurblut-Proben: NSB4, NSB6, NSB7, NSB8, NSB9, NSB10, NSB11. MDS-Proben: MDS1, MDS3, MDS4, MDS5.

Weiter wurden in einem Standard-CFU-Assay zusätzlich vereinzelt die durch expandierten und nicht-expandierten HSCs gebildeten Burst forming unit erythroids (BFU-E) und Colony-Forming Unit-Erythroid (CFU-E) morphologisch miteinander verglichen, um eine Aussage bezüglich der Qualität der expandierten im Vergleich zu nicht-expandierten HSCs zu ermöglichen.

CFU-E können ausschließlich zu Erythrozyten differenzieren. Im Gegensatz dazu sind BFU-E multipotente HSCs. Allerdings weisen CFU-E und BFU-E starke optische Ähnlichkeiten auf. Mikroskopisch stellen sie sich als Kolonien mit mehr als 200 Erythroblasten in einzelnen oder mehreren Clustern dar. Sie erscheinen rot oder braun, da die Zellen hämoglobiniert sind. Der einzige mikroskopisch erkennbare Unterschied zwischen den beiden Kolonieeinheiten ist der bei BFU-E vorhandene zusätzliche leichte Randbereich mit weißen Zellen. Da die eindeutige Identifizierung von BFU-E schwierig

war, wurden die BFU-E zusammen mit CFU-E betrachtet. Der Grund für die Betrachtung dieser Koloniereinheiten war, dass MDS mit einem geringen Wachstum von BFU-E assoziiert ist (DeZern et al., 2013; Geissler et al., 1988; Shih et al., 1991). In der **Abbildung 11** sind die mikroskopischen Aufnahmen von durch expandierten und nicht-expandierten HSCs aus MDS- und Hüftkopfproben in einem Standard-CFU gebildeten BFU-E und CFU-E unter 5-facher Vergrößerung dargestellt:

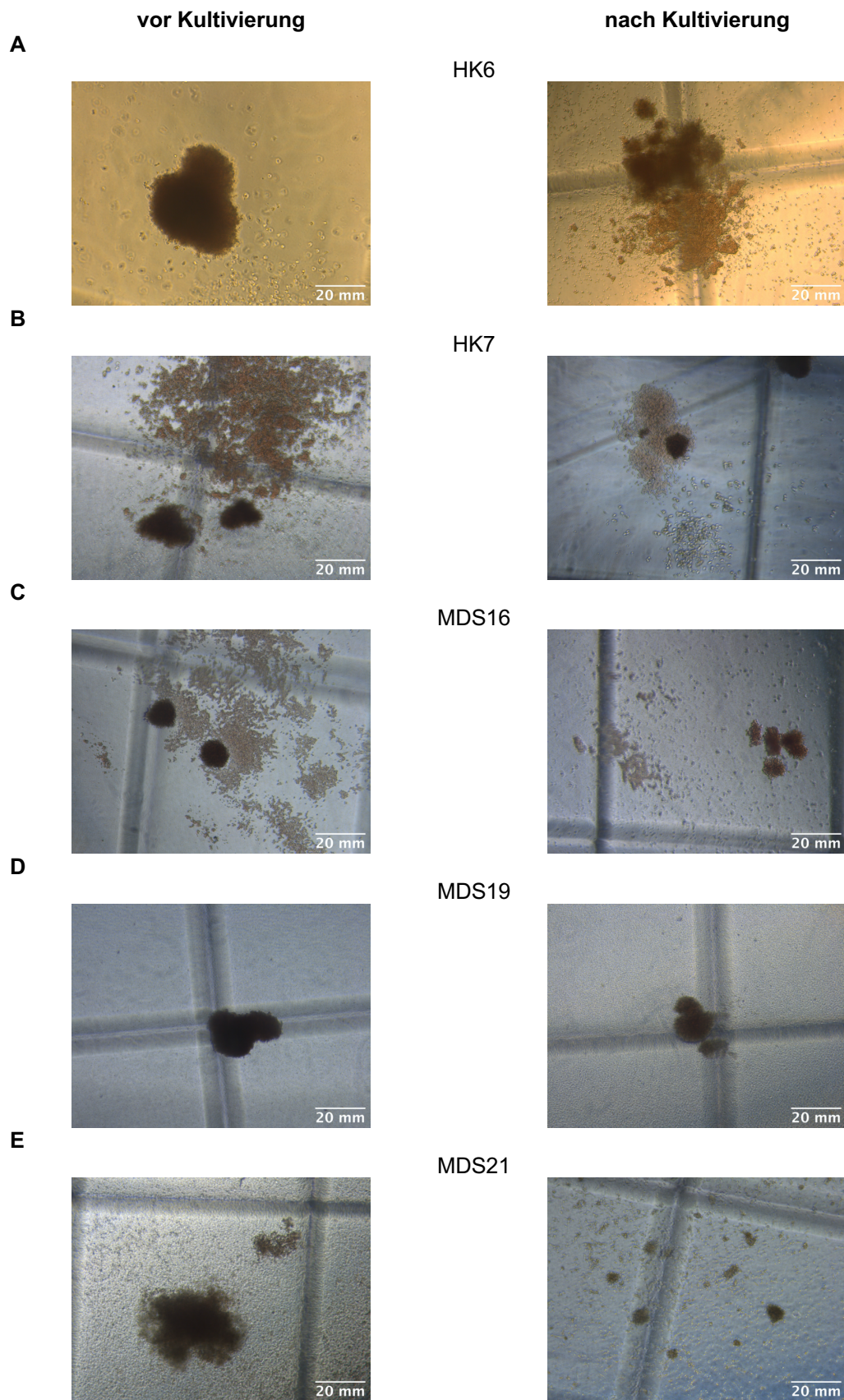


Abbildung 11: Ergebnisse des CFU-Assay

Vergleich von BFU-E (Burst forming unit erythroid) und CFU-E, gebildet von frisch aufgetauten („vor Kultivierung“, linke Spalte in der Abbildung) und im „Zytokin-Mix 1“ mit Zusatz von Flt-3-L („nach Kultivierung“, rechte Spalte in der Abbildung) HSCs aus Proben HK6 (A), HK7 (B), MDS16 (C), MDS19 (D), MDS21 (E). Mikroskopische 5-fache Vergrößerung.

Aus den Aufnahmen geht hervor, dass sich durch die beiden Gruppen gebildete Kolonievinheiten nicht stark voneinander unterscheiden. Die Farbe der durch die expandierten HSCs gebildeten BFU-E/CFU-E erscheint im Vergleich zur Farbe der durch die nicht-expandierten HSCs gebildeten Kolonievinheiten weniger intensiv. Eine weitere Beobachtung war, dass die kultivierten HSCs einen insgesamt kleineren Anteil von gebildeten BFU-E/CFU-E im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufwiesen.

Zusammenfassend legen die durchflusszytometrischen Analysen und CFU-Assays nahe, dass die *in vitro* Expansion unter allen untersuchten Bedingungen zu keiner signifikanten Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut oder MDS-Knochenmark führte.

4.2 NSG Xenograft Transplantationsassay

4.2.1 Primäre Transplantation

Mit dem Ziel, das MDS-Xenotransplantationsmodell zu optimieren, erfolgte die HSCT von in Kultur expandierten und als Kontrolle nicht-expandierten CD34⁺ MDS-HSCs. Die Zellen aus Proben von insgesamt 4 MDS-Patienten (Proben MDS13 – MDS16) wurden zusammen mit entsprechenden MSCs in insgesamt 63 NSG Mäuse intrafemoral injiziert.

Die Kontrollgruppe bestand aus der Subgruppe von frisch aufgetauten CD34⁺ HSCs. Die Experimentalgruppe bestand aus fünf Subgruppen: aus einer Subgruppe von aus MNCs isolierten CD34⁺ Zellen und jeweils zwei Subgruppen mit unterschiedlicher Zellzahl von nach Auftauen und von nach MACS-Isolation expandierten HSCs. Eine Übersicht der Gruppeneinteilung und der Plan des Experiments sind der **Tabelle 12** und der **Abbildung 12** zu entnehmen.

Tabelle 12: Gruppeneinteilung für die *in vivo* Experimente

Intrafemorale Injektion von 1×10^6 MSCs + 2 - 6×10^5 HSCs pro Maus nach sublethaler Konditionierung						
	Kontroll- gruppe	Experimentalgruppen				
		Frisch aufgetaute CD34 ⁺			Frisch isolierte CD34 ⁺ aus MNCs	
Nr. der Subgruppe	1	2	3	4	5	6
Entsprechendes Schema in Abbildung 12	A	B	B	C	D	D
Expansion	nein	ja	ja	nein	ja	ja
Anzahl der injizierten Zellen pro Femur	1×10^5	1×10^5	$\geq 2 \times 10^5$	1×10^5	1×10^5	3×10^5
Anzahl der injizierten Femura	2	2	2	2	2	2
Anzahl der injizierten Zellen pro Maus	2×10^5	2×10^5	$\geq 4 \times 10^5$	2×10^5	2×10^5	6×10^5
Tierzahl bei MDS13	4	4	0	0	0	0
Tierzahl bei MDS14	4	4	3	4	4	2
Tierzahl bei MDS15	4	3	2	0	0	0
Tierzahl bei MDS16	4	3	0	4	0	0
Gesamtterzahl pro Subgruppe	16	14	5	8	4	2

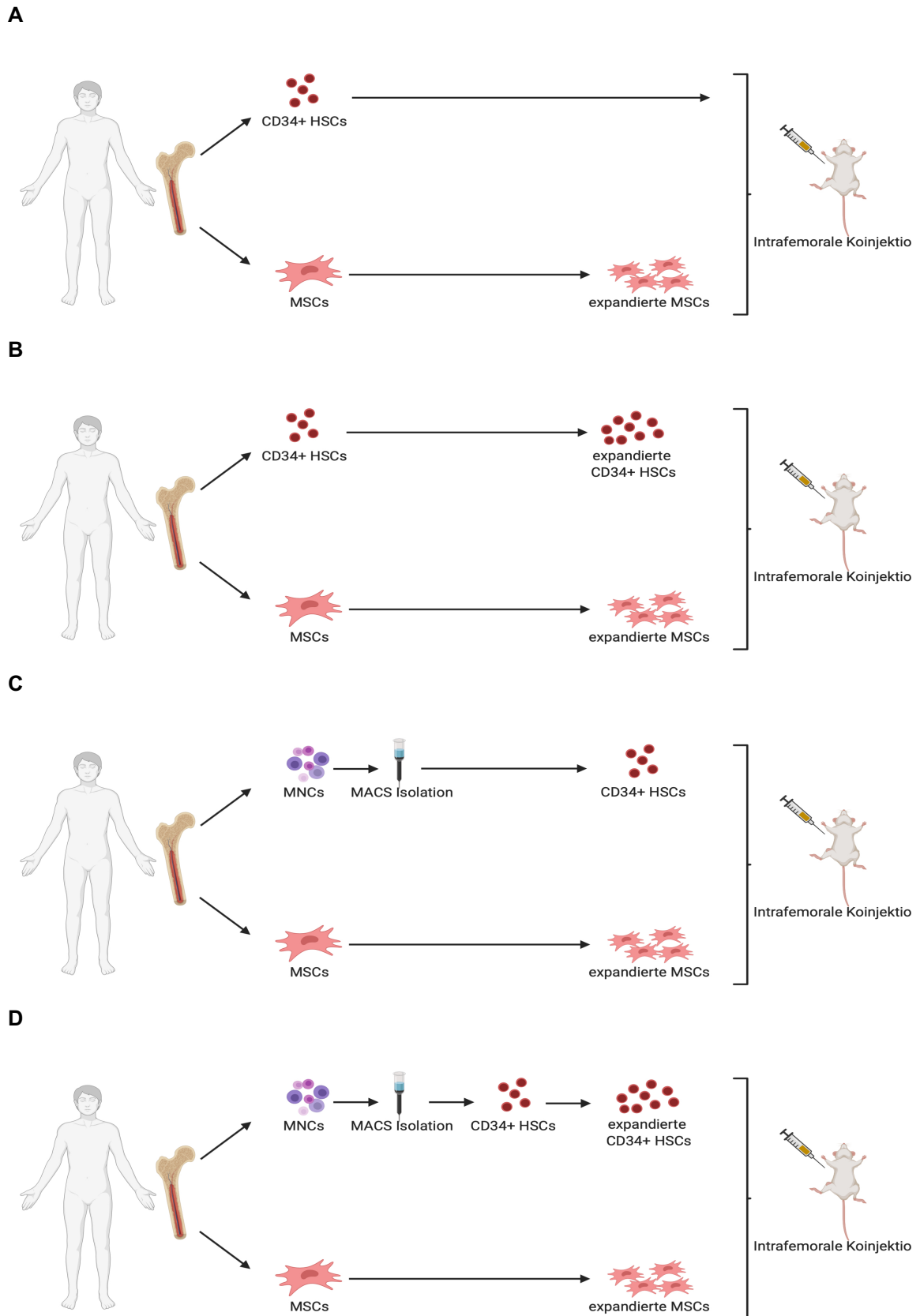


Abbildung 12: Schemata der Experimente in verschiedenen Gruppen
(A) Gruppe „Frisch aufgetaute CD34⁺“; **(B)** Gruppe „Frisch aufgetaute und expandierte CD34⁺“; **(C)** Gruppe „MACS-isolierte CD34⁺“; **(D)** Gruppe „MACS-isolierte und expandierte CD34⁺“. **HSCs**, hämatopoetische Stammzellen. **MNCs**, mononukleäre Zellen. **MSCs**, mesenchymale Stromazellen. **MACS Isolation**, magnetaktivierte Zellsortierung.

2 - 3 Wochen vor der HSCT wurde mit der Expansion von kotransplantierten MSCs begonnen, die nach dem im **Kapitel 3.3.2** beschriebenen Protokoll erfolgte. Am Tag der Transplantation wurden die MSCs geerntet und für die HSCT vorbereitet (siehe **Kapitel 3.3.3**). Bis auf eine Ausnahme wurde bei der HSCT 1×10^6 MSCs pro Maus injiziert. Aufgrund der niedrigen MSCs-Proliferationsrate konnten wir bei den Experimenten mit Proben vom Patienten MDS13 nur $3,4 \times 10^5$ MSCs pro Femur (entspricht $6,8 \times 10^5$ MSCs pro Maus) transplantieren.

Die in den Subgruppen Nr. 2, 3, 5 und 6 verwendeten CD34⁺ Zellen wurden vor der Transplantation bis auf eine Ausnahme von Zellen aus der Probe MDS13 acht Tage lang in Kultur mit „Zytokin-Mix 1“ expandiert. Die Zellen aus der Subgruppe von frisch aufgetauten und expandierten CD34⁺ aus der Probe MDS13 blieben 11 Tage lang in Kultur.

Die Subgruppen Nr. 3 und 6, die Subgruppen mit einer höheren Zahl der expandierten Zellen, wurden eingeführt, wenn CD34⁺ Zellen eine hohe Proliferationsrate in Kultur aufwiesen und die erhaltene Zellmenge die HSCT ermöglichte. Das war der Fall bei dem Patienten MDS14.

In vivo Experimente mit immunomagnetisch isolierten Zellen (Subgruppen Nr. 3 - 6) wurden lediglich mit Proben vom Patienten MDS14 durchgeführt. Der Grund dafür war eine für weitere Experimente nicht ausreichende Menge von MACS-isolierten CD34⁺ Zellen bei Arbeiten mit Proben aus anderen Patienten.

