

**Untersuchung des Einflusses von Rab-GTPasen und
Endozytose-Inhibitoren auf die Zellbiologie und
Zellschicksalsspezifikation von hämatopoetischen
Stamm- und Vorläuferzellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Anna-Kristin Ludwig
aus Uelzen
August 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Bernd Giebel
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Brandau
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2014

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	V
III.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	X
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen.....	1
1.1.1.	Das hämatopoetische Modell.....	1
1.2.	Molekulare Kontrolle von Selbsterhalt und Differenzierung in Stammzellen....	4
1.2.1.	Die Asymmetrische Zellteilung.....	6
1.3.	Das endosomale System.....	11
1.3.1.	Rab-GTPasen.....	14
1.3.2.	Funktionelle Mutationen von Rab-GTPasen	16
1.4.	Manipulation des endosomalen Systems von Zellen.....	17
1.5.	Zielsetzung	18
2.	Material und Methoden.....	20
2.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.1.	Kits und Assays	21
2.1.1.1.	Kits.....	21
2.1.2.	Medien/Medienzusätze	21
2.1.2.1.	Sonstige Chemikalien	22
2.1.3.	Antikörper und Seren.....	24
2.1.4.	Geräte Software	25
2.1.5.	Oligonukleotide und Vektoren.....	25
2.1.6.	Bakterienstämme.....	27
2.1.7.	Zelllinien	27
2.1.8.	Primärzellen	28
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1.	Kultivierung und Anzucht von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen	28
2.2.1.2.	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	29
2.2.1.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.1.4.	Herstellung von Mutationen durch Seiten-gerichtete Mutagenese („Site-directed-mutagenesis“)	31

2.2.2.	Extraktion von Plasmiden aus Bakterien.....	32
2.2.2.1.	DNA-Gelelektrophorese nach (Hjerten, 1961).....	32
2.2.2.2.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.2.3.	Restriktionsverdau von DNA	34
2.2.2.4.	Herstellen von glatten DNA-Enden (<i>blunting</i>) nach Restriktionsverdau	34
2.2.2.5.	Dephosphorylierung von DNA.....	34
2.2.3.	Herstellen und Vermehren von Genkonstrukten in <i>E. coli</i>	35
2.2.3.1.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.3.2.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	36
2.2.4.	Generierung lentivirale Expressionsplasmide für eGFP-Rab-GTPasen	37
2.3.	Zellbiologische Methoden	38
2.3.1.	Kultivierung von HEK293T und K562 Zelllinien.....	38
2.3.2.	Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ).....	39
2.3.3.	Anzucht von MSZ aus Knochenmarkbiopsien.....	39
2.3.4.	Anreicherung von CD34 ⁺ Zellen mit magnetischer Zellseparation (MACS)	40
2.3.5.	Kultivierung von CD34 ⁺ Zellen	40
2.3.6.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	41
2.3.7.	Osteogene und adipogene Differenzierung von MSZ	41
2.3.8.	Differenzierung von HSVZ zu Megakaryozyten oder Erythrozyten.....	43
2.3.9.	CFC (<i>Colony forming cell</i>)-Ansatz.....	46
2.3.10.	Methoden zur Messung der Vitalität von Zellen	47
2.3.10.1.	Zellvitalitätsmessung mit Annexin V	47
2.3.10.2.	Zellvitalitätsmessung mit Propidiumiodid.....	47
2.4.	Methoden zur Messung der Endozytose von Zellen.....	48
2.4.1.	Aufnahme von Transferrin und acDil LDL	48
2.4.2.	Relative Quantifizierung der Endozytose von Transferrin und LDL mittels Durchflusszytometrie	48
2.4.3.	Inhibition von Endozytosewegen	49
2.4.4.	Inhibition der Endozytose durch Pharmazeutika	50
2.5.	Durchflusszytometrie	50
2.5.1.	Untersuchung von CD34 ⁺ Zellen mittels durchflusszytometrischer Analysen .	51
2.5.2.	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) von CD34 ⁺ Zellen	52
2.5.3.	Bildgebende Durchflusszytometrie.....	52
2.5.4.	Durchflusszytometrische Analyse von erythrozytärer und megakaryozytärer Differenzierungsansätze	53
2.6.	Genetische Manipulation von Zellen	54
2.6.1.	Drei Plasmid System zur Generierung viraler Partikel in Zellen	54
2.6.2.	Herstellung virushaltiger Überstände	56
2.6.3.	Transduktion humaner CD34 ⁺ Zellen.....	56

2.6.4.	Transduktion humaner mesenchymaler Stromazellen (MSZ).....	57
2.7.	Biochemische Methoden	57
2.7.1.	Lyse von Zellen zur Gewinnung von Proteinen	57
2.7.2.	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	57
2.7.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	58
2.8.	Immunologische Methoden und Fluoreszenzmikroskopie	59
2.8.1.	Immunologische Detektion von Proteinen („Westernblot-Analyse“).....	59
2.8.2.	Immunfluoreszente Färbung von Proteinen für Fluoreszenzmikroskopie	60
2.8.3.	Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbung von CD63	61
2.8.4.	Vermessung der Vesikelgröße.....	61
2.8.5.	Immunzytochemische Färbung von Blutzellen nach Pappenheim (1870-1916).....	61
2.8.6.	Extrazelluläre Immunfärbung von Zellen für Durchflusszytometrie.....	62
2.8.7.	Intrazelluläre Immunfärbung von Zellen für Durchflusszytometrie	63
2.8.8.	Immunfluoreszenz-Färbungen für durchflusszytometrische Analysen am Amnis Image StreamX.....	63
2.9.	Mikroskopische Lebendzellbeobachtungen	63
2.9.1.	Mikroskopische Motilitätsanalysen von CD34 ⁺ Zellen	64
2.9.2.	Quantifizierung der morphologischen Zellpolarität	65
2.10.	Statistik.....	65
3.	Ergebnisse	66
3.1.	Beschreibung des endosomalen Systems somatischer Stamm- und Vorläuferzellen.....	67
3.1.1.	Anzucht und Charakterisierung von MSZ.....	67
3.1.2.	Marker des endosomalen Systems.....	69
3.1.3.	Endosomale Kompartimente in humanen MSZ.....	69
3.1.4.	Subzelluläre Organisation von Endosomen in CD34 ⁺ Zellen.....	75
3.2.	Genetische Manipulation des endosomalen Systems	82
3.2.1.	Klonierung und Konstruktion von eGFP-Rab-Konstrukten	83
3.2.2.	Validierung lentiviraler eGFP-Rab-GTPase Konstrukte.....	85
3.2.3.	Ektope Expression und phänotypische Beschreibung der	87
	eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteine in humanen MSZ.....	87
3.2.4.	Experimentelle Strategie zur Untersuchung des Einflusses von Rab-GTPasen auf HSVZ.....	100
3.2.5.	Ektop exprimierte eGFP-Rab Fusionsproteine: Subzelluläre Lokalisation und ihre Wirkung auf die Zellpolarisierung humaner CD34 ⁺ Zellen	101
3.2.6.	Analyse von Effekten auf die Zellbiologie von CD34 ⁺ Zellen durch Expression von eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteinen	112
3.2.7.	Analyse der Wirkung ektop exprimierter Rab-GTPasen auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von CD34 ⁺ Zellen	114

3.2.8.	Durchflusszytometrische Analysen von Rab-GTPasen exprimierenden CD34 ⁺ Zellen	120
3.2.9.	Untersuchung des Koloniebildungspotenzials nach ektopter Expression der eGFP-Rab-GTPase Konstrukte	125
3.2.10.	Durchflusszytometrische Analyse von CFC-Ansätzen nach ektopter Expression von Rab5-Varianten.....	133
3.2.11.	Untersuchung des erythrozytären und megakaryozytären Differenzierungspotenzials von CD34 ⁺ Zellen	135
3.2.12.	Validierung des RNAi vermittelten <i>Knockdown</i> von Rab7 in K562 Zellen.....	145
3.1.	Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf Endozytose, Zellpolarität und Zellschicksalsspezifikation von HSVZ.....	148
3.1.1.	Titration der Inhibitoren.....	149
3.1.2.	Inhibition der Endozytose von Transferrin und Dil acLDL nach verschiedenen Zeitpunkten der Inhibitorbehandlung.....	153
3.1.3.	Einfluss einzelner Endozytoseinhibitoren auf die Zellbiologie von CD34 ⁺ Zellen	155
3.1.4.	Einfluss von Inhibitoren auf die Expression von CD133.....	163
3.1.5.	Analyse von Endozytose inhibierenden Pharmazeutika auf die Zellspezifikation von CD34 ⁺ Zellen	166
4.	Diskussion	170
4.1.	Zelluläre Effekte ektopter exprimierter eGFP-Rab-GTPasen	170
4.2.	Beeinflussung der Endozytose durch Inhibitoren in CD34 ⁺ Zellen.....	176
4.3.	Wirkung von Rab-GTPasen und Endozytose-Inhibitoren auf die Zellpolarität von HSVZ.....	178
4.4.	Auswirkung endozytotischer und endosomaler Prozesse auf die Zellschicksalsspezifikation.....	181
4.5.	Ausblick.....	187
5.	Zusammenfassung	189
6.	Anhang.....	193
7.	Literaturverzeichnis.....	210

Danksagung

Lebenslauf

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassisches Modell der humanen Hämatopoese.....	2
Abbildung 2: Neue Modelle der Hämatopoese	4
Abbildung 3: Stammzellnische und asymmetrische Zellteilung.....	6
Abbildung 4: Kinetik der Zelloberflächenexpression von CD34 und CD133 über eine siebentägige Kultivierungsdauer hinweg	9
Abbildung 5: Schematisches Modell des endosomalen Systems der Zelle.....	14
Abbildung 6: Darstellung des Rab-Zyklus an endosomalen Membranen.....	15
Abbildung 7: Sortierschema für Differenzierungsversuche	44
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils lebender Zellen.	48
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung aufgenommener Daten am Amnis Image StreamX. .	53
Abbildung 10: Drei Vektorsystem zur Generierung lentiviraler Partikel.	55
Abbildung 11: Morphologischer Vergleich von MSZ und HSVZ	67
Abbildung 12: Phänotypische und Differenzierungsspezifische Charakteristika von MSZ.....	68
Abbildung 13: Subzelluläre Kompartimente in MSZ.....	71
Abbildung 14: Extra- und intrazelluläre Lokalisation von CD63 in MSZ.....	72
Abbildung 15: IF-Doppelfärbung früher und später endosomaler Proteine in MSZ.	74
Abbildung 16: IF-Dreifachfärbung früher, später und Recycling Endosomen in MSZ.....	75
Abbildung 17: Morphologische Zellpolarisierung von CD34 ⁺ Zellen während der Kultivierung	76
Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbungen früher endosomaler Proteine in CD34 ⁺ Zellen	77
Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Färbungen endosomaler Kompartimente in CD34 ⁺ Zellen	78
Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Färbungen später endosomaler Markerproteine in CD34 ⁺ Zellen	78
Abbildung 21: Immunfluoreszente Doppelfärbungen von endosomalen Proteinen in CD34 ⁺ Zellen	81
Abbildung 22: Durchflusszytometrische Validierung lentiviraler Expressions-konstrukte nach intrazellulärer Rab-Färbung.....	86
Abbildung 23: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab5-Varianten in MSZ.....	89
Abbildung 24: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab7-Varianten in MSZ.....	90
Abbildung 25: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab11-Varianten in MSZ.....	92
Abbildung 26: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab21-Varianten in MSZ.....	93
Abbildung 27: Vergleich der endogenen Lokalisation von Rab5, Rab7 und Rab11 mit den jeweiligen ektop exprimierten eGFP-Rab-Proteinen in MSZ	94
Abbildung 28: Ektipe Expression von Rab5CA führt zu vergrößerten Endosomen	95
Abbildung 29: Ektipe Expression von Rab7CA führt zu vergrößerten Endosomen	96

Abbildung 30: Ektope Expression von Rab5CA verändert die subzelluläre Lokalisation später endosomaler Markerproteine in MSZ.....	98
Abbildung 31: Ektope Expression von Rab7CA und Rab7DN in MSZ	99
Abbildung 32: Experimentelle Strategie zur Analyse des funktionellen Einflusses von eGFP-Rab-GTPasen auf CD34 ⁺ Zellen	101
Abbildung 33: Ektope Expression von eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteinen in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen	106
Abbildung 34: Größe von Rab5WT-, Rab5CA, Rab7WT und Rab7CA-positiven Vesikeln in HSVZ	107
Abbildung 35: Einfluss der ektopen Expression von Rab5-Varianten auf EEA1- und CD63-Vesikel in HSVZ.	109
Abbildung 36: Einfluss der ektopen Expression von Rab5-Varianten auf EEA1- und CD63-Vesikel in HSVZ	110
Abbildung 37: Einfluss von Rab5- und Rab7-Varianten auf die Größe von EEA1- und CD63-Vesikeln in CD34 ⁺ Zellen.	111
Abbildung 38: Endozytische Aufnahme von Transferrin in CD34 ⁺ Zellen	117
Abbildung 39: Endozytische Aufnahme von Dil acLDL in CD34 ⁺ Zellen.....	119
Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analysestrategie zur Ermittlung des Anteils der verschiedenen Zellpopulationen von CD34 ⁺ Zellen	122
Abbildung 41: Änderung des relativen Anteils an eGFP-positiven Zellen.....	123
Abbildung 42: Expansion von eGFP ⁺ CD34 ⁺ Zellen und eGFP ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁺ Zellen.....	125
Abbildung 43: Rab5DN und Rab21DN vermindern das Koloniebildungspotenzial von HSVZ	130
Abbildung 44: Ektop exprimerte Rab-GTPasen beeinflussen die Differenzierung von HSVZ	132
Abbildung 45: Durchflusszytometrische Analysen und Zytospin von CFC-Kolonien	135
Abbildung 46: Versuchsschema für Erythrozyten- und Megakaryozyten-differenzierung von CD34 ⁺ Zellen.	140
Abbildung 47: Quantifizierung der erythrozytären Differenzierung von CD133 ⁺ CD34 ⁺ und CD133 ^{low} CD34 ⁺ Zellen.....	141
Abbildung 48: Quantifizierung der megakaryozytären Differenzierung von CD133 ⁺ CD34 ⁺ und CD133 ^{low} CD34 ⁺ Zellen.....	144
Abbildung 49: Validierung der shRNA-Konstrukte für den <i>Knockdown</i> von Rab7	147
Abbildung 50: Titration der Inhibitoren auf Zytotoxizität von CD34 ⁺ Zellen	152
Abbildung 51: Endozytoseinhibition durch Pharmazeutika.....	155
Abbildung 52: Einfluss von Inhibitoren auf die morphologische Polarität von CD34 ⁺ Zellen	157
Abbildung 53: Bestimmung der molekularen Polarisation von CD34 ⁺ Zellen.	159
Abbildung 54: Beispiele für Inhibitoren, die die morphologische Polarisierung vermindern.	160

Abbildung 55: Mikroskopische Analyse der intrinsischen und morphologischen Polarität an CD34 ⁺ Zellen.....	162
Abbildung 56: Durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenexpression von CD34 und CD133 auf HSVZ.....	165
Abbildung 57: Einfluss von M β CD auf die Zelloberflächenpräsentation von CD133 auf CD34 ⁺ Zellen	166
Abbildung 58: Effekt von Endozytoseinhibitoren auf die Koloniebildungsfrequenz von CD34 ⁺ Zellen.	169
Abbildung 59: Lentivirale Expressionsplasmide pCL6IEGwo und pCL7EGwo. Plasmidgrößen 9027 bp (pCL6IEGwo) und 8379 bp (pCL7EGwo).....	194
Abbildung 60: Lentivirale Strukturplasmide. Helfer Plasmid pCD/NL-BH kodiert für gag und Pol Gene. Hüllplasmid pcoPE kodiert für das Foami Hüllprotein.....	195
Abbildung 61: DNA-Sequenzvergleich von Rab11A aus <i>homo sapiens</i> mit <i>canis lupus familiaris</i>	196
Abbildung 62: Aminosäuresequenzvergleich von Rab11A aus <i>homo sapiens</i> mit <i>canis lupus familiaris</i>	197

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete konjugierte Antikörper zur Analyse humaner Zellen	24
Tabelle 2: Verwendete unkonjugierte Primärantikörper	24
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper.....	25
Tabelle 4: Für immunzytologische Färbungen verwendete Seren	25
Tabelle 5: Synthetisierte Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der eGFP-Rab-GTPase Konstrukte	26
Tabelle 6: Verwendete Vektoren: Amp ^r = Plasmidkodierte Ampicillinresistenz und Kan ^r = Plasmidkodierte Kanamycinresistenz	26
Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme	27
Tabelle 8: Antibiotika	28
Tabelle 9: Zusammensetzung einer Glycerinkultur	29
Tabelle 10: Zusammensetzung LB-Medium	29
Tabelle 11: Zusammensetzung TFB1-Puffer	30
Tabelle 12: Zusammensetzung TFB2-Puffer	30
Tabelle 13: Standard-PCR-Ansatz	30
Tabelle 14: PCR-Profile mit der Phusion-Polymerase.....	31
Tabelle 15: PCR-Profile für die Seiten-gerichtete Mutagenese.....	31
Tabelle 16: Puffer für DNA-Gelelektrophorese	33
Tabelle 17: Agarosegelzusammensetzung.....	33
Tabelle 18: Ansatz für Restriktionsverdau von lentiviralem Vektor bzw. Plasmid mit Insert ..	34
Tabelle 19: Standard-Ligationsansatz für den Einbau von Inserts in den Vektor pBSK	35
Tabelle 20: Standard-Ligationsansatz für den Einbau von Inserts in den Vektor pCL7-eGwo und pCL6-leGwo	36
Tabelle 21: DNA-Sequenzen für die Klonierung der Rab-GTPasen.....	38
Tabelle 22: Osteogenes Differenzierungsmedium	42
Tabelle 23: Adipogene Differenzierungsmedien	43
Tabelle 24: Erythrozytäre Differenzierungsmedien	45
Tabelle 25: Zusammensetzung des Megakaryozyten-Differenzierungsmedium	46
Tabelle 26: Verwendete Pharmazeutika	50
Tabelle 27: Lösungen zur Herstellung einer SDS-PAGE (Laemmli, 1970).....	58
Tabelle 28: Verwendete Trenn- und Sammelgele.....	58
Tabelle 29: Pufferlösungen für Westernblot.....	59
Tabelle 30: Funktionelle Varianten der Rab-GTPasen.....	84
Tabelle 31: Transduktionseffizienz an MSZ.....	88
Tabelle 32: Anteil morphologisch polarisierter CD34 ⁺ Zellen die verschiedene Rab-Proteine exprimieren nach 50-60h Kultivierung	103

Tabelle 33: Messung der <i>in-vitro</i> Motilität von CD34 ⁺ Zellen die verschiedene Rab- Proteine exprimieren nach 50-60h Kultivierung	113
Tabelle 34: Transduktionseffizienz der Endozytoseversuche	115
Tabelle 35: MFI der von Rab-GTPase exprimierenden HSVZ nach Aufnahme von Transferrin-Alexa555	116
Tabelle 36: MFI der von Rab-GTPase exprimierenden HSVZ nach Aufnahme von Dil acLDL	118
Tabelle 37: Transduktionseffizienz von CD34 ⁺ Zellen in den einzelnen Versuchen.....	122
Tabelle 38: Transduktionseffizienz von CD34 ⁺ Zellen	127
Tabelle 39: Mittlere Transduktionseffizienz von CD34 ⁺ Zellen.....	137
Tabelle 40: Quantifizierung von Erythrozyten Differenzierungsansätzen CD133 ⁺ CD34 ⁺ und CD133 ^{low} CD34 ⁺ Zellen.....	139
Tabelle 41: Quantifizierung der Megakaryozyten-Differenzierungsansätze	143
Tabelle 42: Verwendete Inhibitorkonzentrationen	150
Tabelle 43: Verwendete Pharmazeutikakonzentrationen.	153
Tabelle 44: Immunphänotypisierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen	193
Tabelle 45: Vermessene Vesikelgrößen später endosomaler Markerproteine in MSZ	198
Tabelle 46: Vermessene Vesikelgröße früher endosomaler Markerproteine in MSZ.....	199
Tabelle 47: Vermessung von EEA1-Vesikel in HSVZ die Rab5-Varianten exprimieren.....	200
Tabelle 48: Vermessung von EEA1-Vesikel in HSVZ die Rab7-Varianten exprimieren.....	201
Tabelle 49: Vermessung von CD63-Vesikel in HSVZ die Rab5-Varianten exprimieren.....	202
Tabelle 50: Vermessung von CD63-Vesikel in HSVZ die Rab7-Varianten exprimieren.....	203
Tabelle 51: Vermessung von Rab5, Rab5WT, Rab5CA, Rab7WT, Rab7CA, CD63 und EEA1-Vesikel in HSVZ	204
Tabelle 52: Expansion der CD34 ⁺ und CD133 ⁺ CD34 ⁺ Zellen.....	205
Tabelle 53: Koloniebildungspotenzial von CD133 ⁺ CD34 ⁺ Zellen in CFC-Ansätzen.....	206
Tabelle 54: Koloniebildungspotenzial von CD133 ^{low} CD34 ⁺ Zellen in CFC-Ansätzen.....	207
Tabelle 55: Änderung des Anteils eGFP ⁺ Zellen über die Dauer der Kultivierung	208

IV. Abkürzungsverzeichnis

AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
APC	Allophycocyanin
BaEoP	Basophil-Eosinophiler Progenitor
BFU-E	<i>burst forming unit-erythrocyte</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFC	<i>colony forming cell</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CFU-E	<i>colony forming unit-erythrocyte</i>
CFU-G	<i>colony forming unit-granulocyte</i>
CFU-GEMM	<i>colony forming unit-granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit-granulocyte-macrophage</i>
CFU-M	<i>colony forming unit-macrophage</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CMV	humanes Cytomegalievirus
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECD	<i>electron-coupled dye</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	early endosomal Antigen 1
EG	eGFP
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMP	Erythro-Myeloischer Progenitor
EPO	Erythropoietin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fötales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3L	FLT3-Ligand
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FSC	<i>forward scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMP	Granulozyten-Makrophagen Progenitor
GPA	Glycophorin A
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSVZ	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
IEG	IRES-eGFP

IGF	<i>insuline-like growth factor</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
<i>It-HSZ</i>	<i>intermediate term hematopoietic stem cell</i>
kbp	Kilo-Basenpaare
lin	<i>lineage</i>
LMPP	<i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i>
LSK	<i>lineage⁻Sca-1⁺c-kit⁺</i>
LTC-IC	<i>long-term culture initiating cell</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MegE	Megakaryozyten-Erythrozyten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitor
MkP	Megakaryozytärer Progenitor
ML-IC	<i>myeloid-lymphoid initiating cell</i>
M-NK-IC	Makrophagen-NK-Zellen initiierende Zelle
MNZ	mononukleäre Zellen
MPO	Myeloperoxidase
MPP	multipotente Progenitorzelle
NK-IC	<i>natural killer cell-initiating cell</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
NSG	<i>NOD/SCID gamma</i>
NTC	<i>no template-control</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>progenitor cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
ProE	Pro-Erythroblast
PRR	Prolin-reiche Region
psi	<i>pound-force per square inch</i>
Rab	Ras-ähnliches Protein aus Gehirn
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RT	Raumtemperatur
SC	<i>stem cell</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>short-hair-pin RNA</i>
SOP	Sinnesorgan-Progenitorzelle
SRZ	SCID-repopulierende Zelle
SSC	<i>side scatter</i>

<i>st-HSZ</i>	<i>short-term hematopoietic stem cell</i>
TPO	Thrombopoietin
Trf	Transferrin
<i>lt-HSZ</i>	<i>long-term hematopoietic stem cell</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>

1. Einleitung

1.1. Die Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen

Täglich werden bis zu 10^{12} Blutzellen im Knochenmark gebildet. Damit ist das Blut eines der regenerativsten Gewebe im Körper (Doulatov *et al.*, 2012). Die Bildung reifer Blutzellen wird als Hämatopoese bezeichnet. Diese findet während der Ontogenese (u.a. in der fötalen Leber und Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region) und im späteren adulten Organismus (Knochenmark) in unterschiedlichen Geweben statt. Ihre Grundlage bilden die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), die über verschiedenen Progenitorstadien zu allen funktionellen Blutzellen ausreifen können. Die hierarchische Organisation der Hämatopoese wird weitläufig im sogenannten „klassischen Modell“ zusammengefasst (Abbildung 1), dass in verschiedener Hinsicht unter anderem auch durch Arbeiten unserer Gruppe widerlegt wurde.

1.1.1. Das hämatopoetische Modell

Der hierarchische Aufbau des hämatopoetischen Systems ist erstmals im „klassischen Modell“ der Hämatopoese zusammengefasst worden (Akashi *et al.*, 2000a, Akashi *et al.*, 2000b, Majeti *et al.*, 2007). In diesem wird von HSZ ausgegangen, die multipotente Progenitoren (*multipotent progenitors*; MPPs) hervorbringen, deren Nachkommen gemeinsame lymphatische Progenitoren (CLPs; *common lymphoid progenitors*) und gemeinsame myeloische Progenitoren (CMPs; *common myeloid progenitors*) bilden (Galy *et al.*, 1995, Majeti *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2008). CLPs werden als Vorläufer der lymphatischen Linie angesehen und reifen zu B-, T- und NK-Zellen. CMPs sind postulierte Vorläufer der myeloisch-erythrozytären Linie, welche über Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMPs) und Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren (MEPs) Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen und Granulozyten hervorbringen sollen (Abbildung 1).

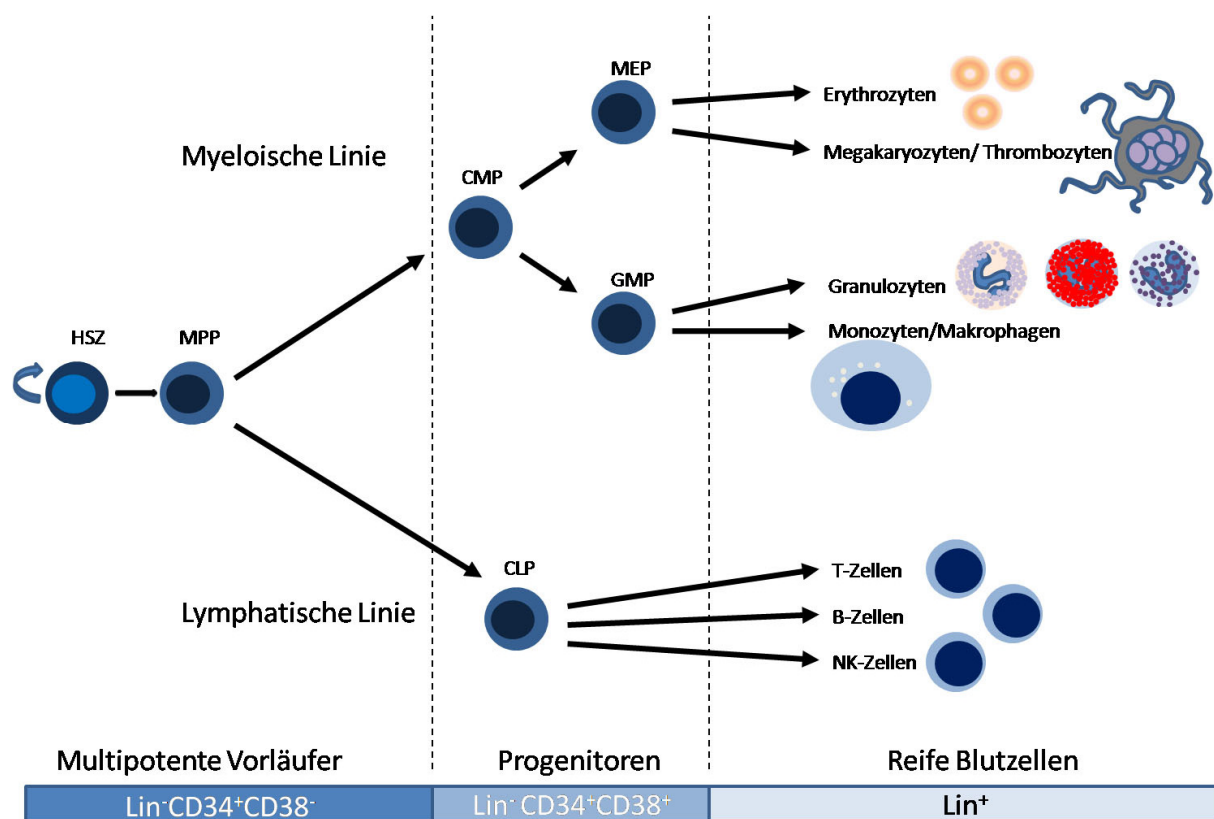


Abbildung 1: Klassisches Modell der humanen Hämatopoese

Modifiziert nach Doulatov *et al.* 2012.

Durch Verwendung von durchflusszytometrischen Analysen in Kombination mit funktionellen Ausleseverfahren ist der hierarchische Aufbau des Modells über Jahrzehnte immer genauer aufgeklärt worden. So wurde in den letzten Jahren das klassische Modell überarbeitet, da die strikte Trennung zwischen der lymphatischen und myeloischen Linie in Frage gestellt worden ist (Adolfsson *et al.*, 2005). Durch die Beschreibung lymphatisch-spezifischer multipotenter Progenitoren (*lymphoid-primed multipotential progenitors*; LMPPs) und multilymphatischer Vorläufer (*mixed-lymphoid progenitors*; MLPs) im humanen und murinen hämatopoetischen System sind Progenitoren identifiziert worden, die lymphatisches und partiell myeloisches Potenzial aufweisen (Mebius *et al.*, 2001, Adolfsson *et al.*, 2005, Giebel *et al.*, 2006, Doulatov *et al.*, 2010, Kawamoto *et al.*, 2010, Goardon *et al.*, 2011). Auf diesen Erkenntnissen über die verschiedenen Progenitoren wurde das „*Composite Model*“ erstellt (Abbildung 2).

Arbeiten unserer Gruppe zeigen unter Verwendung neuer Markerkombinationen, dass GMPs dem klassischen lymphatischen Zweig zugeordnet sind und ausschließlich neutrophile Granulozyten und Makrophagen hervorbringen. Den Daten zur Folge entwickeln sich Eosinophile und Basophile zusammen mit

Erythrozyten und Megakaryozyten aus einem gemeinsamen Vorläufer, der als EMP (*erythro-myeloid progenitor*) bezeichnet wird (Görgens *et al.*, 2013b). Diese Analysen führten zu einem revidierten Modell der Hämatopoese (Abbildung 2).

Eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung des „klassischen Modells“ sowie der Folge Modelle ist die immer besser werdende Kenntnis von Zelloberflächenmarker-Kombinationen, mit denen sich bestimmte hämatopoetische Progenitoren anreichern lassen.

Wie bereits im „Klassischen Modell“ dargestellt gehören die meisten primitiven humanen hämatopoetischen Zellen zur Fraktion der CD34⁺ Zellen, die keine Blutlinien-spezifische Zelloberflächenmarker präsentieren (lineage negativ; lin⁻) und kein oder nur wenig CD38 auf ihrer Zelloberfläche tragen (Abbildung 1). Damit befinden sie sich in der Lin⁻CD34⁺CD38^{low/-} Zellpopulation (Civin *et al.*, 1996, Bhatia *et al.*, 1997b). Die Oberflächenexpression von CD38 deutet auf reifere Progenitoren hin (Lin⁻CD34⁺CD38⁺) (Terstappen *et al.*, 1991, Larochelle *et al.*, 1996). Beide Zellpopulationen Lin⁻CD34⁺CD38^{low/-} und Lin⁻CD34⁺CD38⁺ lassen sich durch die Expression von CD45RA genauer auftrennen. Während HSZ, multipotenten Progenitoren (MPPs) und vielen Zellen des myeloischen Zweigs die Oberflächenpräsenz von CD45RA fehlt, exprimieren Zellen der lymphoiden Linie und GMPs CD45RA auf ihrer Zelloberfläche (Notta *et al.*, 2011). Obwohl der Stammzellmarker CD133 bereits auf HSVZ identifiziert wurde (Gallacher *et al.*, 2000, Bhatia, 2001), ist seine Zelloberflächenexpression bislang nur selten auf hämatopoetischen Subpopulationen untersucht worden. Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sich unter zusätzlicher Verwendung von CD133 in Kombination mit den anderen Markern verschiedene Progenitoren mit unterschiedlichen Differenzierungspotenzialen beschreiben lassen (Görgens *et al.*, 2013b). Die Analysen zeigen, dass MPPs in der Lin⁻CD34⁺CD133⁺CD38^{low/-}CD45RA⁻ Zellfraktion angereichert sind und diese während der Kultivierung Lin⁻CD34⁺CD133⁺CD38^{low/-}CD45RA⁺ (LMPPs) und Lin⁻CD34⁺CD133^{low}CD38⁺CD45RA⁻ (EMPs) hervorbringen (Abbildung 2) (Görgens *et al.*, 2013b). Es zeigte sich ferner, dass aus den LMPPs die GMPs hervorgehen, die in der CD34⁺CD133⁺CD38⁺CD45RA⁺ Fraktion angereichert sind, und die als multilymphatische Progenitoren (MLPs) bezeichneten Vorläufer, die bereits von Doulatov *et al.*, 2010 und Notta *et al.*, 2011 beschrieben wurden. Aus den EMPs

gehen Progenitoren für die megakaryozytäre-erythrozytäre Linie (MEP) und für Eosinophile und Basophile (EoBP) hervor (Görgens *et al.*, 2013b) (Abbildung 2).

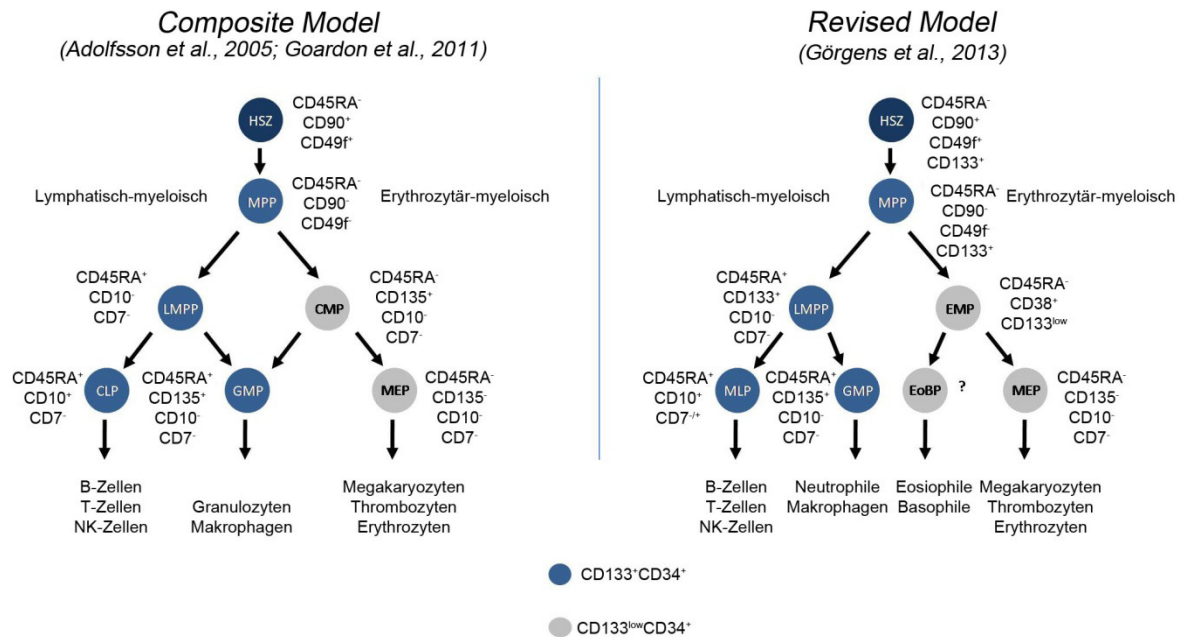


Abbildung 2: Neue Modelle der Hämatopoese

Darstellung zweier aktueller Modelle der Hämatopoese. Das *Composite Model* postuliert von Adolfsson *et al.* 2005; Goardon *et al.* 2011 und das *Revised Model* postuliert von Görgens *et al.* 2013. Mit blau sind CD34⁺CD133⁺ Zellen und mit grau CD34⁺CD133^{low} Zellen in den Modellen dargestellt. Die verschiedenen Vorläufer sind mit den zu ihrer Diskriminierung verwendeten Oberflächenmarkern eingezeichnet. Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), multipotente Progenitoren (MPP), lymphatisch-multipotente Progenitoren (*lympoid-primed multipotent progenitor*, LMPP) sind in beiden Modellen postuliert. Im *Composite Model* wird ein gemeinsamer myeloischer Progenitor (CMP) angenommen, der das Potenzial zur Bildung von Vorläufern mit erythrozytären-megakaryozytären Potenzial (MEP), sowie mit granulozytärem und Makrophagen bildendem Potenzial (GMP) aufweist. Im von unserer AG revidierten Modell (*Revised Model*) wird ein erythrozytär-myeloischer Progenitor (EMP) postuliert der sich zu Vorläufern von eosinophilen und basophilen Granulozyten (EoBP) sowie Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP) entwickelt; die neutrophilen Granulozyten gehen demnach aus GMPs hervor, die wiederum aus LMPPs herranreifen.

1.2. Molekulare Kontrolle von Selbsterhalt und Differenzierung in Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich über einen langen Zeitraum selbst zu erhalten oder bei Bedarf zu funktionellen Blutzellen zu heranzureifen. Die molekularen Mechanismen, die in Stammzellen die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung regulieren, sind weitgehend unverstanden. Eine unkontrollierte Vermehrung wie auch eine unkontrollierte Verminderung somatischer Stammzellen kann fatale Folgen haben. Daher müssen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Hämatopoese streng kontrolliert und reguliert sein (Morrison *et al.*, 1997, Görgens und Giebel, 2010, Frenette *et al.*,

2013). Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie Stammzellen die Entscheidung zwischen Selbsterhalt und Differenzierung kontrollieren können. Aus sequenziellen Transplantationsversuchen primitiver hämatopoetischer Zellen in letal bestrahlte Mäuse deutet sich an, dass HSZ *in vivo* expandieren und auch nach erneuter Transplantation das hämatopoetische System in den Mäusen rekonstituieren können (Iscoe und Nawa, 1997). Demnach können *in vivo*, Stammzellpotenziale von HSZ aufrechterhalten werden. *In vitro* Experimente zum Erhalt und zur Vermehrung von HSVZ in Suspensionskultur zeigten, dass die Zellen nach anfänglicher Expansion ihre primitiven Eigenschaften verlieren (Bhatia *et al.*, 1997a, Shimizu *et al.*, 1998, Görgens *et al.*, 2013a). Bestimmte primitive Charakteristika der HSVZ ließen sich in Gegenwart bestimmter Stromazellen für einen längeren Zeitraum erhalten (Moore *et al.*, 1997, Punzel *et al.*, 1999a, Punzel *et al.*, 1999b, Nolte *et al.*, 2002). Diese Befunde deuten an, dass die Umgebung der Zellen und damit äußere Faktoren den Erhalt von Stammzellen kontrollieren. Solch extrinsische für den Erhalt der Stammzellen notwendige Faktoren werden anscheinend in sogenannten Stammzellnischen räumlich begrenzt bereitgestellt. Hämatopoetische Stammzellnischen wurden bereits 1978 von Raymond Schofield postuliert (Schofield, 1978) (Abbildung 3) und wurden erstmals 2003 im Endosteum des Knochenmarks sowie in der Umgebung von sinusidalen Endothelzellen in der Milz und im Knochenmark nachgewiesen (Calvi *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003, Kiel *et al.*, 2005). Es zeigt sich, dass in den Nischen von Stromazellen sekretierte Signalmoleküle (z.B. Angiopoetin-1 und SDF-1) oder auf der Zelloberfläche der Stromazellen präsentierte Liganden eine wichtige Rolle beim Selbsterhalt und der Proliferation von HSZ spielen (Calvi *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003, Sugiyama *et al.*, 2006, Omatsu *et al.*, 2010, Greenbaum *et al.*, 2013). Im Mausmodell führt z.B. die Deletion des *cxcl12* Gens, welches für die Produktion des *stromal derived factor-1* (SDF-1) verantwortlich ist, sowohl in Endothelzellen als auch in mesenchymalen Stromazellen (MSZ) zum Verlust von HSZ sowie einem teilweisen Verlust von unterschiedlichen Progenitorzellpopulationen (Ding und Morrison, 2013, Greenbaum *et al.*, 2013). Diese und weitere hier nicht aufgeführte Befunde bestärken die Existenz von Stammzellnischen und ihre Bedeutung beim Erhalt von Stammzellen.