Die HSCT in NSG Mäuse erfolgte 8 - 12 Wochen nach der Geburt nach einem im **Kapitel 3.4.5** aufgeführten Protokoll. 12 Wochen nach der SZT führten wir eine KMP durch. 24 Wochen nach der HSCT erfolgte die Tötung der Mäuse und Gesamtanalyse des Knochenmarks. Sowohl nach 12 als auch 24 Wochen nach der HSCT wurden die aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression des humanen und murinen Oberflächenmarker CD45 untersucht. Damit wurde analysiert, ob sich die humanen Zellen im Knochenmark der Empfängermäuse einnisteten. Die **Abbildung 13** zeigt, wie die genaue Identifizierung der Fraktion humaner hCD45⁺ Zellen innerhalb aller untersuchten CD45⁺ Zellen mittels der Gating Strategie erfolgte. Als erstes wurden in einem Streudiagramm SSC-A gegen die fehlende „Sytox Blue Dead Cell Stain“ Markierung aufgetragen und die Fraktion von lebenden Lymphozyten für den nächsten Plot verwendet. Mithilfe der Darstellung der murinen CD45⁺ Markierung gegen die humane CD45⁺ Markierung konnte nun die Fraktion der lebenden humanen CD45⁺ Zellen dargestellt und der Anteil humaner CD45⁺ Zellen innerhalb aller untersuchten CD45⁺ Zellen bestimmt werden.

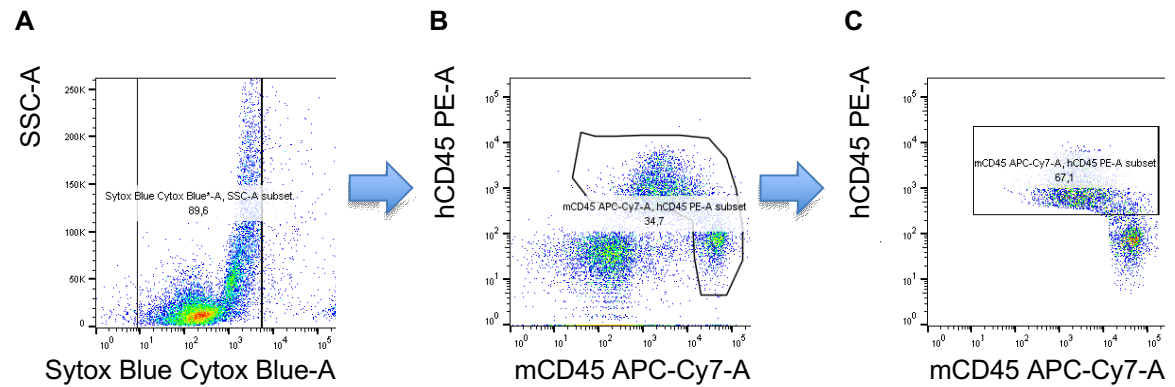


Abbildung 13: Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse und Bestimmung des Engraftments
 Auswertung von rohen Daten mit der Software FlowJo 10.4.1. Engraftmentrate 12 Wochen nach der HSCT von Maus Nr. 1158_20_0207_F4. Subgruppe Nr. 4 (200 000 MACS-isolierte Zellen). Probe MDS14. In der linken Spalte ist die Auswahl der lebenden Zellen gezeigt. In der mittleren Spalte ist die Auswahl der CD45⁺ Zellen gezeigt. In der rechten Spalte ist die Auswahl der hCD45⁺ Population innerhalb aller CD45⁺ Zellen gezeigt.

Eine Übersicht des zeitlichen Verlaufs des Versuchs ist **Abbildung 14** zu entnehmen:

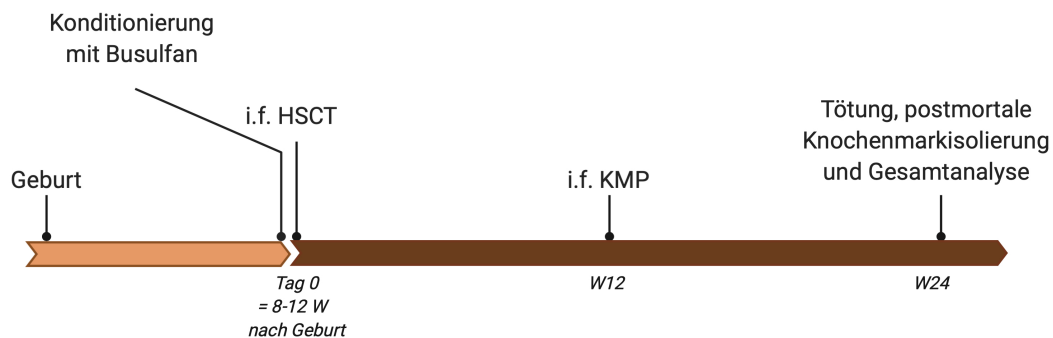


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf des Versuchs

8 – 12 Wochen nach der Geburt erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben die Konditionierung mit Busulfan und HSCT der NSG Mäuse. HSCT bestand aus einer intrafemorale Injektion von MSCs und entsprechenden CD34⁺ Zellen. 12 Wochen nach der HSCT führten wir eine KMP. 24 Wochen nach der HSCT erfolgte die Tötung der Mäuse und Gesamtanalyse. *i. f.*, intrafemorale. *KMP*, Knochenmarkspunktion. *W*, Woche. *HSCT*, hämatopoetische Stammzelltransplantation.

Die Engraftmentraten in der 12. und 24. Woche nach der HSCT konnten bis auf vier Mäuse bei allen Tieren bestimmt werden. Maus Nr. 1158_20_0168_F3, die zur Subgruppe Nr. 3 (600 000 frisch aufgetaute und expandierte Zellen) gehörte, wurde am 76. Tag der Transplantation tot im Käfig vorgefunden. Sie bekam Zellen vom Patienten MDS14 injiziert. Ihre Todesursache konnte nicht geklärt werden. Aufgrund der begonnenen Zersetzungsprozesse des Mausekadaver konnten keine Knochenmarksanalysen durchgeführt werden. Die zweite Maus (Nr. 1158_20_0015_F1), bei der die Engraftmentrate nicht zum richtigen Zeitpunkt bestimmt werden konnte, gehörte zur Subgruppe Nr. 1 (200 000 frisch aufgetaute Zellen) und erhielt mit der HSCT die Zellen des Patienten MDS13. 8 Wochen nach der Transplantation entwickelte sie Anzeichen von Kurzatmigkeit, die gemäß eines Score Sheets ermittelt und beurteilt wurden. Am 63. Tag

nach der HSCT wurde das Tier aufgrund der Erfüllung der Abbruchkriterien nach dem im **Kapitel 3.4.7** aufgeführten Protokoll getötet und eine Analyse des Knochenmarks durchgeführt. Bei dieser Maus zeigte sich eine Engraftment-Rate von 8,6 %. Bei den Versuchstieren Nr. 1158_20_0388_F1 und Nr. 1158_20_0390_F3 aus der Subgruppe Nr. 3 (400 000 frisch aufgetaute und expandierte Zellen), die Zellen von MDS-Probe MDS15 bekamen, wurden die Engraftmentraten lediglich 24 Wochen nach der HSCT bestimmt.

Mäuse, die mindestens 1 % humane CD45⁺-Zellen aufwiesen, wurden als positiv engraftet eingestuft. Bei Betrachtung von Mäusen aus allen Kontrollgruppen zusammen, ist auffallend, dass 73,3 % aller Tiere ein positives Engraftment aufwiesen (siehe **Abbildung 15**). Der Median lag hier bei 2,4 % mit einer großen Spannweite von 96,4 %. Bei allen zur Subgruppe Nr. 2 gehörenden Mäusen lagen 50 % der Engraftment-Raten unter dem Wert von 0,04 %.

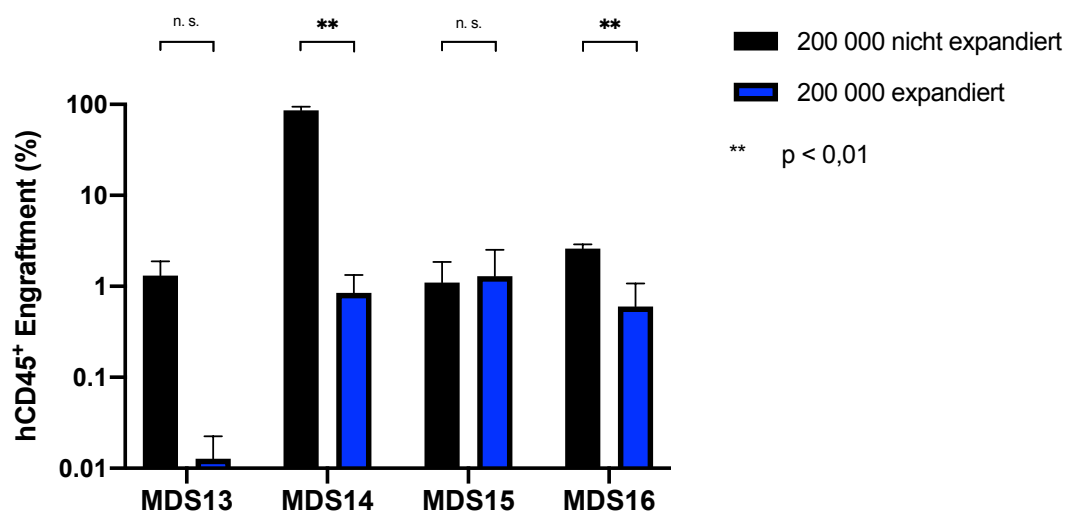


Abbildung 15: Endpunkt-Ergebnisse der Subgruppen 1 und 2 von Proben MDS1 – 16
Durchflusszytometrische Analysen vom Knochenmark 24 Wochen der HSCT. Dargestellt sind Mittelwerte der Engraftmentraten in der jeweiligen Gruppe mit mittleren Standardfehlern. Die Y-Achse ist zur Basis 10 logarithmisch skaliert.

Der Wert von 1 %, der die Schwelle für ein positives Engraftment markiert, entsprach etwa der 70,6 %-Perzentile in der Experimentalgruppe bei einer Spannweite von 3,74 %. Damit wiesen circa 29 % (4 von insgesamt 18 transplantierten Mäusen) ein positives Engraftment in dieser Subgruppe auf. Der Unterschied zwischen der Kontroll- und Subgruppe Nr. 2 ergab sich im gepaarten doppelseitigen *t*-Test als nicht signifikant ($t(3) = 1,049$; $p = 0,37$; $n = 4$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich in multiplen gepaarten *t*-Tests bei Betrachtung der Patientenprobe MDS14 ($t(3) = 10,45$; $p < ,01$; $n = 4$) und der Patientenprobe MDS16 ($t(2) = 13,95$;

$p < 0,01$; $n = 3$) feststellen. Im Gegenteil dazu waren sie bei Patientenproben MDS13 ($t(2) = 2,26$; $p = 0,15$; $n = 3$) und MDS15 ($t(2) = 13,95$; $p = 0,98$; $n = 3$) statistisch nicht signifikant. Die höchsten Mediane der Engraftmentraten sowohl in der Experimental-, als auch in der Kontrollgruppe waren bei der Probe MDS14 festzustellen (siehe **Abbildung 16**). Sie lagen bei 86,2 % mit einer Spannweite von 35,5 % in der Experimental- und bei 0,8 % mit einer Spannweite von 1,7 % in der Kontrollgruppe.

Es konnte keine Korrelation zwischen den erreichten Engraftmentraten und dem MDS-Stadium oder der -Klassifikation der einzelnen MDS-Proben festgestellt werden.

Nähere Daten zu den Transplantationsassays sind der **Tabelle A.3** im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

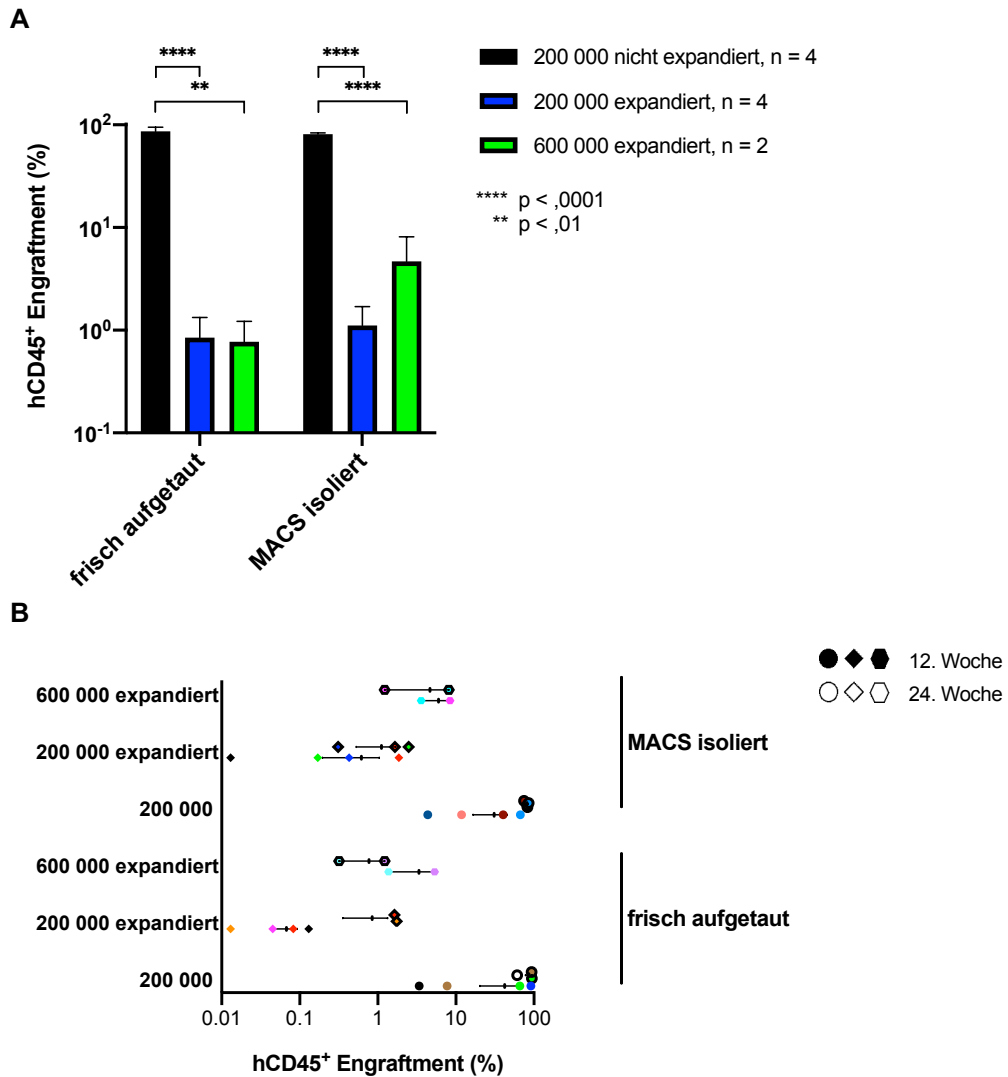


Abbildung 16: Engraftmentrate nach Transplantation der HSCs von der Probe MDS14

Signifikant bessere Engraftmentraten bei Transplantation von nicht-expandierten HSCs in beiden Experimentgruppen im Vergleich zu Gruppen expandierter Zellen. Logarithmische Skalierung zur Basis 10 der Y-Achse (A) bzw. X-Achse (B). (A) Mittelwerte der Engraftmentraten mit Standardfehlern in 6 unterschiedlichen Subgruppen 24 Wochen nach Transplantation. (B) Einzelne Engraftmentraten in 6 unterschiedlichen Subgruppen 12 und 24 Wochen nach der Transplantation mit Mittelwerten und Standardfehlern.

MDS14 war der einzige Patient, dessen Zellen für alle 6 Subgruppen genutzt werden konnten. Das ermöglichte Vergleiche zwischen den einzelnen oder zusammengesetzten Subgruppen.

Für den Vergleich von nicht-expandierten und expandierten Zellen aus der Probe MDS14 wurden die jeweiligen Subgruppen von frisch aufgetauten mit korrespondierenden Subgruppen von MACS-isolierten Zellen zusammenbetrachtet (Subgruppe Nr.1 wurde mit Subgruppe Nr. 3, Subgruppe Nr. 2 mit Subgruppe Nr. 4 und Subgruppe Nr. 3 mit Subgruppe Nr. 6 zusammengesetzt). In den zusammengesetzten Subgruppen Nr. 1 und Nr. 3, die nicht-expandierte Zellen beinhalteten, betrug die mittlere Engraftmentrate 83,7 % mit einer Standardabweichung von 11,7 %. In der Gruppe von 200 000 expandierten Zellen (zusammengesetzte Subgruppen Nr. 2 und Nr. 4) betrug sie 1,0 % mit einer Standardabweichung von 1,0 %. Diese Gruppe wies im Vergleich zu Gruppen von mit 200 000 nicht-expandierten und 600 000 expandierten Zellen (zusammengesetzte Subgruppen Nr. 3 und Nr. 6) transplantierten Mäusen die niedrigsten Engraftmentraten. Im ungepaarten doppelseitigem t-Test wurde bestätigt, dass es keine statistisch signifikante Verbesserung der Engraftmentrate durch die Erhöhung der Anzahl transplantierte Zellen um 400 000 auf 600 000 auftritt bei Experimenten mit expandierten Zellen ($t(2) = 0,89$; $p = 0,47$; $n_1 = 2$; $n_2 = 2$). Die Erhöhung der Engraftmentrate betrug dabei im Mittel $1,7 \pm 1,9$ %. Die Gruppen von mit 200 000 nicht-expandierten Zellen wiesen im Vergleich zu Gruppen von mit 600 000 expandierten Zellen ebenso höhere Engraftmentraten. In der Subgruppe Nr. 3 betrug die mittlere Engraftmentrate 0,8 % mit einer Standardabweichung von 0,6 und war damit im Vergleich zur Subgruppe Nr. 1 statistisch signifikant kleiner (ungepaarter doppelseitiger t-Test: $t(4) = 6,73$; $p < 0,01$; $n_1 = 2$; $n_2 = 4$). Bei der Betrachtung von MACS-isolierten Zellen lag die mittlere Engraftmentrate in der Subgruppe Nr. 6 bei 4,7 % mit einer Standardabweichung von 4,9 % und war damit höher im Vergleich zur korrespondierenden Subgruppe Nr. 4. Die Differenz der Engraftmentraten zwischen den Subgruppen Nr. 4 und Nr. 6 war mit einem p-Wert kleiner als 0,0001 ebenso statistisch signifikant (ungepaarter doppelseitiger t-Test: $t(4) = 19,29$; $n_1 = 4$; $n_2 = 2$). In der Subgruppe Nr. 3 betrug die mittlere Engraftmentrate 0,77 % mit einer Standardabweichung von 0,64 % war damit im Vergleich zur Subgruppe Nr. 1 statistisch signifikant schlechter (ungepaarter doppelseitiger t-Test: $t(4) = 6,73$; $p < 0,01$; $n_1 = 4$; $n_2 = 2$).

Weiter wurden die zusammengesetzten Subgruppen von frisch aufgetauten (Subgruppen Nr. 1 - 3) mit zusammengesetzten Subgruppen von MACS-isolierten Zellen verglichen. Die Verschlechterung der Engraftmentraten bei Verwendung von expandierten Zellen im Vergleich zur gleichen Menge von nicht-expandierten Zellen war in beiden Gruppen

signifikant. In der Gruppe von frisch aufgetauten Zellen hat sich bei Verwendung von expandierten Zellen das Engraftment im Mittel um $85,4 \pm 8,5$ % signifikant verschlechtert (ungepaarter t -Test: $t(6) = 10,07$; $p < ,0001$; $n_1 = 4$; $n_2 = 4$). In der Gruppe von MACS-isolierten Zellen betrug die Differenz der mittleren Engraftmentraten $80,1 \pm 2,3$ % und war damit ebenso signifikant (ungepaarter t -Test: $t(6) = 34,63$; $p < ,0001$; $n_1 = 4$; $n_2 = 4$). Die Differenz der Engraftmentraten zwischen den korrespondierten Subgruppen von MACS-isolierten und frisch aufgetauten Zellen ergab sich in einem gepaarten doppelseitigen t -Test mit einem p -Wert von 0,7622 als nicht signifikant ($t(9) = 0,31$; $n = 10$).

Weiterhin untersuchten wir, ob es im Verlauf des Versuchs zu Änderungen des Engraftments kam. In einem ungepaarten doppelseitigen t -Test zeigte sich, dass es in allen Gruppen zu keinen signifikanten Änderungen der Engraftmentraten zwischen der zwölften und vierundzwanzigsten Woche kam ($t(10) = 0,81$; $p = 0,43$; $n_1 = 6$; $n_2 = 6$).

Eine Übersicht zu tierexperimentellen Versuchen liefert die **Tabelle 13**. Insgesamt zeigte es sich, dass expandierte MDS-HSCs eine im Vergleich zu den nicht-expandierten MDS-HSCs eine statistisch signifikant schlechtere Engraftmentfähigkeit aufwiesen. Während die Rate der als positiv engraftet eingestuften Mäuse in der Kontrollgruppe bei 73,3% lag, betrug sie in der Experimentalgruppe 29 %, das 0,4-Fache des Wertes in der Kontrollgruppe. Weiter zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der erreichten Engraftmentraten bei Vergleich von transplantierten MACS-isolierten und frisch aufgetauten Zellen. Bei Erreichen einer positiven Einnistung zeigten Versuchstiere aller Gruppen einen gleichhochbleibenden Anteil an humanen Zellen in ihrem Knochenmark und damit ein Langzeit-Engraftment. Allerdings konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den HSCT-Ergebnissen und der Schwere und den Typen der verwendeten myelodysplastisch veränderten HSCs festgestellt werden.

Pat.-Nr.	G.	Alter	WHO-Kl. (MDS)	Karyotyp	Mut.	Transplantierte Zellen	Tier-Anz. in K./Ex./Ex+	Tier-Anz. mit E. in K./Ex./Ex+	Ergebnisse
MDS13	m	76	RCMD	46, XY [20]	TET2 (50 %)	CD34+/MSC	4/4/0	2/KE/-	E. nur in der K.
MDS14	m	71	tMDS	46, XY, r(6) (p21q26)	RUNX1, SRSF2, TET2	CD34+/MSC MNC/MSC	4/4/3 4/4/2	4/2/1 4/2/2	Niedrigeres E. in Ex. und Ex+ als in der Ktr. Sek. Tx.: kE
MDS15	m	72	RCMD	46, XY, komplex aberrant, inkl. del (5q), del (ETV6), del (20q)	TP53	CD34+/MSC	4/3/2	1/1/KE	kE
MDS16	m	82	RARS	46, XY	TET2, TP53	CD34+/MSC MNC/MSC	4/3/- 4/-/-	4/1/- KE/-/-	E. nur in der K.

Tabelle 13: Übersicht zu tierexperimentellen Versuchen

E., positives Engraftment. **Ex.**, Experimentalgruppe mit der gleichen Anzahl der transplantierten Zellen wie in der Kontrollgruppe. **Ex+**, Experimentalgruppe mit im Vergleich zur Kontrollgruppe einer höheren Anzahl der transplantierten Zellen. **G.**, Geschlecht. **kE.**, kein Engraftment. **Kl.**, Klassifikation. **K.**, Kontrollgruppe (nicht expandierte Zellen). **Mut.**, Mutation. **Pat.-Nr.**, Patienten-Nummer. **Tx.**, Transplantation.

4.2.2 Serielle Transplantation in sekundäre Empfängermäuse

Die serielle Transplantation in sekundäre Empfängermäuse erfolgte nur in 4 zum Patienten MDS14 gehörigen Experimentalgruppen.

Wir verwendeten Oberschenkelknochen von jeweils 2 Mäusen aus den Gruppen „MACS-isoliert 200 000“, „frisch aufgetaut 200 000“, „MACS-isoliert 600 000 expandiert“ und von einer Maus aus der Gruppe „frisch aufgetaut 200 000 expandiert“ für die sekundäre

Transplantation. Das Knochenmark von jedem primären Empfänger wurden jeweils 2 sekundären Empfänger transplantiert. Damit gab es 14 sekundäre Empfänger. Eine Übersicht zu Tierexperimenten ist der **Tabelle A.3** im Anhang zu entnehmen.

Die erste serielle Transplantation erfolgte mit der Knochenmarksprobe von der Maus Nr. 1158_20_0206_F3. Dabei lysierten wir die Erythrozyten in der gewonnen Knochenmarksprobe, was allerdings zu einer geringen Zellzahl und Lebensfähigkeit führte. Aus diesem Grund erfolgte keine Erythrozytenlyse bei weiteren Knochenmarksproben.

Alle sekundären Empfängertiere mit 2 Ausnahmen wiesen negative Engraftmentraten 12 Wochen nach der Transplantation auf und wurden aus diesem Grund nach den ersten Engraftmentanalysen getötet. Die erste Ausnahme stellt die Maus Nr. 1158_20_0669_F3 aus der Gruppe „frisch aufgetaut 200 000“, eine sekundäre Empfängerin von der Maus Nr. 1158_20_0719_F4, mit einem Engraftment von 1,42 % 12 Wochen nach der HSCT. Das Langzeit-Engraftment war allerdings negativ. Es betrug 0,47 % 24 Wochen nach der HSCT. Weiter wies eine andere Maus aus der Gruppe „MACS-isoliert 200 000“, Nr. 1158_20_0719_F4, ein positives Kurzzeit-Engraftment von 2,67 % auf.

Insgesamt war sowohl ohne als auch mit Expansion die serielle Transplantation von MDS-HSCs mit einem Langzeit-Engraftment nicht erfolgreich.

5 DISKUSSION

5.1 MDS initiierende Zellen

In dieser Arbeit wurden 6 verschiedene robuste Kulturbedingungen für die Expansion von MDS-HSCs untersucht und einander gegenübergestellt. Anschließend wurde die Engraftmentfähigkeiten von in optimalen Bedingungen expandierten Zellen mit der von nicht-expandierten Zellen in tierexperimentellen Experimenten verglichen. Für die Experimente wurden HSCs mit dem $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ Phänotyp ausgewählt. Grund dafür war die Beobachtung von Medyouf et al. (2014), dass ausgerechnet die Zellen mit dem $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ Phänotyp MDS-initiiierende Zellen darstellen, die ihre Multipotenz behalten und eine vielfältige Klonalität zeigen.

5.2 Flt-3-L ist essenziell für die Expansion von hämatopoetischen Stammzellen aus MDS-Patienten

Der erste von uns untersuchte Mediumzusatz, der extrazelluläre Ligand Flt-3, wurde dem Fachartikel von Zhang et al. (2008) entnommen. Durch seine Bindung an den extrazellulären Rezeptor Flt-3 aktiviert er ihn und fördert dadurch das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen durch verschiedene Signalwege, unter anderem PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), RAS und STAT5 (Grafone et al., 2012). Anhand unserer Experimente ließe sich vermuten, dass Flt-3-L für die *in vitro* Expansion von MDS-HSCs essentiell ist. Der Anhaltspunkt für diese Vermutung war das Erreichen einer 2,5-fach besseren Expansion beim Vorhandensein des Flt-3-L im Medium im Vergleich zur Kontrolle ohne Flt-3-L. Flt-3-L war der Einzige von den in dieser Arbeit untersuchten Zusatzstoffen, der zu einer statistisch signifikanten quantitativen Verbesserung der Expansion der MDS-HSCs führte. Deshalb wurde nach dieser Erkenntnis in den nachfolgenden Experimenten sowohl für Kontrollgruppen als auch für Experimentalgruppen den Kulturen immer Flt-3-L zugesetzt.

Auffallend war, dass die positive Wirkung des Flt-3-L auf MDS-HSCs trotz der unterschiedlichen, nicht wie in dem Fachartikel von Zhang et al. (2008) beschriebenen, Durchführung der Zellkulturen, detektiert werden konnte. In Experimenten von Zhang et al. (2008) wurden für die Kultivierung 96-Well-Platten verwendet, in denen die Zellen im 200 μl Medium bei einer Zelldichte von 10^4 Zellen/Well ausgesät wurden. Am dritten Tag der Kultur wurden die Zellen gepoolt und in 6-Well-Platten bei einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml übertragen. In unserer Arbeit wurden die Zellen von Anfang an in 6-Well-Platen und bei einer gleichen Dichte wie in Experimenten von Zhang et al. (2008) von

5×10^4 Zellen/ml (10^5 Zellen/Well) ausgesät. Die Gruppe hatte die Zulaufkultur-Methode gewählt, in unserer Arbeit wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt.

Unsere Erkenntnis, dass Flt-3-L auf die Expansion von MDS-HSCs einen positiven Einfluss nimmt, können durch die Beobachtungen von Zriwil et al. (2018) erklärt und erhärtet werden. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass Flt-3-L eine essentielle Rolle für die Erhaltung der Zellzahl von langzeit-repopulierenden HSCs (LT-HSCs) in Kultur spielt: Eine Flt-3-Deletion in transplantierten HSCs äußerte sich in verminderter Produktion von LT-HSCs, B-Zell- und T-Zell-Vorläuferzellen im Vergleich zur Kontrolle. Dementsprechend können die in der Studie von Zwierzina et al. (1999) detektierten erhöhten Flt-3-L-Spiegel bei knapp der Hälfte der MDS-Patienten mit einer refraktären Anämie als Gegenregulationsmechanismus des Knochenmarksstroma auf die niedrige Anzahl der hämatopoetischen Progenitorzellen angesehen werden.

In diesem Zusammenhang ist allerdings erwähnenswert, dass Flt-3-Mutationen in Zusammenspiel mit Mutationen wie NRAS und IDH1/2 die neu entstehenden AML-Subklone definieren und damit eine mögliche Transformation in sAML bei MDS vorhersagen können (Bejar, 2018). Bei Flt-3-Mutationen ist die Flt-3-Kinase konstitutiv aktiviert, was zur Induktion, Proliferation und Unterhaltung der AML führt (Grafone et al., 2012). Basierend auf den oben dargestellten Ergebnissen könnte man daher vermuten, dass der Überschuss des Flt-3-L in Kultur von MDS-HSCs zu einer bei AML bestehenden klonalen Expansion primitiver myeloischer Vorläuferzellen führt. Denkbar ist auch, dass die dauerhafte *in vitro* Aktivierung des Wachstumsfaktor-Signalisierungsgen Flt-3 bei MDS-HSCs zu einer Mutation dessen und folglich zu einer Transformation zur sAML führen könnte. Aus diesem Grund wären unserer Meinung nach in weiteren Experimenten Untersuchungen der klonalen Verteilung der mit Flt-3-L expandierten MDS-HSCs sinnvoll. Anhand ihrer Ergebnisse wäre eine Aussage bezüglich der möglichen *in vitro* Transformation zur sekundären AML aus MDS während der Zellexpansion möglich.

5.3 Der ungeklärte Einfluss von Angptl5 und IGFBP2 auf die hämatopoetische Stammzellen aus MDS-Proben *in vitro*

Die nächste von uns untersuchte Zytokinmischung wurde ebenso dem Fachartikel von Zhang et al. (2008) entnommen. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass der Zusatz von Angptl5 und IGFBP2 zu der 11-tägigen Kultur von HSCs aus Nabelschnurblut zu keiner signifikanten Änderung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle führt. Das hat sich in unseren Experimenten mit MDS-Stammzellen bestätigt. An dieser Stelle ist allerdings zu erwähnen, dass, genauso wie bei Untersuchungen des Flt-3-L-Einflusses auf die Expansion von MDS-HSCs, von der im Fachartikel beschriebenen Durchführung der Kulturen abgewichen wurde (siehe **Kapitel 5.2**).