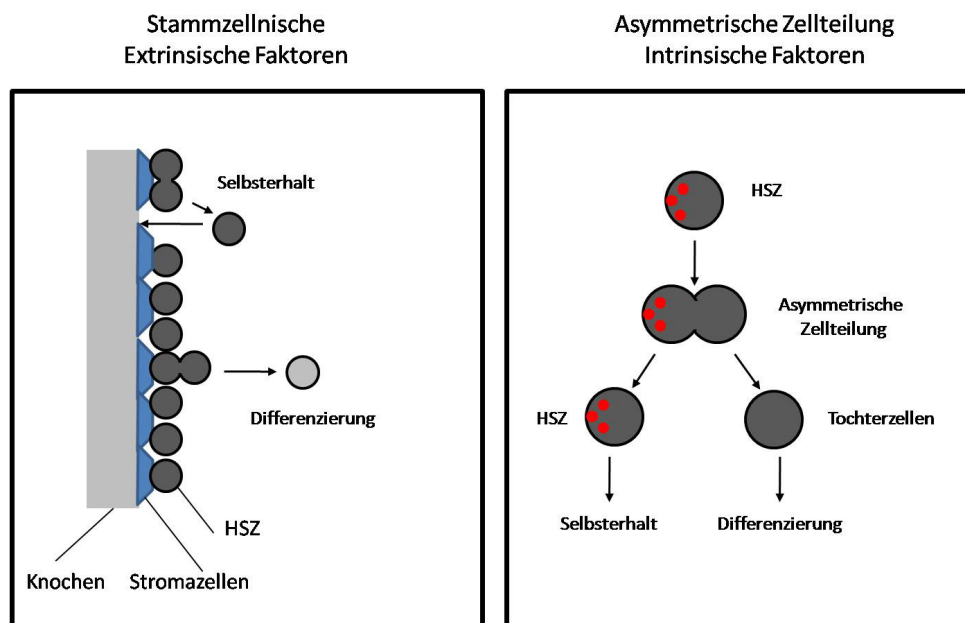


Abbildung 3: Stammzellnische und asymmetrische Zellteilung.

Verändert nach Görgens und Giebel 2010.

Neben den Befunden, die die Existenz der Stammzellnischen bestätigen, deuten einige Analysen darauf hin, dass sich HSVZ asymmetrisch teilen können. Die asymmetrische Zellteilung (Abbildung 3) wird als ein weiterer Mechanismus postuliert, der die Entscheidung Selbsterneuerung oder Differenzierung in HSZ kontrolliert (Ogawa *et al.*, 1984, Suda *et al.*, 1984b, Leary *et al.*, 1985, Brummendorf *et al.*, 1998, Giebel *et al.*, 2006). Auf die asymmetrische Zellteilung in der Hämatopoese wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

1.2.1. Die Asymmetrische Zellteilung

Erste Hinweise auf eine asymmetrische Zellteilung im hämatopoetischen System kamen durch Analysen von HSVZ, bei denen Tochterzellen nach Trennung durch Mikromanipulation vereinzelt Kolonien bilden, die sich in Größe und Linienzusammensetzung stark voneinander unterscheiden. Diese unterschiedliche Entwicklung der Tochterzellen wurde als Folge eines stochastischen Entscheidungsprozess interpretiert (Ogawa *et al.*, 1984, Suda *et al.*, 1984a, Suda *et al.*, 1984b, Leary *et al.*, 1985). In weiteren Untersuchungen brachten 3-17% von $CD34^+CD45RA^{low}CD71^{low}$ Zellen unabhängig von den zugesetzten Zytokinen sich unterschiedlich entwickelnde Tochterzellen hervor (Mayani *et al.*, 1993). Auch hier ist angenommen worden, dass es sich um die Folgen einer stochastisch stattfindenden asymmetrischen Zellteilung handelt (Mayani *et al.*, 1993). Es zeigte sich, dass nur zwischen 20% und 50% der $CD34^+CD38^-$ Zellen aus Knochenmark und 50% der

CD34⁺CD38⁻ Zellen aus Nabelschnurblut in der Lage sind, Kolonien nach 5-wöchiger Ko-Kultur auf bestrahlten Stromazellen zu bilden (Petzer *et al.*, 1996, Conneally *et al.*, 1997). Untersuchungen von CD34⁺CD38⁻CD71^{low}CD45RA^{low} Zellen, die aus der fötalen Leber isoliert worden sind, zeigten neben unterschiedlichem Proliferationsverhalten, dass sich langsam teilende Zellen ein primitiveres Zellschicksal besaßen als schnell teilende Zellen. Weiter zeigte sich, dass Nachkommen einer einzelnen CD34⁺CD38⁻ Zelle sich hinsichtlich ihrer Proliferationskinetik voneinander unterscheiden (Brummendorf *et al.*, 1998). Aufgrund der konstant gehaltenen Bedingungen während der Versuche ist angenommen worden, dass diese Unterschiede ähnlich wie bei der asymmetrischen Zellteilung in Modelorganismen (z.B. *Drosophila melanogaster*) auf die ungleiche Verteilung von Zellschicksalsdeterminanten zurückzuführen ist (Brummendorf *et al.*, 1998). *In vitro* Untersuchungen von CD34⁺CD38⁻ Zellen aus unterschiedlichen Geweben und in Gegenwart unterschiedlicher Zytokine ließen darauf schließen, dass die ersten Zellteilungen in Kultur nach 36-38 h bzw. 48-50 h stattfinden. Der Anteil der Zellen, die dabei Tochterzellen mit unterschiedlichen proliferativen Eigenschaften hervorbrachten, lag unabhängig von den verwendeten Zytokinen zwischen 20% und 40% (Huang *et al.*, 1999). Auch hier wurde vermutet, dass dieser Effekt auf asymmetrische Zellteilungen zurückzuführen ist (Huang *et al.*, 1999). Die daran angeknüpfte individuelle Untersuchung des Differenzierungspotenzials der Tochterzellen von einzeln abgelegten CD34⁺CD38⁻ Zellen in myeloischen und lymphatischen Langzeit-Analyseverfahren (ML-IC-Ansatz) deutete an, dass mehr als 80% der initialen Zellen unterschiedlich spezifizierte Tochterzellen hervorbringen (Punzel *et al.*, 1999c, Giebel *et al.*, 2006).

All diese Experimente ließen eine mögliche asymmetrische Zellteilung im hämatopoetischen System vermuten, konnten diese jedoch nicht direkt durch die unterschiedliche Segregation von Markern beweisen. In Modelorganismen wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ist die asymmetrische Zellteilung am besten beschrieben, und es zeigt sich, dass Zellpolarität-organisierende Proteine wie z.B. PAR-Proteine sowie die atypische Phosphokinase C (aPKC) an diesem Prozess mitwirken (Betschinger *et al.*, 2003, Wodarz, 2005, Wirtz-Peitz *et al.*, 2008). Die Ausbildung der Zellpolarität durch den Par-Komplex (Bazooka/Par-3, Dmel/Par-6 und aPKC; *D.melanogaster/homo sapiens*) ist für die polare Verteilung von Zellschicksalsdeterminanten wie z.B. des

Transkriptionsfaktors Prospero innerhalb sich teilender neuraler Vorläuferzellen (Neuroblasten) erforderlich und steuert die spätere asymmetrische Segregation der Zellschicksalsdeterminanten auf die zwei Tochterzellen (Wodarz und Huttner, 2003, Wu *et al.*, 2008). Auch in *C. elegans* wirkt der Zellpolarität-organisierende Par-Komplex bei der asymmetrischen Zellteilung mit (Hyenne *et al.*, 2008).

Vor dem Hintergrund, dass die Zellpolarität von Zellen eine wichtige Rolle bei der asymmetrischen Zellteilung in Modellorganismen spielt, ist angenommen worden, dass wenn eine asymmetrische Zellteilung im hämatopoetischen System vorkommt, die HSVZ vor und während der Mitose polarisiert sein müssen (Giebel *et al.*, 2004, Giebel *et al.*, 2006, Beckmann *et al.*, 2007). In Kultur zeigt sich, dass HSVZ eine morphologisch polarisierte Form annehmen, mit einer Leitfront (*leading edge*) am vorderen Ende und einem Uropod am hinteren Ende (Giebel *et al.*, 2004). Neben der morphologischen Veränderung der Zellen verteilen sich auch einige Oberflächenproteine in entsprechend polarisierten CD34⁺ Zellen anders. Die Oberflächenproteine CD43, CD44, CD50, CD54 und der Stammzellmarker CD133 reichern sich spezifisch in der Spitze des Uropoden an. Andere Proteine wie CXCR4 und das Gangliosid GM3 sind in der *leading edge* lokalisiert, wohingegen CD34 und CD45 weiterhin über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind (Giebel *et al.*, 2004). In immunfluoreszenz-Färbungen gegen polar organisierte Proteine (CD43, CD44, CD50, CD54 und CD133) zeigt sich, dass sich diese in mitotischen CD34⁺ Zellen vorwiegend in der Teilungsfurche zwischen den entstehenden Tochterzellen befinden. Daraus wurde zunächst gefolgert, dass sich unter den gegebenen Bedingungen die Zellen entweder nicht asymmetrisch teilen, oder dass andere Proteine existieren, die asymmetrisch verteilt werden können (Beckmann *et al.*, 2007).

CD34⁺CD133⁺ Zellen bringen nach der ersten Zellteilungen eine CD34⁺CD133⁺ und eine CD34⁺CD133^{low} Zellpopulation hervor. Der Anteil von CD34⁺CD133^{low} Zellen steigt hierbei mit der Kulturdauer an (Beckmann *et al.*, 2007). Die beobachtete Populationskinetik passt zu einem Modell, nach dem sich 20-30% der CD34⁺CD133⁺ Zellen asymmetrisch teilen und das besagt, dass die Oberflächenexpression von CD133 nur durch asymmetrische Zellteilungen verloren gehen kann und Zellen, die diese Expression einmal verloren haben, stets CD133 negativ bleiben (Giebel *et al.*, 2006, Beckmann *et al.*, 2007, Görgens und Giebel, 2010) (Abbildung 4). In subzellulären Analysen zeigt sich, dass CD133 nicht

asymmetrisch auf der Zelloberfläche von sich teilenden HSVZ segregiert. Der damals gestellten Hypothese zur Folge wurde jedes andere Oberflächenprotein, das differentiell auf CD34⁺CD133⁺ und CD34⁺CD133^{low} Zellen exprimiert wird, als potentieller Marker für ein asymmetrisch segregierendes Protein gesehen (Beckmann et al., 2007). Aufgrund einer durchflusszytometrisch ausgelegten Suche nach differentiell exprimierten Oberflächenproteine an kultivierten CD34⁺ Zellen sind auf CD34⁺CD133⁺ Zellen vier Proteine identifiziert worden, die entsprechend differentiell exprimiert werden. Hierbei handelt es sich um die Tetraspanine CD53 und CD63, dem Transferrinrezeptor (CD71) und dem L-Selektin (CD62L) (Beckmann et al., 2007).

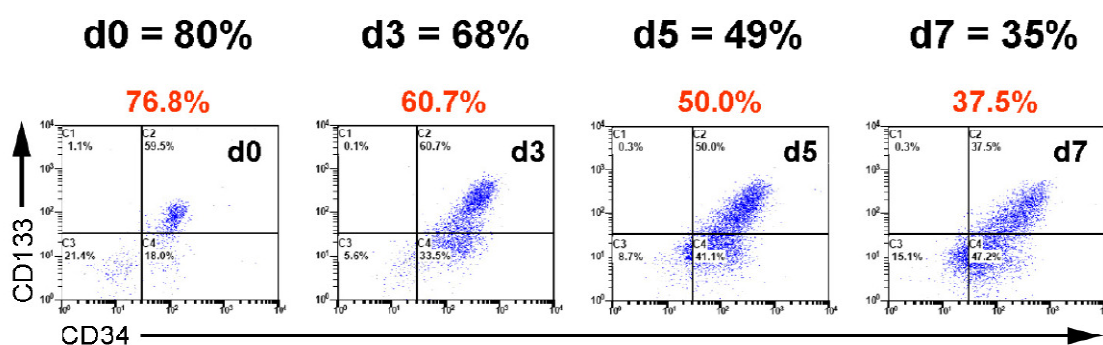


Abbildung 4: Kinetik der Zelloberflächenexpression von CD34 und CD133 über eine siebentägige Kultivierungsdauer hinweg

CD34⁺ Zellen wurden durchflusszytometrisch über die Kultivierungsdauer von 7 Tage analysiert. Der nach der asymmetrischen Zellteilungshypothese postulierte Anteil an CD133⁺ Zellen (schwarze Zahlen) sowie der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil (rote Zahlen) ist dargestellt. Frisch isolierte CD34⁺ Zellen exprimieren zu 80% CD133 auf ihrer Oberfläche. Der hypothetische Anteil der CD34⁺CD133⁺ Zellen an einem bestimmten Kulturtag (n) wurde mit der folgenden Formel berechnet: Anteil der CD34⁺CD133⁺ Zellen = $0,8 \times (0,7 + 0,15)^{n-2}$. Grafik adaptiert von (Görgens und Giebel, 2010).

Die vier so identifizierten Proteine (CD53, CD63, CD71 und CD62L) zeigen in immunfluoreszenten Untersuchungen von sich teilenden CD34⁺CD133⁺ Zellen, dass ca. 20-30% der analysierten Zellen eine asymmetrische Verteilung der Proteine aufweisen. Durch diese Analysen ist erstmals bestätigt worden, dass primitive hämatopoetische Zellen tatsächlich in der Lage sind, sich asymmetrisch zu teilen (Beckmann et al., 2007). Die Frequenz der sich asymmetrisch teilenden Zellen stimmte weitestgehend mit dem Erscheinen der CD34⁺CD133^{low} Population überein, was zu der Annahme führte, dass CD34⁺CD133^{low} Zellen der initialen Hypothese entsprechend aus asymmetrischen Zellteilungen von CD34⁺CD133⁺ Zellen hervorgehen (Giebel, 2008b). Die vier asymmetrisch segregierenden Proteine können im Weiteren in Verbindung mit CD133 genutzt werden, um primitivere von

reiferen kultivierten HSVZ zu unterscheiden. Die Zelloberflächenpräsentation von CD53 und CD62L in Kombination mit CD34 und CD133 weist auf primitivere HSVZ hin, während CD63 und CD71 scheinbar reifere HSVZ markieren (Beckmann et al., 2007).

Interessanterweise sind drei dieser Proteine (CD53, CD63 und CD71) mit endosomalen Transportprozessen assoziiert. Experimentell zeigte sich in intrazellulären Färbungen, dass in entsprechend gefärbten Zellen auch die Endosomen asymmetrisch segregieren. Dies führte zu der Annahme, dass asymmetrische segregierende Endosomen wesentlich an der Zellschicksalsentscheidung von HSVZs beteiligt sind (Giebel und Beckmann, 2007).

In intrazellulären Färbungen mit CD133 und CD63 zeigt sich, dass auch CD133 subzellulär asymmetrisch verteilt werden kann und mit CD63 in vesikulären Strukturen kolokalisiert (Fonseca et al., 2008).

Weitere Hinweise auf eine bedeutende Rolle von Endosomen sind kurz darauf in Modellorganismen wie *Caenorabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* beschrieben worden. In verschiedenen Entwicklungsprozessen wurden ebenfalls asymmetrisch segregierende Endosomen gefunden, und es konnte gezeigt werden, dass diese Zellschicksals-entscheidende Funktionen vermitteln (Andrews und Ahringer, 2007, Coumailleau und Gonzalez-Gaitan, 2008). Da Endosomen auch aktivierte Transmembranrezeptor-Liganden-Komplexe (wie z.B. Notch und Delta) transportieren, ist es wahrscheinlich, dass bei der asymmetrischen Verteilung von Endosomen entsprechende Signale auch nur in einer Tochterzelle transduziert werden (Coumailleau und Gonzalez-Gaitan, 2008). Beispielsweise während der Entwicklung des sensorischen Organs von *Drosophila melanogaster* werden Endosomen, die Delta und Notch transportieren, asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt. Diese Endosomen sind positiv für das Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Bindeprotein SARA (*Smad anchor for receptor activation*), welches im Smad/TGF- β Signalweg involviert ist (Coumailleau et al., 2009). Ein weiteres Beispiel für eine Signalvermittlung durch SARA-Endosomen während der Zellteilung, findet sich bei der Entwicklung der epithelialen Flügelzellen von *Drosophila melanogaster*. Dabei wird durch ungleiche Segregation von *decapentaplegic*- (Dpp=TGF- β -Typ) enthaltenen SARA-Endosomen, während der Mitose, das durch diesen Faktor vermittelte Signal in den Mutterzellen aufrechterhalten (Bökel et al., 2006).

Die Störung der asymmetrischen Segregation dieser Endosomen resultiert in Veränderungen bei der Zellspezifikation nach Zellteilung (Coumailleau und Gonzalez-Gaitan, 2008, Coumailleau *et al.*, 2009). Aus diesem Grund ist es nachvollziehbar, dass die asymmetrische Segregation von Endosomen einen Einfluss auf das Zellschicksal von Stammzellen haben kann. Die genauen Mechanismen, die zur asymmetrischen Segregation der Endosomen führen, sind auch in Modellorganismen bislang nur unvollständig verstanden und in Säugern nahezu unbekannt.

Für das Verständnis von Mechanismen, die die Zellspezifikation regulieren, ist folglich die genaue Analyse der Rolle endosomaler Prozesse in Stammzellen notwendig. Dies trifft umso mehr zu, als dass bereits gezeigt worden ist, dass SARA-Endosomen in der interzellulären Kommunikation von HSVZ und Osteoblasten eine Rolle spielen (Gillette *et al.*, 2009).

Der Befund, dass endosomale Proteine asymmetrisch in HSVZ segregieren führte zu der dieser Arbeit zugrundeliegenden Fragestellung, inwieweit endosomale Prozesse an Zellschicksalsentscheidungen von HSZ steuern. Bevor die gewählte Vorgehensweise beschrieben wird, werden im Folgenden zunächst die Grundlagen des endosomalen Transportsystems dargestellt.

1.3. Das endosomale System

Das endosomale System (durch Vesikel vernetzte Membrankompartimente innerhalb der Zelle) reguliert den Transport von Lipiden und Membranproteinen vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi Apparat bis hin zur Plasmamembran und zurück. Es besteht aus den sogenannten frühen, späten, Sortier- und Recycling-Endosomen sowie Lysosomen, die durch Fusion und Abschnürung von endosomalen Transportvesikeln miteinander im Austausch stehen. Ein wichtiger Prozess, der das endosomale Membransystem mit der extrazellulären Umgebung verbindet ist die Endozytose (Doherty und McMahon, 2009). Sie ist für die Aufnahme von Flüssigkeit, Makromolekülen und anderen Partikeln aus der extrazellulären Umgebung notwendig, dient aber auch dem Recycling von Membranrezeptoren, Transmembranproteinen und Lipiden (Huotari und Helenius, 2011). Die Endozytose führt zur Einstülpung (Invagination) der Plasmamembran ins Zellinnere. Der Abschnürungsprozess der invaginierten Vesikel von der Membran ist Energie-abhängig und wird durch die GTPase Dynamin katalysiert. Dieses helikale Protein

legt sich wie eine Kette um den Hals, der sich einstülpenden Vesikel und trennt sie durch Einschnürung von der Membran ab (Chen *et al.*, 1991, Vallee *et al.*, 1993, Liu und Robinson, 1995, Morlot *et al.*, 2012, Morlot und Roux, 2013). Die abgeknoteten Vesikel transportieren ihren *Cargo* anschließend durch verschiedene Vesikelkompartimente zum jeweiligen Zielort, der häufig im Lysosom liegt (Doherty und McMahon, 2009, Huotari und Helenius, 2011). Der Transport wird hierbei vorwiegend durch verschiedene Mitglieder einer Proteinfamilie reguliert, die Familie der Rab-GTPasen (Schnatwinkel *et al.*, 2004, Lachmann *et al.*, 2011).

Rab-GTPasen sind kleine GTPasen, die zur Familie der Ras-ähnlichen GTPasen gehören. Sie interagieren mit den Membranen von Endosomen wo sie mit Effektorproteinen wechselwirken. Diese Effektorproteine können *Tethering*-Komplexe wie das frühe endosomale Antigen 1 (EEA1; *early endosomal antigen 1*) oder *Snare*-Proteine sein; beide Proteingruppen sind für die Annäherung und Fusion von Vesikeln und Endosomen erforderlich (Sogaard *et al.*, 1994, Mills *et al.*, 1998, Simonsen *et al.*, 1998, Grote und Novick, 1999, Ungermann *et al.*, 2000), indem sie Membranplattformen auf der Oberfläche der Vesikelmembran ausbilden (Horiuchi *et al.*, 1997, Christoforidis *et al.*, 1999, Schnatwinkel *et al.*, 2004, Carney *et al.*, 2006). Die durch Vesikelfusion gebildeten frühen Endosomen reifen nach weiteren Vesikelfusionen von Plasmamembranvesikeln und Vesikeln, die vom Golgi-Apparat kommen, zu Sortier- und späten Endosomen heran (Abbildung 5) (Stoorvogel *et al.*, 1991, van Deurs *et al.*, 1993).

Da einige Rab-GTPasen spezifisch in bestimmten endosomalen Kompartimenten zu finden sind, werden sie häufig als Markerproteine zur Unterscheidung der verschiedenen Kompartimente verwendet. Die Reifung von frühen zu späten Endosomen ist durch eine Änderung der Interaktion spezifischer Rab-GTPasen an der Endosomenmembran gekennzeichnet, die als *conversion* bezeichnet wird (Deretic, 2005, Rink *et al.*, 2005, Abenza *et al.*, 2012). Dabei wird beim Übergang von frühen Endosomen zu späten Endosomen Rab5 (frühe Endosomen) gegen Rab7 (späte Endosomen) auf der Endosomenmembran ausgetauscht (Deretic, 2005, Rink *et al.*, 2005). Dieser Wechsel von Rab5 zu Rab7 ist für die weitere Reifung und Interaktion der Endosomen mit anderen Kompartimenten (Lysosomen und Plasmamembran) erforderlich (Deretic, 2005, Rink *et al.*, 2005, Rojas *et al.*, 2008). Neben der Reifung der Endosomen sind die Rab-GTPasen auch am Recycling von Rezeptoren zur Plasmamembran beteiligt. Beim Recycling werden zwei Wege

unterschieden, ein schneller, direkt von den frühen Endosomen abgehender Rab4-abhängiger Weg und ein langsamer, über perinukleäre Recycling-Endosomen laufender Weg, der durch Rab11 reguliert wird (Sheff et al., 1999). Der Rab11-abhängige Recyclingweg verläuft über ein endosomales Kompartiment, welches als Recycling-Endosomen bezeichnet wird (Abbildung 5). Dieses bringt Rezeptoren nach Dissoziation der Liganden im Sortier-Endosom wieder zurück an die Zelloberfläche. Ein Beispiel für einen über diesen Transportweg regulierten Rezeptor ist der Transferrinrezeptor (Ullrich et al., 1996).

Neben den Rab-GTPasen sind auch andere Membranproteine in verschiedenen subzellulären Vesikelkompartimenten angereichert. Die Lysosomen-assoziierten Membranproteine (LAMP), zu denen LAMP-1 (CD107a), LAMP-2 (CD107b) und LAMP-3 (CD63) gehören, sind Marker für späte Endosomen bzw. Lysosomen (Chen et al., 1985, Kannan et al., 1996, Kobayashi et al., 2000). Andere Proteine, die spezifisch oder hauptsächlich auf einigen Kompartimenten zu finden sind, sind Proteine von Tethering-Komplexen wie das bereits erwähnte EEA1, Hüllproteine wie Clathrin und Caveolin oder auch Rezeptoren wie der Transferrinrezeptor, der Mannoserezeptor, LDL-Rezeptor und der EGF-Rezeptor (Schmid et al., 1988, Tjelle et al., 1996, Mills et al., 1998, Raiborg et al., 2001a, van Meel und Klumperman, 2008). Durch den Nachweis dieser und weiterer Markerproteine lassen sich die unterschiedlichen Endosomenkompartimente identifizieren.

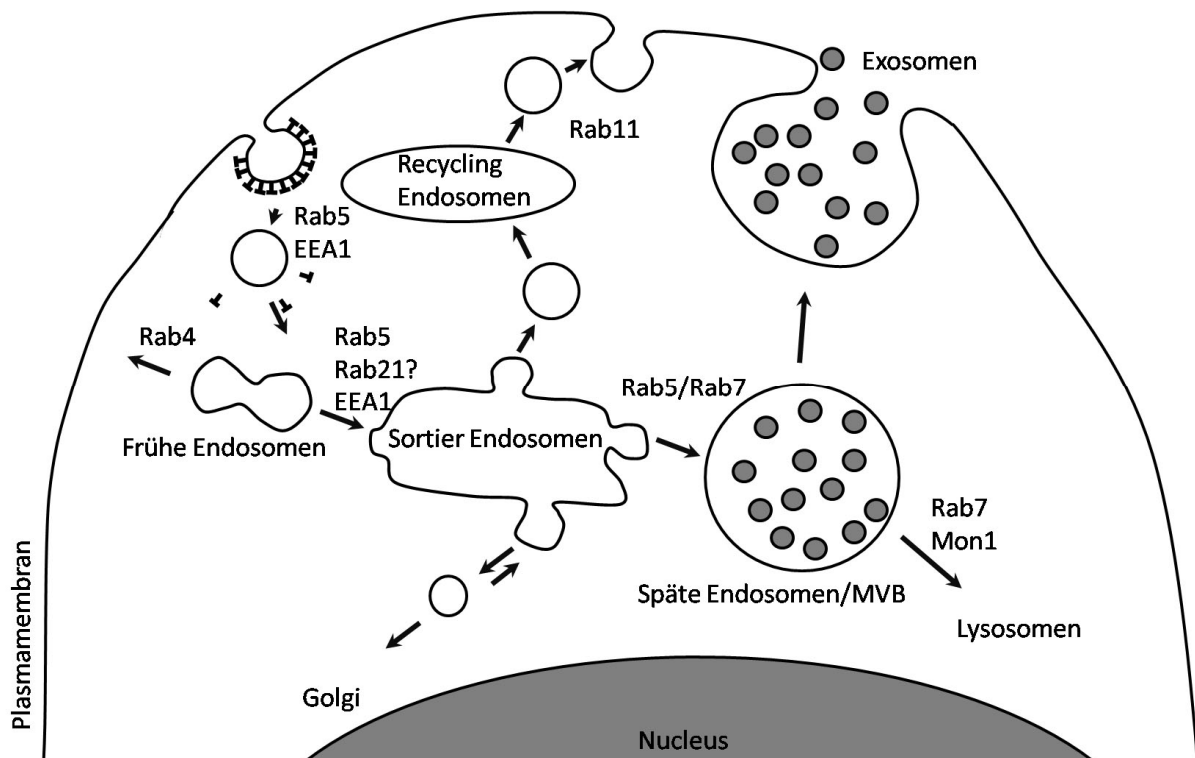


Abbildung 5: Schematisches Modell des endosomalen Systems der Zelle

Darstellung der Reifung der endozytotischen Vesikel von der Plasmamembran über frühe Endosomen und sortier Endosomen zu den späte Endosomen und multivesikulären Körpern (MVB; *Multivesicular bodies*). In MVBs kommt es zur Bildung von intraluminalen Vesikeln. Diese werden zur Degradation der transportierten Proteine und Lipide zu den Lysosomen transportiert oder als Exosomen durch die Verschmelzung des MVB mit der Plasmamembran aus den Zellen ausgeschleust.

Zusammengefasst steuern Rab-GTPasen intrazelluläre Vesikeltransportwege und bestimmen die Ausprägung verschiedener endosomaler Vesikelkompartimente. Im Folgenden wird die Funktionsweise der Rab-GTPasen beschrieben.

1.3.1. Rab-GTPasen

Wie bereits erwähnt, zählt die Familie der Rab-GTPasen zur Superfamilie der Ras-ähnlichen GTPasen und ist in großen Teilen in Eukaryoten konserviert. Im Menschen sind über 60 verschiedene Rab-GTPasen bekannt (Stenmark und Olkkonen, 2001). Diese kleinen GTPasen funktionieren als molekulare Schalter, die über die Bindung von GTP in GDP und P_i (anorganisches Orthophosphat) aktiviert und dessen Hydrolyse inaktiviert werden (Hiraoka *et al.*, 1992; Takai *et al.*, 1992; Novick und Brennwald, 1993).

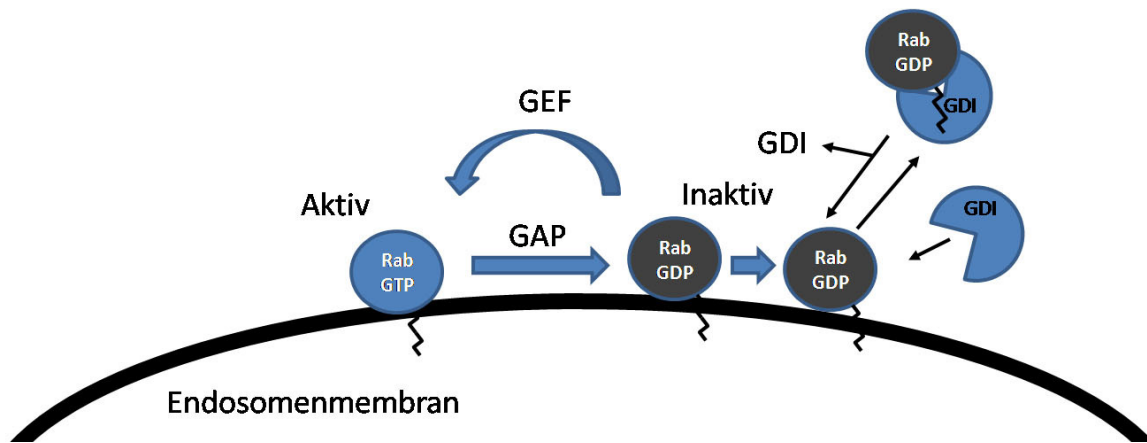


Abbildung 6: Darstellung des Rab-Zyklus an endosomalen Membranen

Rab-GTPasen werden über die Bindung und Hydrolyse von GTP reguliert. Die Bindung und Hydrolyse von GTP wird über Guanidin-Austausch-Faktoren (GEF; Guanosine-exchange-factor) und GTPase aktivierende Proteine (GAP) katalysiert. Die Interaktion der Rab-GTPasen mit der Membran erfolgt über eine Prenylierung am C-Terminus der Enzyme. Die Dissoziation von der Membran wird durch Proteine, die als GTPase Dissoziations Inhibitor (GDI) bezeichnet werden herbeigeführt. Die Interaktion der Rab-GTPase mit dem GDI ist nur in GDP-gebundener Form möglich.

In der Nähe bzw. an ihrem Carboxyl-Ende besitzen Rab-GTPasen zwei Cysteinreste (Khosravi-Far *et al.*, 1991, Farnsworth *et al.*, 1994, Shen und Seabra, 1996). An diesen Cysteinen können Rab-GTPasen postranslational durch Prenylierung (das Anhängen einer Geranylsäuregruppe) modifiziert werden (Khosravi-Far *et al.*, 1991, Farnsworth *et al.*, 1994). Durch diese postranslationale Modifikation können Rab-GTPasen mit intrazellulären Membranen interagieren. Damit die Prenylierung der Rab-GTPasen stattfinden kann, müssen Rab-GTPasen in GDP-gebundener Form vorliegen (Sanford *et al.*, 1993) und mit einem Protein interagieren, dem sogenannten „Rab-Escort-Protein“ (REP).

Interaktionen von Rab-GTPasen mit Membranen sind abhängig von ihrem Aktivierungszustand und dem jeweiligen Effektorproteinen. Sie werden durch Bindung von GTP aktiviert und durch die Hydrolyse des GTPs zu GDP inaktiviert. Dieser Prozess wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) katalysiert. GTPasen, die GDP gebunden haben, können mit sogenannten GTPase-Dissoziations Inhibitoren (GDIs) interagieren, welcher die Prenylierungen vor der wässrigen Umgebung im Zytosol schützt und dadurch auch die Dissoziation der Rab-GTPase von der Membran unterstützt (Abbildung 6) (Stenmark und Olkkonen, 2001). Die Aktivierung der GTPase wird durch ein Protein namens Guanosin Austauschfaktor (GEF; *Guanosin exchange factor*) herbeigeführt. GEF-Proteine führen zur Dissoziation von GDI und GTPase, was das Entlassen von GDP und die Bindung von GTP am Enzym vereinfacht. Durch die folgende Interaktion mit dem

REP werden die GTPasen zur Endosomenmembran transportiert, um mit dieser zu interagieren (Stenmark und Olkkonen, 2001). An Endosomenmembranen regulieren Rab-GTPasen die Bildung von Membranplattformen mit *Tethering*-Komplexen, die für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran, dem Golgi Apparat, dem ER und anderen Endosomen relevant sind (McCray et al., 2010).

1.3.2. Funktionelle Mutationen von Rab-GTPasen

Das GTP/GDP-Bindemotiv von Rab-GTPasen ist hochkonserviert und besteht aus vier Dömänen (Li und Stahl, 1993). Durch Punktmutationen in diesem Bindemotiv kommt es zu einem Aminosäureaustausch in der GTP/GDP-Bindestelle, wodurch Varianten der Rab-GTPasen entstehen, die funktionell verändert sind. Solche funktionsverändernden Mutationen können bei fast allen Rab-GTPasen herbeigeführt werden. Der Austausch von meistens einem Glutaminrest zu einem Leucin in der zweiten Domäne der GTP/GDP-Bindestelle führt zu konstitutiv-aktiven Rab-GTPase Varianten, welche geringere GTP-Hydrolyseaktivität aufweisen (Li und Stahl, 1993, Stenmark *et al.*, 1994, Ullrich *et al.*, 1994). Konstitutiv-aktive (CA) Rab-GTPase Varianten von z.B. Rab5 und Rab7 sind im Zusammenhang mit der Beeinflussung endosomaler Fusionsprozesse in verschiedenen Zelllinien (HeLa, BHK, HEK293 und K562) untersucht worden (Stenmark *et al.*, 1994, Barbieri *et al.*, 1996, Ullrich *et al.*, 1996, Bucci *et al.*, 2000, Simpson *et al.*, 2004). Die Expression von Rab5CA führt zur vermehrten Fusion früher Endosomen, was in einer Vergrößerung der Endosomen resultiert (Stenmark *et al.*, 1994, Barbieri *et al.*, 1996). Eine ähnliche Endosomenfusion und Vergrößerung wird durch die Expression von Rab7CA hervorgerufen, wobei sich hier der Effekt auf die späten Endosomen auswirkt (Bucci *et al.*, 2000). Außerdem weisen die CA-Varianten von Rab5 und Rab7 einen geringeren zytosolischen Anteil auf als die wildtypischen Proteine. Weitere funktionelle Mutationen in der zweiten GTP/GDP-Bindedomäne werden meist durch den Austausch eines Serin- oder Threoninrestes zu einem Asparagin herbeigeführt, was in einer dominant-negativen Enzymvariante resultiert, welche eine erhöhte Affinität zu GDP aufweist (Gorvel *et al.*, 1991, Sanford *et al.*, 1993, Stenmark *et al.*, 1994, Feng *et al.*, 1995). Für die dominant-negativen Varianten von Rab-GTPasen sind noch weitere Mutationen in der zweiten und dritten GTP/GDP-Bindedomäne beschrieben, bei denen andere Aminosäuren ausgetauscht werden (Li und Stahl, 1993). Ihre dominant-negative Aktivität ist ebenso auf eine veränderte Affinität zu GDP und GTP zurückzuführen (Gorvel *et al.*, 1991, Sanford *et al.*, 1993, Feng *et al.*,

1995). Die dominant-negativen Varianten lassen sich ebenfalls für verschiedene Rab-GTPasen (z.B. Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21) herstellen und führen wie konstitutiv-aktive Varianten zu Veränderungen des endosomalen Transportes von Proteinen (Gorvel *et al.*, 1991, Stenmark *et al.*, 1994, Feng *et al.*, 1995, Andre *et al.*, 1997, Bucci *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2001, Simpson *et al.*, 2004). Anders als die wildtypischen und CA-Rab-GTPasen besitzen die DN-Varianten eine geringe Membranassoziation und finden sich vorwiegend im Zytosol der Zellen (Gorvel *et al.*, 1991, Stenmark *et al.*, 1994, Feng *et al.*, 1995, Andre *et al.*, 1997, Bucci *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2001, Simpson *et al.*, 2004). Rab5DN führt beispielsweise in HELA bzw. BHK Zellen zu einer geringeren Aufnahme von Transferrin und *Horseradish peroxidase* (HRP) (Li und Stahl, 1993, Stenmark *et al.*, 1994). Des Weiteren blockiert die Expression von Rab5DN die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion über APPL1 in Zellen (Barbieri *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2013). Die dominant-negative Variante von Rab7 (T22N) führt zur Vergrößerung von Autophagosomen und beeinflusst die Infizierbarkeit von Zellen durch Viren (Gutierrez *et al.*, 2004, Cuesta-Geijo *et al.*, 2012). Rab11DN inhibiert das Recycling des Transferrinrezeptors nach endozytotischer Aufnahme in die Zellen (Ullrich *et al.*, 1996, Ren *et al.*, 1998).

Von Rab7 finden sich neben gezielt herbeigeführten Mutationen auch natürlich vorkommende dominant-negative Mutationen (L129F, K157N, N161T, und V162M), die mit einer Neuropathie, der Charcot-Marie-Tooth Typ 2B Erkrankung assoziiert sind (Cogli *et al.*, 2007, BasuRay *et al.*, 2012, Cogli *et al.*, 2013). Es zeigt sich, dass die Expression der mutierten Rab7-Varianten zu einer verzögerten Signalweiterleitung von Wachstumsfaktorsignalen führt und eine Veränderung der endosomalen und nukleären Signaltransduktion nach sich zieht (BasuRay *et al.*, 2012). Da sich konstitutiv-aktive (CA) und dominant-negative (DN) Enzymmutanten von jeder bekannten Rab-GTPase erstellen lassen, ist es möglich, zielgerichtet bestimmte endosomalen Transportwege zu verändern.

1.4. Manipulation des endosomalen Systems von Zellen

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erläutert, ist das endosomale System ein komplexes Netzwerk aus Vesikeln und Membrankompartimenten, welches neben dem Protein- und Lipidtransport noch an anderen Mechanismen wie Zelladhäsion, Migration, Zellpolarität, Signaltransduktion und asymmetrischer Zellteilung beteiligt ist. Daher ist anzunehmen, wenn das endosomale System durch extrinsische oder

intrinsische Faktoren manipuliert wird, dass sich entsprechende Manipulationen auf die verschiedenen zellulären Prozesse auswirken.

Als Möglichkeit der Manipulation endosomaler Prozesse bietet sich zum einen das genetische Einbringen mutanter Rab-GTPasen in Zellen an, die bestimmte endosomale Transportprozesse regulieren. Ein anderer Ansatzpunkt für die Manipulation ist die Inhibition endozytischer Prozesse durch spezifische Pharmazeutika (Inhibitoren). Chlorpromazin (Chpz), Dynasore (Dyna) und Monodansylcadaverin (MDC) sind gebräuchliche Inhibitoren der Clathrin-vermittelten Endozytosewege (Wang und Liu, 2003, Macia *et al.*, 2006, Ivanov, 2008). Chpz ist ein amphiphatischer Stoff, der sich in die Plasmamembran von Zellen einlagert und deren Fluidität beeinflusst. Dynasore inhibiert spezifisch die GTPase Dynamamin, wodurch die Dynamamin-abhängige und damit zusammenhängende Clathrin-vermittelte Endozytose inhibiert wird. MDC, wirkt stabilisierend auf Clathrin-umhüllten Einstülpungen (*pits*) und verhindert deren Abknospung von der Plasmamembran. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) ist ein Inhibitor von Lipid-raft, Caveolea- und Cholesterol-abhängiger Endozytosewege (Smart und Anderson, 2002, Ivanov, 2008); es depletiert Cholesterol aus der Membran. Das Mycotoxin Cytochalasin B beeinflusst die Endozytose, Phagozytose und Exozytose verschiedener Zellen indem es zur Depolymerisation des Aktin Zytoskeletts führt, welches an Endozytoseprozessen beteiligt ist (Ridler und Smith, 1968, Maeda und Kawamoto, 1986, Athlin *et al.*, 1988, Dai und Li, 1995).

1.5. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit unterteilte sich in zwei Teilbereiche. Zum einen sollte die Bedeutung des endosomalen Systems für zellbiologische Prozesse wie Zellpolarität und Migration analysiert werden, zum anderen sollte die Bedeutung endosomaler Transportprozesse bei der Zellschicksalsspezifikation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) ermittelt werden. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob endosomale Prozesse an der Zellschicksalsspezifikation humaner HSVZ beteiligt sind.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung sollte, da die Organisation des endosomalen Systems im frühen hämatopoetischen Kompartiment bislang nur unzureichend beschrieben ist, dieses in HSVZ mittels Immunfluoreszenz-Färbungen charakterisiert werden. Zur Etablierung dieser Immunfluoreszenz-Färbungen sind aufgrund

limitierter Mengen primärer HSVZ zunächst mesenchymale Stamm- und Stromazellen (MSZ) verwendet worden.