Auffallend an den Ergebnissen von Zhang et al. (2008) war, dass sich bei Vorhandensein von Angptl5 und IGFBP2 in Kultur eine signifikante Verbesserung der Engraftmentrate um 6,2 % im NOD/SCID-Repopulationsassay verglichen mit Kontrollen von ohne Angptl5 und IGFBP2 in Kultur expandierten Zellen und von nicht-expandierten Zellen erzielen ließ. Daraus folgt, dass Angptl5 und IGFBP2 die *ex vivo* Expansion von SCID-Repopulationszellen (SRC) aus Nabelschnurblut unterstützen. Ob die oben dargestellten Ergebnisse von Experimenten mit HSCs aus dem Nabelschnurblut auch für die Zellen von MDS-Patienten zutrifft, lässt sich anhand von *in vitro* Experimente nicht entnehmen. Dafür sind weitere, tierexperimentelle Arbeiten mit der Zytokinmischung „Angptl5 + IGFBP2“ notwendig.

Den fördernden Effekt von Angptl5 auf die *in vitro* Expansion von HSCs aus dem Nabelschnurblut konnten aber im Unterschied zu Zhang et al. (2008) und zu uns die Gruppe von Khoury et al. (2011) zeigen. In ihren Arbeiten wurden CD34⁺ Zellen dem Protein Angptl5 zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren (inklusive IGFBP2) ausgesetzt. Diesmal wurde aber Angptl5 zusätzlich von kokultivierten mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Das führte im Vergleich zur Kontrolle ohne kokultivierte MSCs zu einer effizienteren Expansion humaner hämatopoetischer Stammzellen, ohne deren Repopulationspotential zu beeinträchtigen. Ohne exogen zugegebenes Angptl5 (Kokultur in Gegenwart von SCF, TPO, FGF, IGFBP2 und MSC, die kein Angptl5 sezernieren) betrug die relative Expansion nur 43 % im Vergleich zum Ausgangswert. Ohne andere Wachstumsfaktoren wie SCF, TPO und FGF konnte die Expansion von CD34⁺ Zellen aus dem Nabelschnurblut allerdings gar nicht stattfinden. Aus dieser Studie ging hervor, dass Angptl5 sowohl als lösliches Protein, als auch durch Zell-zu-Zell-Kontakte seine positive Wirkung auf die Expansion von CD34⁺ Zellen in Gegenwart von anderen Wachstumsfaktoren entfalten kann.

Zur Beantwortung der Frage, ob sich eine Kokultur mit Angptl5-sezernierenden MSCs positiv auf die *in vitro* Expansion von MDS-HSCs auswirken könnte, sind weitere Experimente zu planen. Der positive Einfluss von kokultivierten, andere Proteine sezernierenden MSCs auf die Expansion von MDS-HSCs wurde aber bereits durch Medyouf et al. (2014) gezeigt. In ihrer Studie wurde die Expansion von MDS-HSCs unter anderem durch die den Nischefaktor IGFBP2 überproduzierenden MDS-MSCs signifikant gefördert. Dass IGFBP2 auch als lösliches Protein seine auf die *in vitro* Expansion fördernde Wirkung entfalten kann, zeigten Khoury et al. (2011). Die Arbeitsgruppe beobachtete eine Reduktion der relativen Zellzahländerung von CD34⁺CD133⁺ aus dem Nabelschnurblut auf 61 % bei Wegnehmen von IGFBP2 dem Medium mit Zytokinen. Ob durch MSCs sezernierendes IGFBP2 mit dem löslichen IGFBP2 synergistisch fördernd auf

die *in vitro* Expansion wirken können und ob diese Wirkung für die Expansion MDS-HSCs statistisch signifikant ist, ist eine noch in weiteren Experimenten zu beantwortende Frage.

5.4 Der negative Einfluss von UM171 auf die *in vitro* Expansion von hämatopoetischen Stammzellen aus MDS-Proben

Eine weitere Arbeit, auf die wir uns stützten, war die Studie von Fares et al. (2014). Die Ergebnisse dieser Gruppe legten nahe, dass der endotheliale Protein C-Rezeptor (EPCR) ein guter Indikator für expandierte LT-HSCs aus dem Nabelschnurblut darstellt. Weiterhin führte in dieser Studie die Exposition von Nabelschnurblut-HSCs mit UM171, einem Pyrimidoindol-Derivat, zu einer schnellen Induktion der EPCR-Expression und damit zu verstärkter *ex vivo* Expansion, unterdrückter Differenzierung von Progenitorzellen und verbesserter *in vivo* Repopulationsfähigkeit. In der Studie von Psatha et al. (2017) lösten in Zytokinmischungen mit dem Kleinmolekül UM171 expandierte und in Mäuse injizierte HSCs einen höheren Chimärismus im peripheren Blut der Mäuse im Vergleich zur Kontrolle von Mäusen, die mit nicht-expandierten Zellen injiziert wurden.

In unseren *in vitro* Experimenten ergab sich durch den Zusatz von UM171 keine signifikante Veränderung der Anzahl expandierter MDS-HSCs im Vergleich zur Kontrolle beim Vorhandensein von Flt-3-L ohne UM171. Eine Erklärung dafür könnte die Anwendung einer unterschiedlichen Kultur-Methode sein: Die Gruppe von Fares et al. (2014) hat für die Experimente die Zulaufkultur-Methode gewählt; in unserer Arbeit wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt. Diese Argumentation überzeugt allerdings nur teilweise, denn in beiden Fällen befanden sich im Medium vorhandene Zytokine und Zusätze im Überschuss.

Ein weiterer Grund für die von uns beobachtete insgesamt unveränderte Vermehrung von MDS-Stammzellen beim Vorhandensein von UM171 im Vergleich zur Kontrolle könnte die unspezifische Expansionshemmung dieser Zellen durch die starke Unterdrückung der Differenzierung von Progenitorzellen sein. Wir vermuten, dass Blutstammzellen von MDS-Patienten aufgrund ihrer Mutationen sehr sensitiv gegenüber kleinsten Veränderungen in Kultur und sehr anfällig für Störfaktoren sind.

Auch immunologische Faktoren könnten eine Rolle für den von uns gesehenen UM171-Einfluss auf MDS-Zellen spielen. Chagraoui et al. (2019) zeigten, dass sich die UM171-induzierte HSPC-Expansion auf die proinflammatorische Signalisierung basiert und dass UM171 für die homöostatische entzündliche Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies zuständig ist. Laut dieser Studie stützt sich die Expansion der CD34⁺ Zellen dosisabhängig auf die Wirkung von positiven Regulatoren wie NF-κB und deren Integration in eine negative Rückkopplungsschleife. Diese Rückkopplungsschleife verhindert eine toxische

Akkumulation von ROS/Entzündung, die durch die Hochregulierung von EPCR ausgelöst werden könnte. Bei MDS ist aber nicht nur der durch das angeborene Immunsystem aktivierende NF- κ B-Signalweg (Barreyro et al., 2018), sondern auch viele andere Signalwege des angeborenen Immunsystems dysreguliert. Es liegen zahlreiche Alterationen der das angeborene Immunsystem beeinflussenden Genen vor: TLR4, TRAF6, domänenhaltiges Protein des Toll/IL-1 Rezeptors (TIRAP) (Gañán-Gómez et al., 2015; Varney et al., 2015).

Eine Überexpression von immunbezogenen Genen in HSPCs wird bei 50 % der MDS-Patienten berichtet (Hofmann et al., 2002; Pellagatti et al., 2010). Die Mutation der Ras- und Rap1- Signalwege, die unter anderem durch UM171 beeinflusst werden, liegen bei MDS in 9-15 % der Fälle vor (Ika et al., 2009; Lindsley et al., 2017). Die beiden Signalwege verstärken die PI3K-Aktivität, was wiederum zur Erschöpfung und Depletion der HSCs führt (Kharas et al., 2010; Yilmaz et al., 2006; Zhang et al., 2006). Der Einfluss vom Kleinmolekül UM171 auf die Ras- und Rap1- Signalwege besteht darin, dass dieses zu Silencing von den beiden Signalwege, zur weniger PI3K-Aktivität, zur weniger Erschöpfung der HSCs und schließlich zu einem verbesserten Engraftment der HSCs im Falle einer Transplantation führt (Chen et al., 2017).

Bei MDS wird die bereits im Grundzustand bestehende entzündliche Mikroumgebung mit der ineffektiven Hämatopoese bei MDS-HSCs in Verbindung gebracht. Insbesondere frühe Erkenntnisse über die Pathogenese von MDS hoben Erhöhungen entzündlicher Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 bei MDS-Patienten hervor, die zum Tod von Vorläuferzellen im Knochenmark beizutragen schienen (Raza et al., 1996). Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass bei der Exposition von HSCs aus dem MDS-Knochenmark und aus dem Nabelschnurblut mit gleichen Konzentrationen von UM171 ein beträchtlich höherer Entzündungsgrad in der Gruppe von MDS-Zellen festzustellen wäre, welcher die Expansion von MDS-HSCs erschweren würde. Nach dieser Annahme würde die bei MDS bereits bestehende Entzündung mit der durch die UM171 induzierte Entzündung synergistisch wirken. Durch die beschriebene Unterhaltung des Entzündungszustands bei MDS könnte dementsprechend zu keinem vorteilhaften UM171-Einfluss kommen. Weiter könnte vermuten, dass der Zusatz von bei MDS eingesetzten antiinflammatorische Substanzen wie Lenalidomid, die unter anderem die Produktion von TNF- α und Interleukin-6 und -12 hemmen, die positive Wirkung von UM171 ermöglichen könnte. Der Gedanke dahinter ist die Senkung des bei MDS bestehenden Grades der Entzündung und Verhinderung einer möglichen überschüssigen proinflammatorischen UM171-Wirkung. Für Beantwortung der Frage, ob UM171 in

Kombination mit antiinflammatorischen Substanzen positiv auf die MDS-HSCs wirkt, sind weitere Experimente notwendig.

Aufgrund der komplizierten Pathogenese von MDS lässt sich eine weitere mögliche Erklärung für die Diskrepanz der gesehenen UM171-Wirkung in unserer Studie und der Studie von Fares et al. (2017) einführen. Psatha et al. (2017) zeigten, dass sich das transkriptomische Profil von *ex vivo* expandierten, phänotypisch ähnlichen HSCs während der Kultur unter dem Einfluss von Kleinmolekülen änderte und wahrscheinlich Auswirkungen auf ihr Engraftment-Potenzial hatte.

Ob der UM171-Zusatz zu einem verbesserten Langzeit-Engraftment von MDS-HSCs trotz des negativen Ergebnisses *in vitro* führt, lässt sich allerdings nur anhand von Xenotransplantationen prüfen.

5.5 Fehlender Einfluss von PVA auf die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen aus MDS-Proben *in vitro*

Es wird angenommen, dass das Serumalbumin in HSCs-Kulturen die Funktionen der Pufferung, Stabilisierung hydrophober Moleküle und Bereitstellung verschiedener HSC-unterstützender bioaktiver Moleküle übernimmt (Francis, 2010). Serumalbumin-Zusätze wie FKS sind aber die variabelsten Komponenten von HSC-Medien. Sie enthalten zahlreiche unbekannte Faktoren, unter anderem auch unbekannte Selbsterneuerungsagonisten. Sogar die aus FKS isolierte Fraktion V zeigte in Studien eine große Variabilität von Charge zu Charge bei der HSCs-Erhaltung und -Expansion (Ieyasu et al., 2017). Aus diesem Grund wird versucht, mit albuminfreien Medien zu arbeiten. Eine Alternative zum Serumalbumin wurde durch Wilkinson et al. (2019) vorgeschlagen. Die Arbeitsgruppe ersetzte das Serumalbumin durch das synthetische Polymer PVA. Es wurde gezeigt, dass die mit PVA kultivierten Maus-HSCs die mit Humanalbumin kultivierten HSCs in einem kompetitiven SZT-Assay übertrafen. Außerdem konnte die Transplantation von mit PVA expandierten Zellen ohne vorherige Konditionierung der Empfängermäuse erfolgen.

In unserer Arbeit kam für die Expansion von CD34⁺ Zellen das serumfreie StemSpan Medium SFEM II, welches BSA, Insulin, Transferrin und in Iscove's Modified Dulbecco's Medium gelöste Zusätze enthielt, mit verschiedenen Zytokinmischungen zum Einsatz. Wir vermuteten, dass der PVA-Zusatz trotz des Vorhandenseins von BSA im Medium vorteilhafte Auswirkungen auf die HSCs in Kultur hätte haben können und mischten PVA den MDS-HSCs hinzu. An dieser Stelle ist allerdings anzumerken, dass Wilkinson et al. (2019) mit Fibronektin-basierten Medien arbeiteten. Unsere Gruppe verwendete im Gegensatz dazu Flüssigmedien für die Zellkultur. Grund dafür war, dass wir im

Unterschied zur Arbeitsgruppe von Wilkinson et al. (2019) pathologisch veränderte MDS-HSCs expandierten, die, wie bereits oben erwähnt, unserer Vermutung nach sehr sensitiv gegenüber kleinsten Veränderungen in Kultur sind. Wiederholte Isolationen aus Fibronectin-basierten Kulturen könnten ihre Funktion beeinträchtigen. Ein Verzicht auf einen kompletten Mediumwechsel, den wir in unseren Experimenten alle 3 Tage durchführten, und eine Isolation aus Fibronectin-basierten Kulturen am Expansionsende vor der HSCT könnten zur Akkumulation von endogenen Selbsterneuerungsinhibitoren führen. Nishimura et al. (2019) zeigten aber, dass PVA die Aktivität rekombinanter Zytokine auch in flüssigen Medien stabilisiert. Deshalb verzichteten wir auf Fibronectin-basierte Kulturen für die Expansion von MDS-HSCs und fokussierten uns auf flüssige Medien.

Der PVA-Zusatz führte in unseren *in vitro* Experimenten im Vergleich zur Kontrolle ohne PVA weder zur Verbesserung der Proliferation noch zur besseren Erhaltung des Stammzellcharakters von HSCs. Aus diesem Grund gingen wir davon aus, dass die Zusätze des von uns verwendeten Mediums die rekombinanten Zytokine genauso wie PVA stabilisieren können und PVA keinen zusätzlichen Nutzen in *in vitro* Experimenten bringt. Wichtig zu erwähnen ist allerdings, dass Wilkinson et al. (2019) genauso wie unsere Gruppe in *in vitro* Experimenten keine signifikante qualitative Verbesserung der HSCs-Expansion in PVA-Kulturen im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Aus diesem Grund sind *in vivo* Experimente für die Klärung der Frage, ob die mit PVA expandierte MDS-HSCs besser im Knochenmark immundefizienter Mäusen einnisten, notwendig.

5.6 Unterschiedliche Expansionsfähigkeiten der Zellen

In unseren Experimenten fanden wir keine Korrelation zwischen Expansionskapazität der Zellen und MDS-Subtypen oder klinischen Merkmalen des jeweiligen Patienten. Eine Korrelation zwischen dem MDS-Typen und relativer Zellzahländerung während der Kultur wurde aber in der Studie Will et al. (2012) gesehen, in der HSCs aus Patienten mit höherem Risiko eine mit Abstand bessere Expansion im Vergleich zu HSCs aus Patienten mit niedrigem Risiko aufwiesen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz der Ergebnisse könnte die unterschiedliche Kulturdauer sein: In der Studie von Will et al. (2012) betrug die Kulturdauer der MDS-HSCs lediglich 24 - 48 Stunden und damit war um das 11 – 28-Fache kürzer als die Kulturdauer in unseren Experimenten. Will et al. (2012) setzten dem Expansionsmedium im Unterschied zu uns 5 ng/ml vom rekombinanten humanen IL-3 und 5 ng/ml vom rekombinanten humanen IL-6 zu, ohne TPO, FGF-1 oder Flt-3-L beizumischen. Interessanterweise bestand die von Will et al. (2012) untersuchte Kohorte aus lediglich 11 MDS-Patienten. Die von unserer Arbeitsgruppe untersuchte Kohorte

enthielt 25 MDS-Patienten: 13 Patienten mit RCMD, 7 Patienten mit RAEB, 3 Patienten mit RARS, jeweils 1 Patient mit tMDS und CMML. Um eine Aussage bezüglich der möglichen Korrelation zwischen Expansionskapazität der Zellen und MDS-Subtypen machen zu dürfen, ist, unserer Meinung nach, eine noch größere Kohorte notwendig.

5.7 Weitere potenzielle Gründe für die schlechte Expansionsfähigkeit der MDS-HSCs und Vorschlag einer anderen Zellkulturmethode

MDS-HSCs wiesen in unseren Experimenten im Vergleich zu HSCs aus Nabelschnurblut eine insgesamt weniger effektive Expansion *in vitro* auf. Eine der wichtigsten Ursachen dafür ist die höhere spontane Apoptose und Caspase-Aktivität von Zellen aus MDS-Knochenmark als bei Zellen aus einem gesunden Knochenmark (Liesveld et al., 2004). Anhand dieser Erkenntnisse könnte man versuchen, die Apoptose und Caspase-Aktivität in MDS-Kulturen zu unterdrücken und die Zellen zu einer effektiveren Expansion zu bringen. Unsere Vermutung ist allerdings, dass die Hemmung der bei MDS vorhandenen erhöhten Apoptose und Caspase-Aktivitäten zur Änderung der Zytomorphologie und Genetik führen könnten, die im Falle einer Xenotransplantation nicht erwünscht sind. Die zu transplantierenden HSCs sollten den primär gewonnenen Zellen aus dem MDS-Knochenmark möglichst identisch sein. Veränderte Zytomorphologie und -Genetik der Zellen würden die Entwicklung eines optimalen MDS-Xenomodells erschweren. Daher ist eine weitere Optimierung der MDS-Zellkultur vonnöten. Allerdings vermuten wir, dass das weitere Ausprobieren von unterschiedlichen Mediumzusatzstoffen in flüssigen Medien angesichts der oben dargestellten möglichen Folgen kritisch anzusehen ist. Im Allgemeinen sind aufgrund von Akkumulation unterschiedlichster genomischer Schäden wie Punktmutationen in Genen des Splicingapparats (z. B. SF3B1, SRSF2, ZRSR2, U2AF1), Regulatoren epigenetischer Modifikationen (z. B. DNMT3A, TET2, ASXL1, IDH1/2, EZH2) und von Transkriptionsfaktoren (z. B. RUNX1, TP53, ETV6, NPM1, CEBPalpha, GATA2) (Haferlach et al., 2014) einzelne Wachstumsfaktoren und Zytokine für HSCs aus unterschiedlichen MDS-Proben mehr oder weniger bedeutend. Deshalb schlagen wir vor, MDS-HSCs in 3D-Zellkulturen zu expandieren. Bei der Entwicklung eines *in vitro* MDS-Zellkultur-Modells durch Elvarsdóttir et al. (2020) fiel auf, dass CD34⁺ Zellen in 2D-Suspensionskulturen nicht länger als zwei Wochen proliferieren konnten. Im Gegensatz dazu konnte in 3D-Zellkulturen die erythroide Proliferation von CD34⁺ und MNC über vier Wochen stattfinden. Basierend auf diese Ergebnisse könnte man vermuten, dass die Apoptoserate und Caspase-Aktivität von MDS-HSCs in 3D-Zellkulturen deutlich niedriger im Vergleich zu 2D-Zellkulturen sind, was zur Verbesserung des Überlebens und folglich der Expansion hämatopoetischer Zellen führen könnte. Weiterhin können andere Methoden für die *in vitro* Expansion von HSCs wie Anwendung

von einer extrazellulären Matrix, Kokultivierung, Transgen-Überexpression oder Entfernung von Selbsterneuerungs-Antagonisten an Zellen von MDS-Patienten getestet werden (Wilkinson et al., 2020b).

5.8 Identifizierung der hämatopoetischen Progenitorzellen

Ferner stellt sich die Frage, ob sich die hämatopoetischen Progenitorzellen mithilfe der in unserer Arbeit verwendeten Methoden gut ermitteln und erfassen lassen.

5.8.1 CD34⁺CD38⁻ Oberflächenphänotyp

Humane HSCs werden üblicherweise als CD49⁺CD90⁺CD45RA⁻CD34⁺CD38^{lin}⁻ Zellen definiert (Notta et al., 2011). Allgemein anerkannt ist auch, dass der CD34⁺CD38⁻ Phänotyp eine primitive hämatopoetische Subpopulation unter den lineage negativen Zellen in fetalen Geweben und im erwachsenen Knochenmark identifiziert (Hao et al., 1995). Aus diesem Grund wird der CD34⁺CD38⁻ Oberflächenphänotyp oft für die Expansionsbeurteilung von hämatopoetischen Stammzellen benutzt.

Allerdings gibt es zurzeit ein sehr begrenztes Verständnis der Beziehung zwischen Phänotyp und Funktion bei expandierten HSCs. Möglicherweise unterscheiden sich die für die Identifikation der *ex vivo* expandierten HSCs benötigten Zelloberflächenmarker von denen, die für die Isolierung von HSCs verwendet werden. Diese Aussage lässt sich mit den Ergebnissen von Dorrell et al. (2000) bestärken, die eine klare Dissoziation zwischen dem CD34⁺CD38⁺ Oberflächenphänotyp und der SRZ-Funktion zeigten. In der Studie wurde nachgewiesen, dass die CD38-Expression während Kultur von CD34⁺CD38⁺ NB-Zellen verloren geht und dass während die Gesamtzellzahl ansteigt, bleibt die SRZ-Zahl gleich. Auch Wilkinson et al. (2020b) konnten den CD38-Marker als keinen zuverlässigen Marker für humane HSCs, die *ex vivo* kultiviert wurden, identifizieren.

Bis jetzt sind noch keine Oberflächenmarker gefunden worden, die mit der SCID-Repopulationsaktivität sowohl vor als auch nach der HSCs-Kultur korrelieren. Drake et al. (2011) zeigten, dass die gleichzeitige Expression von CD34 und CD133 relativ gut mit der Anzahl von SRCs sowohl vor als auch nach der Kultur korreliert. Als weitere Marker für *ex vivo* expandierte SRCs wurden EPCR und ITGA3 angeboten (Fares et al., 2017; Tomellini et al., 2019). In weiteren Studien wurden hohe Konzentrationen von CD49f oder c-Kit in der HSCs-Kultur mit einer eingeschränkten Selbsterneuerungsfähigkeit assoziiert, während auf funktionellen HSCs nur eine schwache Expression von diesen Oberflächenmarkern nachgewiesen wurde. Das stand im Widerspruch mit dem Immunphänotyp, der für frisch isolierte Zellen beobachtet wurde (Fares et al., 2017; Shin et al., 2014).

Insgesamt weisen die oben dargestellten Erkenntnisse darauf Hinweis, dass die Kombination von Zelloberflächenmarkern von kultivierten Zellen, die wir in unseren Experimenten für die Identifikation von HSCs verwendeten, möglicherweise nicht zuverlässig ist. Vor dem Versuch, die MDS-SRCs-identifizierende Oberflächenmarker zu finden, wäre der Nachweis des Verlusts der CD38-Expression während der Kultur von MDS-HSCs erwünscht. Dafür könnte man die Expression von frühen myeloischen Markern CD13 und CD33 vor und nach der Stammzellenexpansion vergleichen. In weiteren Experimenten könnte man potenzielle Marker der MDS-SRCs wie EPCR und ITGA3 testen.

5.8.2 CFU-Assay

Neben den durchflusszytometrischen Analysen führten wir CFU-Assays mit dem Ziel der HSCs-Identifikation durch. CFU-Assays waren in unserer Arbeit unerlässlich, weil es bei MDS-Zellen im Gegensatz zu Zellen aus dem gesunden Knochenmark oder dem Nabelschnurblut keine Korrelation zwischen Immunphänotyp (Expression des CD34-Antigens) und Funktionalität (Koloniebildungskapazität) der hämatopoetischen Vorläuferzellen gibt (Martínez-Jaramillo et al., 2002). Charakteristisch für MDS ist im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine geringere Anzahl und abnorme Cluster von CFU-bildenden Zellen (Flores-Figueroa et al., 1999), was wir in unseren Experimenten bestätigen konnten. Auffallend war, dass, während die Anzahl von CFU-bildenden MDS-HSCs nicht signifikant unterschiedlich von der Anzahl von CFU-bildenden expandierten MDS-HSCs war, waren die Engraftmentraten in den Gruppen expandierter Zellen signifikant geringer. Erklären lassen sich unsere Ergebnisse mit der Beobachtung von Wilkinson et al. (2019), dass auch wenn der Assay für die Identifikation selbsterneuernder Zellen im Rahmen serieller Transplantationen in sekundäre Empfängermäuse nützlich sein kann, man anhand der CFU-Assay-Ergebnisse keine Aussage bezüglich der HSC-Aktivität machen kann. Der CFU-Assay bestimmt also nur die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung in myeloische, erythroide und megakaryozytäre Vorläuferzellen (Eaves, 2015).

5.9 Fehlende molekulargenetische Charakterisierung

In den Vorarbeiten unserer Gruppen (Medyouf et al., 2014) wurde gezeigt, dass die zusammen mit MSCs kotransplantierten und angewachsenen CD34⁺ MDS-Zellen die gleichen molekularen Läsionen wie ihre ursprüngliche primäre Patientenprobe trugen. Das wurde in molekulargenetischen Untersuchungen durch den Vergleich der primären Zellen mit MDS-Xenografts nachgewiesen. Die Frage, ob die von uns transplantierten expandierten CD34⁺ MDS-Zellen in den immundefizienten Mäusen die gleichen

molekularen Läsionen mit morphologisch-dysplastischen Eigenschaften wie ihre ursprüngliche primäre Patientenprobe trugen, bleibt allerdings aufgrund der von uns nicht durchgeführten molekulargenetischen Analysen offen. Die hCD45⁺ Zellen aus dem gewonnenen murinen Knochenmark wurden für die folgenden molekulargenetischen Untersuchungen von uns sortiert und bei -80 °C gelagert.

5.10 Unterschiedliche Engraftmentraten

Expandierte MDS-HSCs wiesen in unseren Experimenten eine im Vergleich zu den nicht-expandierten Zellen insgesamt signifikant schlechtere bis auf keine Engraftmentfähigkeit auf. Diese Ergebnisse können durch Beobachtungen von Psatha et al. (2017) untermauert werden. Diese Gruppe expandierte gesunde humane HSCs in einer Zytokinmischung mit Flt-3-L, SCF und TPO. Es zeigte sich, dass die expandierten und in Mäuse injizierten HSCs Zellen einen im Vergleich zur Kontrolle von nicht-expandierten Zellen signifikant geringeren Chimärismus im peripheren Blut der Mäuse auslösten. Ein mögliche, von Danet et al. (2001) gelieferte Erklärung dafür ist eine kulturinduzierte Downregulation von Knochenmark-Homing-Molekülen wie VLA-4 (Peled et al., 2000) und CXCR-4 (Peled et al., 1999), die eine Rolle bei der Dissoziation zwischen Phänotyp und Stammzellfunktion in primitiven CD34-Zelluntergruppen spielen könnte. Unabhängig von der Ursache der insgesamt schlechteren Engraftmentrate in der Gruppe von expandierten Zellen im Vergleich zu den nicht-expandierten Zellen, konnten wir allerdings unter allen Gruppen keine Korrelation zwischen den MDS-Subtypen und Engraftmentfähigkeit der jeweiligen Probe finden. Unsere Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen von Studien, mit einer größeren Patientenzahl (Rouault-Pierre et al., 2017; Song et al., 2019), in denen mit nicht-expandierten MDS-HSCs gearbeitet wurde und in denen genau wie in unserem Fall eine Vermutung einer individuell spezifischen Engraftmentfähigkeit der einzelnen MDS-HSCs in Raum gestellt wurde.

Wünschenswert wäre es, im Rahmen weiterer Experimente Marker zu finden, die die Engraftmentfähigkeit von MDS-Stammzellen voraussagen könnten.

5.11 Ausgewählte Tiere

Für unsere Experimente haben wir NSG Mäuse verwendet, die einen auf dem bereits immundefizienten NOD/SCID Hintergrund zusätzlichen Immundefekt durch das Fehlen einer funktionellen Gammakette im Interleukin-2-Rezeptor ausweisen und keine Natürlichen Killer-Zellen mehr ausbilden können. Neuere experimentelle Ansätze mit modifizierten Techniken, wie z. B. intrafemorale oder intrahepatische Injektion primärer humaner blutbildenden Zellen in diesen immundefizienten Tieren zeigten, dass sich unter

optimierten Bedingungen humane Zellen deutlich besser etablieren lassen als in NOD/SCID Mäusen (Aglino et al., 2008; Sanchez et al., 2009).

Unsere Arbeitsgruppe hat in ihren Vorarbeiten unter anderem NSG-S Stämme verwendet, die den gleichen Immundefekt wie die NSG Mäuse tragen, produzieren jedoch zusätzlich die humanen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren IL-3, GM-CSF und SCF. Beim Vergleich der Mäuse wurde gezeigt, dass in Experimenten mit NSG-S Mäusen die Engraftmentraten auf bis zu 70 % humanen Knochenmark-Chimärismus in den Empfängermäusen gesteigert werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die zusätzliche Expression von humanen Zytokinen die Engraftmentrate verbessern kann. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten in der Studie von Maria et al. (2018) die vom NSG-S-Stamm produzierten humanen Zytokine die Engraftmentfähigkeit von MDS-Zellen nicht positiv beeinflussen, woraufhin eine gegensätzliche Hypothese entstand. Die Frage, ob MDS-Zellen in der Lage sind, *in vivo* auf humane Zytokine mit einer Steigerung des Überlebens oder Wachstums zu reagieren, und ob die Engraftmentrate bei Transplantation von expandierten Zellen durch Verwendung von NSG-S statt NSG Mäuse verbessert werden könnte, bleibt damit noch offen.

Weiter ist der MISTRG-Stamm für die Etablierung eines MDS-Xenograftmodell sehr vielversprechend. Mäuse, die zu diesem Stamm gehören, exprimieren den humane M-CSF, IL-3, GM-CSF, Signal regulatorisches alpha-Protein (SIRP α) und TPO und führen im Vergleich zu NSG-Mäusen zu einer erhöhten erythroiden und megakaryozytären Differenzierung (Song et al., 2019) bei intrahepatischer Injektion in bestrahlte Welpen. Nachteilig ist allerdings bei dem MISTRG-stämmigen Mäusen die Entwicklung einer symptomatischen Anämie, welche ein MDS-Charakteristikum darstellt. Das kann die Detektion möglicher phänotypischer MDS-Merkmale in xenotransplantierten Tieren erschweren (Rongvaux et al., 2014). Ob expandierte MDS-HSCs im Knochenmark von Mäusen des MISTRG-Stamms besser engraften könnten, ist in weiteren Experimenten zu untersuchen.

5.12 Notwendigkeit der weiteren Optimierung des MDS-Xenomodells

Zahlreiche vielversprechende pharmakologische Substanzen, die gegen MDS spezifische molekulare Läsionen gerichtet sind wie z. B. Inhibitoren gegen Mutationen von IDH2 stehen zur Verfügung. Diese sollten im MDS-Xenograftmodell präklinisch getestet werden (Swoboda and Sallman, 2019). Vor der klinischen Phase sollten am Tier-Modell die Wirksamkeit, Nebenwirkung, mögliche Entwicklung von Resistenzen näher untersucht werden.

Weiter ist die Wirkung einiger Substanzen, die in der aktuellen Leitlinie für MDS-Therapie vorzufinden sind, kaum bekannt. Das betrifft vor allem die Antimetabolite wie Decitabine und 5-Azatine und den Immunmodulator Lenalidomid. Ein gutes MDS-Xenograftmodell könnte die genauere Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen ermöglichen, um eventuell die Effektivität dieser Substanzen zu steigern.