Um die Beteiligung des endosomalen Systems auf funktioneller Ebene beurteilen zu können, sollte dieses im Weiteren mittels verschiedener Methoden manipuliert werden. Diese Manipulation sollte einerseits durch gezielte genetische Veränderung von Rab-GTPasen als Hauptregulatoren endosomaler Transportprozesse, andererseits durch Verwendung von Endozytose-Inhibitoren erreicht werden. Zur genetischen Manipulation sollten wildtypische Rab-GTPasen und konstitutive-aktive sowie dominant-negative Proteinvarianten nach lentiviralen Gentransfer ektop zunächst zur Validierung in MSZ, danach zur funktionellen Analyse in HSVZ exprimiert werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Rab-GTPasen sollte spezifisch die Bedeutung einzelner endosomaler Transportwege in HSVZ analysiert und im Folgenden durch Verwendung verschiedener endozytotischer Inhibitoren spezifisch abgerundet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät Modell	Hersteller
CO ₂ -Inkubatoren HERAcell 150i und 240i	(Thermo Scientific)
Durchflusszytometer ARIA I	(BD Biosciences)
Cytomics FC500	(Beckman Coulter)
Einfrierhilfe Typ 5100	(Nalgene)
Färbegerät für Objektträger Hematek 2000 Slide Stainer	(Bayer Healthcare)
Geldokumentationsgerät Fusion FX7	(Vilber Lourmat)
Heizblock HX-2	(PeQLab)
Magnet-Heizrührer MR 3002	(Heidolph)
Axio Vert.A1	(Zeiss)
Axio Observer Z1	(Zeiss)
Axio Observer D1	(Zeiss)
PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9700	(Applied Biosystems)
Schüttler VX7	(IKA - Janke & Kunkel)
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS12	(Thermo Scientific)
Spektralphotometer NanoDrop 1000	(PeQLab)
Waage MP-300	(Citizen)
Zentrifugen 5810R und 5424	(Eppendorf)
Universal 30 RF Rotixa/P	(Hettich)
Avanti J-26XP	(Beckman Coulter)
Verbrauchsmaterial	Hersteller
Adhäsionsobjektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Einfrierröhrchen (2 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 20 ml)	Braun (Melsungen)
Feinspitzen-Pasteurpipetten	Alpha Laboratories (Eastleigh, UK)
Filter (0,22 und 0,45 µm Porengröße)	Corning (New York, NY, USA)
Flachbodenplatten (6er, 24er, 96er)	Greiner (Frickenhausen)
Flachbodenplatten Lumex (24er)	Sarstedt (Göttingen)
Injektionsnadeln (Micro-Fine+, 29 G)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
MACS Separationssäulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg) und PeQLab (Erlangen)
Polypropylen-Röhrchen (14 ml, 50 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Polypropylen-Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Reagenzien-Reservoir	Corning (New York, NY, USA)
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner (Frickenhausen)

Zellsieb (40 µm Porengröße)	Partec (Münster)
Zentrifugationsröhrchen (40 ml)	Nalgene (Rochester, NY, USA)
Zytospinaufsätze	Thermo Fisher Scientific (Bonn)

2.1.1. Kits und Assays

2.1.1.1. Kits

Annexin V-Kit	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Flow-Count <i>Fluorospheres</i>	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>High Capacity</i> cDNA RT Kit	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
MBC CD34 <i>Micro Bead</i> Kit human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden)
RT-qPCR MasterMix	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Wizard <i>SV Gel and PCR Clean-Up</i> System	Promega (Madison, WI, USA)
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific (Bonn)

2.1.2. Medien/Medienzusätze

Verwendete Basalmedien

alpha-MEM	Promocell (Heidelberg)
DMEM (1 g/l Glucose)	PAA (Pasching, Österreich)
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAA (Pasching, Österreich)
Ham's F12	Biochrom (Berlin)
IMDM	Lonza (Basel, Schweiz)
RPMI1640	PAA (Pasching, Österreich)

Zusammensetzung der Zellkulturmedien (für Zelllinien)

Medium für HEK293T-Zellen

20% FBS 10% FBS
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
 100 U/ml L-Glutamin
 in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Medium für K562-Zellen

10% FBS
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
 100 U/ml L-Glutamin
 in RPMI1640

Zytokine

Erythropoietin (NeoRecormon; EPO)	Roche (Basel, Schweiz)
Flt3-Ligand (FTL3L)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<i>insulin-like growth factor</i> (IGF-1)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin 3 (IL-3)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin 6 (IL-6)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
<i>stem cell factor</i> (SCF)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Thrombopoietin (TPO)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Seren für die Zellkultur

Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom (Berlin)
FBS für Langzeitkultur	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
FBS für CFC-Ansatz	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
Humanes AB-Serum	Lonza (Basel, Schweiz)
Pferdeserum	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)

Sonstige Medienzusätze

2-Mercaptoethanol	Life Technologies (Karlsruhe)
Ethanolamin	Life Technologies (Karlsruhe)
Gentamycin	Lonza (Basel, Schweiz)
Insulin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Ascorbinsäure	Life Technologies (Karlsruhe)
L-Glutamin	Life Technologies (Karlsruhe)
Methylzellulose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Life Technologies (Karlsruhe)
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Transferrin	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Transferrin Alexa 488 und acDil LDL	Alexa 555 Life Technologies (Karlsruhe) Life Technologies (Karlsruhe)

2.1.2.1. Sonstige Chemikalien

Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Biocoll Separating Solution	Biochrom (Berlin)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chlorpromazin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Clostridium Toxin B</i>	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dynasore	Merck (Darmstadt)
DAPI	Life Technologies (Karlsruhe)
DMSO	Wak-Chemie (Steinbach)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)

Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Färbelösung May-Grünwald	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Färbelösung Giemsa	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Färbelösung (<i>modified Wright's Stain</i>)	Bayer Healthcare (Leverkusen)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Lysepuffer (Erythrozytenlyse)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Lysozym	AppliChem (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Methyl-beta-cyclodextrin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Monodansylcadaverin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nukleasefreies Wasser	Ambion (Austin, TX, USA)
PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Baack Labor (Schwerin)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Retronektin	Takara (Otsu, Japan)
RNAse A	AppliChem (Darmstadt)
Spautin-1	Merck (Darmstadt)
Temed	Life Technologies (Karlsruhe)
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories (München)
Trypanblau	Life Technologies (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.3. Antikörper und Seren

Tabelle 1: Verwendete konjugierte Antikörper zur Analyse humaner Zellen

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD9	PE	Mem-61	Exbio
CD14	PE/APC	M5E2	BD
CD15	PerCP-Cy5.5	80H5	BD
CD16	PE/APC/PE-Cy7	3G8	BD
CD34	ECD	581	Beckman Coulter
CD38	PerCP-Cy5.5	HIT2	BD
CD45	PE-Cy7	J33	Beckman Coulter
CD45RA	PE-Cy7	HI100	Biolegend
CD53	FITC	HI29	Biolegend
CD63	FITC/PE	H5C6/MEM-259	BD
CD71	FITC	YDJ1.2.2	Beckman Coulter
CD81	PE	JS-81	BD
CD107a	PE	H4A3	BD
CD133	PE	AC133	Miltenyi
CD151	PE	14A2.H1	BD
CD235a	PE/APC/Pacific Blue	GA-R2 (HIR2)	BD/Biozol/Biolegend

Tabelle 2: Verwendete unkonjugierte Primärantikörper

Reaktivität	Spezies	Klonalität	Klon	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
<i>β-Aktin</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	AC15	1:2500	Sigma
<i>Alix</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	3A9	1:100	Sigma
<i>CD9</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	Hybridoma Überstand	1:200	Sanchez-Madrid
<i>CD63</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	H5C6	1:250	BD
<i>CD81</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	JS-81	1:100	BD
<i>CD107a</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	H4A3	1:250	Exbio
<i>EEA-1</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	14/EEA1	1:250	BD
<i>Hsp70</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Polyklonal</i>			R&D
<i>Rab5</i>	<i>Maus</i>	<i>Monoklonal</i>	1/Rab5	1:50	BD
<i>Rab5</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Monoklonal</i>	C8B1	1:50	Cell Signaling Technology
<i>Rab7</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Monoklonal</i>	D95F2	1:200	Cell Signaling Technology
<i>Rab11</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Monoklonal</i>	D4F5	1:50	Cell Signaling Technology
<i>Rab21</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Polyklonal</i>		1:1000	Sigma
<i>Tsg101</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Polyklonal</i>		1:1000	Sigma

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper Fluorochrom	Typ	und	Spezies Reaktivität	und	Verdünnung	Hersteller
IgG Alexa-Fluor 488			Ziege anti Maus		1:1000	Life Technologies
IgG Cy3			Esel anti Maus		1:600	Dianova
Fab-Fragmente Cy3			Esel anti Maus		1:300	Dianova
IgG Dylight 649			Esel anti Maus		1:600	Dianova
IgG Cy3			Esel anti Kaninchen		1:700	Dianova
Fab-Fragmente Cy3			Esel anti Kaninchen		1:300	Dianova
IgG Dylight 488			Esel anti Kaninchen		1:500	Dianova
IgG Alexa Fluor 647			Esel anti Kaninchen		1:600	Dianova

Tabelle 4: Für immunzytologische Färbungen verwendete Seren

Spezies	Konzentration	Hersteller
Esel	5% (v/v)	Dianova
Kaninchen	5% (v/v)	Dianova
Maus	5% (v/v)	Dianova

2.1.4. Geräte Software

Die Auswertung von mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit dem Programm AxioVision (Rel. 4.8, Zeiss). Für die Analyse durchflusszytometrischer Messdaten wurden die Programme CXP 2.2 (Beckman Coulter) und Diva 6.1.2 (BD Biosciences) verwendet. Die für die statistischen Auswertung verwendete Programme zur sind unter Punkt 2.10 angegeben.

2.1.5. Oligonukleotide und Vektoren

Anhand der Gensequenzen der einzelnen Rab-GTPasen wurden geeignete Oligonukleotide mit den passenden Schnittstellen entworfen und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Die Oligonukleotide wurden zum Klonieren der eGFP-Rab-Fusionskonstrukte in ein lentivirales Vektorsystem verwendet. Des Weiteren wurden Primer für eine spezifische Mutagenese (Tabelle 5) zur Herstellung funktioneller Mutanten einzelner Rab-GTPasen verwendet. In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 5: Synthetisierte Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der eGFP-Rab-GTPase Konstrukte

Bezeichnung	Basensequenz	Verwendung	Nummer
hRab7CA Mut vor	GGACACAGCAGGACTGGAACGGTTCCAGT	Mutagenese	916
hRab7CA Mut rück	CATATCTGCATTGTGACTAGCCTGTCTATCC	Mutagenese	917
Rab5 bw cloning	GGATCCGCGGCCGCTTAGTTACTACAACAC	Klonierungs Primer	795
Rab11a bw cloning	GGATCCGCGGCCGCTTATATGTTCTGAC	Klonierungs Primer	796
Rab4B bw cloning	GGATCCGCGGCCGCTCAGCAGCCAC	Klonierungs Primer	797
Rab7WT cloning rev	CGACTGCAGCGCGGCCGCTCAGCAACTGCAGCTTTC	Klonierungs Primer	791
Rab7CA forward	GAGGTGATGGTGGATGACAG	Klonierungs Primer	789
pEGFP-Rab cloning forward	GCTAGCGCTACCGGTGCCACCATGGTGAGCAAGG	Klonierungs Primer	792
Rab7CA cloning reverse	TCAGCAACTGCAGCTTTCGCGGCCGCTCAGCAACTG	Klonierungs Primer	790
PR2 Sequencing	GGC CAA ACA GGA TAT CTG CG	Sequenzierprimer	137
eGFP 3'PCR	AGG GTC AGC TTG CCG TAG GT	Sequenzierprimer	688
eGFP 5'PCR	CTGAAGTTCATCTGCACCAC	Sequenzierprimer	687
pCL7 Seq C rev	GCAGCGTATCCACATAGCG	Sequenzierprimer	793

In Tabelle 6 sind die Vektoren für die Klonierung und ektopen Expression der Rab-GTPasen aufgeführt, die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

Tabelle 6: Verwendete Vektoren: Amp^r = Plasmidkodierte Ampicillinresistenz und Kan^r = Plasmidkodierte Kanamycinresistenz

Vektoren	Resistenz	Charakteristika	Referenz
pBlueskript SK (pBSK; Anhang: 1)	Amp ^r	Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pCL7-EGwo (Anhang: 2)	Amp ^r	Lentiviraler Expressionsvektor	Leurs <i>et al.</i> , 2003
pCL6-IEGwo (Anhang: 3)	Amp ^r	Lentiviraler Expressionsvektor	Leurs <i>et al.</i> , 2003

2.1.6. Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden für molekularbiologische Arbeiten die in Tabelle 7 aufgelisteten Bakterienstämme verwendet. Dabei handelt es sich zum einen um den *Escherichia-coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) und One Shot Top10 (Invitrogen). Diese dienen der Vermehrung von Plasmidvektoren und dem darin inserierten Konstrukt.

Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genetische Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TopTen	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara\text{-}leu)7697$ <i>galJ</i> <i>galK</i> <i>rpsL(StrR)</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Life Technologies, Karlsruhe
<i>E. coli</i> XL1- Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lac</i> ^q IZ Δ M15Tn10(Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg

2.1.7. Zelllinien

Die Zelllinien wurden sofern nicht anders beschrieben bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die für die Kultivierung der Zellen verwendeten Medien sind unter Abschnitt 2.1.2 zu finden.

HEK293T

Die HEK293T-Zellen stammen von der humanen embryonalen Nierenzelllinie (*human embryonic kidney*) HEK293 ab, die durch Transfektion mit DNA des Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurde (Graham et al. 1977). HEK293T-Zellen exprimieren im Gegensatz zu dieser Ursprungszelllinie das *large-tumor Antigen des Simian Virus 40* (SV40). Dadurch ist die Replikation von episomalen Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung möglich (DuBridge et al., 1987). In dieser Arbeit wurden die HEK293T-Zellen zur Herstellung virushaltiger Überstände verwendet.

K562

Die Zelllinie K562 ist eine erythroleukämische Zelllinie, die durch Immortalisierung von Blutzellen einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) generiert wurde. Die Zelllinie ist nicht adhärenz und positiv für das Philadelphia Chromosom, so wie für das *bcr:abl* Fusionsgen (Lozzio und Lozzio, 1975, Klein et al., 1976). In

Kultur lassen sich die Zellen in Richtung der Erythrozyten, Granulozyten und Megakaryozyten differenzieren (Klein *et al.*, 1976, Lozzio und Lozzio, 1979). Die K562 wurden in dieser Arbeit zur Analyse von RNAi-vermitteltem *Knockdown* und zur Titration von virushaltigem Überstand verwendet.

2.1.8. Primärzellen

Alle Versuche, bei denen humanes Zellmaterial verwendet wurde, wurden mit Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Die Nabelschnurblute wurden in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Kimmig nach Zustimmung der Mütter abgenommen. Die Verarbeitung der Nabelschnurblute erfolgte spätestens 48 Std. nach Abnahme. In dieser Arbeit verwendete Knochenmarkproben (Rückstellproben) gesunder Spender wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dietrich W. Beelen (Direktor der Klinik für Knochenmarktransplantation, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung und Anzucht von *Escherichia coli*-Kulturen

Escherichia coli-Kulturen (*E. coli*) wurden über Nacht (ÜN) unter aeroben Bedingungen bei 37°C in 5 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) angezogen. Das Medium wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurden Selektionsmedien durch Zugabe entsprechend sterilfiltrierter Antibiotika (Endkonzentrationen siehe Tabelle 8) hergestellt. Für das Gießen von Agarplatten zur Anzucht der Transformanten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar (Gibco BRL, Eggenheim) hinzugefügt.

Tabelle 8: Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O	200 µg/ml
Kanamycin (Kan)	20 mg/ml in H ₂ O	200 µg/ml

Bakterienklone mit rekombinanter DNA wurden in Flüssigkulturen mit 40% (v/v) Glycerin bei -80 °C eingelagert.

Tabelle 9: Zusammensetzung einer Glycerinkultur

Glycerinkultur: 500 µl Glycerin (80% v/v)
500 µl Flüssigkultur
bei – 80°C einfrieren.

2.2.1.2. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

E. coli ist unter normalen Bedingungen befähigt, Fremd-DNA aufzunehmen. Dies ist jedoch nur in begrenztem Umfang möglich. Zur Steigerung der Kompetenz einer Zelle können verschiedene chemische Substanzen eingesetzt werden. Diese perforieren die Zellwand und machen sie dadurch permeabler für die Aufnahme von Fremd-DNA. Im Fall von *E. coli* sind solche Agenzien z.B. RbCl oder CaCl₂ (Dagert und Ehrlich, 1979). Zur Herstellung kompetenter Zellen für eine anschließende Transformation wurden die in Tabelle 7 genannten *E. coli*-Stämme mit einer Rubidiumchlorid-haltigen Lösung behandelt. Der Produktion ging eine Anzucht der *E. coli*-Stämme in selektivem LB-Medium (Tabelle 10) voraus. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 aerob inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und daraufhin für 10 min bei 5.000 x g und 4°C sedimentiert. Nach Resuspendieren des Zellsediments in 40 ml TFB 1-Puffer (Tabelle 11) sowie einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Es folgte die Aufnahme des Zellsediments in 10 ml TFB 2-Puffer (Tabelle 12) und anschließend eine Aliquotierung in 200 µl Fraktionen. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff (N₂) gefroren und bei -80 °C gelagert werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung LB-Medium

LB-Medium:

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

10% (w/v) Bacto Trypton

10% (w/v) NaCl

Bei 180°C autoklavieren und bei 4 °C lagern.

Tabelle 11: Zusammensetzung TFB1-Puffer**TFB1-Puffer:****30 mM Kalium-Acetat****100 mM Rubidiumchlorid****10 mM Calciumchlorid****15% (v/v) Glycerin**

Der pH-Wert wurde mit 0,2 M Essigsäure auf pH 6,1 eingestellt. Dann wurden 50 mM Manganchlorid zugegeben, der pH-Wert stellte sich auf ca. pH 5,8 ein, und der Puffer wurde steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 12: Zusammensetzung TFB2-Puffer**TFB2-Puffer:****10 mM MOPS****75 mM Calciumchlorid****10 mM****Rubidiumchlorid****15% (v/v) Glycerin**

Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid auf pH 6,5 eingestellt.

2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren mittels hitzestabiler, DNA-abhängiger DNA-Polymerasen (Mullis *et al.*, 1986, Mullis und Faloona, 1987). Als dafür nötige Matrize diente in dieser Arbeit Plasmid-DNA, die für eGFP-Rab7, eGFP-Rab5 oder eGFP-Rab11 kodierende Sequenzen trug. Die verwendete Polymerase war die Phusion-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (NEB, Heidelberg). Diese besitzt eine „*proof-reading*“-Aktivität, das heißt eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität.

Tabelle 13: Standard-PCR-Ansatz**Standard-PCR-Ansatz:****eGFP-Rab7CA und eGFP-Rab7DN****1 µg DNA****1,25 µl Primer (5 pmol/µl)****1,25 µl Primer (5 pmol/µl)****2 µl dNTPs (2 mM)****2 µl Phusion-Puffer GC****7 µl MgSO₄ (25 mM)****1 µl Phusion-Polymerase****2,5 µl DMSO**

auf 50 µl mit H₂O_{bidest.} auffüllen

Tabelle 14: PCR-Profile mit der Phusion-Polymerase.

eGFP-Rab-GTPase
95 °C → 5 min
60 °C → 30 s
72 °C → 3 min 35 Zyklen
95 °C → 15 s
60 °C → 2 min
72 °C → 5 min Abkühlen auf
4 °C

2.2.1.4. Herstellung von Mutationen durch Seiten-gerichtete Mutagenese („Site-directed-mutagenesis“)

Zur Herstellung von gerichteten Aminosäure (AS) Mutationen in rekombinanten Proteinen wurde das Plasmidkonstrukt peGFP-Rab7WT (Marino Zerial) als Matrize für die PCR verwendet. Die Amplifizierung des Vektors erfolgte mit spezifischen Oligonukleotiden (Abschnitt 2.1.5; Tabelle 5), die die gewünschten Aminosäureaustausche enthielten. Dazu wurden die in Tabelle 15 aufgeführten PCR-Profile verwendet. Die Matrizen-DNA wurde in Bakterien amplifiziert. Dadurch wurde die DNA postranslational modifiziert (methyliert), im Gegensatz zu dem erhaltenen PCR-Produkt. Damit eine Kontamination der Ausgangs-DNA (nicht mutiert) auszuschließen war, wurde die methylierte Matrizen-DNA abgebaut durch Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym DpnI für 1 Stunde bei 37 °C verdaut (Edelheit *et al.*, 2009). DpnI schneidet spezifisch methylierte DNA, nicht aber unmethylierte DNA (Braman *et al.*, 1996). Der Abbau der methylierten DNA wurde durch eine zwanzigminütige Inkubation bei 80 °C gestoppt. Dadurch blieb nur der amplifizierte Vektor mit den gewünschten AS-Austauschen in der Probe zurück und wurde in kompetente TopTen-Zellen transformiert. Die so hergestellten Proteinmutanten waren pCL7EGwo:Rab7Q67L und pCL7EGwo:Rab7T22N.

Tabelle 15: PCR-Profile für die Seiten-gerichtete Mutagenese.

Rab7Q67L	Rab7T22N

<u>95°C → 5 min</u>	<u>95°C → 5 min</u>
60°C → 30 s	60°C → 30 s
72°C → 3 min 35 Zyklen	72°C → 3 min 35 Zyklen
<u>95°C → 15 s</u>	<u>95°C → 15 s</u>
60°C → 2 min	60°C → 2 min
72°C → 5 min Abkühlen auf 4°C	72°C → 5 min Abkühlen auf 4°C

2.2.2. Extraktion von Plasmiden aus Bakterien

Für die Extraktion von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurden 4 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C ÜN inkubiert. Am Folgetag wurden 1,5 ml der Kultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Bakterien für 1 min bei 10.000 x g pelletiert. Das Pelett wurde in 200 µl TELT-Puffer (1 M Tris pH 8.0; 0,5 M EDTA pH 8.0, 10% Triton X-100; 3,2 M LiCl, 50 mg/ml Lysozym und 20 mg/ml RNase A) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert, die Enzyme bei 100°C für 30 Sekunden inaktiviert und die Suspension für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 10.000 x g pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde die Suspension mit 200 µl Isopropanol versetzt, durchmischt, für 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert um die DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das DNA Präzipitat wurde mit 800 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, für 5 min bei 15.000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Überschüssiger Ethanol wurde bei geöffnetem Gefäß für 2-3 min verdunstet und die DNA in 50 µl Wasser gelöst. Zur Präparation von DNA im Maxi-Maßstab wurde das Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.1. DNA-Gelelektrophorese nach (Hjerten, 1961)

Die DNA besitzt wegen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats eine konstante negative Ladungsdichte. Dadurch lässt sie sich in einer Matrix aus Agarose durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach Größe auftrennen. Das Wanderverhalten der DNA innerhalb des Gels wird von der Porengröße der Gelmatrix, der angelegten Spannung, der Größe und der Konformation der DNA-Moleküle beeinflusst. Aufgrund ihrer vernetzten Poren wirken Agarosegele wie molekulare Siebe, die DNA-Moleküle nach ihrer Größe auftrennen. Je größer ein DNA-Fragment ist, umso langsamer wandert es in Richtung der Anode. Die Porengröße des Gels wird durch die Agarose-Konzentration bestimmt. Diese sinkt mit steigender Konzentration, was dazu führt, dass die generelle Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente vermindert wird. Die verschiedenen Konformationszustände der DNA-Moleküle zeigen ebenfalls

ein unterschiedliches Wanderungsverhalten. Ringförmig geschlossene, zirkuläre DNA-Moleküle, *supercoiled* und lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle besitzen bei gleicher Länge sehr unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Für die DNA-Gelelektrophorese wurde 1 g Agarose in 100 ml 1-fach TBE durch Aufkochen gelöst (Tabelle 17). Die Lösung wurde zum Polymerisieren in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden in 5-fachem Ladepuffer aufgenommen, in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von 110 V aufgetrennt. Als Laufmittel diente 1-fach TBE-Puffer (Tabelle 16). Ein DNA-Längenstandard („*Smart Ladder*“; Thermofisher Scientific) wurde zur Bestimmung der Größe in eine Spur des Agarosegels aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in ein 0,2%-iges Ethidiumbromidbad gelegt, und die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten mit Hilfe des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Tisch detektiert werden.

Tabelle 16: Puffer für DNA-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (10-fach):	Ladepuffer (5-fach):
90 mM Tris/HCl, pH 8,0	5% (v/v) Glycerin
90 mM Borsäure	0,04% (v/v) Bromphenolblau
2 mM EDTA	Angesetzt in 1-fach TBE-Puffer

Tabelle 17: Agarosegelzusammensetzung

Agarosegel:
1% (v/v) Agarose
in 1x TBE-Puffer
0, 5 µg/ml Ethidiumbromid

2.2.2.2. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde unter Verwendung des „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die im Agarosegel enthaltene DNA an eine Säulenmembran zu binden wurde das DNA-enthaltene Agarosestück ausgeschnitten, gewogen und in Bindepuffer aufgelöst. Anschließend wurde die DNA mit nukleasefreiem Wasser von der Säule eluiert und bei -20°C für weitere Experimente aufbewahrt.

2.2.2.3. Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA durch Endonukleasen diente der Vorbereitung von Vektoren und DNA-Inserts für die Ligation (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ansatz für Restriktionsverdau von lentiviralem Vektor bzw. Plasmid mit Insert

<u>pCL7 /pCL6 Agel/NotI</u>	<u>peGFP-C1-Rab Agel/NotI</u>
1 µl Agel	1 µl Restriktionsenzym 1
1 µl NotI	1 µl Restriktionsenzym 2
2 µl Puffer R (NEB)	2 µl Puffer R (NEB)
X µl pCL7/pCL6 (mind.1 µg)	X µl peGFP-Rab (mind.1 µg)
ad. 20 µl H ₂ O ₂ bidest	ad. 20 µl H ₂ O ₂ bidest

Die kodierenden Regionen einiger Rab-GTPasen wurden über PCR amplifiziert, wobei der peGFP-C1-Rab Vektor als Template diente. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide besaßen eine NotI Schnittstelle am 3'-Ende damit das entstehende DNA-Fragment mittels Agel/NotI geschnitten werden konnte.

2.2.2.4. Herstellen von glatten DNA-Enden (*blunting*) nach Restriktionsverdau

Für die Klonierung und letztendliche Ligation einiger DNA-Fragmente in die Zielplasmide wurde eine Strategie gewählt bei der ein Ende nach dem Restriktionsverdau durch die Behandlung mit einem Klenow-Fragment wieder aufgefüllt wurde. Dadurch entsteht ein glattes Ende (*blunt-end*). Für die Herstellung dieser glatten DNA Enden nach Restriktionsverdau, wurde das *Quick-Blunting Kit* (New England Biolabs; NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.5. Dephosphorylierung von DNA

Damit es nach der Restriktion von DNA mit nur einer Endonuklease nicht zum Religieren der DNA kommt, wurde diese mit einer alkalischen Phosphatase (CIP; „calf intestinal phosphatase“) dephosphoryliert. Dazu wurden 50 µl des offenen Plasmids mit 1,2 µl CIP und 5,5 µl NEB3-Puffer bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die CIP durch eine Inkubation bei 80°C inaktiviert.

2.2.3. Herstellen und Vermehren von Genkonstrukten in *E. coli*

Die gewünschten Genkonstrukte wurden mittels spezifischer Oligonukleotiden (Tabelle 5) durch PCR amplifiziert, durch Restriktionsverdau wurden die gewünschten DNA-Enden hergestellt und über Ligation in die Vektoren eingebracht. Anschließend wurden die hergestellten Plasmide in *E. coli* transformiert und vermehrt. Unter Verwendung von für die Sequenzierung designten Oligonukleotide (Tabelle 5) wurden die so hergestellten Plasmide im Institute für Immunologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Cornelia Hardt (Universitätsklinikum Essen) sequenziert.

2.2.3.1. Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligation (Feretti und Sgaramella, 1981) ist eine Methode, mit der ein ausgewähltes DNA-Fragment kovalent in einen mit Endonukleasen geöffneten Vektor inseriert wird. Dabei wird zwischen *blunt-end*- und *sticky-end*-Ligation unterschieden, wobei bei einer „blunt-end“-Ligation der Vektor mit einem Restriktionsenzym geöffnet wurde, welches „glatte“ Enden erzeugt. Die bei der PCR (Kap. II.3.1.3) hergestellten DNA-Fragmente (synthetisiert durch die Phusion-DNA-Polymerase) können so in den Vektor eingefügt werden. Die „*sticky-end*“-Ligation baut hingegen auf den überhängenden-Enden auf, die durch die versetzten Schnittstellen der Restriktionsenzyme entstehen. Aus diesem Grund müssen sowohl der Vektor als auch das zu inserierende Fragment mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten werden, sodass eine komplementäre und kovalente Einbindung in den Vektor gewährleistet ist. Die kovalente Verknüpfung der Enden von DNA-Fragmenten erfolgt mittels DNA-Ligasen. Die Verknüpfung geschieht unter Verbrauch von ATP zur Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen den zusammengelagerten Basenpaaren von Vektor und amplifizierter DNA (Insert).

Für eine DNA-Ligation in einem Vektor ist ein spezielles Vektor/Insert Verhältnis hilfreich. Im Allgemeinen ist ein Verhältnis Insert/Vektor von mindestens 3:1 anzunehmen, es kann aber auch 6:1 betragen. Mit den jeweiligen Vektoren wurden folgende Ligationsansätze erstellt:

Tabelle 19: Standard-Ligationsansatz für den Einbau von Inserts in den Vektor pBSK

Ligationsansatz
1,5 µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2,0 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10-fach)
x µl Vektor pBSK
y µl Insert (Rab-GTPase)
ad. 20 µl H ₂ O _{bidest}

Tabelle 20: Standard-Ligationsansatz für den Einbau von Inserts in den Vektor pCL7-eGwo und pCL6-leGwo

Ligationsansatz
1,5 µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
2,0 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10-fach)
x µl Vektor pCL7- eGwo/pCL6-leGwo
y µl Insert (Rab-GTPase)
ad. 20 µl H ₂ O _{bidest}

Die Ligation wurde bei 4 °C ÜN durchgeführt.

2.2.3.2. Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Zu Beginn der Transformation wurden kompetente Zellen für ca. 15 min auf Eis aufgetaut. Den Aliquots wurde 10 µl Ligationsansatz bzw. isolierte Plasmid-DNA zugegeben und die Ansätze anschließend für 10-20 min auf Eis inkubiert. Ein darauffolgender, 90 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C diente der direkten Aufnahme von Fremd-DNA. Danach wurden die Zellen mit je 1 ml vorgewärmten LB-Medium versetzt. Zur Ausbildung der auf dem Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz wurden die Zellen für 30-40 min aerob bei 37 °C inkubiert (Chung *et al.*, 1989). Für die Selektion der Transformanten wurden je 50 µl Kultur auf Agarplatten (LB-Medium) mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die auf dem Plasmid kodierte Ampicillinresistenz (Kap. II.3.1; Tabelle 7) sollte das Wachstum der positiven Transformanten gegenüber den nicht transformierten Zellen ermöglichen.

2.2.4. Generierung lentivirale Expressionsplasmide für eGFP-Rab-GTPasen

Die kodierenden Regionen der Rab-GTPasen lagen als eGFP-Fusionskonstrukte im peGFP-C3 Expressionsvektor von Clontech vor, die von verschiedenen Arbeitsgruppen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Tabelle 21) wurden. Zur Klonierung der eGFP-Fusionskonstrukte von Rab5WT, Rab5 S34N (DN), Rab5Q79L (CA), Rab7WT, Rab7T22N (DN), Rab7Q67L (CA), Rab11WT, Rab11S25N (DN), Rab11Q70L (CA), Rab21WT, Rab21T33N (DN) und Rab21QL (CA) wurden die kodierenden Sequenzen der einzelnen Rab-GTPasen in die lentiviralen Expressionsplasmide pCL7EGwo und pCL6IEGwo kloniert. Die DNA-Sequenzen der Rab-GTPasen lagen in eukaryotischen Expressionsplasmiden der Firma Clontech vor. Für die Klonierung der eGFP-Rab5-Fusionskonstrukte (WT, DN, CA) in den Zielvektor (pCL7EGwo), wurde dieser zunächst mit *NotI* geschnitten und dann wurde wie unter 2.2.2.4 1 beschrieben die DNA-Enden von *sticky-* zu *blunt-*ends aufgefüllt. Anschließend wurde der Vektor mit *AgeI* verdaut. Die kodierenden Sequenzen von den eGFP-Rab5-Fusionskonstrukten wurden durch einen Restriktionsverdau mit *AgeI/DraI* aus dem peGFP-C3 Vektor geschnitten und dann in den Vektor pCL7EGwo *AgeI/NotI blunt* ligiert. Bei Rab7 wurden die kodierenden Sequenzen für die Fusionskonstrukte über *AgeI/NotI* aus dem eGFP-C3 Vektor geschnitten und in einen *AgeI/NotI* geöffneten pCL7eGwo Vektor ligiert. Die kodierenden Sequenzen für Rab11WT, Rab11DN und Rab11CA wurden durch *NheI/Acc65I* aus dem peGFP-C3 Vektor geschnitten und in den *NheI/BsrGI* geöffneten pCL6eGwo ligiert. Für den Transfer der DNA-Sequenzen von eGFP-Rab21WT, DN und CA wurden diese durch den Verdau des eGFP-C3 Vektors mit *AgeI/PspOMI* ausgeschnitten und in einen *AgeI/NotI* geöffneten pCL7EGwo ligiert. Vektorkarten der zwei verwendeten lentiviralen Expressionsplasmide finden sich in Abbildung 10 (Abschnitt 2.6.1). Die Überführung der kodierenden Sequenzen der eGFP-Fusionskonstrukte wurde durch die Sequenzierung der lentiviralen Plasmide kontrolliert. Die Sequenzierung wurde wie zuvor bereits erwähnt am Institut für Immunologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Hardt unter Verwendung der in Tabelle 5 aufgeführten Sequenzierprimer durchgeführt.

Tabelle 21: DNA-Sequenzen für die Klonierung der Rab-GTPasen

eGFP-Fusionskonstrukte	Spezies	Quelle
peGFP-C3: Rab5WT, Rab5S34N (DN), Rab5Q79L (CA)	<i>Homo sapiens</i>	Stenmark <i>et al.</i> , 1994, Sonnichsen <i>et al.</i> , 2000, Rink <i>et al.</i> , 2005
peGFP-C3: Rab7WT	<i>Homo sapiens</i>	Papini <i>et al.</i> , 1997, Rink <i>et al.</i> , 2005 (Papini <i>et al.</i> , 1997, Rink <i>et al.</i> , 2005)
peGFP-C3: Rab11WT, Rab11S25N (DN), Rab11Q70L (CA)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Ullrich <i>et al.</i> , 1996, Sonnichsen <i>et al.</i> , 2000
peGFP-C3: Rab21WT, Rab21T33N (DN), Rab21Q78L (CA)	<i>Homo sapiens</i>	Simpson <i>et al.</i> , 2004
peGFP-C3: Rab7T22N (DN), Rab7Q67L (CA)	<i>Homo sapiens</i>	Diese Arbeit

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung von HEK293T und K562 Zelllinien

HEK293T

HEK293T Zellen wurden sofern nicht anders beschrieben in DMEM Medium unter Zugabe von 10% FBS kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner) bis zu einer Konfluenz von 20-80% kultiviert, bevor sie 1:5 gesplittet wurden. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

K562

Zellen der Zelllinie K562 wurden, sofern nicht weiter beschrieben, in RPMI Medium mit dem Zusatz von 10% FBS kultiviert. Die Zellen wurden, da es sich um eine Suspensionszelllinie handelt, in speziellen Suspensionskulturflaschen (Greiner) kultiviert. Die Zellen wurden 1-2 mal die Woche 1:5 gesplittet und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

2.3.2. Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ)

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) wurden aus Nabelschnurblut isoliert (Giebel *et al.*, 2004, Görgens *et al.*, 2013b). Dazu wurden je 35 ml Nabelschnurblut zuerst auf 15 ml eines Ficoll-Gradienten (Dichte 1,077 g/ml; Biocoll Separating Solution) geschichtet. Dieser Gradient wurde bei 900 x g für 20 min bei Raumtemperatur (RT) und ohne Bremse zentrifugiert. Durch diesen Schritt werden die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte von den mononukleären Blutzellen (MNZ), zu denen die Monozyten, Lymphozyten und HSVZ gehören, abgetrennt. Die MNZ bilden eine weiße Interphase in der Mitte des Gradienten, und in der Phase darüber befindet sich das Plasma mit den Thrombozyten. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde die Interphase mit den MNZ abgenommen und in ein 50 ml Spitzbodengefäß überführt. Die isolierten MNZ werden in 50 ml Phosphatpuffer, pH 7,4 (PBS), aufgenommen und 6 min bei 650 x g und RT zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt werden Plättchen abgetrennt, die im Überstand zu finden sind. Das Zellsediment mit den restlichen Erythrozyten und den MNZ wurde nach diesem Schritt in 20 ml Ammoniumchloridlösung (Gibco) aufgenommen und 7 min bei 4°C inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von PBS gestoppt. Die MNZ werden durch Zentrifugation bei 900 x g für 5 min sedimentiert und in 25 ml PBS aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl am Sysmex Zellzählgerät verwendet. Weitere 100 µl der Zellsuspension wurden für durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung des CD34⁺ Zellgehaltes abgenommen.

2.3.3. Anzucht von MSZ aus Knochenmarkbiopsien

Zur Anzucht von MSZ wurde Vollknochenmark oder aus diesem wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben isolierte MNZ verwendet. 1 ml Vollknochenmark oder 2 x 10⁶ MNZ wurden in 2 ml DMEM mit 1,0 g/l Glukose und 10% Plättchenlysate aufgenommen und in einer 6-Lochplatte (Greiner) ausgesät (Doucet *et al.*, 2005). Nach 24 h wurde das Medium und die nicht adhärenen Zellen entfernt, und nach zweimaligen Spülen mit PBS wurde 2 ml neues Medium zugesetzt. Alle 3-4 Tage wurde das Medium ausgewechselt, und nach 7-14 Tagen waren die ersten MSZ Kolonien in der Kulturplatte mikroskopisch zu erkennen. Die Zellen wurden expandiert und bei jeder zweiten Passage durchflusszytometrisch auf die Zelloberflächenexpression von

CD73, CD31, CD45, CD90 und CD105 hin analysiert. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen für die osteogene und adipogene Differenzierung verwendet.

2.3.4. Anreicherung von CD34⁺ Zellen mit magnetischer Zellseparation (MACS)

In der Zellpopulation der CD34⁺ Zellen sind die HSVZ angereichert (Miltenyi *et al.*, 1990, Miltenyi, 1997, Richel *et al.*, 2000). Um diese Zellen aus den MNZ anzureichern, wurden die Zellen durch einen weiteren Zentrifugationsschritt sedimentiert und in 500 µl MACS-Puffer (0,1% BSA, 2 mM EDTA in PBS) resuspendiert. Dem Zellgemisch wurde 100 µl F_c-Rezeptor Blockingreagenz (MBC CD34 *Micro Bead* Kit human, Miltenyi Biotec) und 40 µl anti-CD34-Antikörper pro 1 x 10⁸ MNZ hinzugegeben und für 30 min 4°C inkubiert. Der verwendete Antikörper ist mit ferromagnetischen Partikeln gekoppelt (MBC CD34 *Micro Bead* Kit human). Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Antikörper durch Waschen mit MACS-Puffer entfernt und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Antikörper-Zellsuspension wurde durch einen 40 µm Filter auf eine mit MACS-Puffer equilibrierte Separationssäule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet (Midimacs *Separation Unit*, Miltenyi Biotec), gegeben. Die Säule wurde in dem Magnetfeld mit dem dreifachen Säulenvolumen an MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen durch zweimaliges Waschen der Säule mit MACS-Puffer eluiert. Die isolierten CD34⁺ Zellen wurden danach durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit analysiert. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden CD34⁺ Zellen aus insgesamt 95 Nabelschnurbluten auf eine mittlere Reinheit von 80% ± 9 angereichert.

2.3.5. Kultivierung von CD34⁺ Zellen

Zur Kultivierung der angereicherten HSVZ aus Nabelschnurblut wurde zytokinhaltiges Medium („Iscove's modified Eagle's Medium“ (IMDM) mit 20% FBS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 100 U/ml L-Glutamin, 10 ng/ml SCF, 10 ng/ml TPO und 10 ng/ml FLT3L) verwendet (Kobayashi *et al.*, 1997, Ohmizono *et al.*, 1997, Luens *et al.*, 1998). Vor dem Gebrauch wurde das Medium mit einem 0,22 µm Filter von Sartorius steril filtriert. Es wurden 1 x 10⁵ Zellen in 500 µl Medium aufgenommen und in 24 well Suspensionskulturplatten bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 3 Tagen wurde das Medium erneuert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, für die Versuche in diesem Medium kultiviert.

2.3.6. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung von lebenden Zellen wurden diese durch Zentrifugation sedimentiert und in einer Dichte von mindestens 200.000 Zellen/ml im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden 750 µl der Zellsuspension 1:1 mit Einfriermedium (80% FBS, 20% DMSO) gemischt, um eine Endkonzentration von 10% DMSO im Gemisch zu erhalten. Die Zugabe von DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses, da die Zellen ansonsten lysiert würden. Anschließend wurde die Zellsuspension in Einfrier Röhrchen (Greiner) überführt und unter Verwendung einer Einfrierhilfe (enthält Isopropanol), die eine konstante Temperaturabsenkung von 1 °C/min ermöglicht, bei -80 °C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen für die langfristige Lagerung in Stickstoff-Tanks überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C für 3-5 Minuten erwärmt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Spitzbodengefäße mit 20 ml vorgewärmten Kulturmedium überführt und für 5 min bei 600 x g sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Kultur genommen. Durch den Zentrifugationsschritt wurde die Konzentration des DMSO im Medium verringert. 24 h nach dem Auftauen wurde das Medium komplett gewechselt, um tote Zellen aus der Kultur zu entfernen (Lovelock und Bishop, 1959).

2.3.7. Osteogene und adipogene Differenzierung von MSZ

Mesenchymale Stamm-/Stromazellen lassen sich zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren (Pittenger et al., 1999). Die aus Knochenmarkbiopsien angezogenen MSZ wurden nach Differenzierungsprotokollen, die von der Arbeitsgruppe um Prof. Sven Brandau (Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Universitätsklinikum Essen) adaptiert (Hemeda *et al.*, 2010) und von uns weiterentwickelt wurden, differenziert.

Osteogene Differenzierung von MSZ

Zur osteogenen Differenzierung von MSZ wurden je 4×10^4 Zellen pro Vertiefung in eine 12-Lochplatte ausgesät. Die MSZ wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% bei 37 °C und 5% CO₂ in DMEM mit 1,0 g/l Glukose und 10% Plättchenlysat kultiviert. Für die Induktion der osteogenen Differenzierung wurden die MSZ mit Osteogenese-

induzierendem Medium (OIM) für 14 Tage kultiviert (Tabelle 22). Das OIM wurde alle 3-4 Tage zu 50% durch frisches OIM ersetzt. Nach 14 Tagen wurde das Medium vollständig entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gespült und dann mit 4% (v/v) Paraformaldehyd (PFA) für 5 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurde aufgrund der Differenzierung gebildete Calcium-haltige Knochenmatrix mit 2%iger (w/v) Alizerin Rot-Färbelösung (pH 4,1 - 4,3) für 2 min bei RT angefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde durch 2-3-maliges Spülen mit PBS entfernt. Anschließend wurde die Färbung mikroskopisch dokumentiert.

Tabelle 22: Osteogenes Differenzierungsmedium

Osteogenese-induzierendes Medium
(OIM)

10% FBS

1% Natriumpyruvat

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

100 U/ml L-Glutamin

0,1 μ M Dexamethason

10 mM beta-Glycerolphosphat

300 μ M Ascorbinsäure

in DMEM (4,5 g/l Glucose)

(Hameda *et al.*, 2010)

Adipogene Differenzierung von MSZ

Für die adipogene Differenzierung der MSZ wurde die gleiche Menge an Zellen verwendet wie bei der osteogenen Differenzierung und diese ebenso in 12-Lochplatten bis zu einer 70-80%-igen Konfluenz kultiviert. Die Differenzierung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Medien, dem Adipogenese-induzierenden Medium (AIM) und dem Adipogenese-erhaltenden Medium (AEM) (Tabelle 23). Die Induktion der Adipogenese mit dem AIM erfolgte über die ersten 4 Tage der Differenzierung. Anschließend wurde das Medium gegen das AEM ausgetauscht, welches alle 3-4 Tage zu 50% ausgetauscht wurde. Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung wurden die gebildeten Triglyzeride in den Zellen durch eine Oil Red O-Färbelösung angefärbt.

Tabelle 23: Adipogene Differenzierungsmedien

Adipogenese-induzierendes Medium (AIM)	Adipogenese-erhaltendes Medium (AEM)
10% FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 100 U/ml L-Glutamin 1 µM Dexamethason 200 µM Indomethacin in DMEM (4,5 g/l Glucose) (Hemeda <i>et al.</i>, 2010)	10% FBS 1% Natriumpyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 100 U/ml L-Glutamin 1 µM Dexamethason 200 µM Indomethacin 2 µM Insulin 500 µM IBMX in DMEM (4,5 g/l Glucose) (Hemeda <i>et al.</i> , 2010)

Oil Red O-Stocklösung

300 mg Oil Red O in 100 ml Isopropanol (stabil für 1 Jahr nach Herstellung)

Oil Red O-Färbelösung (stabil für 2 h nach Herstellung)

Die Stocklösung wird 3:2 mit H₂O_{bidest} gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Vor der Verwendung wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert um Schwebstoffe zu entfernen. Die filtrierte Lösung wurde zur Färbung der Triglyzeride verwendet.

2.3.8. Differenzierung von HSVZ zu Megakaryozyten oder Erythrozyten

Zur Analyse des Einflusses von genetischen veränderten Proteinen auf das Differenzierungspotenzial von HSVZ wurden die Zellen nach genetischer Manipulation in Differenzierungsansätze durchflusszytometrisch sortiert, die die Reifung der Zellen in Megakaryozyten oder Erythrozyten untersuchte. Dabei wurde die megakaryozytäre bzw. erythrozytäre Differenzierung durch spezifische Zytokine stimuliert (siehe Zusammensetzung der Medien weiter unten)(Bruno *et al.*, 1988, Muta *et al.*, 1994, Bruno *et al.*, 2003, Boyer *et al.*, 2008, Dorn *et al.*, 2008).

Für die Versuche wurden zunächst CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut wie in 2.3.2 beschrieben isoliert und direkt nach der Isolierung transduziert (Abschnitt 2.6.3). Die Zellen wurden bis Tag 3 kultiviert (Abschnitt 2.3.2) dann durchflusszytometrisch sortiert auf CD34⁺CD133⁺ und CD34⁺CD133^{low} und in je 800 µl Differenzierungsmedien (sehen unten) aufgenommen. Für den Erythrozytenansatz wurden 5.000 Zellen von jeder Fraktion sortiert und beim Megakaryozytenansatz

wurden mindestens 10.000 Zellen als Startmaterial für die Differenzierung benötigt. Weniger Zellen führten zum Absterben der Ansätze.

Die Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe in Replikaten in einer 96 Lochplatte ausplattiert. Dabei wurden wenn 5000 Zellen in einer Verdünnungsreihe 1:2 verdünnt. Jeder Ansatz wurde in 200 µl des jeweiligen Differenzierungsmediums für 14 Tage kultiviert (Abbildung 7). Alle drei Tage wurde das Medium erneuert, indem 80 µl abgenommen und 120 µl zugefügt wurden. Im Falle der Erythrozyten-Differenzierung wurden zwei Medien verwendet (siehe unten): Eins, das die Proliferation der Zellen stimuliert, welches für die erste Woche der Kultivierung verwendet wurde und eines, das die Ausreifung der Zellen verbessert. Letzteres wurde ab Tag 8 der Kultivierung bis Tag 14 verwendet. Die Quantifizierung der Differenzierungsansätze erfolgte Durchflusszytometrisch mit Hilfe von *Flow count* beads (Beckman Coulter) und ist unter Abschnitt 2.5.4 beschrieben.

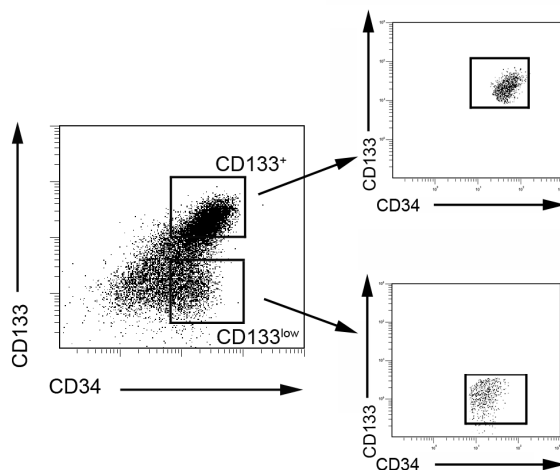


Abbildung 7: Sortierschema für Differenzierungsversuche

Zellen wurden immunfluoreszent mit CD34-ECD und CD133-PE Antikörpern gefärbt und mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) auf die Zellpopulationen CD34⁺CD133⁺ und CD34⁺CD133^{low} sortiert.

Erythrozytendifferenzierung:

Das Proliferationsmedium unterstützte die Reifung und Proliferation der erythrozytären Progenitoren zu Beginn der Kultivierung und wurde alle drei Tage gewechselt. Nach 7 Tagen wurde das Medium durch das Differenzierungsmedium ersetzt, welches zusätzlich noch Insulin enthält, wodurch die Ausreifung der Progenitoren verstärkt wurde. Dieses wurde auch alle 3 Tage durch frisches Medium ausgetauscht.

Für die Differenzierung in Erythrozyten wurden die in Tabelle 24: Erythrozytäre Differenzierungsmedien aufgeführten Medien verwendet.

Tabelle 24: Erythrozytäre Differenzierungsmedien

<u>Proliferationsmedium</u>	<u>Erythrozyten-Differenzierungsmedium</u>
<u>Tag 0 – Tag 7 für 10 ml Medium</u>	<u>Tag 7 – Tag 14 für 10 ml Medium</u>
8,0 ml Dulbeccos modified Eagle Medium 1,5 ml 15% v/v Fötales Rinderserum (FBS) 0,1 ml 20% Rinderserumalbumin (BSA) 1 U / μ l Erythropoetin 10 ng / ml SCF 0,128 mg / ml Transferrin 40 ng / ml Insulin Wachstumsfaktor (IGF-1) Frisch zusetzen: 1% (100 x) Penicillin-Streptomycin-Glutamin 10 nM β -Mercaptoethanol	Wie Proliferationsmedium mit Zusatz von 1 μ g / ml Insulin Frisch zusetzen: 1% (100 x) Penicillin-Streptomycin-Glutamin 10 nM β -Mercaptoethanol

Megakaryozytendifferenzierung:

Die Differenzierung von HSVZ in Megakaryozyten wurde der kommerziell erwerbliche MegaCult[®]-Ansatz der Firma Stemcell Technologies modifiziert. Dieser basiert auf Vorarbeiten zur *in vitro* Differenzierung von HSVZ in Megakaryozyten und Thrombozyten (Bruno *et al.*, 1988, Teramura *et al.*, 1992, Teramura und Mizoguchi, 1992, Boyer *et al.*, 2008). Zur Induktion der megakaryozytären Differenzierung wurden die Zytokine TPO, IL-3 und IL-6 sowie das Hormon Insulin und das Glykoprotein Transferrin dem Medium zugesetzt (Bruno *et al.*, 2003). Die Zytokine TPO, IL-3 und IL-6 wirken proliferationsfördernd auf HSVZ (Kollet *et al.*, 1999) wobei TPO als wichtigster Faktor der megakaryozytären Differenzierung und anschließenden Abschnürung von Thrombozyten beschrieben ist (Bruno *et al.*, 1988; Banu *et al.*, 1995). Von diesen Vorarbeiten ausgehend wurde für die Megakaryozytendifferenzierung das folgende Medium verwendet:

Tabelle 25: Zusammensetzung des Megakaryozyten-Differenzierungsmedium**Megakaryozyten-Differenzierungsmedium****(MK-Medium) für 10 ml**

**9,3 ml Iscoves modifiziertes Dulbecco`s Medium
(IMDM)**

5% Rinderserumalbumin (BSA)

2 mM L-Glutamin

10 ng/ml rekombinantes humanes Insulin

200 µg / ml humanes Transferrin

200 ng / ml rekombinantes humanes TPO

10 ng / ml rekombinantes humanes Interleukin

10 ng / ml rekombinantes humanes Interleukin

Frisch zusetzen:

10 nM β-Mercaptoethanol

1% (100 x) Penicillin-Streptomycin-Glutamin

Die Zellen wurden in dem Differenzierungsmedium nach Zellsortierung aufgenommen und für 14 Tage kultiviert. Jeden dritten Tag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, um die Wirkung der Zytokine zu gewährleisten.

2.3.9. CFC (*Colony forming cell*)-Ansatz

Im CFC-Ansatz wird das erythrozytär-myeloisches Differenzierungspotenzial von HSVZ untersucht (Burgess *et al.*, 1982, Nicola und Johnson, 1982, Muta *et al.*, 1994). Für die Durchführung wurden die zu untersuchenden Zellen in Replikaten und mit definierter Zellzahl von in der Regel 200 Zellen direkt mit Hilfe durchflusszytometrischer Sortierung in 1 ml semisolidem Methylzellulosemedium (Methocult H4434 Classic, Stemcell Technologies) sortiert. Nach gründlichem Mischen der wurden die Ansätze zunächst um Luftblasen zu vermindern für 30 min bei 37°C inkubiert und dann unter Vermeidung erneuter Luftblasenbildung in je zwei Vertiefungen in der Mitte einer 24-Lochflachbodenplatte pipettiert. Damit das Austrocknen der Ansätze vermindert wurde, in die nicht befüllten Vertiefungen der Platte 1 ml steriles H₂O_{bidest} gefüllt. Die Ansätze wurden für 14 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das verwendete Medium enthielt Methylzellulose, FBS, BSA, 2-Mercaptoethanol, sowie die Wachstumsfaktoren SCF, GM-CSF, IL-3 und EPO, wodurch die eingebrachten HSVZ mit erythrozytär-myeloischen Differenzierungspotenzial zur Differenzierung angeregt werden. Die einzelnen differenzierenden Zellen bilden hämatopoetische Kolonien, die je nach Form und

Größe morphologisch in fünf Kolonietypen unterteilt werden können: CFU-E (*colony-forming-uniterythroid*), BFU-E (*burst-forming-unit-erythroid*), CFU-G (*colony-forming-unitgranulocyte*), CFU-M (*colony-forming-unit-macrophage*), CFU-GM (*colony-formingunit-granulocyte-macrophage*) und CFU-MIX oder -GEMM (*colony-forming-unit-granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte*)-Kolonien.

Alle gebildeten hämatopoetischen Kolonien wurden nach 14 Tagen entsprechend der fünf Kolonietypen mikroskopisch ausgewertet.

2.3.10. Methoden zur Messung der Vitalität von Zellen

2.3.10.1. Zellvitalitätsmessung mit Annexin V

Zellen werden zur Bestimmung ihrer Vitalität mit Fluorochrom-konjugiertem Annexin V-FITC gefärbt. Annexin V ist ein Protein, welches in Abhängigkeit von Calcium an Phosphoserinreste bindet. Phosphoserine findet man auf der Oberfläche von präapoptotischen, apoptotischen und nekrotischen Zellen. Daher ist es durch die Verwendung von Fluorochrom-konjugiertem Annexin V möglich, lebende von toten und apoptotischen Zellen zu unterscheiden.

Dazu wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation bei 900 x g für 5 min konzentriert. Das Zellsediment wurde in 90 µl PBS (ohne Kalzium) resuspendiert und mit 10 µl 10 x Annexinbindepuffer (BD) versetzt. Anschließend wurden direkt 3 µl Annexin V-FITC zu 100 µl der Zellsuspension gegeben und der Ansatz für 15 min bei 4°C inkubiert. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zellen mit 200 µl 1 x Annexinbindepuffer aufgefüllt und dann gemessen. Die Messungen wurden einem FC500 Durchflusszytometer (Beckman Coulter) durchgeführt. Über den Anteil der Annexin V-positiven Zellen kann man den relativen Anteil der apoptotischen und prä-apoptotischen Zellen bestimmen.

2.3.10.2. Zellvitalitätsmessung mit Propidiumiodid

Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen in einer Zellsuspension, wurden 100 µl dieser Zellsuspension mit 2 µl einer 1 mg/ml Propidiumiodid (PI) –Lösung für 20 min bei 4°C versetzt. PI ist ein Farbstoff der in die DNA von Zellen interkaliert aber nicht eine intakte Zellmembran passieren kann. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 8).

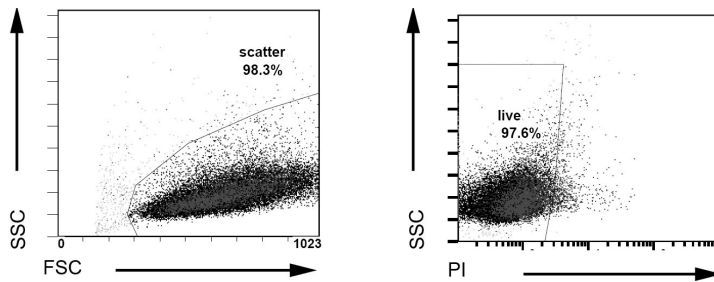


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils lebender Zellen.

Das *Gate* (scatter) grenzt die analysierte Zellpopulation ein. In dem weiteren *Dotplot* SSC/PI wurde der Anteil lebender Zellen (live), die nicht PI – positiv waren, analysiert.

2.4. Methoden zur Messung der Endozytose von Zellen

2.4.1. Aufnahme von Transferrin und acDil LDL

Zur Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem Transferrin und LDL wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, wie unter den Abschnitten 2.3.2 und 2.3.4 beschrieben isoliert. Das Protokoll zu Aufnahme von Transferrin-Alexa 555 (Trf) und 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin acetylierten *Low Density Lipoprotein* (Dil acLDL oder kurz LDL) wurde nach anderen Protokollen modifiziert (Dausend *et al.*, 2008). Es wurden 50.000 Zellen pro 24-Lochflachbodenplatte in IMDM Medium mit Zusatz von 20% fötalem Rinderserum (FBS), 10ng/ml SCF, 10ng/ml FLT3L, 10ng/ml TPO und 1% 100-fach Penicillin-Streptomycin-Glutamin kultiviert. Für die Aufnahme von Transferrin-Alexa555 (Trf) oder Dil acLDL (LDL) wurde dem Medium für 30 min 10 µg/ml Trf oder 1 µg/ml LDL zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen in kaltem PBS durch zweimalige Zentrifugation bei 900 x g und 4 °C gewaschen, um freie Liganden aus der Zellsuspension zu entfernen. Es wurde kalter Puffer verwendet, damit keine weitere Endozytose stattfinden kann. Diese Methode wurde nach Gao modifiziert (Gao *et al.*, 2000). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 100 µl Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann für die mikroskopische und durchflusszytometrische Analyse verwendet.

2.4.2. Relative Quantifizierung der Endozytose von Transferrin und LDL mittels Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Endozytose von Transferrin-Alexa555 und Dil acLDL durch CD34⁺ Zellen wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.4.1 beschrieben behandelt. Bei der Analyse der Wirkung der Pharmazeutika wurden die Zellen zur Unterscheidung zwischen lebenden und apoptotischen/toten Zellen mit AnnexinV-FITC gefärbt (Abschnitt 2.3.10.1). Für Aufnahmeversuche von genetisch

manipulierten Zellen wurde Propidiumiodid (PI) zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Der relative Anteil der lebenden Zellen, die Transferrin oder LDL aufgenommen haben wurde analysiert. Die Änderung in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für Trf und LDL in Histogrammen wurde als Maß für die Endozytoseaktivität der Zellen verwendet.

2.4.3. Inhibition von Endozytosewegen

Die ersten Studien zur Inhibition der Endozytose von Zellen wurden Anfang der 1980er Jahre durchgeführt. Dabei wurde vorallem die Rezeptor-vermittelte Endozytose mittels Monodansylcadaverin (MDC) (Davies *et al.*, 1980), Kalium-Depletion (Larkin *et al.*, 1983) oder unter Verwendung einer hypertonen Saccharoselösungen (Daukas und Zigmond, 1985) blockiert. In Tabelle 26 sind die in dieser Arbeit verwendeten Pharmazeutika zur Manipulation und Inhibition von Endozytoseprozessen aufgelistet.

Tabelle 26: Verwendete Pharmazeutika

Pharmazeutika	Wirkung	Verwendete Konzentration	Literatur
Chlorpromazin (Chpz)	Clathrin-abhängige Endozytose	50 µM	Sigwald und Bouttier, 1953
Clostridium Toxin B (CDTxB)	Rho-GTPase Inhibitor	200 nM	Görgens <i>et al.</i> , 2012
Cytochalasin B (Cyt B)	Actin Polymerisierung	10 µg/ml	(Athlin <i>et al.</i> , 1988)
Dynasore (Dyna)	Dynamamin Inhibitor	100 µM	Marcia <i>et al.</i> , 2005
Methyl-beta-cyclodextrin (MBCD)	Depletion von Cholesterol in der Zellmembran Clathrin-unabhängige Endozytose	5 mM	Ivanov, 2008
Spautin-1 (Spautin)	Autophagosom Inhibitor Abbau von vps34 (PI3KC3)	20 µM	Liu <i>et al.</i> , 2011
Monodansylcadaverine (MDC)	Clathrin-abhängige Endozytose	200 µM	Davies <i>et al.</i> , 1980

2.4.4. Inhibition der Endozytose durch Pharmazeutika

Für die Inhibition der Endozytose mit den jeweiligen unter Abschnitt 2.4.3 beschriebenen Inhibitoren wurden je Ansatz 50.000 CD34⁺ Zellen in 500 µl IMDM mit 20% FBS resuspendiert und in eine 24-Lochplatte ausgesät. Direkt nach der Anreicherung der CD34⁺ Zellen wurden die Inhibitoren zum Medium hinzugefügt. Nach 16-24 h oder 50-60 h der Kultivierung wurden die Zellen mikroskopisch auf die morphologische Polarisierung (Abschnitt 2.9.2), durchflusszytometrisch auf die Vitalität (Abschnitt 2.3.10.1) und den inhibitorischen Effekt hin untersucht. Zur Untersuchung des inhibitorischen Effektes wurden dem Medium nach den jeweiligen Zeitpunkten Fluorochrom-konjugierte Rezeptorliganden (Dil acLDL und Transferrin-Alexa555) zugesetzt. Durch die Inkubation für 45 min bei 37 C inkubiert wurde die Endozytose stimuliert. Ungebundene Liganden wurden nach 45 min durch zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 900 x g für 5 min entfernt. Anschließend wurde die Aufnahme der Rezeptorliganden durchflusszytometrisch anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen bestimmt.

2.5. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen in Suspension anhand ihrer phänotypischen Proteinbeschaffenheit und physikalischen Eigenschaften zu unterscheiden. Dabei wird die Zellsuspension durch eine Kapillare vom Durchflusszytometer aufgesogen. Aufgrund des Flüssigkeitsstroms in der Kapillare kommt es zu einer hydrodynamischen Fokussierung der einzelnen Zellen in der Mitte des Stroms. Dies ermöglicht es, dass die Zellen einzeln in die Messküvette des Gerätes geleitet werden, in der sie einen Laserstrahl passieren. Wenn eine Zelle den

Laserstrahl durchquert kommt es zur Streuung und Beugung des Lichts. Der Grad der Lichtstreuung oder Beugung ist abhängig von der Zellbeschaffenheit. Dabei kann zum einen die Beugung des Lichtes bestimmt werden, die durch die Plasmamembran der Zelle und ihre Form entsteht, diese Beugung des Lichtes wird als *Forward scatter* (FSC) bezeichnet und dient als Maß für die Größe der Zellen. Zum anderen gibt es die Streuung von Licht, die durch intrazelluläre Strukturen wie den Zellkern oder Granula ausgelöst wird. Diese Streuung wird als *Side scatter* (SSC) bezeichnet und beschreibt die Granularität der Zellen. Die Streuung des Lichtes wird von optischen Sensoren im Gerät, sogenannten Photoelektronenvervielfachern (PMT, *photomultiplier tube*), detektiert.

Durch die Verwendung von Wellenlängen spezifischen Lasern in Kombination von Bandpassfiltern lassen sich verschiedenste Fluoreszenzfarbstoffe anregen und detektieren. In Kombination mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern ist es möglich, Zelloberflächenstrukturen (Proteine, Glykosylierungen und andere molekulare Modifikationen) von Zellen zu markieren und detektieren. Des Weiteren können durch das Laserlicht fluoreszente Proteine angeregt werden wie zum Beispiel das grün fluoreszierende Protein (GFP) oder rot fluoreszierende Protein (RFP) (Ehrig *et al.*, 1995, Ropp *et al.*, 1995, Tomiyama *et al.*, 2008, Morozova *et al.*, 2010). Solche Proteine werden als Reporterproteine nach genetischer Manipulation von Zellen verwendet (Kalejta *et al.*, 1999, Beggah *et al.*, 2008). Durch die Expression der Reporterproteine lassen sich positiv manipulierte Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz von nicht manipultierten Zellen unterscheiden und bei der durchflusszytometrischen Analyse von diesen gesondert analysieren. Die durchflusszytometrische Daten wurde mit der *CXP-Analyse Software* von Beckman Coulter ausgewertet.

2.5.1. Untersuchung von CD34⁺ Zellen mittels durchflusszytometrischer Analysen

Durchflusszytometrische Analysen wurden in dieser Arbeit für die immunphänotypische Beschreibung von HSVZ und MSZ über die Kulturdauer verwendet. Dazu wurden die Zellen in Suspension zunächst mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD34-ECD, CD45RA-PECy7, CD133-PE und Propidiumiodid bei HSVZ und gegen CD105-FITC oder CD90-FITC, CD73-PE, CD34-ECD, CD45-PECy7 und Propidium bei MSZ gefärbt (Abschnitt 2.8.6) und dann durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.2. Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) von CD34⁺ Zellen

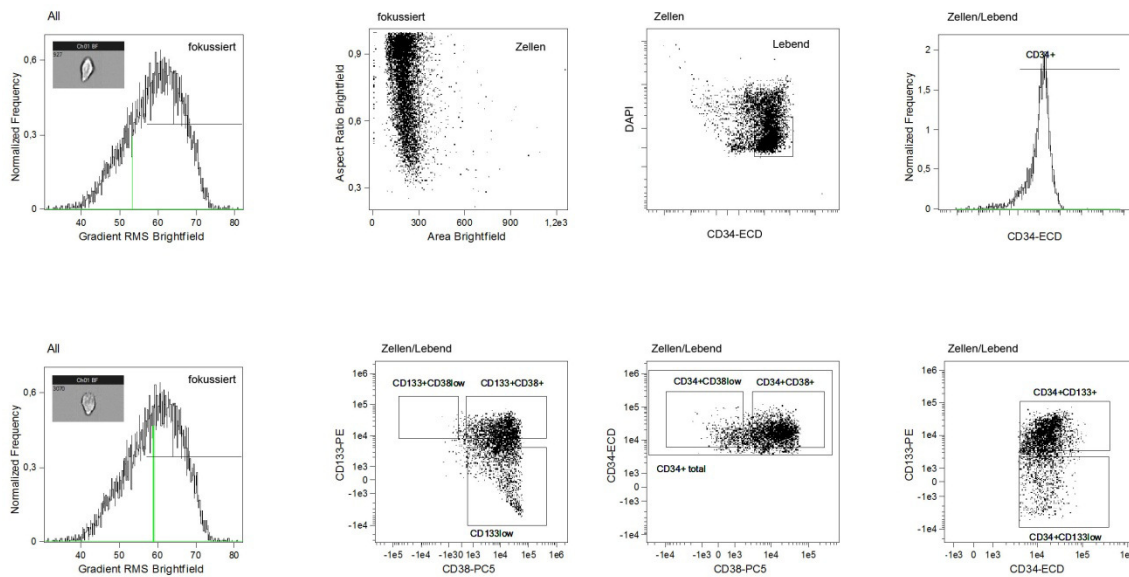
Mit der Entwicklung der Durchflusszytometrie wurde auch die darauf basierende Technik der Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung (FACS) entwickelt. Bei der konventionellen Messanwendung werden die Zellen nach der Analyse in einem Abfallbehälter entsorgt. Die für die Zellsortierung verwendeten Geräte sind in der Lage, die Zellen unmittelbar nach der Messung physikalisch aufzutrennen und in separaten Gefäßen aufzufangen (Bonner *et al.*, 1972, Torok-Storb *et al.*, 1980).

Für die Analyse unterschiedlicher Subpopulationen von CD34⁺Zellen, wurden diese mittels FACS separiert und in funktionelle Analyseansätze eingebracht. Die CD34⁺ Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.8.6 beschrieben immunfluoreszent mit Antikörpern gegen CD133-PE und CD34-ECD angefärbt und anschließend auf die Subpopulationen CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ sortiert.

2.5.3. Bildgebende Durchflusszytometrie

Der Amnis Image Stream X ist eine Kombination aus Durchflusszytometer und Fluoreszenzmikroskop. Diese Kombination ermöglicht es, die bei der Durchflusszytometrie indirekte Analyse von zellulären Prozessen sowie phänotypische Zelloberflächenverteilung von Proteinen auch morphologisch zu analysieren. Das Gerät dokumentiert, bei einer Flussgeschwindigkeit von 1000 Zellen pro Minute während der durchflusszytometrischen Analyse bis zu 12 Fotos von einer Zelle in verschiedenen Fluoreszenzkanälen. Durch die Fähigkeit die Zellen wie bei der konventionellen Durchflusszytometrie darzustellen (Histogrammen und Punktwolken-Plots), können die Zellpopulationen im *dotplot* über *gating* separat analysiert werden (Abbildung 9). Die Messung der Zellen erfolgte mit der *INSPIRE Software* und die spätere Auswertung der Daten mit der *IDEAS Software*. Mit der bildgebenden Durchflusszytometrie lassen sich zum einen die analysierten Zellen in konventionellen durchflusszytometrischen *Dotplots* oder Histogrammen darstellen. Des Weiteren ist es möglich in den *Dotplots* oder Histogrammen einzelnen Punkte (*Dotplot*) oder *Peaks* (Histogramme) auszuwählen, von denen dann die mikroskopischen Bilder der an dieser Stelle gemessenen Zelle (Punkt) oder Zellen (*Peak*) angezeigt werden.

Darstellung durchflusszytometrischer Messungen am Amnis Image Stream X



Mikroskopische Aufnahmen am Amnis Image Stream X

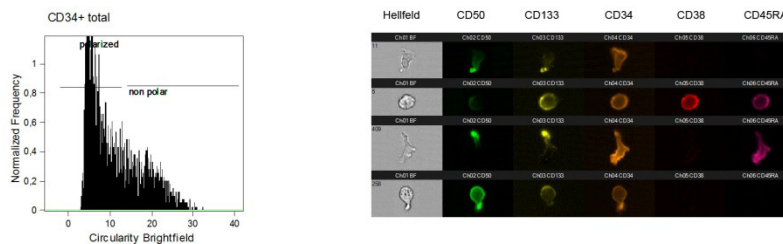


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung aufgenommener Daten am Amnis Image StreamX.

2.5.4. Durchflusszytometrische Analyse von erythrozytärer und megakaryozytärer Differenzierungsansätze

Nach 14 Tagen der Kultivierung in den erythrozytären oder megakaryozytären Differenzierungsmedien (Abschnitt 2.3.8), wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Zelloberflächenexpression von linienspezifischen Proteinen analysiert und mit Hilfe von *Flow count Beads* quantifiziert. Dabei wurden als Marker für die erythroide Differenzierung die Zelloberflächenexpression von Glycophorin A (CD235a) und CD45 auf den differenzierten Zellen analysiert. Reife erythrozytäre Zellen präsentieren $CD235a^+ CD45^-$ wohingegen nicht erythrozytär differenzierte Zellen den Oberflächenphänotyp $CD235a^- CD45^+$ besitzen (Dorn *et al.*, 2008). Bei der megakaryozytären Differenzierung wurden die Marker $CD41^+ CD61^+$ zur Identifizierung von reifenden Megakaryozyten verwendet. Zur Quantifizierung der Differenzierung der $CD34^+$ Zellen in erythrozytäre und megakaryozytäre Zellen wurden die Zellen aus den Differenzierungsansätzen an Tag 14 in 100 μ l PBS

aufgenommen und mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern: anti-CD235a-PE, CD45-PE-Cy7 für erythrozytäre Zellen und anti-CD41-PE, CD61-PE-Cy7 für megakaryozytäre Zellen für 30 min auf 4°C gefärbt. Nach 30 min wurden ungebundene Antikörper durch Auffüllen der Zellsuspension auf 6 ml mit Isoton (Beckman Coulter) und 5 minütiger Zentrifugation bei 900 x g entfernt. Vor dem Zentrifugationsschritt wurde auf die 6 ml Zellsuspension 50 µl von einer definierten Menge an *Flow count Beads* gegeben. Diese Beads werden während der durchflusszytometrischen Analyse vom Gerät gezählt wodurch sich anschließend die absoluten Zellzahlen für die differenzierten Zellen berechnen lassen. Durch die Bestimmung der Zellzahl nach Differenzierung konnte die absolute Zahl der expandierten differenzierten Zellen ermittelt werden.

2.6. Genetische Manipulation von Zellen

2.6.1. Drei Plasmid System zur Generierung viraler Partikel in Zellen

Für die Herstellung viraler Partikel in Zellen, wurde ein lentivirales Vektorsystem, welches von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Helmut Hanenberg (Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) entwickelt wurde, verwendet.

Dieses Vektorsystem basiert auf einem für die gewünschte DNA kodierenden Vektorplasmid, einem Helferplasmid und einem Hüllplasmid. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide waren der pCL6-IEGwo und der pCL7-EGwo, die jeweils die kodierende Sequenz für *eGFP* als Reporter gen tragen und auf dem zur Familie der Retroviren gehörenden Lentivirus HIV (humanes Immundefizienzvirus) basieren. Das Reporter gen steht unter der Kontrolle des SSFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotors. Des Weiteren enthält das Vektorplasmid eine Sequenz mit mehreren Restriktionsschnittstellen für DNA-Nucleasen, die sogenannte MCS (*multiple cloning site*) über die gewünschte DNA-Sequenzen in den Vektor eingebracht werden können. Das auf dem Vektorplasmid enthaltene virale Verpackungssignal Ψ ist notwendig für den Transport viraler mRNA in die gebildeten Viruspartikel. Die spätere Integration der durch den Virus kodierten genetischen Information in das Genom der Zielzelle wird durch die auf dem Vektor enthaltenen LTRs (*long terminal repeats*) ermöglicht. Um sicherzustellen, dass die gebildeten viralen Partikel replikationsinkompetent sind, ist eine Deletion in der U3-Region im 3'-LTR-Bereich der viralen Expressionskassette durchgeführt worden (Leurs *et al.*, 2003).

Auf dem Helferplasmid (pCD/NL-BH) finden sich die viralen Strukturgene *gag* und *pol* sowie die regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev* und *tat*, die unter der Kontrolle des CMV (humaner Cytomegalie-Virus)-Promotors stehen (Mochizuki *et al.*, 1998). Als Hüllplasmid wurde der Vektor pcoPE verwendet. Dieser kodiert unter der Regulation des CMV-Promotors für das foamyvirale (protypische Foamyvirus) Hüllprotein. Die Verwendung des Foamyvirus Hüllproteins zur Pseudotypisierung der viralen Partikel bietet einen weiteren Wirts- und Gewebetropismus als das klassisch verwendete Glykoprotein G des *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) (Meiering und Linial, 2001). Durch die Größe des Foamyvirus-Genoms von über 13 kb hat es potenziell eher die Fähigkeit, große heterologe Gensequenzen zu verpacken (Heinkelein *et al.*, 1998). Eine Darstellung der verwendeten Vektorkarten der einzelnen Plasmide ist in Abbildung 10 dargestellt.

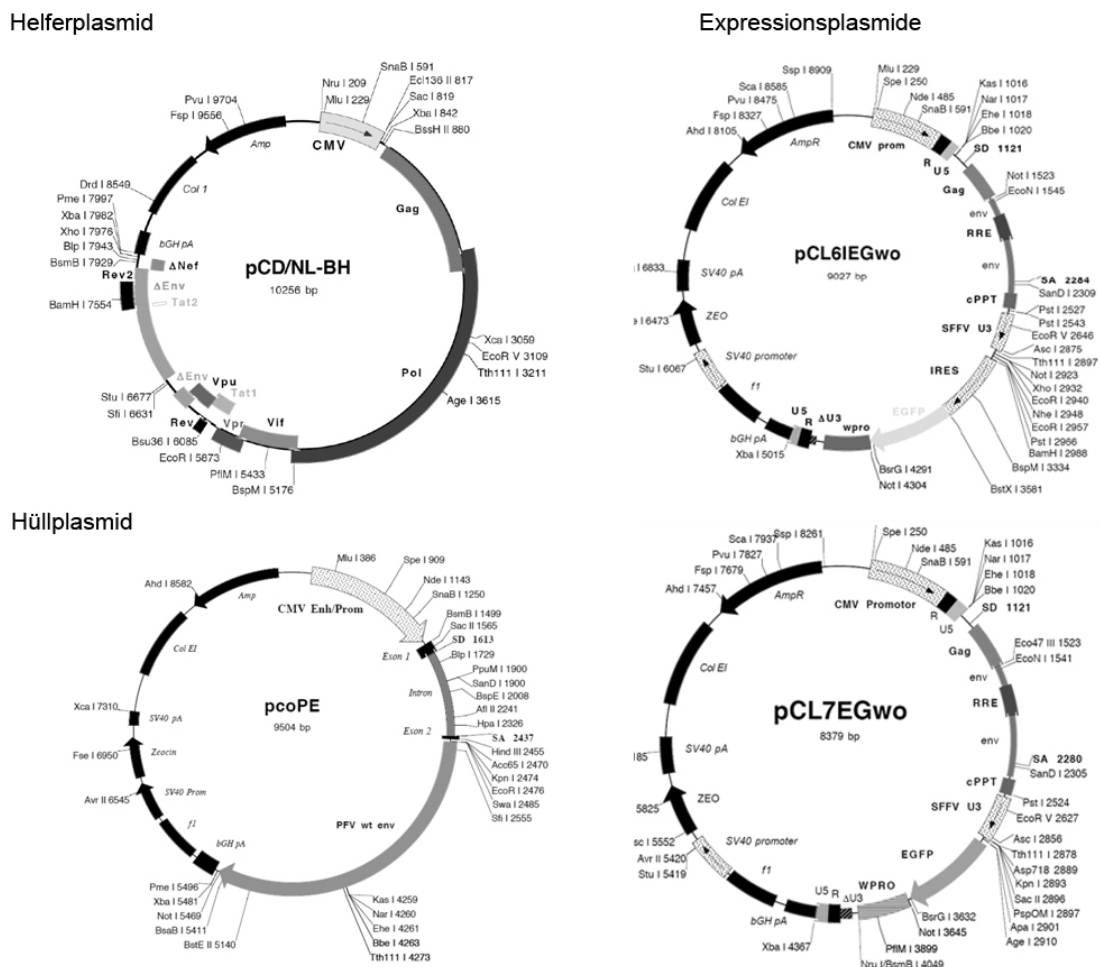


Abbildung 10: Drei Vektorsystem zur Generierung lentiviraler Partikel.

Plasmidkarten mit Restriktionsschnittstellen für das Helferplasmid pCD/NL-BH, das Hüllplasmid pcoPE und die zwei verwendeten Expressionplasmide pCL6IEGwo und pCL7EGwo.

2.6.2. Herstellung virushaltiger Überstände

Für jeden herzustellenden virushaltigen Überstand wurden 6×10^6 HEK293T-Zellen pro 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und für einen Tag kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit den drei im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Plasmiden transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI, hochmolekular, Sigma-Aldrich) verwendet, welches Komplexe mit der DNA bildet (Boussif *et al.*, 1995, Ogris *et al.*, 2003). Zur Vorbereitung der Transfektion wurde je Zellkulturflasche 135 µl PEI-Lösung (1 mg/ml) in 12 ml serumfreiem Medium in 14 ml-Röhrchen vorgelegt. Dann wurden die Plasmide hinzugegeben (Transferplasmid und Helferplasmid je 40 µg, Hüllplasmid 8 µg je Ansatz), der Ansatz gut vermischt und für 30 min bei RT inkubiert, um die Bildung von PEI-DNA Komplexen zu ermöglichen. Im Anschluss wurde die Transfektionslösung auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, 6 ml serumhaltiges Kulturmedium hinzugefügt und der Ansatz über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und je Flasche durch 20 ml Natriumbutyrat-haltiges (Buttersäure Natriumsalz, Merck) Medium ersetzt (10% FBS, 10 mM Natriumbutyrat in DMEM 4,5 g/l Glucose). Durch die Zugabe von Natriumbutyrat wird der CMV-Promotor der Plasmide induziert, wodurch bis zu zwölfmal höhere Virustiter erreicht werden können (Radsak *et al.*, 1989; Leurs *et al.*, 2003). Nach 6-8 h wurde das Medium erneut durch frisches Medium ersetzt und nach einer Inkubationsdauer von 18-22 h der virushaltige Überstand geerntet. Dazu wurde der Überstand abgenommen, zur Entfernung von residualen Zellen durch 0,45 µm Filter filtriert und in aerosoldichte 40 ml-Zentrifugationsröhrchen (Nalgene) überführt. Die viralen Partikel wurden durch Zentrifugation der Überstände bei 25.000 x g für 90 min bei 4 °C konzentriert, nach Entfernen des Überstandes im gewünschten Volumen HEPES-gepufferten Mediums (20% FBS in IMDM) aufgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Ermittlung der Infektiosität der auf diese Weise hergestellten virushaltigen Überstände, wurden die viralen Partikel durch eine serielle Verdünnung (10^{-3} , 10^{-2} und 10^{-1}) an einer definierten Zellzahl ausgesäter HEK293T Zellen titriert. Nach 48 Stunden wurden die Anteile eGFP-positiver Zellen quantifiziert.