Außerdem könnte die Entwicklung eines robusten funktionellen MDS-Xenograftmodells neue Möglichkeiten für eine personalisierte Medizin für MDS-Patienten ermöglichen. Bei MDS kommt es schrittweise zu einer Akkumulation von unterschiedlichsten genomischen Schäden wie chromosomalen Aberrationen, DNA-Punktmutationen und epigenetischen Veränderungen in hämatopoetischen Stammzellen, die heute genau detektiert werden können. Die Entwicklung und Erarbeitung von neuen zielgerichteten Medikamenten, die gegen bestimmte Mutationen und Kombination dieser gerichtet sind, ist heute ebenso möglich. Da die Patienten noch am Leben sind, wäre schlussfolgernd die Entwicklung einer Plattform hilfreich, mit welcher man neue zielgerichtete Substanzen für einzelnen Patienten testen könnte, bevor man sie dem Patienten verabreicht.

Zusammenfassend würde die Optimierung des MDS-Xenomodells ein besseres Verständnis der Erkrankung und ihrer Behandlung ermöglichen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Durchführung präklinischer funktioneller Versuche zur Aufklärung von Pathomechanismen myelodysplastischer Syndrome (MDS) werden häufig primäre CD34-positive hämatopoetische Stammzellen (HSCs) dieser Patienten verwendet. Der limitierende Faktor dabei ist jedoch die meistens stark begrenzte Anzahl dieser undifferenzierten Zellen in den Knochenmarkproben der Patienten. Wir verfolgten daher in dieser Arbeit die Fragestellung, ob sich MDS-Stammzellen durch *in vitro* Stammzellexpansionsprotokolle vermehren lassen, ohne dass dabei Ihre Stammzellfunktionalität verloren geht. Wir untersuchten in vergleichenden Analysen die Fähigkeit des Engraftments von expandierten HSCs im Vergleich zu nativen unveränderten HSCs in einem murinen MDS-Xenograftmodell.

Zur *in vitro* Expansion behandelten wir CD34-positive MDS-HSCs mit sechs verschiedenen, bereits publizierten Zytokinmischungen zur Stammzellexpansion über einen Zeitraum von 11 - 13 Tagen. Damit konnten wir eine durchschnittlich 5,6-fache Expansion erreichen (95 %-CI [3,89; 7,39]). In allen experimentellen Gruppen induzierte die Expansion keine signifikante Differenzierung der Stammzellen gemessen an den durchflußzytometrisch gemessenen Stammzellmarkern CD34⁺CD38⁻. Darüber hinaus konnten wir in allen Bedingungen eine erhaltene koloniebildende Aktivität in einem Standard Colony-forming-unit-Assay nachweisen. Insbesondere mit Hinzugabe des FMS-ähnlichen Tyrosinkinase 3 Liganden (Flt-3-L) in Kultur ließ sich eine 2,5-fach bessere Expansion von MDS-HSCs im Vergleich zu Zytokincocktails ohne Flt-3-L erzielen. Damit stellte sich Flt-3-L als wesentlicher Hauptfaktor zur *in vitro* Expansion von MDS-HSCs dar. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe anderer Zytokine, die sich für die Expansion gesunder HSCs als effektiv gezeigt hatten, wie z. B. Angiopoietin-like 5 (Angptl-5), Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2), UM171 oder PVA bei MDS-HSCs nicht zu einem expansiven Effekt.

Zur Testung des differentiellen Engraftments in Abhängigkeit des vorangegangenen *in vitro* Expansionsprotokolls in einem murinen Xenograftmodell wurden insgesamt 4 MDS-Patientenproben in insgesamt 63 NSG-Mäuse intrafemoral transplantiert. Das Engraftment wurde jeweils 12 und 24 Wochen nach der Transplantation gemessen. Dabei zeigten sich deutlich höhere Engraftmentraten in der nativen nicht expandierten Kontrollgruppe (73,3 % der Mäuse mit positiven Engraftment) im Vergleich zu den *in vitro* expandierten HSCs (29 % der Mäuse mit positivem Engraftment). Die unterlegenen Engraftmentraten von expandierten MDS-HSCs ließen sich nicht durch Transplantation höherer Zellzahlen verbessern.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass sich MDS-HSCs in gewissem Umfang zwar zahlenmäßig erfolgreich *in vitro* expandieren lassen, aber nur unter Verlust an Funktionalität im Engraftment Assay eines murinen Xenograftmodells. Eine *in vitro* Expansion MDS-HSCs ist daher nicht geeignet, um limitiertes MDS Biomaterial für präklinische Versuchszwecke zu vermehren.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Expansion CD34 ⁺ HSCs aus 5 Nabelschnurblut-Proben im Medium "Zytokin-Mix 1" mit Flt-3-L	43
Abbildung 2: Expansion CD34 ⁺ HSCs aus MDS-Patienten im Medium „Zytokin-Mix 1“ mit Flt-3-L	45
Abbildung 3: Nicht-lineare Korrelation zwischen der relativen Zellzahländerung von MDS-HSCs und der Leukozytenzahl im Blut vom jeweiligen Patienten.....	47
Abbildung 4: Einfluss von Flt-3-L auf die 11-tägige Expansion CD34 ⁺ HSCs	49
Abbildung 5: Einfluss von UM171 auf die 11-tägige Expansion CD34 ⁺ HSCs	52
Abbildung 6: Einfluss von PVA auf Expansion CD34 ⁺ HSCs	53
Abbildung 7: Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse der Zellen aus der MDS-Probe MDS11 vor der Expansion	54
Abbildung 8: Keine signifikante Differenzierung von HSCs während der HSCs-Kultivierung	55
Abbildung 9: Beurteilung der Differenzierung von HSCs aus Nabelschnurblut- und MDS-Proben während der Kultivierung anhand durchflusszytometrischer Analysen	57
Abbildung 10: Beurteilung der Differenzierung von HSCs aus Nabelschnurblut- und MDS-Proben während der Kultivierung anhand des Standard CFU-Assay	58
Abbildung 11: Ergebnisse des CFU-Assay	60
Abbildung 12: Schemata der Experimente in verschiedenen Gruppen	63
Abbildung 13: Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse und Bestimmung des Engraftments	65
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf des Versuchs	65
Abbildung 15: Endpunkt-Ergebnisse der Subgruppen 1 und 2 von Proben MDS1 – 16..	66
Abbildung 16: Engraftmentrate nach Transplantation der HSCs von der Probe MDS14.	68

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Lösung für die magnetische Zellsortierung	27
Tabelle 2: Herstellung des Einfriermediums	29
Tabelle 3: Medienzusammensetzung der 6 untersuchten Konditionen	30
Tabelle 4: Herstellung des FACS-Puffers	32
Tabelle 5: Verwendete Mischung von Antikörpern für <i>in vitro</i> Experimente.....	32
Tabelle 6: Mediummenge für die Kultur der MSCs	34
Tabelle 7: Betäubung und Analgesie	38
Tabelle 8: Verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Analysen aus dem murinen Knochenmark	40
Tabelle 9: Herstellung des Sorting-Puffers	40
Tabelle 10: Nichtlineare Regressionsanalyse (Exponentialfunktion) der Wachstumskurven von Nabelschnurblut-HSCs	44
Tabelle 11: Lineare Regressionsanalyse der Wachstumskurven von HSCs aus MDS-Knochenmarkspalten	46
Tabelle 12: Gruppeneinteilung für die <i>in vivo</i> Experimente.....	62
Tabelle 13: Übersicht zu tierexperimentellen Versuchen.....	71

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abarrategi, A., Foster, K., Hamilton, A., Mian, S.A., Passaro, D., Gribben, J., Mufti, G., and Bonnet, D. (2017). Versatile humanized niche model enables study of normal and malignant human hematopoiesis. *J Clin Invest* 127, 543-548.

Abdel-Wahab, O., Gao, J., Adli, M., Dey, A., Trimarchi, T., Chung, Y.R., Kuscu, C., Hricik, T., Ndiaye-Lobry, D., Lafave, L.M., *et al.* (2013). Deletion of *Asx11* results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 210, 2641-2659.

Agliano, A., Martin-Padura, I., Mancuso, P., Marighetti, P., Rabascio, C., Pruneri, G., Shultz, L.D., and Bertolini, F. (2008). Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 123, 2222-2227.

Allampallam, K., Shetty, V., Mundle, S., Dutt, D., Kravitz, H., Reddy, P.L., Alvi, S., Galili, N., Saberwal, G.S., Anthwal, S., *et al.* (2002). Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cells in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 75, 289-297.

Antonelli, A., Noort, W.A., Jaques, J., de Boer, B., de Jong-Korlaar, R., Brouwers-Vos, A.Z., Lubbers-Aalders, L., van Velzen, J.F., Bloem, A.C., Yuan, H., *et al.* (2016). Establishing human leukemia xenograft mouse models by implanting human bone marrow-like scaffold-based niches. *Blood* 128, 2949-2959.

Awada, H., Thapa, B., and Visconte, V. (2020). The Genomics of Myelodysplastic Syndromes: Origins of Disease Evolution, Biological Pathways, and Prognostic Implications. *Cells* 9.

Bain, B.J. (1996). The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol* 94, 206-209.

Baksh, D., Song, L., and Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8, 301-316.

Barreyro, L., Chlon, T.M., and Starczynowski, D.T. (2018). Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. *Blood* 132, 1553-1560.

Bejar, R. (2018). What biologic factors predict for transformation to AML? *Best Pract Res Clin Haematol* 31, 341-345.

Bejar, R., and Steensma, D.P. (2014). Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood* 124, 2793-2803.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., *et al.* (2011). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 364, 2496-2506.

Bennett, J.M. (2016). Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 16, 607-609.

Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., *et al.* (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345-1348.

Boogaerts, M.A., Nelissen, V., Roelant, C., and Goossens, W. (1983). Blood neutrophil function in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 55, 217-227.

Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Lu, L., Hangoc, G., Anderson, D., Cosman, D., Lyman, S.D., and Williams, D.E. (1991). Effect of murine mast cell growth factor (c-kit proto-oncogene ligand) on colony formation by human marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 77, 2142-2149.

Brunstein, C.G., and Wagner, J.E. (2006). Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med* 57, 403-417.

Cazzola, M. (2020). Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 383, 1358-1374.

Cazzola, M., Rossi, M., and Malcovati, L. (2013). Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood* 121, 260-269.

Chagraoui, J., Lehnertz, B., Girard, S., Spinella, J.F., Fares, I., Tomellini, E., Mayotte, N., Corneau, S., MacRae, T., Simon, L., *et al.* (2019). UM171 induces a homeostatic inflammatory-detoxification response supporting human HSC self-renewal. *PLoS One* 14, e0224900.

Chen, S., Gao, R., Kobayashi, M., Yu, H., Yao, C., Kapur, R., Yoder, M.C., and Liu, Y. (2017). Pharmacological inhibition of AKT activity in human CD34(+) cells enhances their ability to engraft immunodeficient mice. *Exp Hematol* 45, 74-84.

Cogle, C.R. (2015). Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. *Curr Hematol Malig Rep* 10, 272-281.

Côme, C., Balhuizen, A., Bonnet, D., and Porse, B.T. (2020). Myelodysplastic syndrome patient-derived xenografts: from no options to many. *Haematologica* 105, 864-869.

Danet, G.H., Lee, H.W., Luongo, J.L., Simon, M.C., and Bonnet, D.A. (2001). Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34(+) cells after ex vivo expansion. *Exp Hematol* 29, 1465-1473.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., *et al.* (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360, 2289-2301.

Della Porta, M.G., Galli, A., Bacigalupo, A., Zibellini, S., Bernardi, M., Rizzo, E., Allione, B., van Lint, M.T., Pioltelli, P., Marengo, P., *et al.* (2016). Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 34, 3627-3637.

DeZern, A.E., Pu, J., McDevitt, M.A., Jones, R.J., and Brodsky, R.A. (2013). Burst-forming unit-erythroid assays to distinguish cellular bone marrow failure disorders. *Exp Hematol* 41, 808-816.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Dorrell, C., Gan, O.I., Pereira, D.S., Hawley, R.G., and Dick, J.E. (2000). Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 95, 102-110.

- Drake, A.C., Khoury, M., Leskov, I., Iliopoulou, B.P., Fragoso, M., Lodish, H., and Chen, J. (2011). Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2 γ ^{-/-} (NSG) mice. *PLoS One* 6, e18382.
- Du, Z., Wei, C., Cheng, K., Han, B., Yan, J., Zhang, M., Peng, C., and Liu, Y. (2013). Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J Surg Res* 183, 907-915.
- Eaves, C.J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125, 2605-2613.
- Edling, C.E., and Hallberg, B. (2007). c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1995-1998.
- Elvarsdóttir, E.M., Mortera-Blanco, T., Dimitriou, M., Boudierlique, T., Jansson, M., Hofman, I.J.F., Conte, S., Karimi, M., Sander, B., Douagi, I., *et al.* (2020). A three-dimensional in vitro model of erythropoiesis recapitulates erythroid failure in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 34, 271-282.
- Fares, I., Chagraoui, J., Gareau, Y., Gingras, S., Ruel, R., Mayotte, N., Csaszar, E., Knapp, D.J., Miller, P., Ngom, M., *et al.* (2014). Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 345, 1509-1512.
- Fares, I., Chagraoui, J., Lehnertz, B., MacRae, T., Mayotte, N., Tomellini, E., Aubert, L., Roux, P.P., and Sauvageau, G. (2017). EPCR expression marks UM171-expanded CD34(+) cord blood stem cells. *Blood* 129, 3344-3351.
- Flores-Figueroa, E., Gutiérrez-Espindola, G., Guerrero-Rivera, S., Pizzuto-Chavez, J., and Mayani, H. (1999). Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro colony growth and long-term proliferation. *Leuk Res* 23, 385-394.
- Francis, G.L. (2010). Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology* 62, 1-16.
- Gammaitoni, L., Weisel, K.C., Gunetti, M., Wu, K.D., Bruno, S., Pinelli, S., Bonati, A., Aglietta, M., Moore, M.A., and Piacibello, W. (2004). Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. *Blood* 103, 4440-4448.
- Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Starczynowski, D.T., Colla, S., Yang, H., Cabrero-Calvo, M., Bohannon, Z.S., Verma, A., Steidl, U., and Garcia-Manero, G. (2015). Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 29, 1458-1469.
- Garcia-Manero, G. (2012). Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 87, 692-701.
- Garcia-Manero, G., and Fenaux, P. (2011). Hypomethylating agents and other novel strategies in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 29, 516-523.
- Geissler, K., Hinterberger, W., Jäger, U., Bettelheim, P., Neumann, E., Haas, O., Ambros, P., Chott, A., Radaszkiewicz, T., and Lechner, K. (1988). Deficiency of pluripotent hemopoietic progenitor cells in myelodysplastic syndromes. *Blut* 57, 45-49.
- Germing, U., Kobbe, G., Haas, R., and Gattermann, N. (2013). Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 110, 783-790.