2.6.3. Transduktion humaner CD34⁺ Zellen

Die Transduktion humaner CD34⁺ Zellen erfolgte in 24er Flachbodenplatten (*suspension culture plate*, Greiner), die vorher nach Herstellerangaben mit Retronektin (8 µg/cm² in PBS) beschichtet worden waren (Takara, Otsu, Japan).

Hierfür wurde die Flachbodenplatte entsprechend dem berechneten Titer mit 0,01-0,5 ml virushaltigem Überstand je Vertiefung beladen und bis zu 1×10^5 frisch isolierte CD34⁺ Zellen in Medium (IMDM mit 20% FBS) je Vertiefung hinzupipettiert. Die Zytokine SCF, TPO und FLT3L (Endkonzentration 10 ng/ml) wurden hinzugegeben. Nach 4-6 h wurden die Zellen jeweils geerntet, mit Medium (20% FBS in IMDM) gewaschen und in frisches Medium (IMDM mit 20% FBS und je 10 ng SCF, TPO und FLT3L) überführt. Nach 50-72 h wurde die Transduktionseffizienz der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.6.4. Transduktion humaner mesenchymaler Stromazellen (MSZ)

Für die Transduktion von MSZ wurden 20.000 Zellen pro 6er Flachbodenplatte ausgesät und einen Tag kultiviert, bevor die Zellen mit viralen Überständen entsprechend dem Titer (0,01-0,1 ml) behandelt wurden. Während der Transduktion wurden die Zellen wie zuvor unter Abschnitt 2.3.3 beschrieben kultiviert. Nach 4-6 h wurden die Zellen mit PBS gespült, um restliche virale Partikel zu entfernen. Dann wurde den Zellen frisches Medium (DMEM 10% PL) zugesetzt. Nach 50-72 h wurde die Transduktionseffizienz der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.7. Biochemische Methoden

2.7.1. Lyse von Zellen zur Gewinnung von Proteinen

Für die Herstellung von Proteinlösungen für die Analyse im Western Blot, wurden $3-5 \times 10^6$ K562-Zellen mittels Zentrifugation bei 4°C und 900 x g für 5 min sedimentiert. Durch zweimaliges waschen in 4°C kalten PBS wurde restliches Medium aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellen wurden erneut bei 4°C und 900 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellsediment in 500 µl Lysispuffer (0,1% (w/v) NP40, Tris-HCl pH 7,6) der 1x Protaseinhibitor-Cocktail (Roche) enthält resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Lösung 1 min bei 16.000 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Zytosolische Proteine und Detergenz-lösliche Membranproteine) wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und zur Proteinbestimmung verwendet.

2.7.2. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) ist eine Methode zur quantitativen Analyse des Proteingehaltes einer Lösung. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250, der ein aromatisches Ringsystem besitzt, bindet an die Argininreste von Proteinen. Dadurch tritt eine Verschiebung des

Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm auf, die zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt wird (Bradford, 1976).

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde mit H₂O_{bidest} auf 100 µl verdünnt und mit 100 µl Bradford-Reagenz in einer 96-er Lochbodenplatte 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer „Spectronic 20 Genesys“ (Spectronic Instruments, Cambridge, UK) gegen einen Leerwert (100 µl H₂O_{bidest}, 100 µl Bradford-Reagenz) gemessen. Anhand einer mit 1-10 µg BSA erstellten Eichgraden wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.7.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Die SDS-PAGE wurde nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Sie fand unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen statt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese in 2 x Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Durch die Zugabe von 10 µl 1 M DTT und erneutes fünfminütiges Kochen wurden die Proteine zusätzlich reduziert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 1,0 mm Gelen bei konstant 20 mA und bei 1,5 mm Gelen bei 25 mA für zwei Stunden in einer Gelelektrophoresekammer (Hoefler Scientific Instruments 1988-1989 Gelsystem).

Tabelle 27: Lösungen zur Herstellung einer SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

<u>Acrylamid/ Bisacrylamid:</u>	<u>Trenngelpuffer:</u>	<u>Sammelgelpuffer:</u>	<u>Elektrodenpuffer (10-fach):</u>
30% BioRad	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	0,05 M Tris/HCl, pH 8,5
	0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
			384 mM Glycin

In den folgenden Tabellen wurde die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Sammel- und Trenngele aufgelistet.

Tabelle 28: Verwendete Trenn- und Sammelgele.

Trenngele	Sammelgel		
	10%	12,5%	3%
Acrylamid	3,35 ml	4,20 ml	1,35 ml
Trennpuffer	2,50 ml	2,50 ml	2,00 ml
Wasser	4,10 ml	3,25 ml	4,65 ml
APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	35 µl	35 µl	35 µl

2.8. Immunologische Methoden und Fluoreszenzmikroskopie

2.8.1. Immunologische Detektion von Proteinen („Westernblot-Analyse“)

Für die „Westernblot-Analyse“ wurde eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore, Darmstadt) und die „Mini Trans-Blot Cell“ der Firma BioRad (München) eingesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die SDS-Gele für 60 min bei 90 Volt nach Angaben des Herstellers (BioRad, München) geblottet.

Tabelle 29: Pufferlösungen für Westernblot

<u>20 x Transferpuffer:</u>	<u>1 x Transferpuffer:</u>	<u>TBS-Puffer:</u>
200 mM Tris/HCl, pH 8,3	50 ml 20 x Transferpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4
2 M Glycin	20% (v/v) Methanol	5 mM EDTA 150 mM NaCl
	add 1l H ₂ O _{dest.}	150 mM NaCl

Ponceau-Färbung

Diese reversible Färbung wurde verwendet, um den Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran zu kontrollieren (Sambrook et al., 1989). Die Ponceau-Färbung ist nicht nur reversibel, sondern fixiert zudem die Proteine auf der Membran. Anschließend wurde die Membran für 1 h in PBS pH 7,4 oder Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) pH 7,4 mit 5% Milchpulver (Sigma) inkubiert, um die PVDF-Membran komplett mit Protein zu blockieren. Dadurch wurde einer unspezifischen Kreuzreaktion der Antikörper mit der Membran vorgebeugt. Die immunologische Detektion erfolgte ÜN durch Inkubation des blockierten Blots in mit PBS verdünnten primären Antikörpern. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte die Kopplung des sekundären Antikörpers für eine Stunde in PBS. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges mit PBS entfernt. Zur Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers wurden die Blots mittels der sensiblen Chemo-Lumineszenz-Methode entwickelt.

Chemo-Lumineszenz-Entwicklung

Der Blot wurde mit Hilfe des „Super-Signal West Femto Chemoluminescent Substrat“- Kits der Firma Pierce (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die Chemilumineszenz wurde in mit einer lichtsensitiven Kamera in einer Vilber Fusion FX7 Westernblotdokumentationseinheit detektiert. Mittels der BIO ONE Software 1.7 wurde die Bandenstärke densitometrisch quantifiziert.

2.8.2. Immunfluoreszente Färbung von Proteinen für Fluoreszenzmikroskopie

Durch immunzytochemischen Färbungen können Proteine und Strukturen innerhalb der Zellen durch Verwendung von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen spezifische Proteine mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Diese werden durch Licht spezifischer Wellenlängen angeregt und durch Abstrahlung einer Fluoreszenz in einem anderen Wellenlängenbereich werden die markierten Proteine unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Zur Immunfluoreszenten Färbung hämatopoetischer Zellen wurde eine in unserer Gruppe entwickelte Protokoll leicht modifiziert verwendet (Giebel *et al.*, 2004, Beckmann *et al.*, 2007, Görgens *et al.*, 2012).

Für die Immunfärbung wurden die hämatopoetischen Zellen nach 50-60 h Kultivierung für 10 min bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd in einem 15 ml Spitzbodenröhrchen fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei RT und 900 x g sedimentiert. Die Zellen wurden in 10 ml PBS gewaschen, erneut bei 900 x g sedimentiert und in 1 ml 0,1% Triton X100 in PBS (PBST) aufgenommen. Die Zellen wurden für 15 min in der Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und erneut sedimentiert. Durch die Behandlung mit PBST wurde die Zellmembran der Zellen permeabilisiert, damit intrazelluläre Proteine mit Antikörpern markiert werden können. Damit es nicht zu einer unspezifischen Bindung der Antikörper kommt werden die Zellen für 30 min mit 5% Serum der Spezies aus der der sekundäre Antikörper kommt inkubiert. Das Serum blockt unspezifische Bindestellen für Antikörper, die z.B. durch freie Fc-Rezeptoren entstehen. Anschließend wird der Primärantikörper auf die Zellen gegeben. Dieser wird über Nacht (ÜN) oder für mindestens 1h auf den Zellen bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen werden zweimal mit 0,01% Triton X100 (0,01% PBSTX) enthaltendem PBS durch Zentrifugation gewaschen. Dadurch wurde ungebundener Antikörper entfernt. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper für 30

min bei RT auf die Zellen gegeben. Nach diesem Schritt wurden die Zellen durch dreimalige Zentrifugation mit 0,01% PBSTX gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und 10 µl der Zellsuspension wurde auf Histobond Adhäsionsobjekträger von Marienfeld getropft. Die Zellen wurden 5-10 min inkubiert, damit sie auf dem Objekträger adhären. Dann wurde das überschüssige PBS mit einer Pipette entfernt und die Zellen wurden mit Prolong Antifade Gold Eindeckelmedium (Life Technologies) eingedeckelt.

2.8.3. Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbung von CD63

Für eine spezielle extra- und intrazelluläre Doppelfärbung wurden die Zellen zunächst extrazellulär nach Fixierung mit Paraformaldehyd gegen CD63 immunocytochemisch gefärbt. Dabei wurden als sekundäre Antikörper Esel-anti-Maus Fab-Fragmente, die mit Cy3 konjugiert waren, verwendet. Zur Blockierung noch freier Epitope am Primärantikörper wurden unkonjugierte Esel-anti-Maus Fab-Fragmente verwendet. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und intrazellulär mit den gleichen primären CD63-Antikörpern gefärbt. Zur Detektion wurden als sekundäre Antikörper Ziege-anti-Maus IgG mit Alexa488 konjugiert verwendet.

2.8.4. Vermessung der Vesikelgröße

Die Größenmessung der Vesikel in MSZ und HSVZ anhand von IF-Bildern wurde computerbasiert mit dem Mess-Modul der AxioVison4.8 Software von Zeiss durchgeführt. Zur Auswertung wurden Bilder der Zellen verwendet, die mit dem ApoPlan 63 x Objektiv (Öl) oder dem ApoPlan 100 x Objektiv (Öl) aufgenommen wurden und daher über die entsprechende mikroskopische Auflösung verfügten. Die einzelnen Vesikel wurden in 2-3 unabhängigen Färbungen und an mindestens 3 Zellen vermessen. Bei den MSZ wurden pro Zelle ca. 5-15 Vesikel vermessen bei den HSVZ waren es pro Zellen 3-5 Vesikel. Die Vermessung der Vesikel erfolgte durch Bestimmung des Durchmessers wobei der Messbalken verwendet wurde.

2.8.5. Immunzytochemische Färbung von Blutzellen nach Pappenheim (1870-1916)

Zur histologischen Färbung von hämatopoetischen Zellen wird ein Farbgemisch aus sauren und basischen Farbstoffen verwendet. Durch dieses wird eine panoptische Färbung der hämatopoetischen Zellen erreicht, wodurch sie im Mikroskop

phänotypisch unterschieden werden können. Die basischen Farbstoffe in dem Farbgemisch binden an saure (basophile) Zellbestandteile wie DNA und RNA und färben diese blau an. Die sauren Farbstoffe reagieren mit azidophilen Bestandteilen der Zellen wie z.B. Hämoglobin und färben diese rötlich an (Brugsch *et al.*, 1953).

Pappenheimfärbung

Für die immunzytochemische Färbung von hämatopoetischen Zellen wurden die Zellen mittels einer Zytospin Zentrifuge bei 1000 x g für 2 min auf einen Objekträger aufgebracht und für 30 min. bei RT trocknen gelassen. Dann wurden die auf dem Objekträger befindlichen Zellen für 3 min in May-Grünwald-Lösung (Eosinophiles-Methylenblau, Methanol und Glycerin) fixiert und gefärbt. Anschließend wurden die Objekträger für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 20 min in filtrierter 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung (Eosinsaures Azur I und Azur II sowie Methanol und Glycerin) inkubiert. Die Färbelösungen wurden von Sigma Aldrich fertig bezogen. Darauf folgt eine Inkubation für 1 min in destilliertem Wasser und das Trocknen der Objekträger bei RT für 1 Stunde (h). Nachdem die Objekträger getrocknet waren, wurden die Präparate für die Mikroskopie vorbereitet. Dazu wurden die gefärbten Zellen unter Verwendung des Eukitt Eindeckelmediums der Firma Sigma Aldrich und eines Deckgläschen für die längerfristige Aufbewahrung präpariert.

2.8.6. Extrazelluläre Immunfärbung von Zellen für Durchflusszytometrie

Die extrazelluläre Immunfärbung von Zellen mit direkt Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurde in Anwesenheit von 5% (v/v) Eseserum oder Mausserum durchgeführt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern. Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Antikörper in einer Verdünnung von 1:30 für 25 min bei 4°C im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Bevor die Zellen durchflusszytometrisch analysiert wurden, wurde nicht gebundener Antikörper durch Waschen mit Isoton entfernt. Für den Ausschluss toter Zellen wurden die Kernfarbstoffe DAPI (Endkonzentration 0,1 µg/ml) oder Propidiumiodid (1 µg/ml) verwendet. Diese können nur in Zellen mit einer nicht intakten Membran eindringen und in die DNA interkalieren. Dadurch konnten während durchflusszytometrischer Messungen vitale Zellen (kein Fluoreszenzsignal) von toten Zellen (Fluoreszenzsignal) unterschieden werden.

2.8.7. Intrazelluläre Immunfärbung von Zellen für Durchflusszytometrie

Für die in dieser Arbeit durchgeführten intrazellulären Färbungen wurden die Zellen zunächst für 20 min bei 4°C mit 4% (v/v) Para-Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit PBS gewaschen und dann für 20 min bei RT unter der Verwendung von 0,1% (v/v) Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen sedimentiert und in 100 µl 0,01% Triton X-100 in PBS (Waschpuffer) aufgenommen und mit 5% (v/v) Eselserum blockiert. Anschließend wurde der Zellsuspension unkonjugierter Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Rab5 1:50, Rab7 1:100, Rab11 1:50 und Rab21 1:500) für 1 Stunde bei RT zugesetzt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit Waschpuffer, gefolgt von einer 5 minütigen Zentrifugation bei 900 x g, entfernt. Darauf folgte die Inkubation mit den jeweiligen sekundären, Fluorochrom-konjugierten Antikörpern für 1 Stunde bei RT auf dem Taumler im Dunkeln. Zum Schluss wurden durch 3 maliges Waschen mit Waschpuffer nicht gebundene Sekundärantikörper aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellen wurden nach dem letzten Zentrifugationsschritt (5 min bei 900 x g) in 200 µl Isoton (Beckman Coulter) aufgenommen und standen dann für durchflusszytometrische Analysen zur Verfügung. Bei allen durchflusszytometrischen Messungen wurden ungefärbte und mit Isotyp-Antikörper behandelte Zellen als Kontrollen mitgemessen.

2.8.8. Immunfluoreszenz-Färbungen für durchflusszytometrische Analysen am Amnis Image StreamX

Für die Analysen im Amnis Image Stream wurden die Zellen mit 0,5%igem (v/v) PFA für 5-7 min bei RT leicht fixiert. Das PFA wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS aus der Zellsuspension entfernt. Anschließend wurden die Zellen in Suspension wie für durchflusszytometrische Analysen immunologisch mit Fluorochrom-konjugierten Primärantikörpern in Gegenwart von 5% Eselserum für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Freier ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zum Messen wurden die Zellen in 70 µl PBS aufgenommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und am Amnis Image StreamX gemessen.

2.9. Mikroskopische Lebendzellbeobachtungen

Zur Untersuchung der Morphologie sowie der Verteilung von Proteinen auf der Zellmembran oder innerhalb der Zellen wurden die Zellen licht- und fluoreszenzmikroskopisch über die Zeit beobachtet. Für diese

Lebendzellbeobachtungen wurde ein AxioObserverZ1 der Firma Zeiss verwendet. Dieses Mikroskop war mit einer Klimakammer und einem CO₂-Modul sowie einem elektronisch steuerbarem Tisch ausgestattet. Dadurch war es möglich an verschiedenen Positionen innerhalb der Zellkulturschalen Zellen zu beobachten. Durch das *Mark and Find* – Modul der AxioVision4.8 Software in Kombination mit dem Zeitintervall-Modul wurden Lebendzellbeobachtungen durchgeführt.

2.9.1. Mikroskopische Motilitätsanalysen von CD34⁺Zellen

Für die Analyse der Zellmotilität wurden CD34⁺ Zellen wie unter den Abschnitten 2.3.2, 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben isoliert, angereichert und kultiviert. Um Einflüsse der Effektoren zu untersuchen, wurden die Zellen nach Anreicherung aus dem Nabelschnurblut mittels lentiviraler Partikel transduziert. Nach 50-60 h Kultivierung wurden die CD34⁺ Zellen in einer 24 Lochplatte in die Klimakammer des Mikroskops gestellt. Die Zellen wurden für 30 min in der Kammer äquilibriert, um die durch den Temperaturwechsel entstehende Drift der Zellen zu vermeiden. Mit Hilfe des *Mark and Find*-Moduls sowie dem einstellbaren Zeitintervall-Modul wurden alle 120 Sek. Aufnahmen von den Zellen im Hellfeld und Fluoreszenzkanal (für eGFP mit der Colibri-LED-Einheit 470 nm Anregungslicht) durchgeführt.

Die Filme wurden zur Bestimmung der Motilität der Zellen mit der ImageJ 1.43u (NIH) Software mit dem *Manual Tracking Plugin* (Fabrice Cordelières) ausgewertet wobei 10-20 einzelne Zellen über die Dauer des Films verfolgt wurden. Die so ermittelten Daten wurden mit dem Chemotaxis und Migration Tool 2.0 (ibidi, Martinsried, Germany) weiter analysiert. Die zurückgelegte Distanz der Zellen wurde dabei mit einer Zenterkorrektur in einem Graphen dargestellt, sodass alle analysierten Zellen von einem Punkt wanderten. Aufgrund der zurückgelegten Distanz und dem Zeitintervall wurde die durchschnittliche Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$) und Gesamtdistanz, die eine Zelle zurückgelegt hat, bestimmt.

2.9.2. Quantifizierung der morphologischen Zellpolarität

Zur Bestimmung des Anteils von morphologisch polarisierten CD34⁺ Zellen wurden diese wie in den Abschnitten 2.3.2, 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben isoliert, angereichert und kultiviert. Nach 50-60 h der Kultivierung wurden die Zellen mikroskopisch auf ihre Polarisierung hin ausgezählt, es wurden 100-200 Zellen pro Ansatz ausgezählt. Hierbei wurde zwischen morphologisch polarisierten Zellen (Ausläufer, Uropod und *Leading edge*) und morphologisch nicht polarisierten Zellen (kreisrund, oval, ohne Ausläufer) unterschieden (Görgens *et al.*, 2012).

2.10. Statistik

Alle statistischen Daten sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Alle Signifikanzniveaus wurden, sofern nicht anders erwähnt, mit Hilfe des gepaarten, zweiseitigen *students t*-Tests mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2007 und Graphpad Prism 5 ermittelt. Von einem signifikanten Unterschied wurde bei einer errechneten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ ausgegangen. Bei geringen Versuchszahlen ($n=3$ oder 4) wurden auch p -Werte von $p < 0,1$ mit einem Sternchen gekennzeichnet. In diesen Fällen wurde dies noch einmal in der Legende erwähnt. Errechnete p -Werte wurden ansonsten wie folgt in Abbildungen gekennzeichnet: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden vier asymmetrisch verteilte Proteine in einem Teil mitotischer HSVZ identifiziert. Drei dieser vier Proteine sind mit Endosomen assoziiert und es konnte gezeigt werden, dass in einem Teil der mitotischen HSVZ Endosomen ungleich auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden (Beckmann *et al.*, 2007, Giebel und Beckmann, 2007). Auch in Modellorganismen wurde asymmetrische Segregation von Endosomen beschrieben, wo sie nachweislich an Zellschicksalsentscheidungen beteiligt sind (Bökel *et al.*, 2006, Coumailleau und Gonzalez-Gaitan, 2008, Coumailleau *et al.*, 2009). Neben Zellschicksalsentscheidungen wirken Endosomen auch bei anderen zellulären Prozessen wie Migration, Adhäsion und Zellpolarität mit (Wang *et al.*, 2001; Emery *et al.*, 2005; Golachowska *et al.*, 2010). In guter Übereinstimmung hierzu zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass Pharmazeutika, die unter anderem die Endozytose inhibieren [Cytochalasin B und Methyl- β -cyclodextrin] (Rikihisa *et al.*, 1994, Awasthi-Kalia *et al.*, 2001, Shogomori und Futerman, 2001), die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität von HSVZ unterbinden (Görgens *et al.*, 2012). Basierend auf diesen Befunden stellte sich die Frage, inwieweit Endosomen an der Zellschicksalsspezifikation sowie der Ausbildung der Zellpolarität von HSVZ beteiligt sind, bzw. ob zu Grunde liegende Prozesse durch endosomalen Transport reguliert werden.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt, die in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt sind. Zuerst wurden zur erstmaligen Beschreibung des endosomalen Systems in HSVZ Immunfluoreszenzfärbungen (IF-Färbungen) gegen endosomale Markerproteine etabliert und anschließend das endosomale System der HSVZ charakterisiert (Abschnitt 3.1). Für die Manipulation endosomaler Prozesse wurden im Weiteren zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: i) Die Beeinflussung des endosomalen Systems durch lentiviral vermittelte Expression von wildtypischen und mutanten Formen verschiedener Rab-GTPasen (Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21) (Abschnitt 3.2) und ii) die Inhibition endozytotischer Prozesse durch pharmazeutische Substanzen (Abschnitt 3.1). Effekte auf die Endozytose, Zellpolarität und Zellschicksals Spezifikation der HSVZ wurden hierbei separat untersucht.

3.1. Beschreibung des endosomalen Systems somatischer Stamm- und Vorläuferzellen

Da das endosomale System von HSVZ nur unzureichend beschrieben ist, war der erste Schritt, dieses mittels Immunfluoreszenz-Färbungen zu charakterisieren. Aufgrund der Tatsache, dass HSVZ in Kultur keine Plastikadhärenz besitzen und sich Suspensionszellen deutlich schwieriger färben lassen, als plastikadhärente Zellen, wurden für die Etablierung der Antikörper Färbungen mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSZ) gewählt. MSZ eignen sich aufgrund ihrer Flächigkeit hervorragend für subzelluläre Analysen (Abbildung 11).

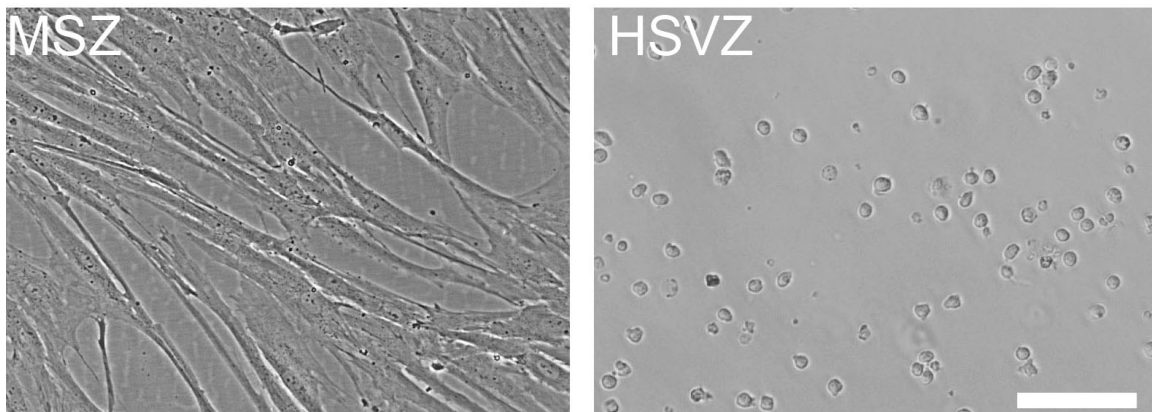


Abbildung 11: Morphologischer Vergleich von MSZ und HSVZ

Phasenkontrastaufnahme von MSZ aus Knochenmark und Hellfeldaufnahme von frisch isolierten CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurrestblut. Maßstabsbalken: 20 µm.

3.1.1. Anzucht und Charakterisierung von MSZ

Im Rahmen der Arbeit wurden aus drei Knochenmarksbiopsien von Stammzellspendern MSZ angezogen (Abschnitt 2.3.3). Diese wurden entsprechend des gültigen Standards zur Charakterisierung von MSZ, zunächst durchflusszytometrisch charakterisiert und ihr osteogenes und adipogenes Differenzierungspotenzial analysiert (Abbildung 12).

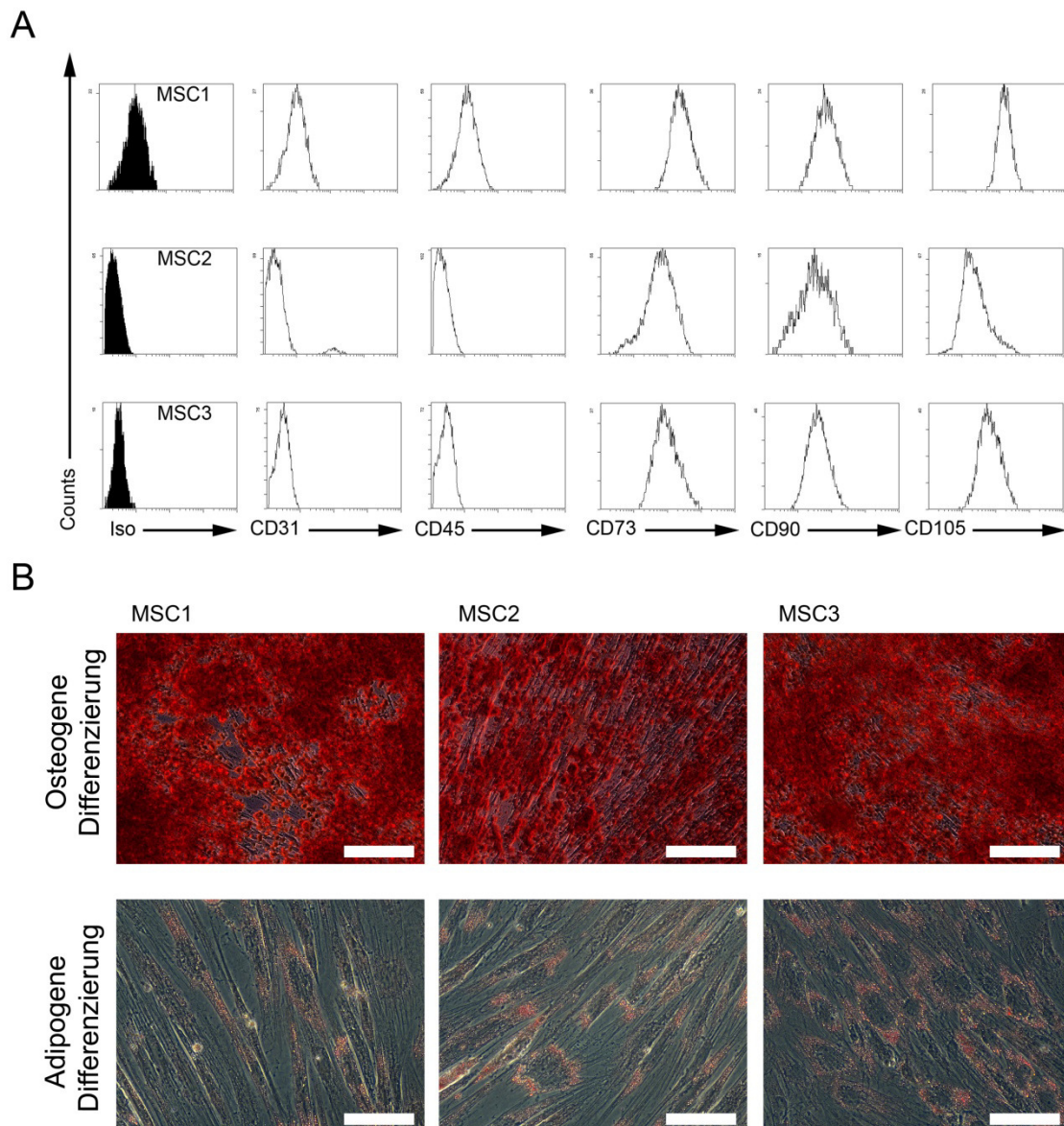


Abbildung 12: Phänotypische und Differenzierungsspezifische Charakteristika von MSZ

A) Aus Knochenmarkbiopsien angezogene MSZ (MSC1, MSC2 und MSC3) wurden auf die Oberflächenexpression von CD31, CD45, CD73, CD90 und CD105 hin durchflusszytometrisch analysiert. Histogramme der jeweiligen Fluoreszenzintensität der einzelnen Marker sind für 3 verschiedene MSZ-Linien dargestellt. B) Beispiel für adipogen und osteogen differenzierte MSZ. Adipogene Differenzierungsansätze wurden mit *Oil red O* und osteogene mit Alizarinrot gefärbt. Maßstabsbalken 100 μm .

Bei den durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich, dass alle aus den Knochenmarkproben angezogene Zellen die MSZ-Zelloberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 exprimierten und weder den endothelialen Marker CD31 noch das pan-hämatopoetische Oberflächenantigen CD45 auf ihrer Oberfläche trugen (Abbildung 12A). Da sich auch Zellen aller drei Präparationen in Richtung

Adipogenese, Osteogenese (Abbildung 12B) und Chondrogenese differenzieren ließen, erfüllten alle Zellpräparationen die gegenwärtigen Kriterien, um als MSZ bezeichnet zu werden (Fekete *et al.*, 2012, Chatzistamatiou *et al.*, 2014). Die chondrogene Differenzierung der MSZ wurde von Stefan Radtke durchgeführt und ist daher hier nicht mit dargestellt.

3.1.2. Marker des endosomalen Systems

Wie bereits im Abschnitt 1.3 beschrieben, besteht das endosomale System aus frühen, späten, Recycling- und Sortier-Endosomen (Mayorga *et al.*, 1988, Schmid *et al.*, 1988, Griffiths und Gruenberg, 1991, Stoorvogel *et al.*, 1991, Wood *et al.*, 1991, Thilo *et al.*, 1995, Sheff *et al.*, 1999, Sonnichsen *et al.*, 2000). Diese können durch die Präsenz verschiedener Proteine wie Mitgliedern der Rab-GTPasen, Tethering-Komplexe, Tetraspanine, bestimmter lysosomaler Proteine (CD107a, CD107b) sowie verschiedener Hüllproteine (Clathrin, Caveolin) und Rezeptoren (CD71) spezifisch unterschieden werden.

Sich einstülpende Plasmamembranvesikel sind von Hüllproteinen wie Clathrin oder Transmembranproteinen wie Caveolin umgeben (Raiborg *et al.*, 2001a, Boettner *et al.*, 2011a, Boettner *et al.*, 2011b, Krauss und Haucke, 2011, Kiss, 2012). Frühe Endosomen tragen an ihrer Membran Proteine wie Rab5 und EEA-1 (Mills *et al.*, 1998, Simonsen *et al.*, 1998, Christoforidis *et al.*, 1999, Rubino *et al.*, 2000), wohingegen sich auf Sortier- und späten Endosomen die Proteine CD63, CD107a und Rab7 finden (Feng *et al.*, 1995, Tjelle *et al.*, 1996, Bucci *et al.*, 2000, Kobayashi *et al.*, 2000). Recycling-Endosomen lassen sich durch die Präsenz von Rab4 bzw. Rab11 in zwei Klassen unterteilen: schnelle Recycling-Endosomen (Rab4) und langsame Recycling-Endosomen (Rab11) (Pasqualato *et al.*, 2004, Hoogenraad *et al.*, 2010). Als potenzielle Marker für die Beschreibung der verschiedenen endosomalen Kompartimente (früh, späte, Recycling- und Sortier-Endosomen) wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechend Antikörper gegen Clathrin, Rab5, Rab7, Rab11, EEA-1, CD63, und CD107a gewählt.

3.1.3. Endosomale Kompartimente in humanen MSZ

Zur Beschreibung des endosomalen Kompartiments in MSZ wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen die frühen endosomalen Proteine Rab5, EEA1 und Clathrin, die späten endosomalen Proteine Rab7, CD63 (*Lysosome associated membrane protein-3*; Lamp-3) und CD107a (*Lysosome associated*

membrane protein-1; Lamp-1) bzw. dem Recycling Endosomen-assoziierten Protein Rab11 gefärbt (Abschnitt 2.8.2).

Zur Orientierung bei der subzellulären Beschreibung der endosomalen Kompartimente von MSZ dient die in Abbildung 13 A aufgezeigte Skizze einer MSZ mit der Einteilung in Filopodien, Peripherie und perinukleäre Region. Den Erwartungen entsprechend wiesen die untersuchten endosomalen Proteine eine vesikuläre Verteilung auf, was sich an der punktuellen (endosomalen) Lokalisierung im perinukleären Bereich erkennen ließ (Abbildung 13B). Die für die frühen Endosomen als Marker untersuchten Proteine EEA1, Rab5 und Clathrin fanden sich auf Endosomen, welche meist über die gesamten Zellen verteilt sind und eine Anreicherung von Vesikeln im perinukleären Bereich besitzen (Abbildung 13B). Rab11 wurde als Markerprotein für die Recycling Endosomen verwendet. Die Immunfluoreszenz-Färbungen für Rab11 zeigten ebenfalls eine Verteilung der durch die spezifischen Antikörper markierten Endosomen über die gesamten Zellkörper mit einer Anreicherung im perinukleären Bereich. Die mittels anti-Rab11 Antikörper markierten Vesikelstrukturen waren optisch kleiner und feiner als die mit den Antikörpern gegen frühe endosomale Proteine markierten Strukturen (Abbildung 13B). Die Vesikel, die mit Antikörpern gegen späte endosomale Proteine (Rab7, CD63 und CD107a) markiert waren ließen alle eine ähnliche subzelluläre Verteilung im perinukleären Bereich der MSZ erkennen. Die endosomalen Strukturen die durch Antikörper gegen Rab7 und CD63 markiert waren, wiesen neben vereinzelter punktueller Lokalisierung vorwiegend eine tubuläre bzw. kettenartige Struktur auf (Abbildung 13B). CD63 fand sich zudem über die gesamte Plasmamembran und in feinen, haarartigen Ausläufern auf der Zelloberfläche MSZ wieder (Abbildung 13B).

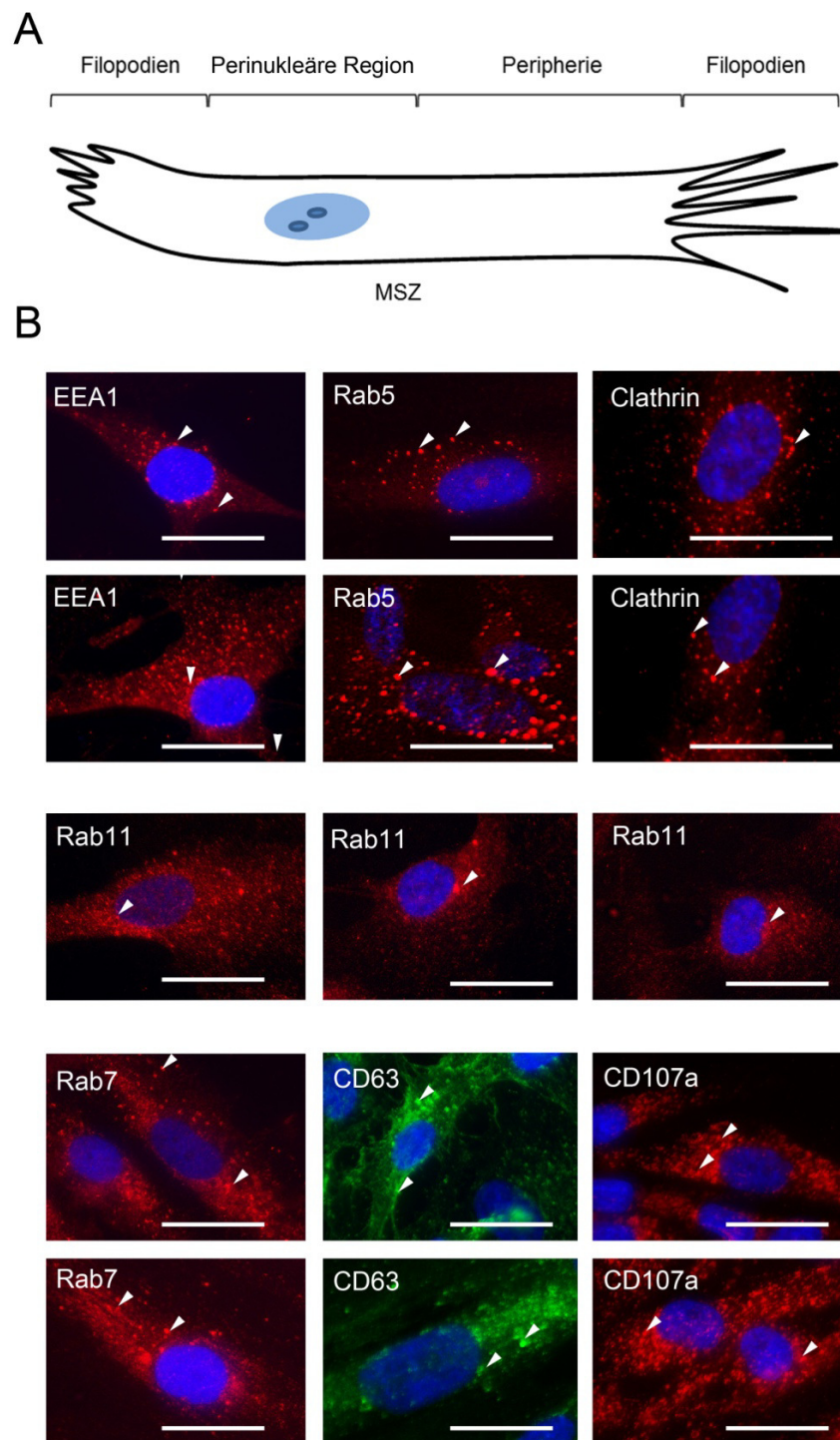


Abbildung 13: Subzelluläre Kompartimente in MSZ

A) Einteilung der zellulären Regionen von MSZ. B) IF-Färbungen von subzellulären Strukturen und Kompartimenten. Es wurden frühe endosomale Proteine EEA1, Clathrin oder Rab5, späte endosomale Proteine und Lysosomen assoziierte Proteine Rab7, CD63 und CD107a mit gegen diese Proteine gerichteten Antikörpern markiert und mittels Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern (Cy3-konjugiert oder Alexa488-konjugiert) angefärbt. Als Marker für Recycling-Endosomen wurde Rab11 immunfluoreszent angefärbt. Die Pfeile weisen auf die endosomale Lokalisation der verschiedenen Markerproteine hin. Maßstabsbalken 20 μ m. Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC* und *100x/1,45 Oil DIC*.

Da CD63 sowohl in Vesikeln als auch in der Plasmamembran von MSZ zu finden war, bot es sich an, den extra- und intrazellulären Anteil von CD63 mittels Immunfluoreszenz-Färbungen getrennt zu untersuchen.

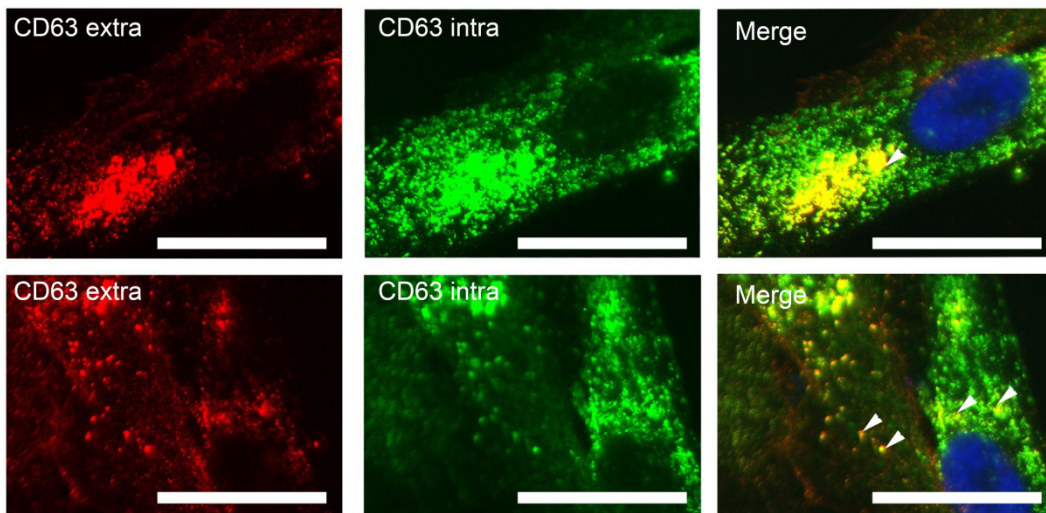


Abbildung 14: Extra- und intrazelluläre Lokalisation von CD63 in MSZ.

MSZ wurden extrazellulär mit anti-CD63 Antikörpern (Klon H5C6) markiert. Anschließend wurde mit Cy3-konjugierten Esel-anti-Maus-Fab-Fragmenten gegengefärbt (CD63 extra). Freie Epitope an den Primärantikörpern wurden mit unkonjugierten Esel-anti-Maus-Fab-Fragmenten blockiert, so dass nach der Permeabilisierung der Zellen die intrazelluläre Markierung von CD63 mit dem gleichen Antikörperklon (H5C6) durchgeführt und mit Ziege-anti-Maus-Alexa488 detektiert wurde (CD63 intra). Die Überlagerung (Merge) der Bilder mit der Dapi-Färbung zeigt die Ko-Lokalisation von CD63 in gelb und ist durch die Pfeile angezeigt. Perinukleäre Ko-Lokalisation von CD63 (obere Reihe). Ko-Lokalisierung von CD63 in der Peripherie der Zellen (untere Reihe). Maßstabsbalken 20 μm . Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

Es zeigte sich in der mikroskopischen Auswertung der IF-Färbungen, dass die extrazellulären und intrazellulären Fluoreszenzsignale von CD63 zum Teil an der Membran im perinukleären Bereich ko-lokalisieren (Abbildung 14). Um die subzelluläre Organisation der verschiedenen endosomalen Kompartimente in MSZ detaillierter zu beschreiben, wurden IF-Färbungen gegen verschiedene Kompartimentsmarker (Rab5, EEA1, Rab11 und CD63) in Doppelfärbungen und Dreifachfärbungen durchgeführt. Die Verteilung der als Kompartimentsmarker verwendeten Proteine war in den Immunfluoreszenzdoppelfärbungen gegen Rab5/CD63 und EEA1/CD63 ähnlich wie in den jeweiligen Einzelfärbungen. Dabei zeigte sich, dass die frühen endosomalen Proteine Rab5 und EEA1 im Wesentlichen räumlich getrennt von den CD63-positiven Kompartimenten lokalisiert sind (Abbildung 15, Abbildung 16). Vereinzelt fand sich eine benachbarte Lokalisation bzw. Ko-Lokalisation von Rab5 bzw. EEA1 mit CD63 (Abbildung 15). Um die subzelluläre Organisation von frühen, späten und Recycling Endosomen in MSZ zu

beschreiben, wurden Dreifachfärbungen gegen entsprechende Proteine (EEA1, Rab11 und CD63) durchgeführt. Diese ließen erkennen, dass wie zuvor bei den Doppelfärbungen vereinzelt Endosomen positiv für EEA1 und CD63 sind. IF-Färbungen gegen Rab11 zeigten wie zuvor bei den Einzelfärbungen eine Markierung von sehr kleinen Vesikelstrukturen. Die Dreifachfärbungen deuteten außerdem darauf hin, dass einige EEA1- und CD63- positive Vesikel auch mit Rab11 markiert sind. Dies zeigt, dass es in MSZ wie in anderen Zellen Übergangskompartimente gibt, die die Vernetzung innerhalb des endosomalen Systems widerspiegeln (Deretic, 2005, Rink *et al.*, 2005, Abenza *et al.*, 2012). Einzelne Vesikel, die positiv für alle drei Proteine (EEA1, CD63 und Rab11) waren, konnten unter diesen Bedingungen nicht gefunden werden (Abbildung 16).

Um die optischen Eindrücke der Vesikelform und Verteilung anhand der IF-Färbungen spezifischer zu beurteilen, wurde die Größe von EEA1-, Rab5-, Rab7- und CD63-positiven Vesikel in 3-4 Zellen (3-10 Vesikel/Zelle) vermessen. Die Vesikelmessungen zeigten, dass die Durchmesser der Vesikel, die positiv für die frühen endosomalen Marker Rab5 und EEA1 waren, einen mittleren Durchmesser von $0,80 \pm 0,29 \mu\text{m}$ (Rab5) und $0,86 \pm 0,30 \mu\text{m}$ (EEA1) haben (Anhang: Tabelle 46). Vesikel, die für die späten endosomalen Marker Rab7- und CD63-positiv sind, besitzen einen mittleren Durchmesser von $0,83 \pm 0,22 \mu\text{m}$ (Rab7) und $0,89 \pm 0,23 \mu\text{m}$ (CD63) (Anhang: Tabelle 45). Zur Vermessung Rab11 positiver Endosomen, reichte die Auflösung und Vergrößerung nicht aus (Abbildung 13; Abbildung 16).

Aufgrund der erzielten Ergebnisse in den MSZ wurden die hier als Endosomenmarker verwendeten Proteine Rab5 und EEA1 (frühe Endosomen), Rab11 (Recycling Endosomen), sowie Rab7 und CD63 (späte Endosomen) für die Beschreibung der endosomalen Organisation als gut geeignet eingestuft. Entsprechend wurden für die subzellulären Analysen in HSVZ vorwiegend die Antikörperkombinationen gegen EEA1/CD63, Rab5/EEA1 und Rab5/CD63 verwendet. Rab11 wurde aufgrund der geringeren Auflösung und der sehr kleinen Vesikelstrukturen in MSZ in HSVZ nur in Einzelfärbungen verwendet.

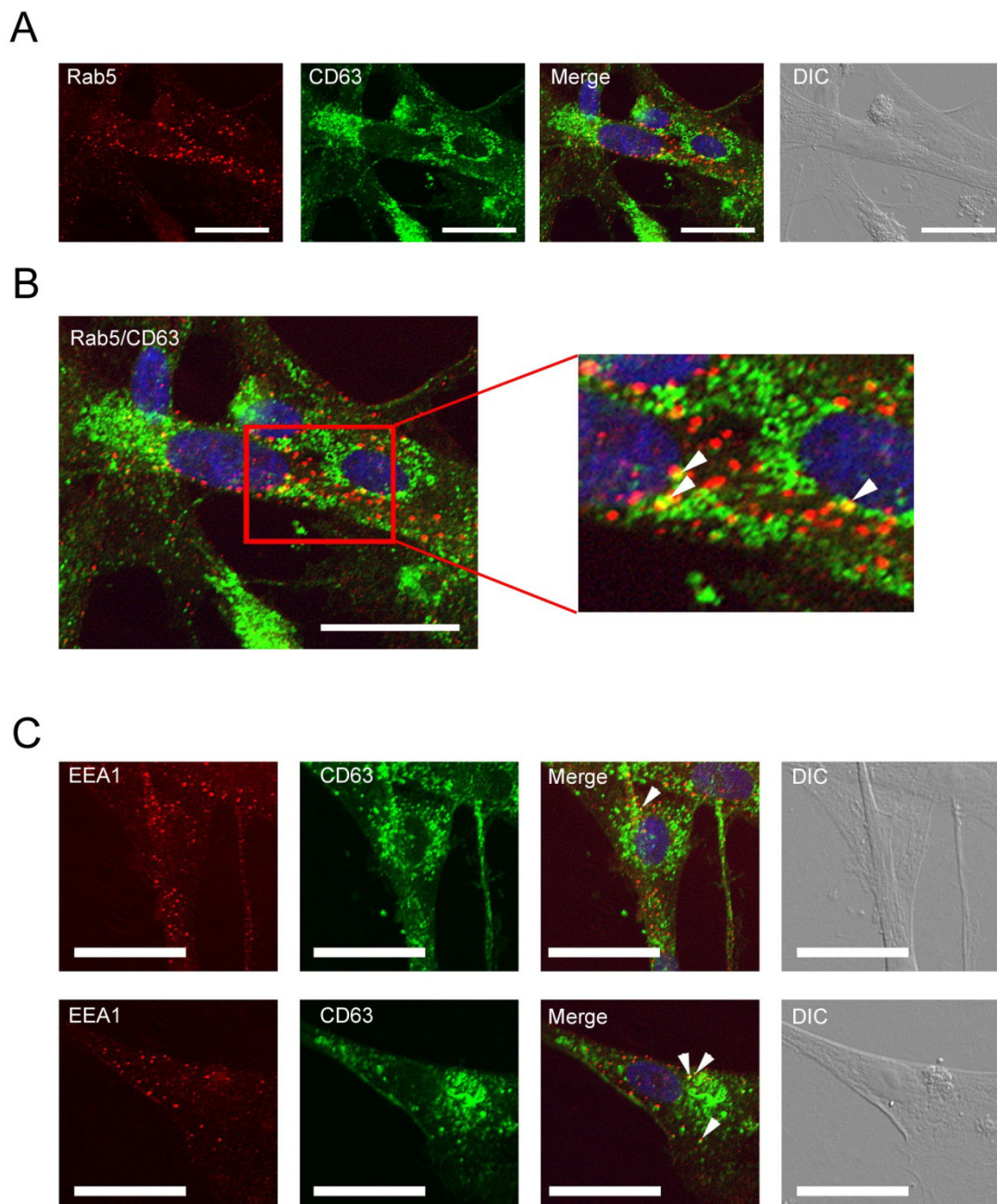


Abbildung 15: IF-Doppelfärbung früher und später endosomaler Proteine in MSZ.

A) Als früher endosomaler Marker wurde Rab5 und als später endosomaler Marker CD63 mit spezifischen Antikörpern angefärbt. B) Ausschnitt aus den überlagerten Bildern (Merge) zeigt die partielle Ko-Lokalisation, welche durch Pfeile gekennzeichnet ist. C) Doppelfärbung mit Antikörpern gegen EEA1 (frühe Endosomen) und CD63 (späte Endosomen). Partielle Ko-Lokalisation der Markerproteine ist durch Pfeile gekennzeichnet. Maßstabsbalken 20 µm. Objektiv *Plan-Apochromat* 20x/1.0 DIC.

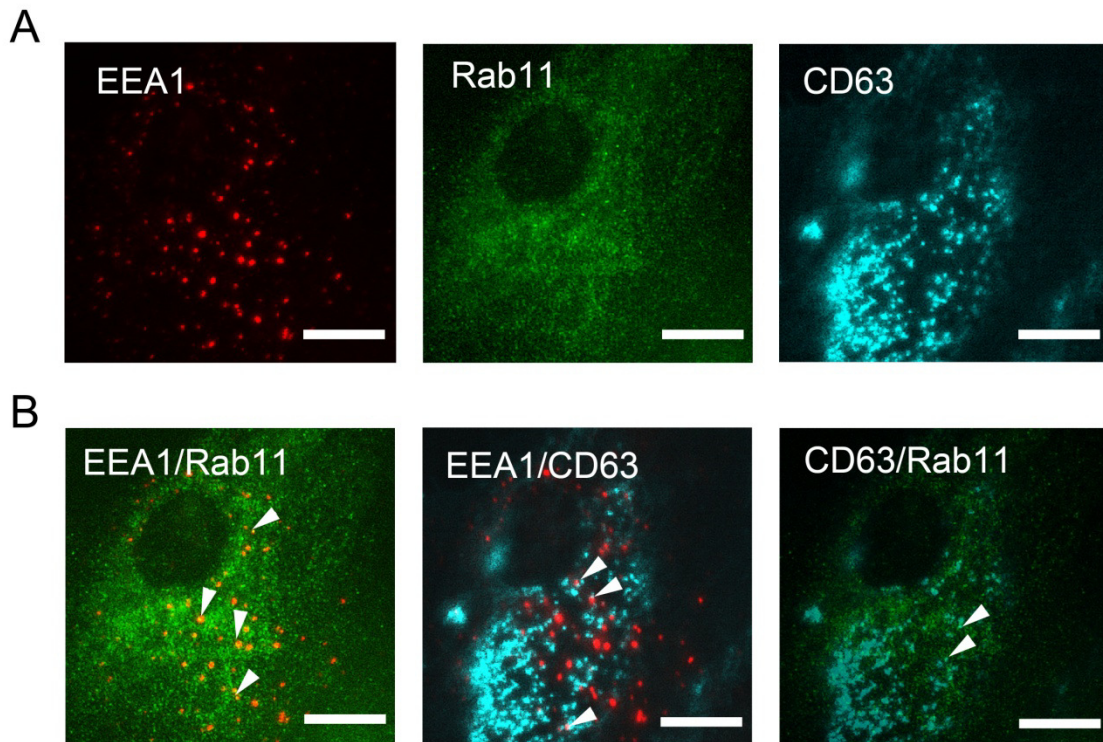


Abbildung 16: IF-Dreifachfärbung früher, später und Recycling Endosomen in MSZ
 A) Färbungen mit Antikörpern gegen EEA1 (frühes endosomales Protein), Rab11 (Recycling Endosomen) und CD63 (spätes endosomales Protein). B) Ausschnitt aus (A) mit Einzelbildern und Überlagerungsbildern (Merge) der einzelnen Fluoreszenzkanäle. Maßstabsbalken 20 µm. Objektiv *Plan-Apochromat* 20x/1.0 DIC.

3.1.4. Subzelluläre Organisation von Endosomen in CD34⁺Zellen

Frisch isolierte CD34⁺ Zellen sind relativ klein (5-7 µm) und fast vollständig rund. Sie besitzen im Vergleich zu ihrem Kernvolumen wenig Zytoplasma und weisen keine morphologische Zellpolarisierung auf (Giebel *et al.*, 2004). Durch die erfolgte Kultivierung in Gegenwart von Zytokinen (FLT3L, TPO, SCF) polarisierten die CD34⁺ Zellen morphologisch und nahmen innerhalb der ersten 60 Stunden an Größe zu (ca. 15 µm) (Abbildung 17). Aufgrund der zuvor genannten Zellcharakteristika *in vitro* wurden für die Beschreibung der Organisation endosomaler Kompartimente CD34⁺ Zellen verwendet, die zuvor für 50-60 h in Gegenwart von Zytokinen (FLT3L, TPO, SCF) kultiviert wurden.

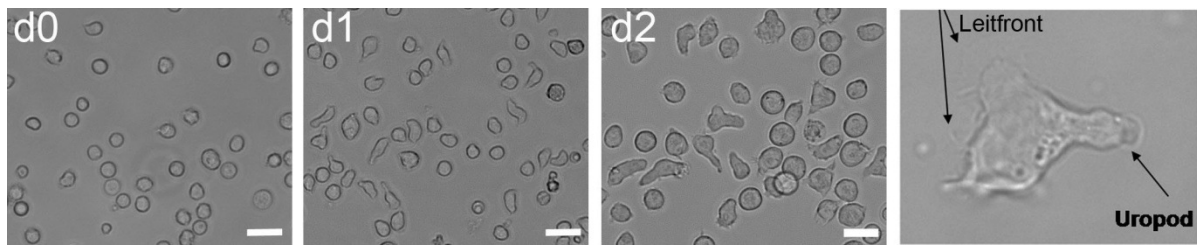


Abbildung 17: Morphologische Zellpolarisierung von CD34⁺ Zellen während der Kultivierung

A) CD34⁺ Zellen frisch nach Isolation aus dem Nabelschnurblut (d0), nach 16-24h (d1) und 50-60h (d2) Kultivierung in Gegenwart von SCF, TPO und FLT3L. B) Vergrößerung einer einzelnen morphologisch polarisierten CD34⁺ Zelle nach 50-60h der Kultivierung. Es sind die Leitfront und der Uropod zu erkennen.

Für die Beschreibung der endosomalen Kompartimente wurden die Zellen mit Antikörper gegen Rab5, Clathrin, EEA1, Rab11, CD107a, CD63 und Rab7 (Abbildung 18; Abbildung 19; Abbildung 20) sowie Antikörper gegen CD71 (Abbildung 19) und α -Adaptin (Abbildung 18) immunfluoreszent gefärbt. In Analogie zu den IF-Färbungen an MSZ wurden zunächst Einzelfärbungen mit den Antikörpern durchgeführt. In diesen Färbungen ließ sich erkennen, dass die frühen endosomalen Markerproteine Rab5, Clathrin, EEA1 und α -Adaptin an der Basis und in der Spitze des Uropoden von CD34⁺ Zellen angereichert sind (Abbildung 18). Rab11- oder CD71-positive Endosomen befinden sich vorwiegend in der Basis des Uropoden und im perinukleären Bereich der Zellen. Außerdem besitzt CD71 wie erwartet zusätzlich einen prominenten Plasmamembrananteil (Abbildung 19). Der Hauptteil der für die verschiedenen Markerproteine positiven Endosomen befand sich an der Basis des Uropoden nahe dem Zellkern angereichert (Abbildung 19).

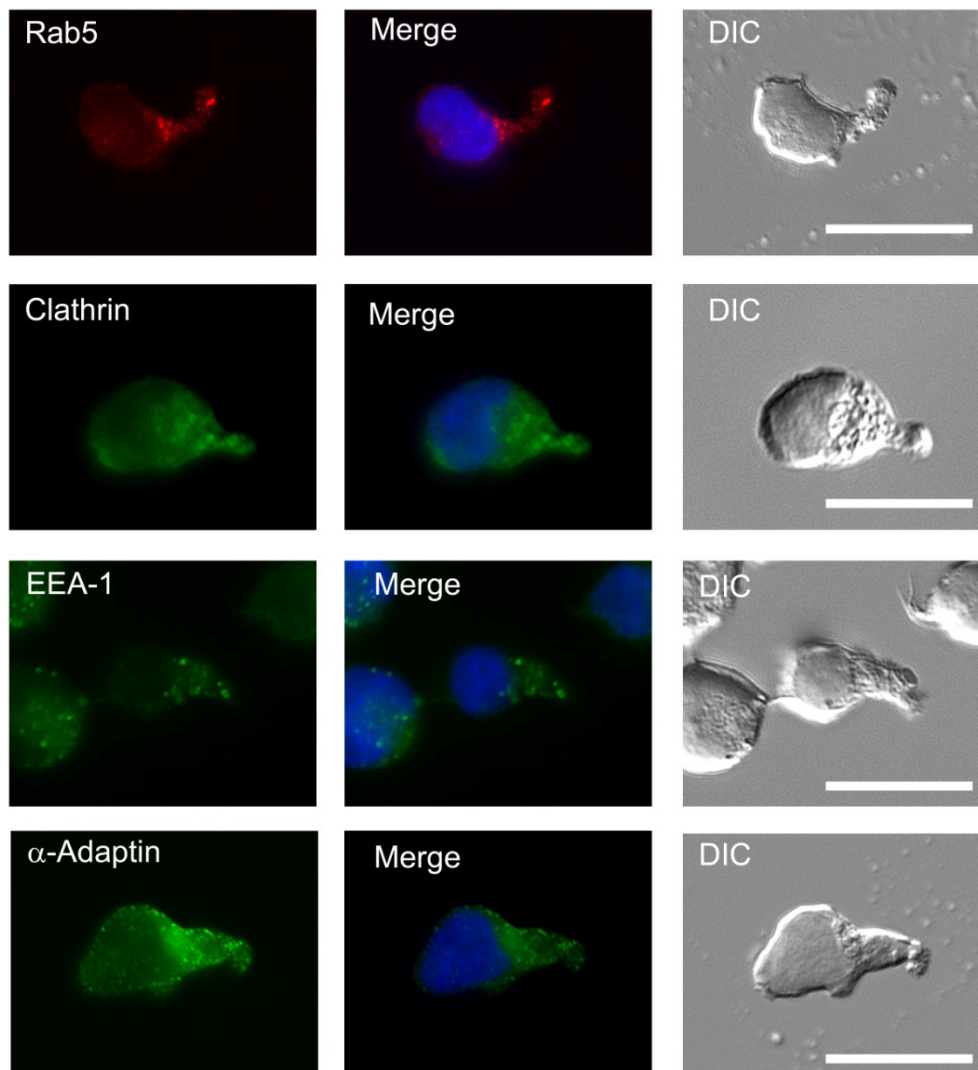


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbungen früher endosomaler Proteine in CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden nach 50-60 Stunden Kultivierung mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen frühe endosomale Proteine angefärbt. Als frühe endosomale Markerproteine wurden Clathrin, Rab5, EEA-1 und α-Adaptin verwendet. Maßstabsbalken 10 µm. Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40* Oil DIC.

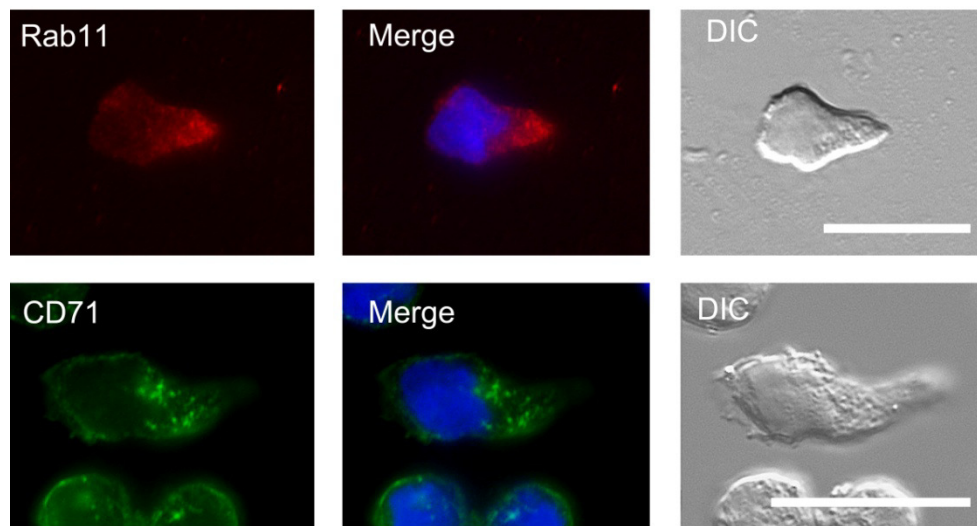


Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Färbungen endosomaler Kompartimente in CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden nach 50-60 Stunden Kultivierung mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Markerproteine von Recycling Endosomen angefärbt. Als Markerproteine für Recycling Endosomen wurden Rab11 und CD71 verwendet. Maßstabsbalken 10 µm. Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

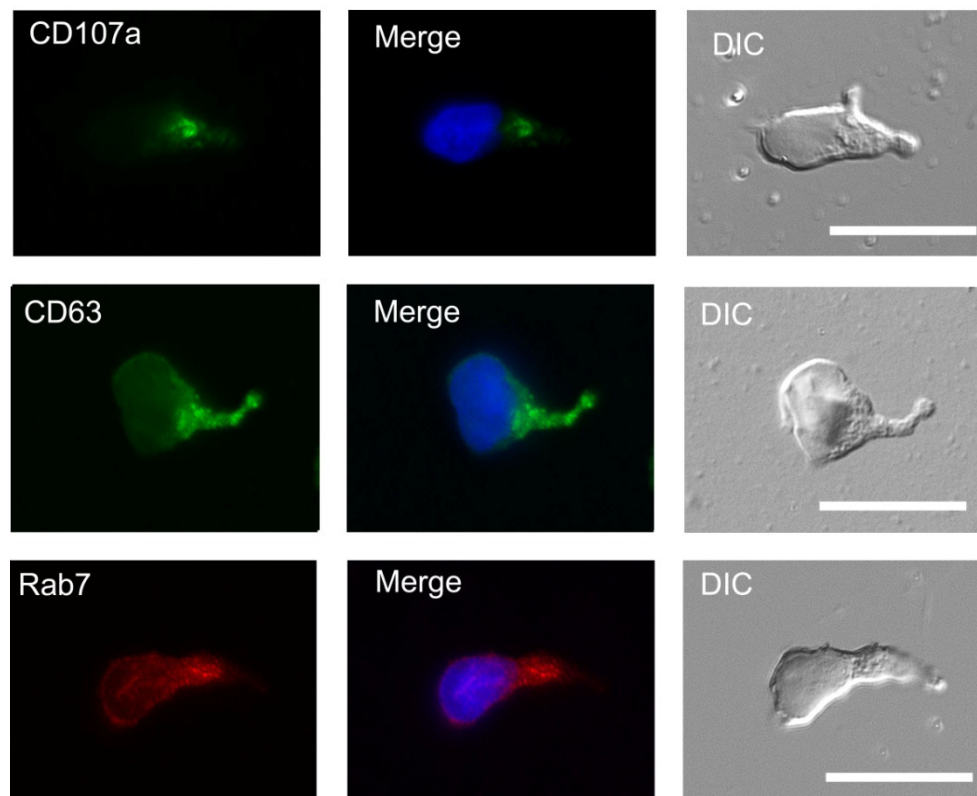


Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Färbungen später endosomaler Markerproteine in CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden nach 50-60 Stunden Kultivierung mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen späte endosomale und lysosomale Proteine angefärbt. Als späte endosomale und lysosomale Markerproteine wurden CD107a, CD63 und Rab7 mit entsprechenden Primärantikörpern sichtbar gemacht. Maßstabsbalken 10 µm. Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

Immunfluoreszenz-Färbungen gegen späte endosomale und lysosomale Proteine (Rab7, CD63 und CD107a) ließen erkennen, dass Rab7 in der Basis des Uropoden in tubulär geformten Vesikeln lokalisiert war (Abbildung 20). CD63 war in dicht beieinander liegenden Vesikelstrukturen von der Basis des Uropoden bis in den Hals des Uropoden angereichert (Abbildung 20). Eine ähnlich dichte Anordnung der Vesikel zeigte auch CD107a in den HSVZ. CD107a-positive Vesikel waren in der Uropodbasis angereichert (Abbildung 20). Die Immunfluoreszenz-Färbungen der frühen, späten und Recycling Endosomenmarker in HSVZ zeigte, dass sich die einzelnen Vesikelstrukturen teilweise in Größe und Form unterschieden. Optisch ließen sich Unterschiede in der subzellulären Verteilung und Größe in den Einzelfärbungen von der frühen endosomalen Marker Rab5, Clathrin, EEA1 und α -Adaptin im Vergleich zu späten endosomalen Proteinen wie CD63 und CD107a erkennen. Frühe Endosomenmarker (Rab5, Clathrin, EEA1 und α -Adaptin) waren von der perinukleären Region bis in die Spitze des Uropoden und vereinzelt in der *Leading edge* zu finden (Abbildung 18). Die markierten Vesikel ließen keine Zusammenlagerung in einer bestimmten Region erkennen (Abbildung 18). Späte endosomale Markerproteine (CD107a, CD63 und Rab7) fanden sich wie zuvor erwähnt in der perinukleären Region lokalisiert (Abbildung 20). Außerdem zeigte sich in Immunfluoreszenz-Färbungen von CD63 und CD107a eine enge Zusammenlagerung von Vesikeln. Bei CD63 verteilten sich diese häufig von der Basis des Uropoden bis in dessen Spitze (Abbildung 20).

Zur spezifischeren Beschreibung der subzellulären Organisation in HSVZ wurden im Weiteren Doppelfärbungen durchgeführt, um die räumliche Trennung der frühen und späten Endosomen in HSVZ zu untersuchen. Es wurden Doppelfärbungen gegen Rab5/EEA1, EEA1/CD63, Rab5/CD63, Rab7/CD107a und Rab7/CD63 durchgeführt (Abbildung 21). Aus diesen war zu erkennen, dass die frühen endosomalen Marker Rab5 und EEA1 in HSVZ meist auf den gleichen Kompartimenten zu finden sind (Abbildung 21). Frühe und späte endosomale Marker (Rab5/CD63 und EEA1/CD63) sind wie zuvor bei den MSZ weitestgehend räumlich von einander getrennt (Abbildung 21). Wie bei den MSZ beschrieben finden sich auch hier vereinzelt Vesikel, die doppelt positiv für beide Marker (Rab5/CD63 und EEA1/CD63) sind (Abbildung 21). Die Doppelfärbungen der späten endosomalen Markerproteine Rab7/CD107a und Rab7/CD63 zeigten, dass Rab7 und CD107a weitestgehend

kolokalisieren, wohingegen Rab7 und CD63 nur partiell eine Ko- bzw. benachbarte Lokalisation aufweisen (Abbildung 21).

Um in den HSVZ die Größe der frühen und späten Endosomen spezifisch beurteilen zu können, wurden in Analogie zu den Versuchen mit MSZ die Rab5-, EEA1- und CD63-positiven Vesikel in HSVZ vermessen. Aufgrund der höheren Hintergrundfärbung, des geringeren Kontrastes und der begrenzten mikroskopischen Auflösung, konnten Vesikel von Rab11-immunfluoreszenten Färbungen für die Vermessungen nicht verwendet werden. Für die Bestimmung des Vesikeldurchmessers in HSVZ wurden je 3-5 Vesikel in 4-7 Zellen vermessen. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den in MSZ analysierten Endosomen, dass die EEA1- und Rab5-positiven Vesikel mit $0,55 \pm 0,14 \mu\text{m}$ (EEA1) und $0,53 \pm 0,15 \mu\text{m}$ (Rab5) durchschnittlich einen kleiner Durchmesser besitzen als die Rab7- und CD63-positiven Vesikel mit $0,74 \pm 0,26 \mu\text{m}$ (Rab7) und $0,82 \pm 0,17 \mu\text{m}$ (CD63) (Anhang: Tabelle 51).

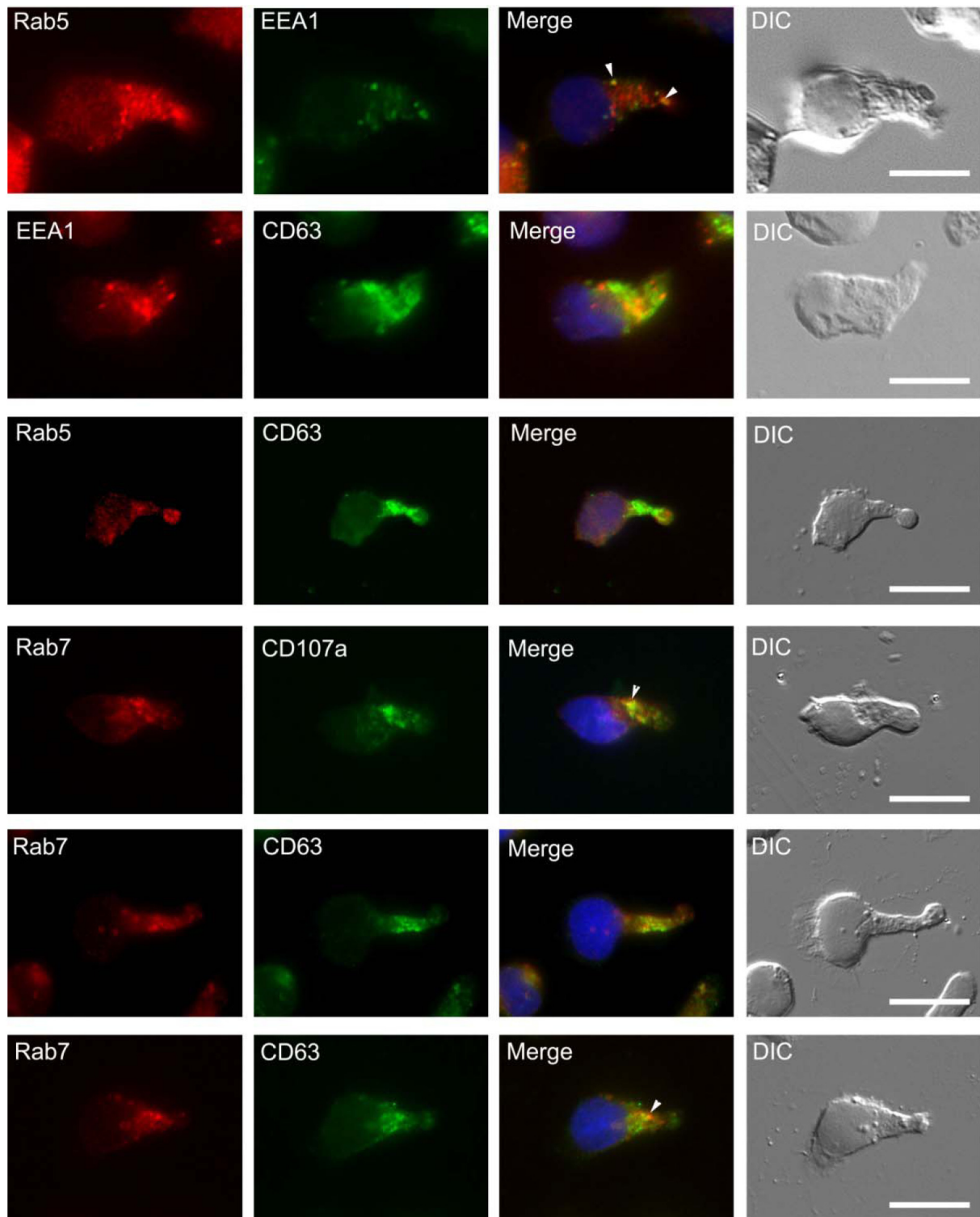


Abbildung 21: Immunfluoreszente Doppelfärbungen von endosomalen Proteinen in CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden 50-60 h kultiviert und mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen verschiedene endosomale Proteine gefärbt. Es wurden Antikörper gegen frühe endosomale Marker Rab5 und EEA1 sowie späte endosomale Proteine CD63, CD107a und Rab7 verwendet. Maßstabsbalken 5 μ m. Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

Die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenz-Färbungen gegen frühe, späte endosomale und lysosomale Markerproteine, wie Rab5, EEA1, Rab7, CD63 und

CD107a deuten an, dass frühe und späte endosomale Kompartimentsmarker in HSVZ meist getrennt voneinander in den Zellen lokalisiert sind. Nur vereinzelt finden sich Endosomen, die sowohl für frühe (EEA1; Rab5) als auch späte (CD63) endosomale Proteine positiv sind. Außerdem zeigten die Vesikelvermessungen, dass Vesikel die für frühe oder späte endosomalen Proteinen positiv sind unterschiedliche Größen in CD34⁺ Zellen aufweisen (Abbildung 21). Die hier beschriebenen Verteilungsmuster der verschiedenen Markerproteine entsprechen mit Ausnahme der Vesikeldurchmesser den Erkenntnissen aus den MSZ. Ferner finden sich ähnliche Verteilungsmuster der Endosomen die positiv für diese Markerproteine sind in anderen Zellen, wie HeLa, BHK und HEK293 (Parton *et al.*, 1992, Bucci *et al.*, 1994, Callaghan *et al.*, 1999, Bucci *et al.*, 2000, McCaffrey *et al.*, 2001). Daher ist anzunehmen, dass das endosomale System und somit frühe, späte und Recycling-Endosomen und Lysosomen in HSVZ ebenso wie in anderen Säugerzellen organisiert sind. Diese Erstbeschreibung der endosomalen Organisation in CD34⁺ Zellen diente im Weiteren als Orientierung für die folgende genetische Manipulation der endosomalen Maschinerie mittels lentiviral vermittelter ektooper Expression von eGFP-Rab-GTPase Konstrukten.

3.2. Genetische Manipulation des endosomalen Systems

Wie unter Abschnitt 1.3 der Einleitung beschrieben sind Rab-GTPasen Schlüsselproteine bei der Regulation des intrazellulären Vesikelsystems und stellen gute Angriffspunkte für die Manipulation des endosomalen Systems von Zellen dar. Die Funktion von Rab-GTPasen lässt sich durch das Einführen von Punktmutationen gezielt beeinflussen: Bestimmte Aminosäuresubstitutionen in der GTP-bindenden Domäne können Rab-GTPasen in konstitutiv-aktive oder dominant-negative Varianten verwandeln (Abschnitt 1.3.2). In Abhängigkeit der jeweils verwendeten Rab-GTPasen und ihrer spezifischen Funktion können über solche mutanten Formen selektiv endosomale Wege gestört und so deren Bedeutung für biologische Prozesse einer Zelle ermittelt werden (Stenmark *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1998, Ren *et al.*, 1998, Bucci *et al.*, 2000, Wegner *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, Rab-GTPasen, die frühe (Rab5, Rab21), späte (Rab7) und Recycling-(Rab11) endosomale Transportwege regulieren, genetisch zu manipulieren und anschließend Effekte auf die subzelluläre Organisation, Zellbiologie und Zellschicksalsspezifikation von HSVZ zu analysieren. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die genetische Manipulation durch

virale Transduktion effizienter und schonender für CD34⁺ Zellen ist (von Levetzow, 2008), als die zuvor verwendete Methodik der Nukleofektion, mit der sich CD34⁺ Zellen gut transfizieren lassen (von Levetzow *et al.*, 2006). Demnach wurden als erstes lentivirale Plasmide generiert, die dominant-negative (DN), konstitutiv-aktive (CA) und wildtypische (WT) Proteine von Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 kodieren.

3.2.1. Klonierung und Konstruktion von eGFP-Rab-Konstrukten

Als Ausgangsmaterial zur Generierung der verschiedenen Konstrukte wurden uns die kodierenden Regionen der wildtypischen (WT) humanen Rab-GTPasen (Rab5A, Rab7A und Rab21) sowie die DN- und CA-Varianten für Rab5 und Rab21 als eGFP-Fusionsprotein kodierende cDNA von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt (Tabelle 30). Bei den in dieser Arbeit verwendeten cDNAs des wildtypischen (WT) Rab11A und der DN- und CA-Varianten handelt es sich, um die Homologe aus *Canis lupus familiaris*. Die cDNA-Sequenz von Rab11A WT (*Canis lupus familiaris*) stimmt zu 96,3% mit der humanen cDNA-Sequenz von Rab11A WT überein (siehe Anhang, Abbildung 61). Dabei haben die Unterschiede in der DNA-Sequenz laut Sequenzalignment keine Änderung in der Aminosäuresequenz von Rab11A zur Folge, weshalb anzunehmen ist, dass das Rab11A-Homolog aus *Canis lupus familiaris* die gleiche Funktion in humanen Zellen ausübt wie das humane Homolog (siehe Anhang, Abbildung 62). Die mutierten cDNA-Varianten von Rab7 (T22N; DN und Q67L; CA) wurden durch Seiten-gerichtete Mutagenese im Rahmen dieser Arbeit generiert. Hierfür diente die das wildtypische Rab7 kodierende DNA als *Template*. Wie unter Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben wurden die Punktmutationen mittels PCR und spezifischer Oligonukleotide in die Rab7-DNA-Sequenz eingebracht. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den pBSK-Vektor über *blunt-end* Ligation eingebracht und sequenziert. Durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *AgeI/NotI* wurden die eGFP-Rab7-Varianten aus den jeweiligen Vektoren ausgeschnitten und in den ebenfalls über diese Restriktionsschnittstellen geöffneten pCL7EGwo-Vektor ligiert. Die Einbringung der DNA-Sequenzen der eGFP-Fusionskonstrukte von Rab5WT, Rab5 S34N (DN), Rab5Q79L (CA), Rab11WT, Rab11S25N (DN), Rab11Q70L (CA), Rab21WT, Rab21T33N (DN) und Rab21QL (CA) wurden wie unter Abschnitt 2.2.4 mittels Restriktionsverdau und Ligation in die lentiviralen Vektoren pCL7EGwo (Rab5, Rab7 und Rab21) und pCL6IEGwo (Rab11)

überführt. Die generierten lentiviralen Expressionsplasmide wurden in Bakterien vermehrt und die DNA-Sequenzen mittels Sequenzierung vollständig überprüft.

Tabelle 30: Funktionelle Varianten der Rab-GTPasen.