- Germing, U., Strupp, C., Giagounidis, A., Haas, R., Gattermann, N., Starke, C., and Aul, C. (2012). Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 36, 727-734.
- Glimm, H., Oh, I.H., and Eaves, C.J. (2000). Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0). *Blood* 96, 4185-4193.
- Grafone, T., Palmisano, M., Nicci, C., and Storti, S. (2012). An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev* 6, e8.
- Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., *et al.* (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 2454-2465.
- Gressner, A.M., and Arndt, T. (2019). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., *et al.* (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241-247.
- Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Kastelein, R., Bazan, J.F., Hudak, S., Wagner, J., Mattson, J., *et al.* (1994). Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368, 643-648.
- Hao, Q.L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1995). A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86, 3745-3753.
- Harnan, S., Ren, S., Gomersall, T., Everson-Hock, E.S., Sutton, A., Dhanasiri, S., and Kulasekararaj, A. (2016). Association between Transfusion Status and Overall Survival in Patients with Myelodysplastic Syndromes: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Acta Haematol* 136, 23-42.
- Hasserjian, R.P. (2019). Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology* 86, 7-13.
- Hayakawa, J., Hsieh, M.M., Uchida, N., Phang, O., and Tisdale, J.F. (2009). Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2Rgamma(null) mice. *Stem Cells* 27, 175-182.
- Himburg, H.A., Muramoto, G.G., Daher, P., Meadows, S.K., Russell, J.L., Doan, P., Chi, J.T., Salter, A.B., Lento, W.E., Reya, T., *et al.* (2010). Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 16, 475-482.
- Hofmann, W.K., de Vos, S., Komor, M., Hoelzer, D., Wachsman, W., and Koeffler, H.P. (2002). Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* 100, 3553-3560.
- Ieyasu, A., Ishida, R., Kimura, T., Morita, M., Wilkinson, A.C., Sudo, K., Nishimura, T., Ohehara, J., Tajima, Y., Lai, C.Y., *et al.* (2017). An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. *Stem Cell Reports* 8, 500-508.

Ika, S.A., Qi, X.F., and Chen, Z.X. (2009). Regulatory function and expression of rap1gap gene in hematopoietic cells-review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 17, 1093-1096.

Jacobsen, S.E., Okkenhaug, C., Myklebust, J., Veiby, O.P., and Lyman, S.D. (1995). The FLT3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: synergistic interactions with interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J Exp Med* 181, 1357-1363.

Julius M. Cruse, R.E.L., Huan Wang (2004). 3 - CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. In *Immunology Guidebook*, J.M. Cruse, R.E. Lewis, and H. Wang, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 47-124.

Kantarjian, H.M., Giles, F., List, A.F., Lyons, R., Price, S., Deuson, R., and Leveque, J. (2006). The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndrome (MDS) (American Society of Hematology).

Kharas, M.G., Okabe, R., Ganis, J.J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D.G., and Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* 115, 1406-1415.

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

Kim, E., Ilagan, J.O., Liang, Y., Daubner, G.M., Lee, S.C., Ramakrishnan, A., Li, Y., Chung, Y.R., Micol, J.B., Murphy, M.E., *et al.* (2015). SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* 27, 617-630.

Krevvata, M., Shan, X., Zhou, C., Dos Santos, C., Habineza Ndikuyeze, G., Secreto, A., Glover, J., Trotman, W., Brake-Silla, G., Nunez-Cruz, S., *et al.* (2018). Cytokines increase engraftment of human acute myeloid leukemia cells in immunocompromised mice but not engraftment of human myelodysplastic syndrome cells. *Haematologica* 103, 959-971.

Kumar, S., and Geiger, H. (2017). HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol Med* 23, 799-819.

Liesveld, J.L., Jordan, C.T., and Phillips, G.L., 2nd (2004). The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells* 22, 590-599.

Lindsley, R.C., Saber, W., Mar, B.G., Redd, R., Wang, T., Haagenson, M.D., Grauman, P.V., Hu, Z.H., Spellman, S.R., Lee, S.J., *et al.* (2017). Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 376, 536-547.

List, A., Ebert, B.L., and Fenaux, P. (2018). A decade of progress in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Leukemia* 32, 1493-1499.

Liu, J., Li, K., Yuen, P.M., Fok, T.F., Yau, F.W., Yang, M., and Li, C.K. (1999). Ex vivo expansion of enriched CD34+ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 24, 247-252.

Lyman, S.D., James, L., Bos, T.V., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L.T., Picha, K.S., McKenna, H.J., Splett, R.R., *et al.* (1993a). Molecular cloning of a ligand for the flt3 flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75, 1157-1167.

- Lyman, S.D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L.T., Picha, K.S., McKenna, H.J., Splett, R.R., *et al.* (1993b). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75, 1157-1167.
- Maassen, A., Strupp, C., Giagounidis, A., Kuendgen, A., Nachtkamp, K., Hildebrandt, B., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., and Germing, U. (2013). Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res* 37, 64-70.
- Maria, K., Xiaochuan, S., Chenghui, Z., Cedric Dos, S., Georges Habineza, N., Anthony, S., Joshua, G., Winifred, T., Gisela, B.-S., Selene, N.-C., *et al.* (2018). Cytokines increase engraftment of human acute myeloid leukemia cells in immunocompromised mice but not engraftment of human myelodysplastic syndrome cells. *Haematologica* 103, 959-971.
- Martin, M.G., Welch, J.S., Uy, G.L., Fehniger, T.A., Kulkarni, S., Duncavage, E.J., and Walter, M.J. (2010). Limited engraftment of low-risk myelodysplastic syndrome cells in NOD/SCID gamma-C chain knockout mice. *Leukemia* 24, 1662-1664.
- Martínez-Jaramillo, G., Flores-Figueroa, E., Sánchez-Valle, E., Gutiérrez-Espíndola, G., Gómez-Morales, E., Montesinos, J.J., Flores-Guzmán, P., Chávez-González, A., Alvarado-Moreno, J.A., and Mayani, H. (2002). Comparative analysis of the in vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors from patients with aplastic anemia and myelodysplasia. *Leuk Res* 26, 955-963.
- Matthews, W., Jordan, C.T., Wiegand, G.W., Pardoll, D., and Lemischka, I.R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 65, 1143-1152.
- McKenna, H.J., de Vries, P., Brasel, K., Lyman, S.D., and Williams, D.E. (1995). Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86, 3413-3420.
- McNiece, I.K., Langley, K.E., and Zsebo, K.M. (1991). Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* 19, 226-231.
- Medyouf, H., Mossner, M., Jann, J.C., Nolte, F., Raffel, S., Herrmann, C., Lier, A., Eisen, C., Nowak, V., Zens, B., *et al.* (2014). Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell* 14, 824-837.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
- Montalban-Bravo, G., and Garcia-Manero, G. (2018). Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 93, 129-147.
- Mufti, G.J., McLornan, D.P., van de Loosdrecht, A.A., Germing, U., and Hasserjian, R.P. (2018). Diagnostic algorithm for lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 32, 1679-1696.
- Muguruma, Y., Matsushita, H., Yahata, T., Yumino, S., Tanaka, Y., Miyachi, H., Ogawa, Y., Kawada, H., Ito, M., and Ando, K. (2011). Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 96, 543-551.

- Nachtkamp, K., Stark, R., Strupp, C., Kündgen, A., Giagounidis, A., Aul, C., Hildebrandt, B., Haas, R., Gattermann, N., and Germing, U. (2016). Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 95, 937-944.
- Navas, T., Zhou, L., Estes, M., Haghazari, E., Nguyen, A.N., Mo, Y., Pahanish, P., Mohindru, M., Cao, T., Higgins, L.S., *et al.* (2008). Inhibition of p38alpha MAPK disrupts the pathological loop of proinflammatory factor production in the myelodysplastic syndrome bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma* 49, 1963-1975.
- Neukirchen, J., Blum, S., Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Haas, R., Aul, C., Gattermann, N., and Germing, U. (2009). Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 83, 477-482.
- Neukirchen, J., Lauseker, M., Blum, S., Giagounidis, A., Lübbert, M., Martino, S., Siragusa, S., Schlenk, R.F., Platzbecker, U., Hofmann, W.K., *et al.* (2014). Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res* 38, 57-64.
- Neukirchen, J., Schoonen, W.M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., and Germing, U. (2011). Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res* 35, 1591-1596.
- Nikoloski, G., Langemeijer, S.M., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E.R., van der Heijden, A., Scheele, T.N., Vandenbergh, P., de Witte, T., *et al.* (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EHZ2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42, 665-667.
- Nishimura, T., Hsu, I., Martinez-Krams, D.C., Nakauchi, Y., Majeti, R., Yamazaki, S., Nakauchi, H., and Wilkinson, A.C. (2019). Use of polyvinyl alcohol for chimeric antigen receptor T-cell expansion. *Exp Hematol* 80, 16-20.
- Notta, F., Doulatov, S., and Dick, J.E. (2010). Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood* 115, 3704-3707.
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333, 218-221.
- Obeng, E.A., Chappell, R.J., Seiler, M., Chen, M.C., Campagna, D.R., Schmidt, P.J., Schneider, R.K., Lord, A.M., Wang, L., Gambe, R.G., *et al.* (2016). Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. *Cancer Cell* 30, 404-417.
- Pang, W.W., Pluvina, J.V., Price, E.A., Sridhar, K., Arber, D.A., Greenberg, P.L., Schrier, S.L., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2013). Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3011-3016.
- Papa, L., Djedaini, M., and Hoffman, R. (2020). Ex vivo HSC expansion challenges the paradigm of unidirectional human hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1466, 39-50.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., *et al.* (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616-3627; quiz 3699.

Parmentier, S., Schetelig, J., Lorenz, K., Kramer, M., Ireland, R., Schuler, U., Ordemann, R., Rall, G., Schaich, M., Bornhäuser, M., *et al.* (2012). Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica* 97, 723-730.

Paul, S.M., Shuli, L., Sarah, N., Edwin, P.A., Joseph, H.A., Philippe, A., Corey, S.C., Vincent, T.H., Natasha, K., John, K., *et al.* (2016). Infused total nucleated cell dose is a better predictor of transplant outcomes than CD34+ cell number in reduced-intensity mobilized peripheral blood allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica* 101, 499-505.

Pazianos, G., Uqoezwa, M., and Reya, T. (2003). The elements of stem cell self-renewal: a genetic perspective. *Biotechniques* 35, 1240-1247.

Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., *et al.* (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95, 3289-3296.

Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., *et al.* (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-848.

Pellagatti, A., and Boultonwood, J. (2015). The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 95, 3-15.

Pellagatti, A., Cazzola, M., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Verma, A., Norbury, C.J., *et al.* (2010). Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* 24, 756-764.

Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Dané, A., Gammaitoni, L., and Aglietta, M. (1998). Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. *Leukemia* 12, 718-727.

Pomeroy, C., Oken, M.M., Rydell, R.E., and Filice, G.A. (1991). Infection in the myelodysplastic syndromes. *Am J Med* 90, 338-344.

Psatha, N., Georgolopoulos, G., Phelps, S., and Papayannopoulou, T. (2017). Brief Report: A Differential Transcriptomic Profile of Ex Vivo Expanded Adult Human Hematopoietic Stem Cells Empowers Them for Engraftment Better than Their Surface Phenotype. *Stem Cells Transl Med* 6, 1852-1858.

Raza, A., Mundle, S., Shetty, V., Alvi, S., Chopra, H., Span, L., Parcharidou, A., Dar, S., Venugopal, P., Borok, R., *et al.* (1996). Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int J Hematol* 63, 265-278.

Reinisch, A., Thomas, D., Corces, M.R., Zhang, X., Gratzinger, D., Hong, W.-J., Schallmoser, K., Strunk, D., and Majeti, R. (2016). A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells. *Nature Medicine* 22, 812-821.

Robert-Richard, E., Ged, C., Ortet, J., Santarelli, X., Lamrissi-Garcia, I., de Verneuil, H., and Mazurier, F. (2006). Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica* 91, 1384.

- Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S.V., Teichmann, L.L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A.K., *et al.* (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol* 32, 364-372.
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O., and Birnbaum, D. (1991). Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6, 1641-1650.
- Rouault-Pierre, K., Mian, S.A., Goulard, M., Abarrategi, A., Di Tulio, A., Smith, A.E., Mohamedali, A., Best, S., Nloga, A.M., Kulasekararaj, A.G., *et al.* (2017). Preclinical modeling of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 31, 2702-2708.
- Sack, U., Tarnok, A., Rothe, G. (2007). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.*
- Sanchez, P.V., Perry, R.L., Sarry, J.E., Perl, A.E., Murphy, K., Swider, C.R., Bagg, A., Choi, J.K., Biegel, J.A., Danet-Desnoyers, G., *et al.* (2009). A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23, 2109-2117.
- Shastri, A., Will, B., Steidl, U., and Verma, A. (2017). Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 129, 1586-1594.
- Shih, L.Y., Chiu, W.F., and Lee, C.T. (1991). Diagnostic and prognostic values of in vitro culture growth patterns of marrow granulocyte-macrophage progenitors in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 5, 1092-1098.
- Shin, J.Y., Hu, W., Naramura, M., and Park, C.Y. (2014). High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J Exp Med* 211, 217-231.
- Shirai, C.L., Ley, J.N., White, B.S., Kim, S., Tibbitts, J., Shao, J., Ndonwi, M., Wadugu, B., Duncavage, E.J., Okeyo-Owuor, T., *et al.* (2015). Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo. *Cancer Cell* 27, 631-643.
- Shyu, W.C., Lin, S.Z., Yang, H.I., Tzeng, Y.S., Pang, C.Y., Yen, P.S., and Li, H. (2004). Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 110, 1847-1854.
- Song, Y., Rongvaux, A., Taylor, A., Jiang, T., Tebaldi, T., Balasubramanian, K., Bagale, A., Terzi, Y.K., Gbyli, R., Wang, X., *et al.* (2019). A highly efficient and faithful MDS patient-derived xenotransplantation model for pre-clinical studies. *Nat Commun* 10, 366.
- Steensma, D.P. (2012). Dysplasia has A differential diagnosis: distinguishing genuine myelodysplastic syndromes (MDS) from mimics, imitators, copycats and impostors. *Curr Hematol Malig Rep* 7, 310-320.
- Sweeney, M.R., Applebaum, K.M., Arem, H., Braffett, B.H., Poynter, J.N., and Robien, K. (2019). Medical Conditions and Modifiable Risk Factors for Myelodysplastic Syndrome: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 28, 1502-1517.
- Swerdlow SH, C.E., Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber D, Hasserjian RP, LeBeau MM, Orazi A, Siebert R (2017). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Swoboda, D.M., and Sallman, D.A. (2019). Mutation-Driven Therapy in MDS. *Curr Hematol Malig Rep* 14, 550-560.

Tadokoro, Y., Hoshii, T., Yamazaki, S., Eto, K., Ema, H., Kobayashi, M., Ueno, M., Ohta, K., Arai, Y., Hara, E., *et al.* (2018). Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress. *Cell Stem Cell* 22, 713-725.e718.

Tefferi, A., Hanson, C.A., and Inwards, D.J. (2005). How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults. *Mayo Clin Proc* 80, 923-936.

Teufel, M., Bares, R., Ernemann, U., and Horger, M. (2008). [Extra-medullary hematopoiesis: imaging findings]. *Rofo* 180, 775-780.

Thanopoulou, E., Cashman, J., Kakagianne, T., Eaves, A., Zoumbos, N., and Eaves, C. (2004). Engraftment of NOD/SCID-beta2 microglobulin null mice with multilineage neoplastic cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 103, 4285-4293.

Tomellini, E., Fares, I., Lehnertz, B., Chagraoui, J., Mayotte, N., MacRae, T., Bordeleau, M., Corneau, S., Bisailon, R., and Sauvageau, G. (2019). Integrin- α 3 Is a Functional Marker of Ex Vivo Expanded Human Long-Term Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep* 28, 1063-1073.e1065.

Tsapogas, P., Mooney, C.J., Brown, G., and Rolink, A. (2017). The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Int J Mol Sci* 18.

Van den Berghe, H., Cassiman, J.J., David, G., Fryns, J.P., Michaux, J.L., and Sokal, G. (1974). Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* 251, 437-438.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.

Varney, M.E., Melgar, K., Niederkorn, M., Smith, M., Barreyro, L., and Starczynowski, D.T. (2015). Deconstructing innate immune signaling in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 43, 587-598.

Velten, L., Haas, S.F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B.P., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E.C., Nowak, D., *et al.* (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol* 19, 271-281.

Verburgh, E., Achten, R., Louw, V.J., Brusselmans, C., Delforge, M., Boogaerts, M., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., and Verhoef, G. (2007). A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia* 21, 668-677.

Wagner, J.E., Jr., Brunstein, C.G., Boitano, A.E., DeFor, T.E., McKenna, D., Sumstad, D., Blazar, B.R., Tolar, J., Le, C., Jones, J., *et al.* (2016). Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell* 18, 144-155.

Wilkinson, A.C., Igarashi, K.J., and Nakauchi, H. (2020a). Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. *Nat Rev Genet* 21, 541-554.

Wilkinson, A.C., Ishida, R., Kikuchi, M., Sudo, K., Morita, M., Crisostomo, R.V., Yamamoto, R., Loh, K.M., Nakamura, Y., Watanabe, M., *et al.* (2019). Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature* 571, 117-121.

Wilkinson, A.C., Ishida, R., Nakauchi, H., and Yamazaki, S. (2020b). Long-term ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. *Nat Protoc* 15, 628-648.

Will, B., Zhou, L., Vogler, T.O., Ben-Neriah, S., Schinke, C., Tamari, R., Yu, Y., Bhagat, T.D., Bhattacharyya, S., Barreyro, L., *et al.* (2012). Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood* 120, 2076-2086.

Wilson, A.B., Neogi, T., Prout, M., and Jick, S. (2014). Relative risk of myelodysplastic syndromes in patients with autoimmune disorders in the General Practice Research Database. *Cancer Epidemiol* 38, 544-549.

Wimazal, F., Sperr, W.R., Kundi, M., Meidlinger, P., Fonatsch, C., Jordan, J.H., Thalhammer-Scherrer, R., Schwarzinger, I., Geissler, K., Lechner, K., *et al.* (2001). Prognostic value of lactate dehydrogenase activity in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 25, 287-294.

Wong, T.N., Ramsingh, G., Young, A.L., Miller, C.A., Touma, W., Welch, J.S., Lamprecht, T.L., Shen, D., Hundal, J., Fulton, R.S., *et al.* (2015). Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature* 518, 552-555.

Wunderlich, M., Brooks, R.A., Panchal, R., Rhyasen, G.W., Danet-Desnoyers, G., and Mulloy, J.C. (2014). OKT3 prevents xenogeneic GVHD and allows reliable xenograft initiation from unfractionated human hematopoietic tissues. *Blood* 123, e134-144.

Wunderlich, M., Chou, F.S., Link, K.A., Mizukawa, B., Perry, R.L., Carroll, M., and Mulloy, J.C. (2010). AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia* 24, 1785-1788.

Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475-482.

Zhang, C.C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H., and Lodish, H.F. (2008). Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 111, 3415-3423.

Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., *et al.* (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 441, 518-522.

Zhou, Y., Tang, G., Medeiros, L.J., McDonnell, T.J., Keating, M.J., Wierda, W.G., and Wang, S.A. (2012). Therapy-related myeloid neoplasms following fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Mod Pathol* 25, 237-245.

Zriwil, A., Böiers, C., Kristiansen, T.A., Wittmann, L., Yuan, J., Nerlov, C., Sitnicka, E., and Jacobsen, S.E.W. (2018). Direct role of FLT3 in regulation of early lymphoid progenitors. *Br J Haematol* 183, 588-600.

Zsebo, K.M., Wypych, J., McNiece, I.K., Lu, H.S., Smith, K.A., Karkare, S.B., Sachdev, R.K., Yuschenkoff, V.N., Birkett, N.C., Williams, L.R., *et al.* (1990). Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell* 63, 195-201.

Zwierzina, H., Anderson, J.E., Rollinger-Holzinger, I., Torok-Storb, B., Nuessler, V., and Lyman, S.D. (1999). Endogenous FLT-3 ligand serum levels are associated with disease stage in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 13, 553-557.

10 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle A.1: Informationen zu verwendeten Proben der MDS-Patienten

G., Geschlecht. KI., Klassifikation. Pat.-Nr., Patienten-Nummer.

Pat.-Nr.	WHO-KI. (MDS)	G.	Alter	Karyotyp	Mutationen
MDS1	RCMD	w	63	46, XX	ASXL1, N986S
MDS2	RCMD	m	79	46, XY	BCOLR1, SLU7, PP2D1
MDS3	RAEB-II	m	65	46, XY	ASXL1, G646Wfs*12
MDS4	RAEB-I	w	76	46, XX, del (5q)	-
MDS5	RCMD	m	69	47, XY, +8	SF3B1, TET2
MDS6	RCMD	m	78	46, XY	ASXL1 (50 %), RUNX1 (30 %)
MDS7	RCMD	m	73	46, XY	TET2, SRSF2, ASXL1
MDS8	RARS	w	75	46, XX	Kein Nachweis von NRAS, KRAS, NPM1, ASXL1, ETV6, EZH2, RUNX1, TET2, TP53
MDS9	RARS	m	76	46, XY	IDH2, R140Q
MDS10	RAEB	m	70	46, XY	ASXL1, SRSF2, RUNX1, CBL
MDS11	RCMD	m	70	46, XY	ASXL1 8 %, JAK2 7 %, U2AF 11 %
MDS12	RAEB	m	70	46, XY	ASXL1, SRSF2, RUNX1, CBL
MDS13	RCMD	m	76	46, XX	TET2 (50 %)
MDS14	tMDS	m	71	46, XY, r(6) (p21q26)	RUNX1, SRSF2, TET2
MDS15	RCMD	m	72	46, XY, komplex aberrant, inkl. del (5q), del (ETV6), del (20q)	TP53
MDS16	RARS	m	82	46, XY	TET2, TP53
MDS17	RCMD	m	78	46, XY [20]	ASXL1 (50 %), RUNX1 (30 %)
MDS18	RCMD	w	74	46, XX, del (13)(q14)	ASXL1, KRAS, SRSF2, TET2, Kit D816V
MDS19	RAEB-II	m	80	46, XY, komplex aberrant del (5q)	TP53, EVI1, 5q-
MDS20	RAEB	m	70	46, XY	ASXL1, SRSF2, RUNX1, CBL
MDS21	CMML	m	84	46, XY	TET2, RUNX1, SRSF2
MDS22	RAEB-I	m	79	46, XY	ASXL1, EZH2, RUNX1, STAG2
MDS23	RCMD	m	71	46, XY	ASXL1, RUNX1, NRAS, PTPN11, SATG2, TET2, ZRSR2, EZH2
MDS24	RCMD	m	64	46, XY [20]	ASXL1
MDS25	RCMD	m	78	46, XY [20]	ASXL1, RUNX1

Tabelle A.2: Abbruchkriterien für Versuchstiere / Score Sheet

Parameter	Symptome	Maus-ID:	Bewertung
Allgemeinzustand	Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber		0
	Fell stumpf, gestäubt; Augen trüb		1
	Verkrustete Augen/Nase Brillenbildung, verklebte oder feuchte Körperöffnungen;		2
	unnormale Haltung; hoher Muskeltonus; Krämpfe; Lähmungen; Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an		3
Körpergewicht Bei Auffälligkeiten täglich, ansonsten erfolgt das Wiegen 1x wöchentlich	Unbeeinflusst oder Anstieg		0
	Gewichtsverlust < 10 %		1
	Gewichtsverlust 10-20 %		2
	Keine Nahrungsaufnahme; Gewichtsverlust > 20 %		3
Spontanverhalten	normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)		0
	ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik		1
	Isolation; Apathie; Koordinationsstörungen		2
	Schmerzäußerungen; Automutilation (Selbstverletzendes Verhalten)		3
	Summe		0 - 9
<p>Interpretation der erreichten Punktzahl:</p> <p>0 = normal</p> <p>1 - 5 = sorgfältig beobachten; ggf. Verabreichung von Carprofen 5 µg/g KG 1 x täglich s. c.</p> <p>6 - 9 = Tier leidet und muss unverzüglich getötet werden.</p>			

Tabelle A.3: Ergebnisse der in vivo Experimente
Pat.-Nr., Patienten-Nummer. W., Woche.

Pat.-Nr.	Mausnummer	Gruppe	Engraftment, %		Kommentare
			W. 12	W. 24	
	1158_20_0015_F1		-	-	63. Tag: Tötung aufgrund von Dyspnoe; Engraftment bei Tötung betrug 8,55 %
	1158_20_0017_F3	frisch aufgetaut 200 000	0,38	2,24	-
	1158_20_0020_F5		8,46	0,38	-
MDS13	1158_20_0021_F6		1,87	1,23	-
	1158_20_0070_F1		0,01	0,004	-
	1158_20_0071_F2	frisch aufgetaut 200 000	0,041	0,01	-
	1158_20_0072_F3	expandiert	0	0	-
	1158_20_0073_F4		0	0,0205	-
	1158_20_0121_F2		91,2	96,4	-
	1158_20_0122_F3	frisch aufgetaut 200 000	66,1	94,2	-
	1158_20_0157_F6		3,38	60,9	-
	1158_20_0158_F7		7,75	93,4	-
	1158_20_0166_F1		0,083	1,64	-
	1158_20_0167_F2	frisch aufgetaut 200 000	0,13	1,74	-
	1158_20_0169_F4	expandiert	0,045	0	-
MDS14	1158_20_0170_F5		0,014	0	-
	1158_20_0133_F1		5,34	1,22	-
	1158_20_0134_F2	frisch aufgetaut 600 000	1,37	0,32	-
	1158_20_0168_F3	expandiert	-	-	76. Tag: tot vorgefunden
	1158_20_0204_F1		4,38	82,7	-
	1158_20_0205_F2	MACS-isoliert 200 000	40,5	74,9	-
	1158_20_0206_F3		11,8	82,0	-
	1158_20_0207_F4		67,1	85,4	-

Pat.- Nr.	Mausnummer	Gruppe	Engraftment, %		Kommentare
			W. 12	W. 24	
	1158_20_0123_F4		0,17	2,48	-
	1158_20_0125_F6	MACS-isoliert 200 000	0,43	0,31	-
	1158_20_0126_F7	expandiert	0,013	0	-
	1158_20_0135_F3		1,86	1,66	-
	1158_20_0124_F5	MACS-isoliert 600 000	8,44	1,22	-
	1158_20_0127_F8	expandiert	3,6	8,13	-
	1158_20_0636_F1	sekundäre Empfänger von	0,35	-	sekundäre Empfänger von Gruppe „MACS-isoliert 200 000“
	1158_20_0638_F3	1158_20_0206_F3	0,47	-	
	1158_20_0637_F2	sekundäre Empfänger von	0,6	-	sekundäre Empfänger von Gruppe „frisch aufgetaut 200 000“
	1158_20_0719_F4	1158_20_0207_F4	2,67	-	
MDS14	1158_20_0667_F1	sekundäre Empfänger von	0,48	0,87	sekundäre Empfänger von Gruppe „frisch aufgetaut 200 000“
	1158_20_0669_F3	1158_20_0158_F7	1,42	0,44	
	1158_20_0668_F2	sekundäre Empfänger von	0,55	-	
	1158_20_0697_F4	1158_20_0157_F6	0	-	
	1158_20_0703_F2	sekundäre Empfänger von	0,026	-	sekundäre Empfänger von Gruppe „MACS-isoliert 600 000 expandiert“
	1158_20_0704_F3	1158_20_0127_F8	0,032	-	
	1158_20_0716_F1	sekundäre Empfänger von	0	-	sekundäre Empfänger von Gruppe „frisch aufgetaut 200 000 expandiert“
	1158_20_0717_F2	1158_20_0124_F5	0	-	
	1158_20_0690_F3	sekundäre Empfänger von	0,027	-	sekundäre Empfänger von Gruppe „frisch aufgetaut 200 000 expandiert“
	1158_20_0691_F4	1158_20_0166_F1	0,054	-	

Pat.- Nr.	Mausnummer	Gruppe	Engraftment, %		Kommentare
			W. 12	W. 24	
	1158_20_0421_F1		0,11	0,015	-
	1158_20_0422_F2	frisch aufgetaut 200 000	1,1	3,33	-
	1158_20_0423_F3		1,27	0,69	-
	1158_20_0424_F4		0,31	0,38	-
MDS15	1158_20_0389_F2		0,048	0,15	-
	1158_20_0391_F4	frisch aufgetaut 200 000 expandiert	0	0	-
	1158_20_0411_F5		0,016	3,74	-
	1158_20_0388_F1	frisch aufgetaut 400 000 expandiert	-	0,055	-
	1158_20_0390_F3		-	0,031	-
	1158_20_0395_F3		2,32	3,27	-
	1158_20_0396_F4	frisch aufgetaut 200 000	2,12	2,4	-
	1158_20_0397_F5		5,63	1,91	-
	1158_20_0398_F6		15,2	2,83	-
MDS16	1158_20_0410_F1		0,048	1,55	-
	1158_20_0412_F3	frisch aufgetaut 200 000 expandiert	0,21	0,21	-
	1158_20_0413_F4		0,1	0,035	--
	1158_20_0372_F3		1,47	0,25	-
	1158_20_0374_F5	MACS-isoliert 200 000	4,92	0,096	-
	1158_20_0393_F1		0,28	0,014	-
	1158_20_0394_F2		2,34	0,039	-

11 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Timiriasova Polina
Geburtsdatum: 30.11.1997
Geburtsort: Kasan, Russland
Familienstand: ledig
Vater: Nikolay Timiriasov, Geschäftsmann
Mutter: Marina Solnyschkina, Professorin an der Universität Kasan

SCHULISCHER WERDEGANG

2004 - 2007 Schule Nr. 161, Kasan, Russland
2007 - 2009 Judische Schule Nr. 12, Kasan, Russland
2009 - 2015 Lyzeum mit vertieftem Physik- und Mathematikunterricht, Kasan, Russland
2015 Abitur
*Attestat o srednem (polnom) obshchem obrazovanii;
Durchschnittsnote: 5,0 (von max. 5,0)*

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10/2015 - 07/2016 Studienkolleg der Universität Heidelberg, Kurs M
Feststellungsprüfung, Juli 2016: Note: 1,4.
09/2016 Beginn des Studiums an der Universität Heidelberg
Fak. Medizin Mannheim
08/2018 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
Note: 2,0
10/2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)

12 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Daniel Nowak, Leiter des Labors und des Molekularen Tumorboards der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim, sehr dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit eröffnete, diese Arbeit im wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik auszuführen. Ein großer Dank für die Bereitstellung eines interessanten Themas und für die kompetente Begleitung während der der Promotion.

Ebenso danke ich Prof. Dr. rer. Nat. Alice Fabarius, Laborleiterin der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim, für die ermutigenden Worte und wertvollen Ratschläge für die Verfassung dieser Dissertationsschrift.

Bei meiner Betreuerin PhD Dr. Eva Altmann, bei PhD Dr. Vladimir Ryabov und bei MSc Nanni Schmitt möchte ich mich sehr herzlich für die hervorragende vielseitige Unterstützung bedanken. Bei Problemen und Fragen konnten sie mir sowohl bei der Laborarbeit als auch bei der Planung der Experimente und beim Analysieren der Ergebnisse weiterhelfen. Ganz herzlich danke ich PhD Dr. Eva Altmann für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und für alle wertvollen Anmerkungen, die zur Vollendung der Arbeit beitrugen.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitern des wissenschaftlichen Labors, die mich sowohl praktisch als auch durch das hervorragende Arbeitsklima unterstützen. Ein besonderer Dank gilt hierbei Frau Verena Nowak, Frau Julia Obländer und Frau Iris Palme, die mich in die Laborarbeit einführten.

Ich danke meinem Freund Benjamin Herdeanu für die Ermutigung und Unterstützung, die mir auch an schwierigen Tagen viel Kraft und Motivation geschenkt und Mut gemacht haben. Gleicher Dank gilt meinen Freunden Darya Nosan, Jan Albin und Lena Braz.

Zu guter Letzt danke ich vom tiefsten Herzen meinen Eltern für ihre Liebe, Geduld und ungebrochene Unterstützung, die sie mir zuteilwerden lassen haben. Herzlichen Dank!