Rab-GTPase	Mutation	Funktion	Herkunft
Rab5WT	Keine	Wildtypisches Protein Isoform Rab5A	Marino Zerial
Rab5DN	S34N	Dominant-negativ	Marino Zerial
Rab5CA	Q79L	Konstitutiv-aktiv	Marino Zerial
Rab7WT	Keine	Wildtypisches Protein Isoform Rab7A	Marino Zerial
Rab7DN	T22N	Dominant-negativ	Diese Arbeit
Rab7CA	Q67L	Konstitutiv-aktiv	Diese Arbeit
Rab11WT	Keine	Wildtypisches Protein Isoform Rab11A	Marino Zerial
Rab11DN	S25N	Dominant-negativ	Marino Zerial
Rab11CA	Q70L	Konstitutiv-aktiv	Marino Zerial
Rab21WT	Keine	Wildtypisches Protein	Simpson <i>et al.</i> , 2004
Rab21DN	T33N	Dominant-negativ	Simpson <i>et al.</i> , 2004
Rab21CA	Q78L	Konstitutiv-aktiv	Simpson <i>et al.</i> , 2004

Anschließend wurden mit einer von der Arbeitsgruppe um Helmut Hanenberg (Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) adaptierten Methodik infektiöse lentivirale Partikel generiert. Der Beschreibung von Leurs *et al.* (Leurs *et al.*, 2003) entsprechend wurden für die virale Generation ein drei Vektorsystem verwendet. Dieses Vektorsystem basiert auf einem für die gewünschte DNA kodierenden Vektorplasmid, einem Helferplasmid und einem Hüllplasmid. Die verwendeten Vektorplasmide sind die bereits erwähnten pCL6-IEGwo und pCL7-EGwo. Bei dem Helferplasmid handelt es sich um das pCD/NL-BH, das die viralen Strukturgene *gag* und *pol* sowie die regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev* und *tat* kodiert, welche unter der Kontrolle des CMV (humaner Cytomegalie-Virus)-Promotors stehen (Mochizuki *et al.*, 1998). Als Hüllplasmid wurde der Vektor pcoPE verwendet, der unter Regulation des CMV-Promotors das foamyvirale (protoypische Foamyvirus) Hüllprotein kodiert. Die Funktionalität der lentiviralen Partikel und somit der jeweiligen Expressionskassetten wurde zunächst an HEK293T und hämatopoetischen K562 Zellen validiert. Der Einfachheit halber werden die eGFP-Rab-GTPase Konstrukte im

Folgenden als Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 mit der zusätzlichen Abkürzung der jeweiligen Proteinvariante WT, DN oder CA bezeichnet.

3.2.2. Validierung lentiviraler eGFP-Rab-GTPase Konstrukte

Zur Bestimmung des Virustiters wurden virale Partikel in unterschiedlichen Verdünnungen (10^{-3} , 10^{-2} und 10^{-1}) auf HEK293T Zellen gegeben. Nach 24-30 h wurde die Transduktionseffizienz anhand der eGFP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Transduktionseffizienz mit einer mittleren MOI (*multiplicity of infection*) von 0,5, was rechnerisch 50% der transduzierten Zellen entspricht, wurde meist schon mit 0,5-1 μ l des generierten viralem Überstandes an HEK293T erzielt. Die ektop exprimierten eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteine hatten wie zu erwarten eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation die an dieser Stelle aber nicht genauer untersucht wurde.

Um die Reaktivität der eGFP-Rab-GTPase Konstrukte mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen, wurden repräsentativ für hämatopoetische Zellen Suspensionszellen der Zelllinie K562 transduziert und für die verschiedenen eGFP-Rab-GTPasen Fusionsproteine Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 sowie deren Varianten (DN und CA) stabile Zelllinien generiert.

Zellen der generierten K562 Zelllinien wurden mit entsprechenden Antikörpern gegen Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 intrazellulär gefärbt. Die so markierten Zellen wurden mit entsprechenden PE-konjugierten Antikörpern gegengefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch Darstellung der eGFP-Fluoreszenz (Fusionsproteine) gegen die PE-Fluoreszenz wurde untersucht, ob Rab-GTPase exprimierende Zellen auch ein erhöhtes PE-Fluoreszenzsignal zeigten. Bei Überexpression der jeweiligen Rab-GTPasen sollte das PE-Signal mit erhöhter eGFP-Fluoreszenz der transduzierten Zellen ebenfalls ansteigen.

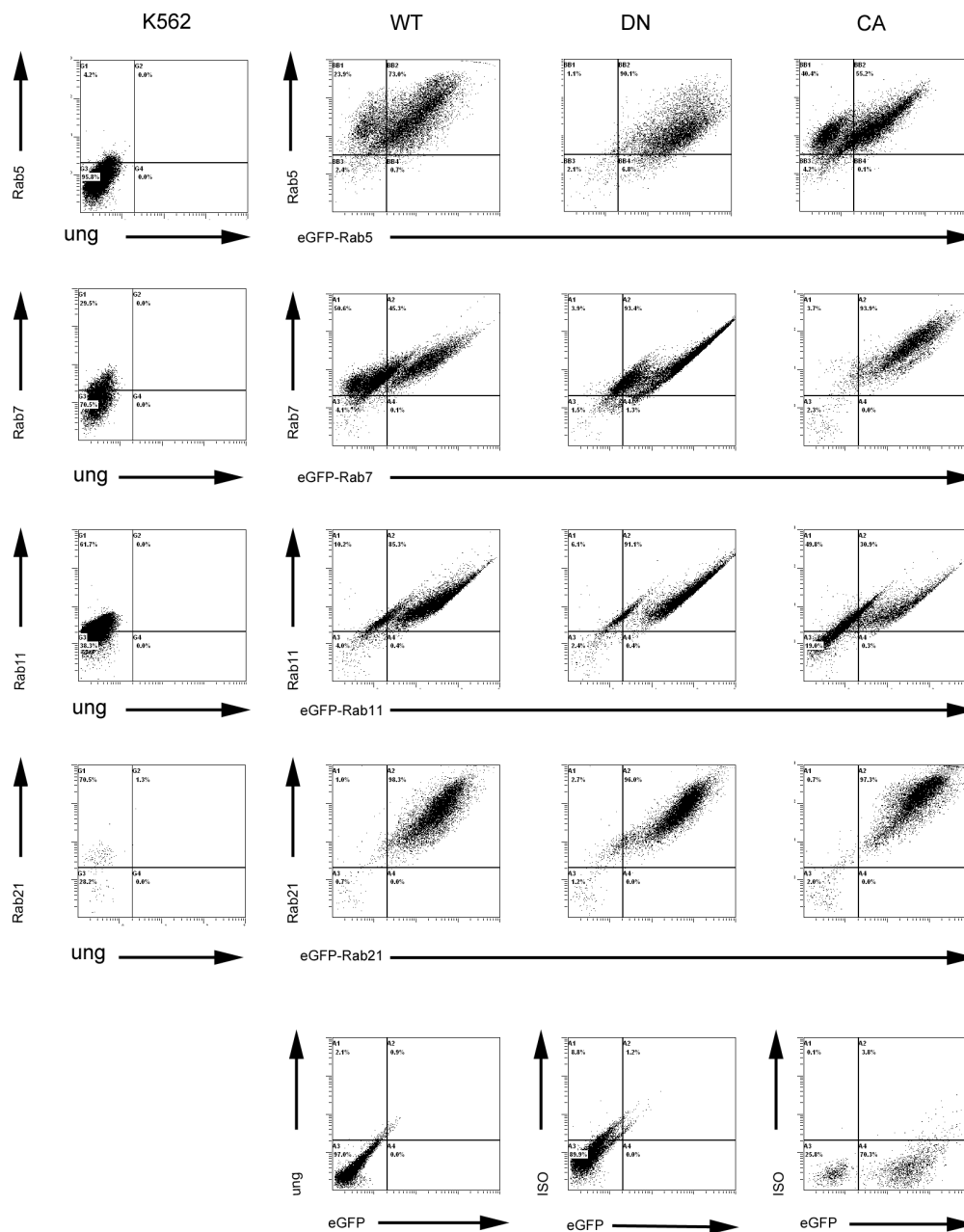


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Validierung lentiviraler Expressionskonstrukte nach intrazellulärer Rab-Färbung

Darstellung durchflusszytometrischer Messungen von K562 Zellen nach Transduktion verschiedener pCL7/eGFP-Rab-Konstrukte (Rab5WT, Rab5DN, Rab5CA, Rab7WT, Rab7DN, Rab7CA, Rab11WT, Rab11DN, Rab11CA, Rab21WT, Rab21DN und Rab21CA). Von oben nach unten sind die Rab-GTPasen (Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21) dargestellt und von links nach rechts die jeweiligen Varianten (WT, DN, CA). In der letzten Reihe sind die Kontrollen aufgezeigt: ungefärbte nicht transduzierte K562 Zellen und mit Isotyp und sekundärem Antikörper gefärbte nicht transduzierte und transduzierte K562 Zellen.

In allen Analysen zeigte sich, dass wie zu erwarten eine klare Korrelation zwischen eGFP- und PE-Fluoreszenzsignal in allen transduzierten K562-Zelllinien bestand (Abbildung 22). Somit konnte bestätigt werden, dass alle Rab-GTPase-Konstrukte mit den jeweiligen Antikörpern reagierten. Dies ließ darauf schließen, dass die

hergestellten viralen Partikel funktionsfähig waren und die so in die Zellen eingebrachten cDNA der eGFP-Rab-Konstrukte korrekt exprimiert wurden.

3.2.3. Ektope Expression und phänotypische Beschreibung der eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteine in humanen MSZ

Um die subzelluläre Lokalisation der eGFP-Rab-GTPasen und ihre Auswirkung auf die endosomale Organisation der Vesikelkompartimente zu untersuchen, wurden zunächst MSZ mit den generierten lentiviralen Überständen transduziert. Wie bereits unter Abschnitt 3.1 beschrieben kann die Organisation des endosomalen Systems in MSZ deutlich einfacher beschrieben werden als in hämatopoetischen Suspensionszellen (CD34⁺Zellen). Aufgrund von Erfahrungswerten wurde für die Transduktionen der MSZ die 2-3-fache Konzentration an Virusüberstand verwendet, die nach Titration an HEK293T Zellen zu einer Transduktionseffizienz von 50% der HEK293T führten. 50-60 h nach Transduktion ließ sich die erste eGFP-Expression in den Zellen erkennen. Die MSZ wurden nach dieser Zeit zunächst mikroskopisch und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. In den ersten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ließ sich erkennen, dass die verwendeten MSZ mit allen generierten viralen Partikeln transduziert werden konnten. Ferner wurden keine erkennbaren Unterschiede in der Morphologie transduzierter und nicht-transduzierter Zellen festgestellt. In durchflusszytometrischen Messungen dreier unabhängiger MSZ-Linien wurde die mittlere Transduktionseffizienz anhand der eGFP-Expression bestimmt (**Tabelle 31**). Dabei wurden tote Zellen mittels Propidiumiodid Färbung aus der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 31: Transduktionseffizienz an MSZ

Transduktionseffizienz In %	V1	V2	V3	MW	Stabw
eGFP	63,7	17,4	30	37,03	23,94
Rab5WT	70,3	83,6	30	61,30	27,91
Rab5DN	87,9	86,2	67	80,37	11,61
Rab5CA	71,3	18,5	52	47,27	26,72
Rab7WT	64,5	17,9	36,1	39,50	23,49
Rab7DN	44,8	20,4	25	30,07	12,97
Rab7CA	45	35,5	43	41,17	5,01
Rab11WT	13,5	28	48	29,83	17,32
Rab11DN	57,9	35	30	40,97	14,88
Rab11CA	70,5	62	41	57,83	15,18
Rab21WT	35,5	17,4	n.b.	26,45	12,80
Rab21DN	5	26	28	19,67	12,74
Rab21CA	41	35	63	46,33	14,74

Alle Werte repräsentieren den prozentualen Anteil eGFP-positiver MSZ nach 50-60h Kultivierung. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmt

Zur Weiteren Untersuchung der subzelluläre Verteilung der eGFP-Rab-GTPasen in MSZ wurden 72-90 h nach lentiviraler Transduktion fluoreszenzmikroskopische Analysen an lebenden Zellen durchgeführt. Der endogenen Verteilung von Rab5 an fixierten, nicht transduzierten MSZ entsprechend (Abschnitt 3.1.3; Abbildung 13) waren eGFP-Rab5WT Proteine in Vesikelstrukturen im perinukleären Bereich als auch in der Zellperipherie verteilt zu erkennen. In der perinukleären Region fanden sich sowohl eGFP-Rab5 Proteine an vesikulären Strukturen assoziiert als auch diffus im Zytoplasma verteilt (Abbildung 23; Abbildung 27). Eine Anreicherung der eGFP-Rab5 vesikulären Strukturen war besonders im perinukleären Bereich der Zellen, in den Zellausläufern und in Zell-Zellkontaktregionen zu erkennen (Abbildung 23). Hierbei ließ sich feststellen, dass die Vesikel in der perinukleären Region größer waren als in der Zellperipherie (Abbildung 23). Im Gegensatz zu Rab5WT, war die dominant-negative Variante von Rab5 (Rab5DN) mit keinen vesikulären Strukturen in MSZ assoziiert. Es wies nur eine diffuse Verteilung über das Zytoplasma der Zellen auf, mit einer Anreicherung in der perinukleären Region (Abbildung 23). In MSZ, die Rab5CA exprimierten, waren große vakuolenartige Vesikelstrukturen zu erkennen an denen das Fusionsprotein zu finden war (Abbildung 23). Eine zytosolische Lokalisation von Rab5CA konnte nicht beobachtet werden. Die markierten vesikulären Strukturen waren hingegen größer als in MSZ, die Rab5WT exprimierten (Abbildung 23). Ferner zeigte die subzelluläre Verteilung der Rab5CA markierten Vesikel eine Anreicherung im perinukleären Bereich und in den Zellausläufern der

MSZ (Abbildung 23). Die Expression von Rab7WT in MSZ zeigte eine vesikuläre und zytosolische Verteilung des eGFP-Fusionsproteins. Beide Verteilungsmuster des

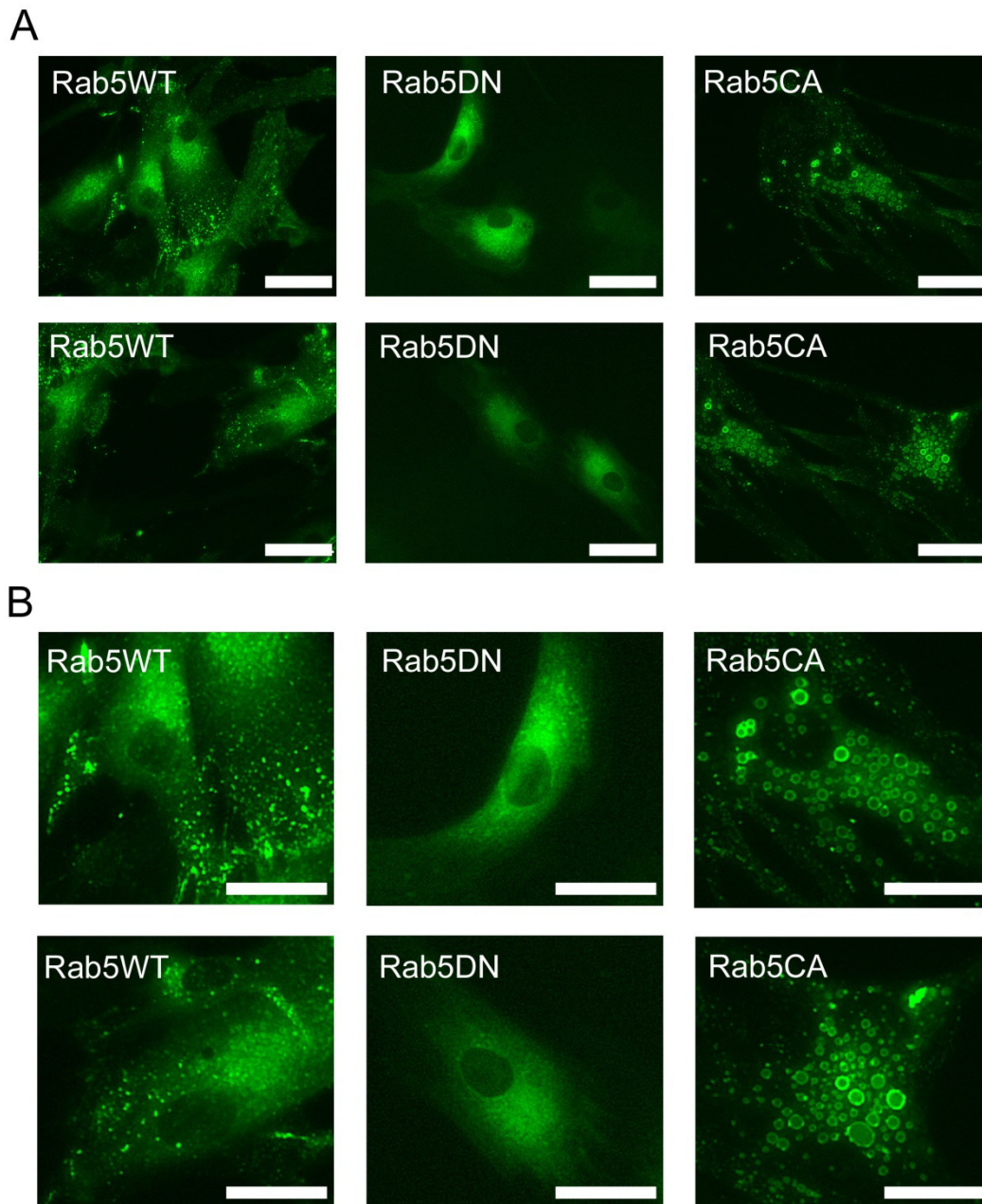


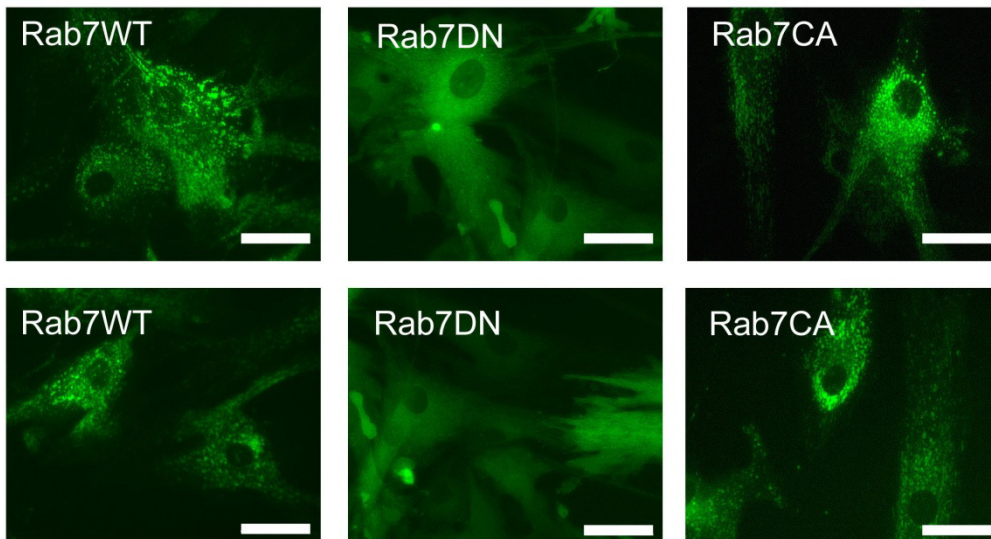
Abbildung 23: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab5-Varianten in MSZ

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden MSZ, die Rab5WT, Rab5DN und Rab5CA ektop exprimieren. B) Ausschnitte einzelner Zellen zeigen die perinukleäre Region mit vesikulärer und zytosolischer Verteilung der Rab5-Varianten. Maßstabsbalken 50 μm , aufgenommen mit Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

Proteins (vesikulär und zytosolisch) waren in der perinukleären Region der Zellen verstärkt angereichert (Abbildung 24; Abbildung 27). Meist wiesen Rab7WT markierten Vesikelstrukturen eine tubuläre Form auf und waren eng gepackt. Die Verteilung und Form der Rab7WT-Vesikel entsprach in etwa der von endogenen Rab7-Vesikeln in nicht transduzierten Zellen (Abbildung 27). In MSZ, die Rab7DN

exprimierten, ließ sich keine spezifische Assoziation der eGFP-Rab7DN Proteine an vesikuläre Struktur erkennen. Die Fusionsproteine waren diffus über das Zytoplasma der Zellen verteilt, mit einer Anreicherung im perinukleären Bereich (Abbildung 24).

A



B

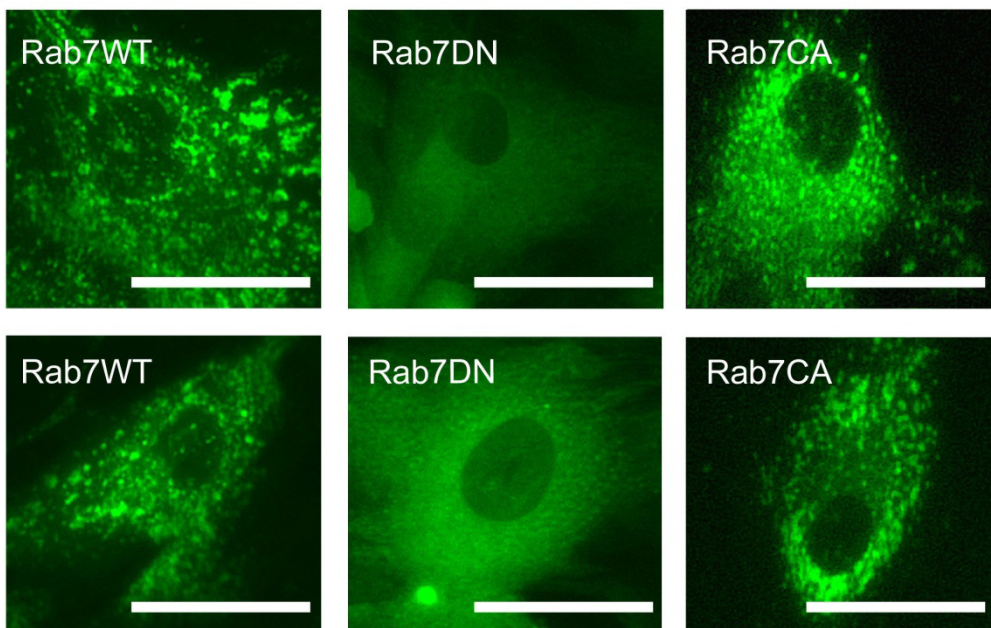


Abbildung 24: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab7-Varianten in MSZ

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden MSZ die Rab7WT, Rab7DN und Rab7CA ektop exprimieren. B) Ausschnitte einzelner Zellen zeigen die perinukleäre Region mit vesikulärer und zytosolischer Verteilung der Rab7-Varianten. Maßstabsbalken 50 μ m aufgenommen mit Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

Rab7CA zeigte eine perinukleäre Verteilung von eng benachbarten tubulären Vesikeln (Abbildung 24). Des Weiteren wiesen die untersuchten Rab7CA exprimierenden MSZ vergrößerte Vesikelstrukturen auf als Rab7WT exprimierende MSZ (Abbildung 24). Die subzelluläre Verteilung von Rab11WT ließ tubuläre

Vesikelstrukturen vom perinukleären Bereich der Zellen bis in die Zellperipherie erkennen. Die in der Peripherie befindlichen Vesikel waren größer als die in der perinukleären Region der MSZ (Abbildung 25). Diese Lokalisation von Rab11WT entsprach in etwa der von Rab11 in nicht transduzierten MSZ (Abbildung 25; Abbildung 27). Die dominant-negativen eGFP-Rab11 Fusionsproteine verteilten sich über das Zytoplasma und fanden sich angereichert in der perinukleären Region in einer Netzstruktur (Abbildung 25). Die Expression von Rab11CA hatte eine Akkumulation von Vesikelstrukturen in der perinukleären Region zur Folge. Es ließ sich außerdem eine Verteilung von Vesikeln in der Peripherie erkennen, die kleiner als bei Rab11WT waren (Abbildung 25). Die subzellulären Analysen der Rab21WT Verteilung in den Zellen ließ eine Anreicherung von Vesikeln im perinukleären Bereich sowie eine zum Teil zytosolische Proteinverteilung erkennen. Die Vesikel erstreckten sich bis in die Peripherie, dort waren sie nicht so stark angereichert wie in der perinukleären Region der Zellen (Abbildung 26). Rab21DN zeigte eine Verteilung im Zytosol der Zellen und eine Akkumulation in einer Netzstruktur nahe dem Nukleus (Abbildung 26). Die konstitutiv-aktive Variante von Rab21 lokalisierte in Vesikeln in der perinukleären Region der Zellen, die sich teilweise netzartig akkumulierten (Abbildung 26).

Die verschiedenen Varianten (WT, DN, CA) der Rab-GTPasen (Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21) wiesen alle ein unterschiedliches subzelluläres Verteilungsmuster auf ohne und mit Assoziation zu Vesikelstrukturen. Alle dominant-negativen Varianten der jeweiligen Rab-GTPasen verloren ihre Assoziation zu Vesikelstrukturen und verteilten sich im gesamten Zytoplasma mit einer Anreicherung in der perinukleären Region der Zellen. Rab11DN und Rab21DN akkumulierten zusätzlich in einer Netzstruktur. Die durch die verschiedenen Rab-GTPasen markierten Vesikelstrukturen varrierten in Größe und Form. Es ließ sich erkennen, dass die WT und CA Varianten von Rab5, Rab7 und Rab11 die Größe der durch die Rab-GTPasen markierten Vesikelstrukturen verändern könnten. Die CA-Varianten von Rab5 und Rab7 führten zu einer Vergrößerung der Kompartimente wohingegen Rab11CA eher kleinere Vesikel markierte.

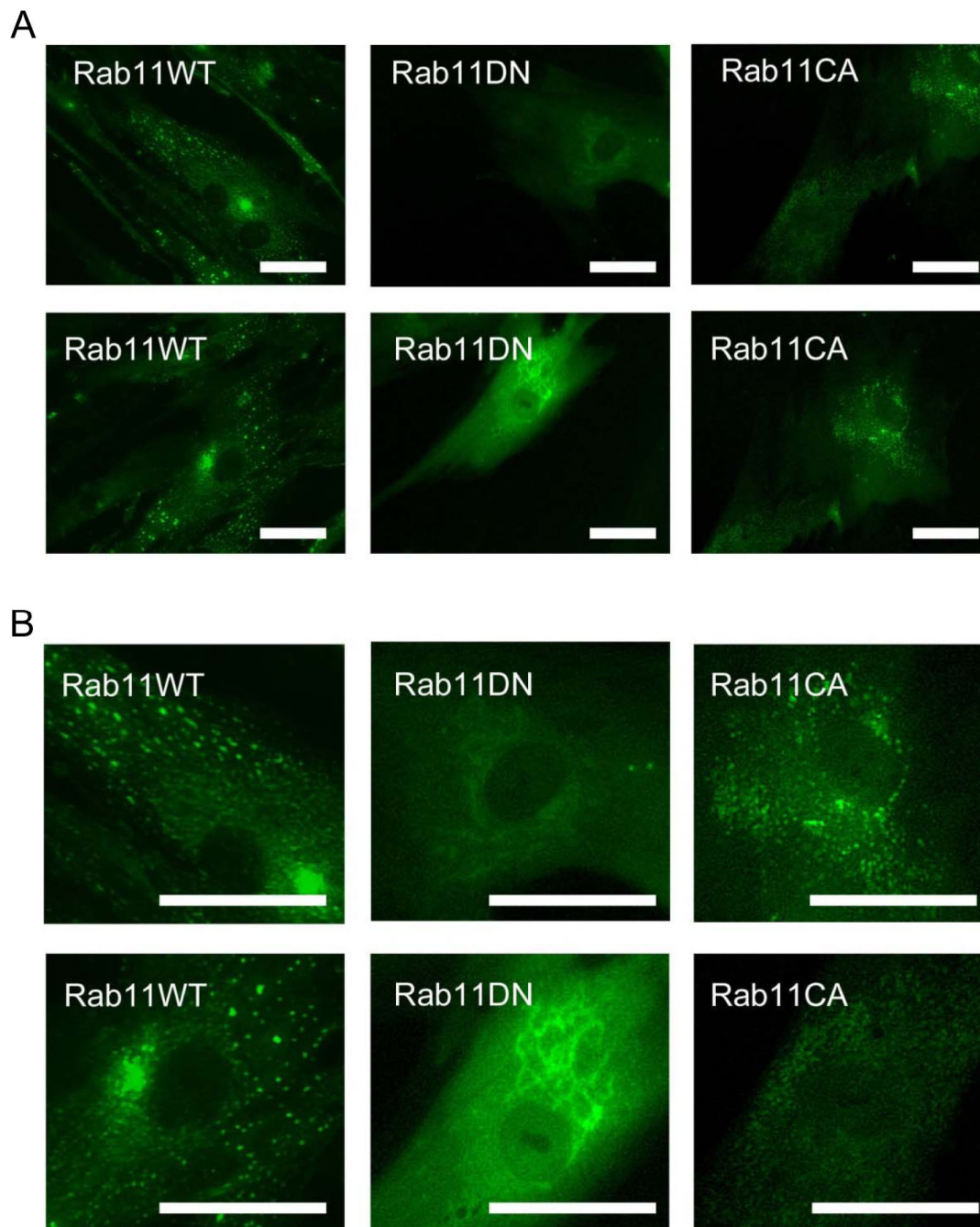


Abbildung 25: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab11-Varianten in MSZ

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden MSZ die Rab11WT, Rab11DN und Rab11CA ektop exprimieren. B) Ausschnitte einzelner Zellen zeigen die perinukleäre Region mit vesikulärer und zytosolischer Verteilung der Rab11-Varianten. Maßstabsbalken 50 μ m aufgenommen mit Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

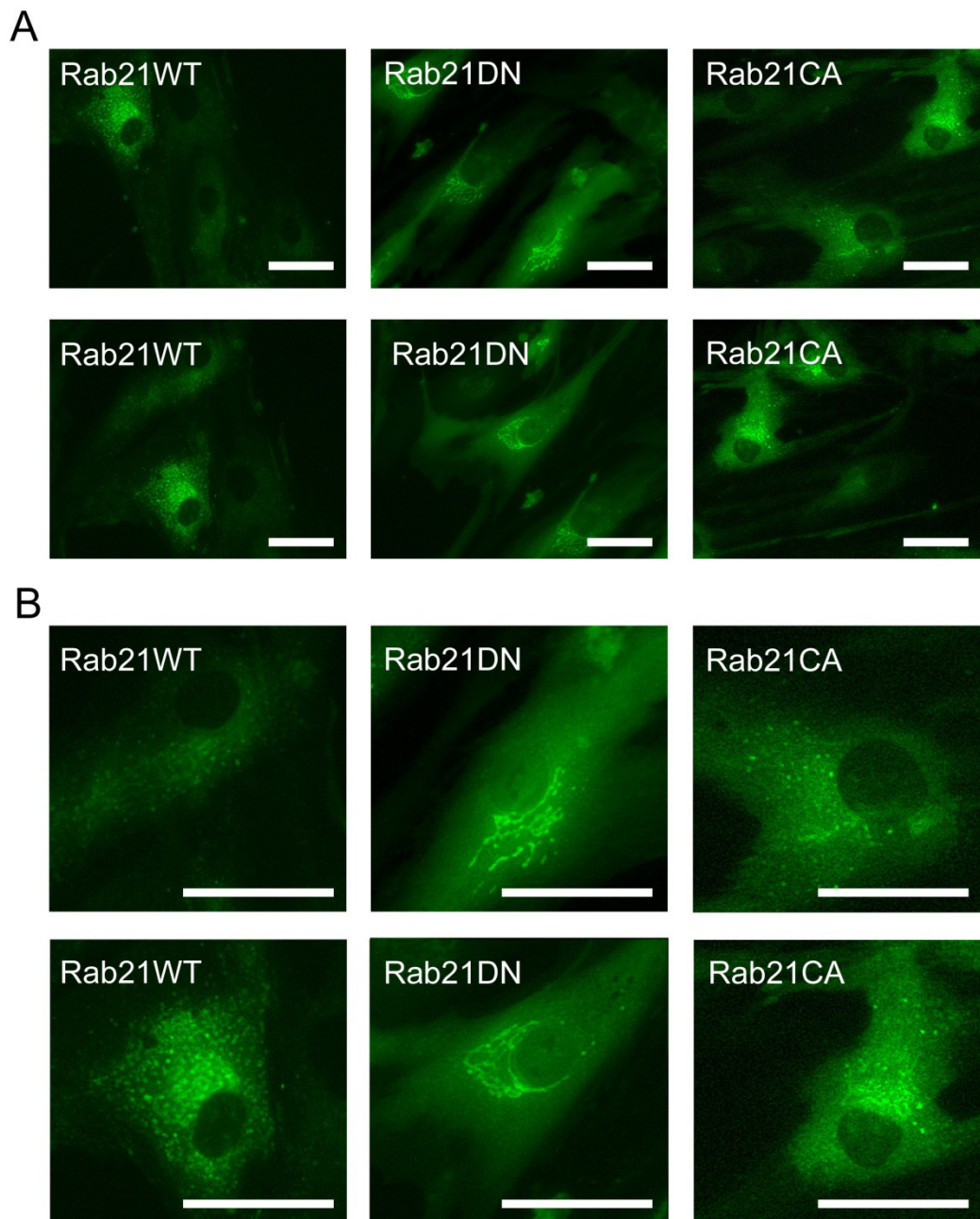


Abbildung 26: Unterschiedliche subzelluläre Verteilung der Rab21-Varianten in MSZ

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden MSZ die Rab21WT, Rab21DN und Rab21CA ektop exprimieren. B) Ausschnitte einzelner Zellen zeigen die perinukleäre Region mit vesikulärer und zytosolischer Verteilung der Rab21-Varianten. Maßstabsbalken 50 µm aufgenommen mit Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

Um die festgestellte optische Vesikelgrößenänderung durch die Expression der Rab-GTPasen beurteilen zu können wurden die Vesikel in den Zellen vermessen. Für die Vermessungen der Vesikel wurden Zellen die Rab5WT, Rab5CA, Rab7WT und Rab7CA exprimierten verwendet. Da die Vermessung von Rab11 Vesikeln in Immunfluoreszenz-Färbungen nicht möglich war (Abschnitt 3.1.3), wurden die Vesikel in Rab11WT und Rab11CA exprimierenden Zellen nicht vermessen.

Zur Bestätigung des optischen Eindrucks in dem Rab5CA und Rab7CA die Größe der entsprechend markierten Vesikel beeinflussten, wurden die jeweiligen Vesikel im Vergleich zu Rab5WT und Rab7WT markierten Vesikeln vermessen. Des Weiteren wurden die durch Rab5CA und Rab7CA festgestellten Größenveränderungen der Endosomen im Vergleich zu Rab5 und Rab7 markierten vesikulären Kompartimente in nicht transduzierten Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht.

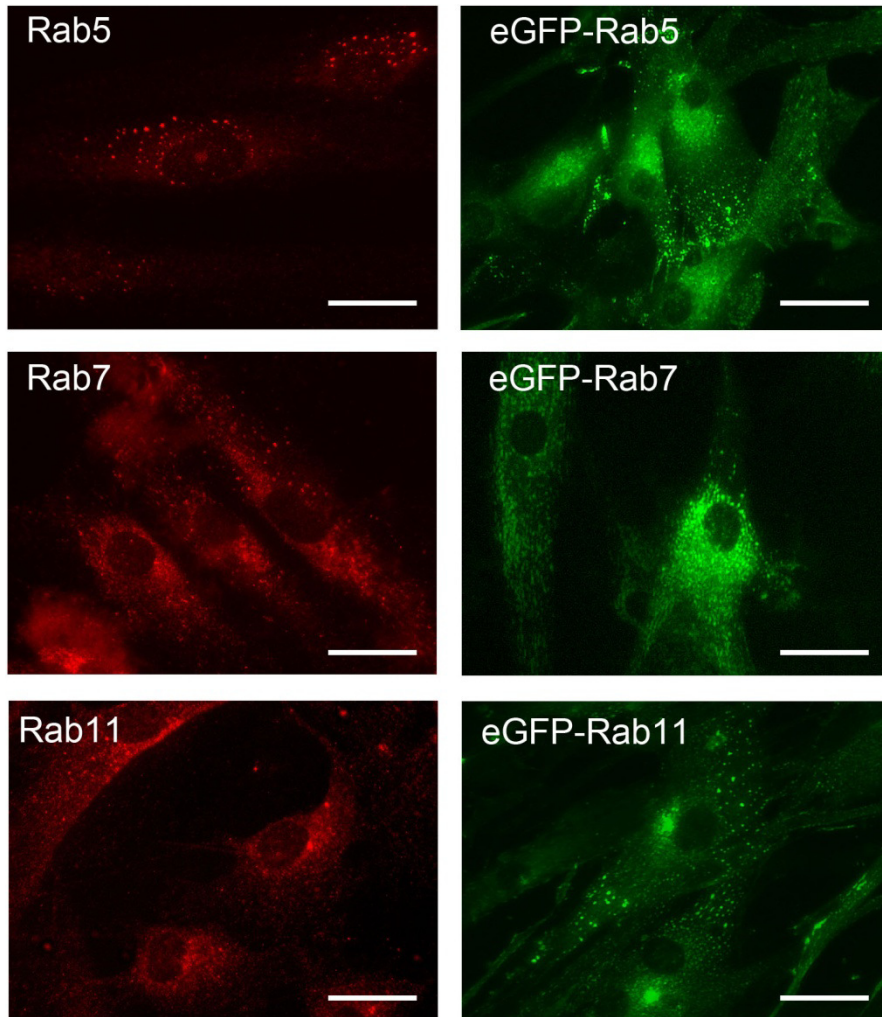


Abbildung 27: Vergleich der endogenen Lokalisation von Rab5, Rab7 und Rab11 mit den jeweiligen ekto exprimierten eGFP-Rab-Proteinen in MSZ

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MSZ, die immunfluoreszent gegen Rab5, Rab7 und Rab11 gefärbt wurden im Vergleich zu MSZ die eGFP-Rab5WT, eGFP-Rab7WT und eGFP-Rab11WT exprimieren. Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

Da Rab5 und Rab7 Immunfluoreszenz-Färbungen (IF-Färbungen) an MSZ auch teilweise eine höhere Hintergrundfluoreszenz besaßen und diese bei der Vermessung der Vesikel störend sein kann, wurden zusätzlich IF-Färbungen gegen EEA1 (Marker früher Endosomen) und CD63 (Marker später Endosomen) durchgeführt sowie die Größe der durch diese Proteine markierten Vesikel

vermessen. Für die Untersuchung wurden in 3-5 Zellen, 10-15 Vesikel vermessen um den visuellen Eindruck zu belegen. Dabei zeigte sich, dass die durch Rab5WT markierten Vesikel durchschnittlich einen Durchmesser von $1,05 \pm 0,24 \mu\text{m}$ und Rab5CA-positive Vesikel im Mittel einen von $1,86 \pm 0,58 \mu\text{m}$ besaßen (Anhang: Tabelle 45; Tabelle 46). Des Weiteren fanden sich in Rab5CA exprimierenden Zellen vereinzelt Vesikel, die einen Durchmesser von bis zu $14 \mu\text{m}$ aufwiesen (Abbildung 28B). Die zur Kontrolle in nicht transduzierten MSZ vermessenen EEA1-positiven Vesikel hatten einen Durchmesser von $0,86 \pm 0,30 \mu\text{m}$ und Rab5-positive Vesikel einen von $0,80 \pm 0,29 \mu\text{m}$ (Abbildung 28; Anhang: Tabelle 45; Tabelle 46).

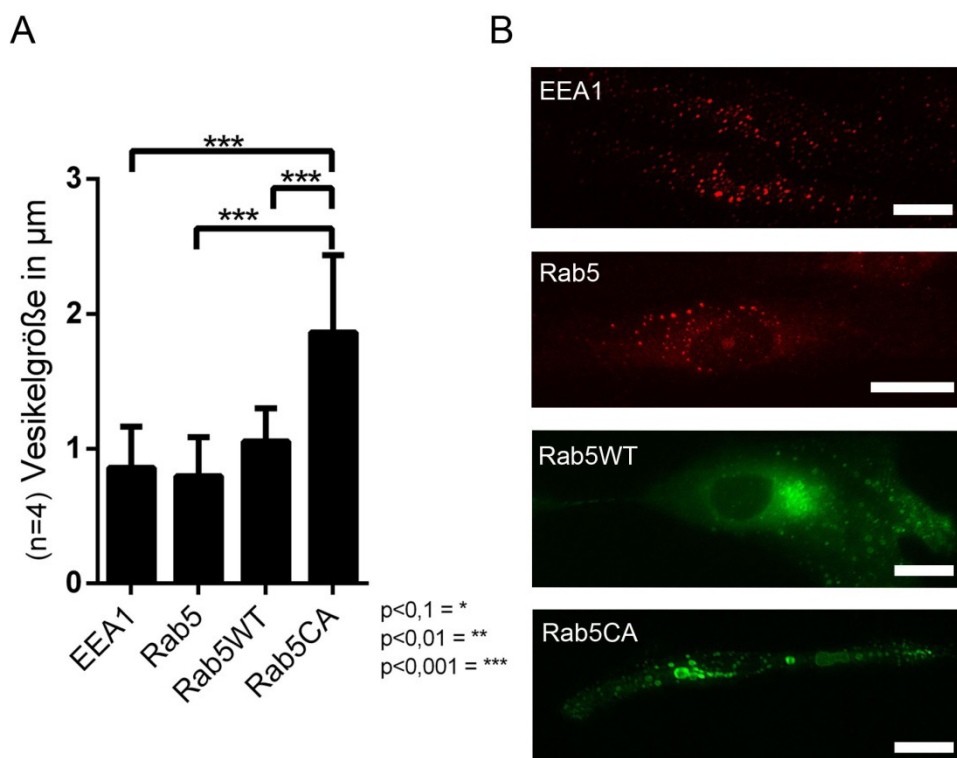


Abbildung 28: Ektope Expression von Rab5CA führt zu vergrößerten Endosomen

Mikroskopische Vermessung Rab5WT, Rab5CA, Rab5 und EEA1 positiver Vesikel in MSZ. A) Mittlere Größe von Rab5 und EEA1 gefärbten Vesikeln in Kontrollzellen, sowie Rab5WT und Rab5CA exprimierenden Zellen. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MSZ, die mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Rab5 und EEA1 angefärbt wurden, sowie von eGFP-Rab5WT und eGFP-Rab5CA exprimierenden Zellen. Maßstabsbalken 20 µm, Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

Die Rab7WT-Vesikel zeigten keinen signifikanten Größenunterschied zu den mit dem späten endosomalen Marker CD63 markierten Vesikeln ($0,89 \pm 0,23 \mu\text{m}$; 4-5 Zellen, je 5-7 Vesikel; Abbildung 30 A; Anhang: Tabelle 45) in unmanipulierten Zellen auf. Die Größe der Rab7WT-positiven ($1,01 \pm 0,27 \mu\text{m}$) Vesikel war im Vergleich zu Rab7-positiven ($0,83 \pm 0,22 \mu\text{m}$; Anhang: Tabelle 45) Vesikeln in

Kontrollzellen leicht vergrößert. Im Falle von Rab7CA zeigte sich, dass die Expression von Rab7CA zu einer Vergrößerung der markierten tubulären Endosomen von durchschnittlich $1,01 \pm 0,27 \mu\text{m}$ (Rab7WT; 5 Zellen; je 10 Vesikel gemessen; Anhang: Tabelle 45) auf $2,08 \pm 0,65 \mu\text{m}$ (Rab7CA; 5 Zellen; je 10 Vesikel gemessen; Anhang: Tabelle 45) führte (Abbildung 29).

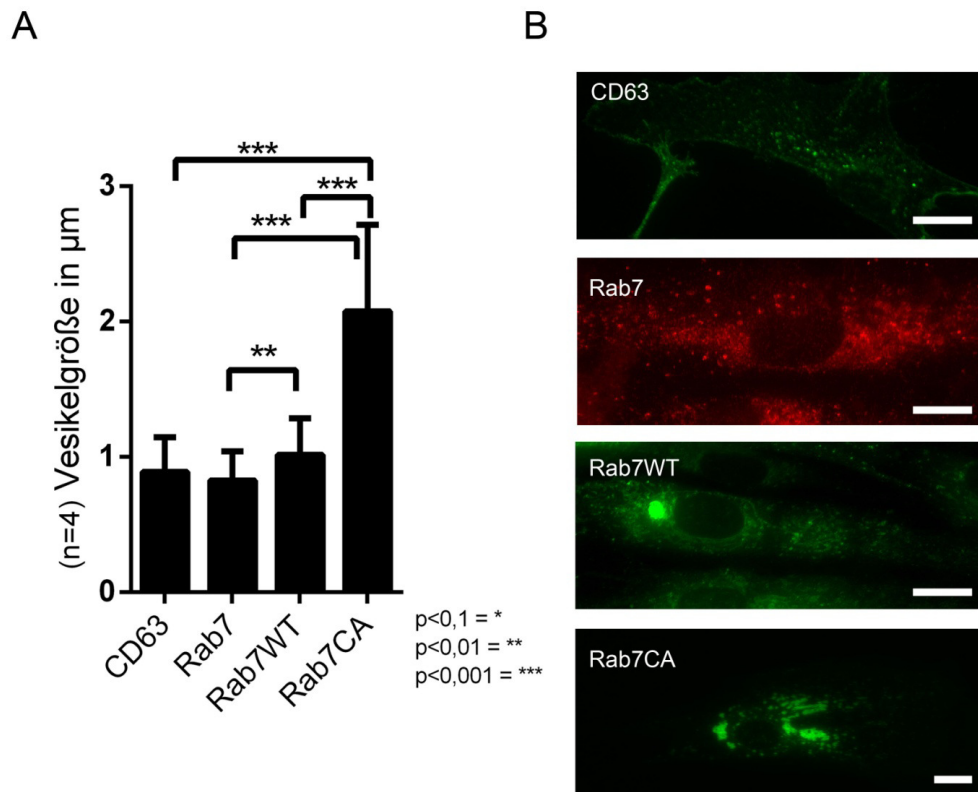


Abbildung 29: Ektope Expression von Rab7CA führt zu vergrößerten Endosomen

Mikroskopische Vermessung Rab7WT-, Rab7CA-, Rab7- und CD63-positiver Vesikel in MSZ. A) Mittlere Größe von späten Endosomen in Kontrollzellen (CD63), Rab7WT und Rab7CA exprimierenden Zellen. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MSZ die mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen EEA1 und Rab5 angefärbt wurden, sowie von eGFP-Rab7WT und eGFP-Rab7CA exprimierenden Zellen. Maßstabsbalken 20 µm, Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korrektur.

Damit wiesen die Rab7WT und CD63 markierten Endosomen eine ähnliche Größe wie die Rab5WT markierten Endosomen und die für den frühen endosomalen Marker EEA1-positiven Endosomen in nicht manipulierten Zellen auf (Abbildung 28; Abbildung 30). Die ermittelte Vergrößerung der durch eGFP-Rab5CA und eGFP-Rab7CA markierten Endosomen ist auch in anderen Zellen wie BHK, CHO und HeLa beschrieben (Stenmark *et al.*, 1994, Roberts *et al.*, 1999, Bucci *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2001). Im Weiteren deutet die bei Rab11DN und Rab21DN beobachtete Lokalisation der Proteine in einer netzartige Struktur daraufhin, dass sich die Proteine vermutlich im Trans-Golgi-Netzwerk der Zellen

zusammenlagern, wie in anderen Studien aus HeLa, BHK und CHO-Zellen für diese Rab11 und Rab21 Varianten beschrieben (Ullrich *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1998, Ren *et al.*, 1998, Wilcke *et al.*, 2000, Simpson *et al.*, 2004, Simpson und Jones, 2005). Da die weitere Untersuchung der netzartigen Struktur die durch Rab11DN und Rab21DN Varianten markiert wurde wohl zu keiner neuen Erkenntnis führen würde, wurde diese nicht spezifisch untersucht.

Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der dominant-negativen und konstitutiv-aktiven Varianten von Rab5 und Rab7 sowie die Vergrößerung der durch Rab5CA und Rab7CA markierten Endosomen im Vergleich zu den jeweilig wildtypischen Proteinen führte zu der Annahme, dass andere Endosomen assoziierte Proteine in ihrer Lokalisation verändert sein könnten. Um dieser Frage nachzugehen wurden Rab5CA, Rab5DN, Rab7CA und Rab7DN exprimierende Zellen mit Antikörpern gegen EEA1 und CD63 gefärbt.

Es zeigte sich, dass die ektope Expression von Rab5CA zur Vergrößerung der EEA1-positiven Endosomen führt. Dabei finden sich eGFP-Rab5CA und EEA1 auf den gleichen Vesikeln lokalisiert (Abbildung 30). In Rab5DN exprimierenden MSZ findet sich EEA1 ähnlich verteilt wie in nicht manipulierten Zellen (Abbildung 30). CD63 findet sich in Rab5CA exprimierenden Zellen meist auf der Membran und im Lumen der Rab5CA-positiven Vesikel wieder, zeigt aber auch vereinzelt eine von Rab5CA-positiven Vesikeln unabhängige Lokalisation. Aufgrund der Ko-Lokalisation der CD63-positiven mit Rab5CA-positiven Endosomen weisen diese wie die Rab5CA markierten Vesikel einen größeren Durchmesser auf als in nicht transduzierten Zellen (Abbildung 30). CD63 zeigte in den Färbungen von Rab5DN exprimierenden MSZ keine erkennbare Änderung der subzellulären Verteilung im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (Abbildung 30).

Die Immunfluoreszenz-Färbungen gegen das frühe endosomale Protein EEA1 und das späte endosomale Protein CD63 in Rab7CA exprimierenden MSZ zeigten eine ähnliche Verteilung der Proteine wie in nicht transduzierten Zellen (Abbildung 15; Abbildung 31). Dabei ließ sich im Weiteren eine partielle Ko-Lokalisation von Rab7CA mit EEA1 oder CD63 auf Vesikeln erkennen (Abbildung 31). In Rab7DN exprimierenden Zellen waren EEA1- und CD63-positive Endosomen ähnlich verteilt wie in den Immunfluoreszenz-Färbungen von nicht transduzierten MSZ (Abbildung 15; Abbildung 31).

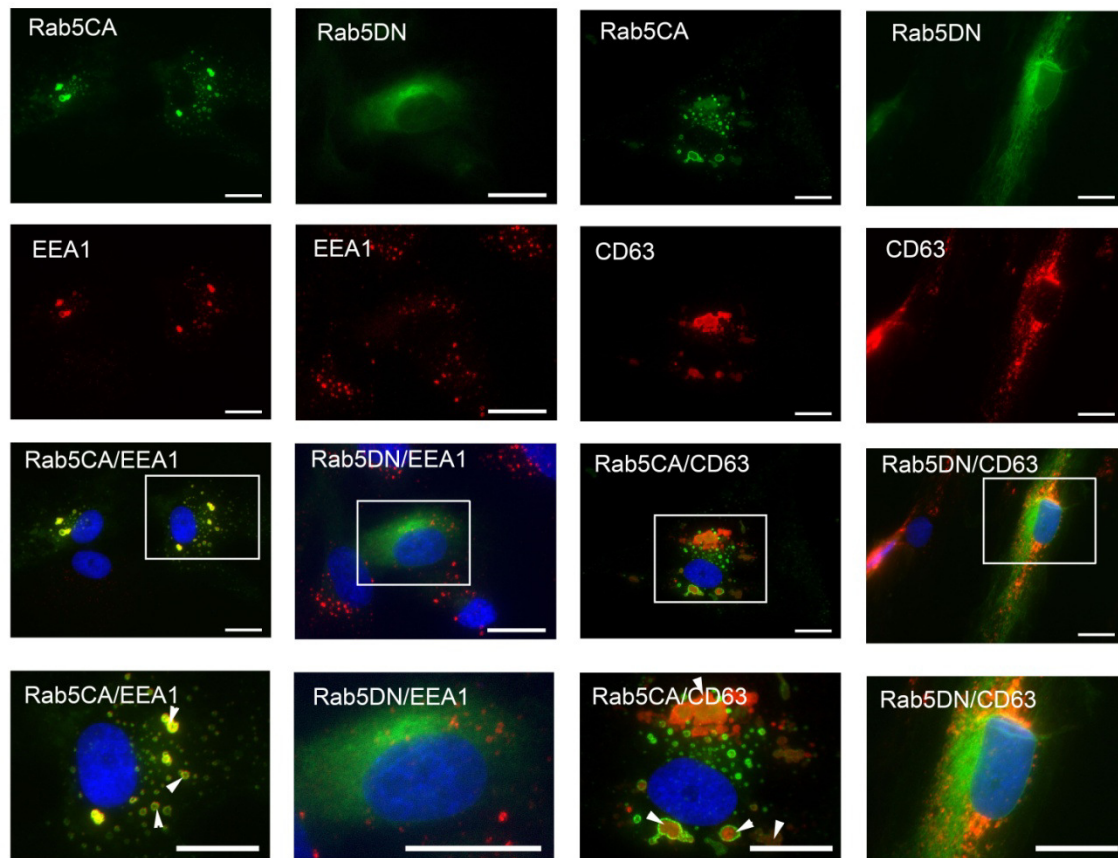


Abbildung 30: Ektope Expression von Rab5CA verändert die subzelluläre Lokalisation später endosomaler Markerproteine in MSZ

Immunfluoreszenz-Färbungen von Rab5CA und Rab5DN exprimierenden MSZ. MSZ wurden mit Antikörpern gegen EEA1 und CD63 markiert und mit Cy3-konjugierten Esel-anti-Maus Antikörpern gegengefärbt. Einzelkanalbilder und Überlagerungsbilder sind dargestellt. Vergrößerung aus Überlagerungsbild durch Rechteck markiert. Pfeile in Vergrößerung markieren Änderungen der subzellulären Organisation von EEA1- und CD63-positiven Endosomen sowie deren Ko-Lokalisation mit eGFP-Rab5CA. Maßstabsbalken 20 μm , Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC* und Objektiv *Plan-Apochromat 100x/1.45 Oil DIC*.

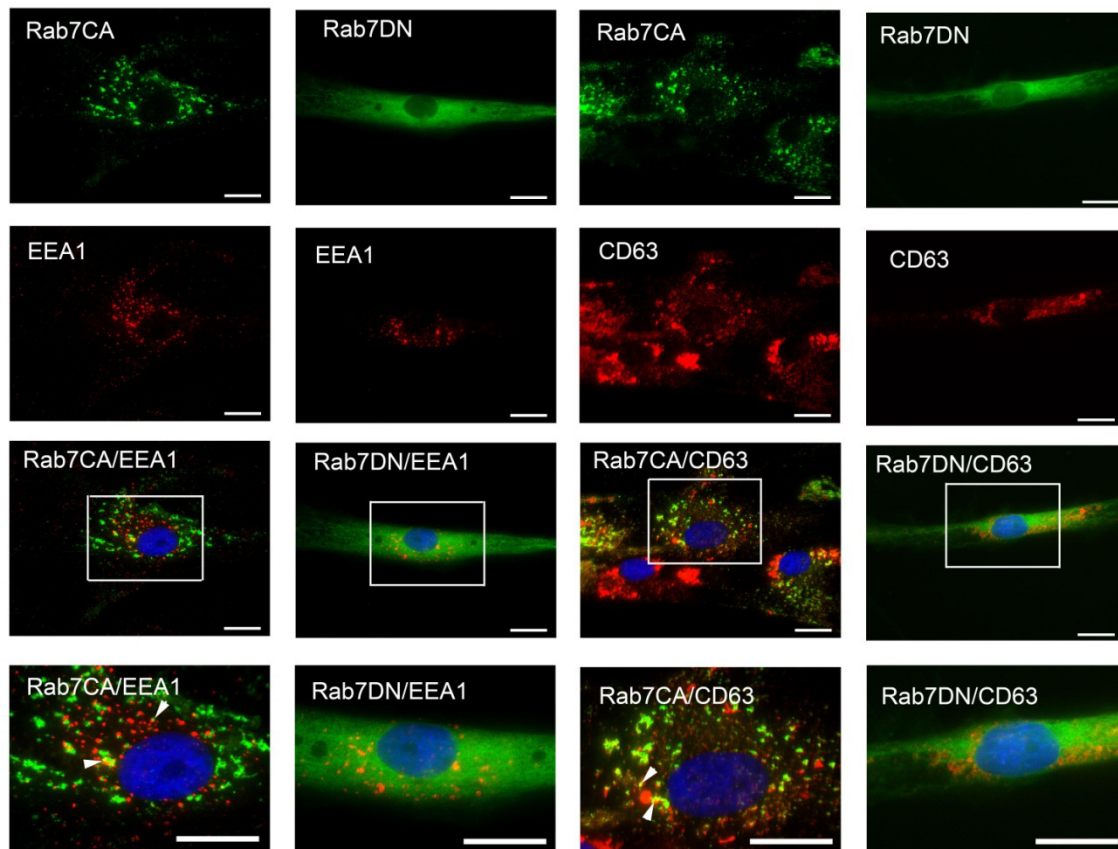


Abbildung 31: Ektope Expression von Rab7CA und Rab7DN in MSZ

Immunfluoreszenz-Färbungen von Rab7CA und Rab7DN exprimierenden MSZ. MSZ wurden mit Antikörpern gegen EEA1 und CD63 markiert und mit Cy3-konjugierten Esel-anti-Maus Antikörpern gegengefärbt. Pfeile markieren benachbarte und partiell kolokalisierte Endosomen, die mit eGFP-Rab7CA und Antikörpern gegen EEA1 und CD63 markiert sind. Maßstabsbalken 20 μm , Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

Die subzellulären Analysen der verschiedenen Rab-GTPasen in MSZ zeigten, dass die Proteine unterschiedlich in den Zellen verteilt waren und die ektope Expression von CA- und DN- Varianten gezielt die subzelluläre Organisation der Kompartimente verschiedenartig beeinflusst. Dabei zeigte die Expression von Rab5CA und Rab7CA stärksten Veränderungen der markierten Endosomen. Die markierten Vesikel haben einen größeren Durchmesser als in Kontrollzellen oder Rab5WT und Rab7WT exprimierenden Zellen. Des Weiteren zeigten Immunfluoreszenz-Färbungen gegen EEA1 und CD63, dass Rab5CA einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung dieser Proteine hat. Vesikel die positiv für EEA1 und CD63 sind werden durch die Expression von Rab5CA größer und CD63 befindet sich häufig im Lumen der Rab5CA-positiven Vesikel. Diese Beeinflussung der Subzellulären Organisation der endosomalen Maschinerie durch die Rab-GTPase Varianten deutet folglich an, dass Rab-GTPasen und ihre DN- und CA-Varianten gute Werkzeuge für Manipulation des

endosomalen Systems und der damit verknüpften Signaltransduktionsprozesse von Zellen darstellen. Im Folgenden werden Effekte der eGFP-Rab-Fusionsproteine auf die Zellbiologie und Zellschicksalsentscheidung von HSVZ untersucht.

3.2.4. Experimentelle Strategie zur Untersuchung des Einflusses von Rab-GTPasen auf HSVZ

Um die Effekte ektop exprimierter Rab-GTPasen auf das endosomale System sowie die Zellbiologie und die Zellspezifikation von CD34⁺ Zellen zu untersuchen, wurden CD34⁺ Zellen nach Isolation transduziert und für 50-60 h kultiviert. Nach Auftreten der eGFP-Fluoreszenz wurden sie fluoreszenzmikroskopisch untersucht und in verschiedene funktionelle Analysen überführt (Abbildung 32). Morphologisch wurde die subzelluläre Verteilung der eGFP-Rab-GTPasen, die Ausbildung bzw. den Erhalt der Zellpolarität und Motilität der CD34⁺ Zellen beurteilt (Abbildung 32A). Zur Bestimmung der Motilität und Polarität von CD34⁺ Zellen wurden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. Aufgrund der eGFP-Fluoreszenz konnte zwischen transduziert und nicht transduzierten Zellen unterschieden werden sodass nur transduzierte Zellen in die Analysen eingeschlossen wurden (Abbildung 32A). Zur Analyse des Einflusses der Rab-GTPasen auf die *in vitro* Entwicklung von CD34⁺ Zellen wurde die Präsenz primitiv hämatopoetischer Markerproteine (CD34 und CD133) auf der Zelloberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 6, Tag 10) durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 32 B; C). Für die spezifischer Untersuchung des Einflusses der Rab-GTPasen auf Zellschicksalsentscheidungen von CD34⁺ Zellen wurden die manipulierten Zellen in CFC-Ansätzen analysiert (Abbildung 32E). Die Zellen wurden dazu bis Tag 3 kultiviert und dann in die CFC-Ansätze sortiert. Durch die Auftrennung der gesamt CD34⁺ Zellen in CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen kann eine höhere Auflösung erzielt werden, da so gezielt die Differenzierungspotenziale der lymphatisch-myeloischen (CD133⁺CD34⁺) und erythrozytär-myeloischen (CD133^{low}CD34⁺) CD34⁺ Zellpopulationen getrennt voneinander untersucht werden können (Abbildung 32E)(Görgens *et al.*, 2013b). In CFC-Ansätze wurde dann nach 14 Tagen das Differenzierungspotenzial der jeweilig eingesetzten Zellpopulation (CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺) in Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen untersucht.

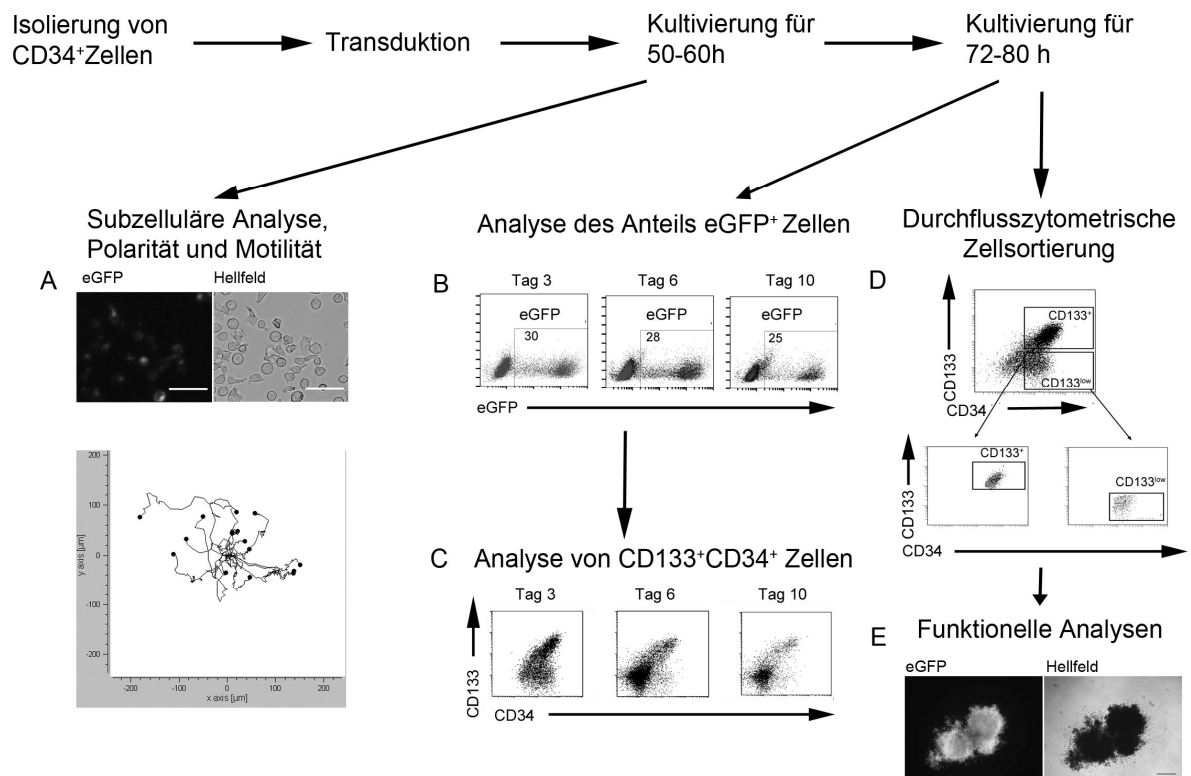


Abbildung 32: Experimentelle Strategie zur Analyse des funktionellen Einflusses von eGFP-Rab-GTPasen auf CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden transduziert, für 50-60 h bzw. bis zu 10 Tage kultiviert und nach mikroskopischer Beurteilung der subzellulären Verteilung sowie der Zellpolarität und Motilität (A; Maßstabsbalken 20 μm), durchflusszytometrisch analysiert (B und C) und sortiert (D). E) Nach mehrwöchiger Analyse der sortierten Zellen in funktionellen *in vitro* Ausleseverfahren (CFC-Ansatz; Maßstabsbalken 100 μm) konnte die eGFP-Fluoreszenz in den differenzierten Zellen der gebildeten Kolonien nachgewiesen werden.

3.2.5. Ektop exprimierte eGFP-Rab Fusionsproteine: Subzelluläre Lokalisation und ihre Wirkung auf die Zellpolarisierung humaner CD34⁺ Zellen

Um den Einfluss der eGFP-Rab-GTPasen auf die Zellbiologie und subzellulären Vesikelorganisation zu untersuchen, wurden CD34⁺ Zellen zunächst wie zuvor beschrieben transduziert (Abschnitt 2.6.3). Nach 50-60 h wurde die subzelluläre Lokalisation der eGFP-Rab-GTPasen sowie deren Einfluss auf die endosomale Maschinerie und zellbiologischen Charakteristika (Zellpolarität und Motilität) der CD34⁺ Zellen mikroskopisch analysiert.

Wie bereits zuvor erwähnt, lässt sich die subzelluläre Verteilung und Organisation von Endosomen an morphologisch polarisierten Zellen besser beschreiben, als an nicht polarisierten Zellen (Abschnitt 3.1.4). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob sich transduzierte und polarisierte Zellen in einzelnen Ansätzen

fanden. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen ließen erkennen, dass in allen Ansätzen nach Transduktion mit den verschiedenen Rab-GTPasen (Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21) sowie ihren Varianten (CA und DN) polarisierte Zellen vorlagen (Tabelle 32). Für eine spezifischere Aussage über die morphologische Polarisierung der CD34⁺Zellen wurde die Anzahl der polarisierten Zellen mikroskopisch quantifiziert. Dazu wurde der Anteil der morphologisch polarisierten, eGFP-Rab-GTPase exprimierenden CD34⁺ Zellen nach 50-60 h (Tag 2) Kultivierung durch Auszählen von 100-200 Zellen bestimmt (Tabelle 32). Als Kontrollen wurden genetisch nicht veränderte und mit eGFP transduzierte Zellen mitgeführt. Alle Kontrollansätze zeigten nach 50-60 h der Kultivierung einen Anteil von 70,88% \pm 7,54 bis 75,12% \pm 9,25 (K) polarisierten CD34⁺ Zellen. Die mit den eGFP-Fusionskonstrukten von Rab5, Rab7 und Rab21 transduzierten CD34⁺ Zellen zeigten keinen erkennbaren Effekt auf die morphologische Polarisierung der Zellen. Der Anteil an morphologisch polarisierten CD34⁺ Zellen entsprach dem der Kontrollgruppen (nicht transduzierte Zellen und eGFP-exprimierende Zellen; Tabelle 32). Im Falle der CD34⁺ Zellen, die eGFP-Rab11DN (S25N) exprimierten, war eine Verringerung der morphologischen Zellpolarisierung auf 63,05% \pm 8,31 ($p(K) = 0,02$; $p(eGFP) = 0,01$; Tabelle 32) zu erkennen. Die Expression der konstitutiv-aktiven Variante und des Wildtyp Proteins von Rab11 hatten keinen Einfluss auf die Polarisierung der CD34⁺ Zellen (Rab11WT: 70,31% \pm 9,36; Rab11CA: 70,82% \pm 7,86; Tabelle 32). In allen Transduktionsansätzen mit den verschiedenen Rab-GTPasen, fanden sich genügend polarisierte Zellen für die Beschreibung der subzellulären Verteilung der ektop exprimierten Proteine. In den durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Analysen der eGFP-Rab-Fusionsproteine exprimierenden CD34⁺ Zellen zeigte sich, dass die Rab-Varianten unterschiedliche subzelluläre Verteilungen aufwiesen.

Rab5WT war an vesikulären Strukturen von der Basis bis zur Spitze des Uropoden zu finden. Im Weiteren wies Rab5WT auch einen zytosolischen Anteil in HSVZ auf (Abbildung 33). Rab5DN befand sich diffus über das Zytoplasma der HSVZ verteilt (Abbildung 33). Bei Rab5CA konnten deutlich größere Vesikelstrukturen in den HSVZ beobachtet werden als in Rab5WT exprimierenden Zellen, die teilweise die kompletten Zellen einnahmen (Abbildung 33).

Tabelle 32: Anteil morphologisch polarisierter CD34⁺ Zellen die verschiedene Rab-Proteine exprimieren nach 50-60h Kultivierung

Polarität in %	K	eGFP	Rab5WT	Rab5DN	Rab5CA	Polarität in %	K	eGFP	Rab11WT	Rab11DN	Rab11CA
V1	81,45	83,33	81,25	82,54	74,58	V1	81,45	83,33	73,61	68,54	78,00
V2	64,50	74,02	74,16	66,67	76,38	V2	64,50	74,02	72,60	61,94	72,83
V3	79,41	85,48	77,78	89,02	80,82	V3	79,41	85,48	73,33	69,23	72,53
V4	66,60	69,30	73,00	75,00	76,00	V4	66,60	69,30	54,00	55,00	75,00
V5	73,54	71,30	79,00	73,00	79,00	V5	73,54	71,30	78,00	72,00	71,00
V6	70,95	69,09	68,57	66,67	72,73	V6	70,95	69,09	n.b.	51,61	55,56
V7	61,93	59,44	69,09	59,21	62,98						
Mittelwert	71,20	73,14	74,69	73,16	74,64	Mittelwert	72,74	75,42	70,31	63,05	70,82
Stabw	7,42	8,94	4,88	10,18	5,80	Stabw	6,78	7,22	9,36	8,31	7,86
p (K)		0,31	0,54	0,36	0,19	p (K)		0,21	0,74	0,02	0,63
p (eGFP)			0,52	0,99	0,53	p (eGFP)			0,19	0,01	0,20
p (WT)				0,59	0,98	p (WT)				0,06	0,49
p (DN)					0,60	p (DN)					0,05
Polarität in %	K	eGFP	Rab7WT	Rab7DN	Rab7CA	Polarität in %	K	eGFP	Rab21WT	Rab21DN	Rab21CA
V1	81,45	83,33	71,25	80,73	69,37	V1	81,45	83,33	75,47	77,68	78,89
V2	64,50	74,02	68,61	68,10	74,75	V2	64,50	74,02	70,64	75,00	57,65
V3	66,60	69,30	81,00	84,00	60,00	V3	79,41	85,48	77,14	85,07	86,15
V4	70,95	69,09	67,80	63,41	65,00						
Mittelwert	70,88	73,93	72,16	74,06	67,28	Mittelwert	75,12	80,94	74,42	79,25	74,23
Stabw	7,54	6,67	6,07	9,87	6,28	Stabw	9,25	6,10	3,38	5,22	14,81
p (K)		0,29	0,74	0,59	0,51	p (K)		0,12	0,86	0,43	0,84
p (eGFP)			0,75	0,98	0,13	p (eGFP)			0,05	0,49	0,31
p (WT)				0,56	0,46	p (WT)				0,10	0,98
p (DN)					0,40	p (DN)					0,50

Alle Werte geben den prozentualen Anteil morphologische polarisierter CD34⁺ Zellen an. Abkürzungen: K = nicht transduzierte Zellen; MW = Mittelwert; n. b. = nicht bestimmbar/kontaminiert; WT= wildtypische Proteinvariante; DN= dominant-negative Proteinvariante; CA=konstitutiv-aktive Proteinvariante; Stabw: Standardabweichung; p (K) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Kontrollzellen; p (eGFP) = Signifikanzberechnung im Vergleich zur CD34⁺eGFP⁺ Zellen; p (WT) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Zellen, die wildtypisches Protein exprimieren; p (DN) = Signifikanzberechnung im Vergleich Zellen, die dominant-negatives Protein exprimieren (t-Test, zweiseitig, gepaart).

Die Varianten von Rab7 zeigten eine unterschiedliche Lokalisierung in den HSVZ. So besaß Rab7WT einen zytosolischen und vesikulären Anteil (Abbildung 33). Die zytosolische Verteilung war ähnlich wie die vesikulär assoziierte Komponente von Rab7WT an der Basis des Uropoden zu finden. Im Weiteren waren die markierten Vesikelstrukturen nicht rund wie bei Rab5WT, sondern meist tubulär (Abbildung 33).

Rab7DN fand sich diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt mit keinem spezifischen Anreicherungsort innerhalb der HSVZ (Abbildung 33). Für Rab7CA ließ sich eine vesikuläre Lokalisation an der Basis des Uropoden und damit perinukleären Region erkennen (Abbildung 33). Vereinzelt verteilten sich auch Vesikel bis in die Spitze des Uropoden.

Die Expression von Rab11WT zeigte häufig Vesikel nahe der Plasmamembran, die sich entlang des Uropodenhals bis in dessen Spitze erstreckten (Abbildung 33). Ansonsten fanden sich auch Vesikel in der perinukleären Region und in der *Leading edge* (Abbildung 33). Rab11DN zeigte eine überwiegend zytosolische Verteilung in den HSVZ. In einigen Zellen ließ sich eine Anreicherung in einer tubulären Struktur im perinukleären Bereich erkennen (Abbildung 33). Bei HSVZ die Rab11CA exprimierten, fanden sich vesikuläre Strukturen von der Basis des Uropoden bis in dessen Spitze. Die Rab11CA-Vesikel waren teils eng zusammengelagert (Abbildung 33).

In Rab21WT exprimierenden CD34⁺Zellen wurde eine vesikuläre und zytoplasmatische Lokalisierung wie bei Rab5WT festgestellt. Rab21WT positive Vesikel waren über die gesamten Zellen verteilt (Abbildung 33). Wie bei Rab11 fanden sich Rab21DN-Proteine diffus im Zytoplasma verteilt mit einer Anreicherung in einer Struktur im perinukleären Bereich der Zellen (Abbildung 33).

Zusammenfassend ließen die Untersuchungen der subzellulären Verteilung der verschiedenen Rab-GTPasen erkennen, dass alle Varianten eine etwas unterschiedliche Lokalisation in den HSVZ aufweisen. Die wildtypischen und konstitutiven Proteinvarianten besitzen eine vesikuläre Verteilung in den Zellen wohingegen die dominant-negativen Varianten aller hier exprimierten Rab-GTPasen eine diffuse zytosolische Verteilung aufzeigen. Bei den Analysen fielen vor allem vesikuläre Größenveränderungen nach der Expression von Rab5CA und Rab7CA im Vergleich zu den jeweiligen wildtypischen Proteinen auf. Daher wurden für weitere Analyse der hier festgestellten subzellulären Veränderung der Vesikelkompartimente die Größe von Rab5WT, Rab5CA, Rab7WT und Rab7CA Vesikeln im Vergleich zu Rab5-, EEA1-, Rab7- und CD63-positiven Vesikeln in den CD34⁺ Zellen vermessen (Abbildung 34). Die Vermessung der markierten Kompartimente in Rab5WT und Rab5CA exprimierenden CD34⁺ Zellen, zeigte eine Vesikelgröße von durchschnittlich $0,69 \pm 0,19 \mu\text{m}$ bei Rab5WT und $3,05 \pm 1,97 \mu\text{m}$ bei Rab5CA (Abbildung 34 A und B; Anhang: Tabelle 51). Damit waren die Rab5CA-positiven

Vesikel auf den Durchmesser bezogen im Mittel 4,4-fach größer als Vesikel, die mit Rab5WT-eGFP markiert waren (Abbildung 34 A und B; Anhang: Tabelle 51). Zur Kontrolle des Einflusses von Rab5WT auf die Vesikelgröße der Zellen wurde die Größe von Rab5- und EEA1-positiven Vesikel in nicht genetisch manipulierten Zellen vermessen. Diese wiesen eine durchschnittliche Größe von $0,55 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (Rab5) und $0,54 \pm 0,14 \mu\text{m}$ (EEA1) auf, was ungefähr der ermittelten Größe der Rab5WT-Vesikel entspricht (Abbildung 34 A und B; Anhang: Tabelle 51). Durch die Expression von Rab5CA füllten die Vesikel, wie bereits oben erwähnt nahezu das gesamte Zytoplasma der Zellen aus und waren schon lichtmikroskopisch zu erkennen (Abbildung 33).

Im Falle von Rab7WT und Rab7CA zeigte sich dagegen, dass in den CD34⁺ Zellen sowohl die Rab7WT ($1,29 \pm 0,5 \mu\text{m}$; Anhang: Tabelle 51) als auch die Rab7CA ($1,26 \pm 0,6 \mu\text{m}$; Anhang: Tabelle 51) Vesikel im Vergleich zu den CD63- und Rab7-positiven Vesikeln vergrößert waren (CD63: $0,83 \pm 0,18 \mu\text{m}$; Rab7: $0,74 \pm 0,26 \mu\text{m}$; Anhang: Tabelle 51) (Abbildung 34 C und D). Dies deutet auf eine strukturelle Veränderung der späten endosomalen Kompartimente durch die ektopische Expression von Rab7WT und Rab7CA hin, die bei MSZ nicht so deutlich festgestellt wurde.

Daher wurde um Effekte der festgestellten Größenänderungen der Rab5CA- und Rab7CA- markierten Endosomen im Bezug auf andere endosomale Markerproteine zu untersuchen, wurden im Weiteren Immunfluoreszenz-Färbungen gegen frühe (EEA1) und späte (CD63) endosomale Proteine durchgeführt. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen EEA1 und CD63 an eGFP-Rab5WT, -Rab5DN, -Rab5CA, -Rab7WT, -Rab7DN und -Rab7CA exprimierenden Zellen durchgeführt, deren subzelluläre Verteilung analysiert und die Vesikelgröße der EEA1- und CD63-positiven Kompartimente vermessen (Abbildung 37A).

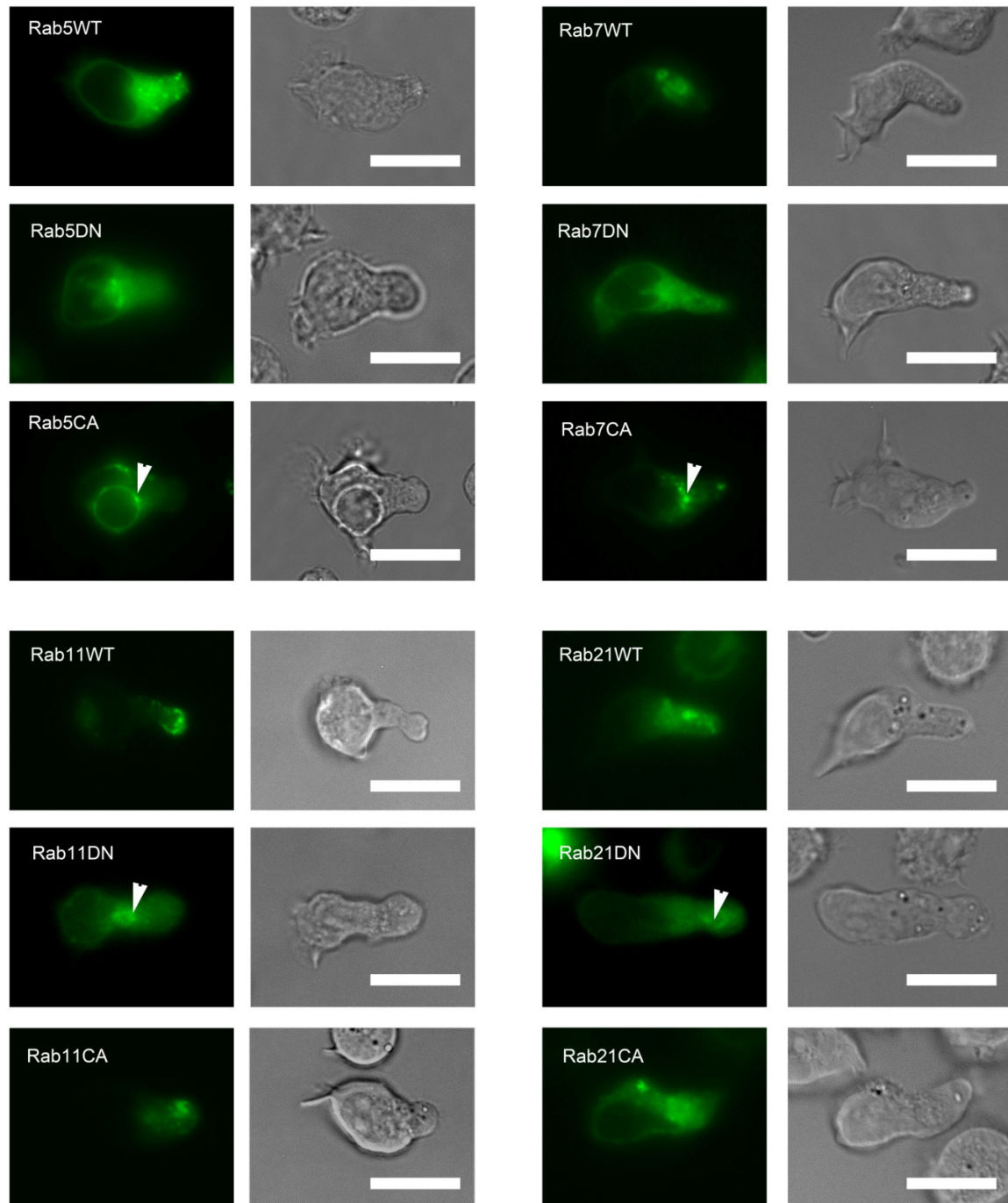


Abbildung 33: Ektope Expression von eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteinen in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender, morphologisch polarisierter CD34⁺ Zellen nach 50-60h in Kultur. CD34⁺ Zellen wurden lentiviral mit den eGFP-Rab5WT, -Rab5DN (S34N), -Rab5CA (Q79L), -Rab7WT,- Rab7DN (T22N), -Rab7CA (Q67L), -Rab11WT, -Rab11DN (S25N), -Rab11CA (Q70L), -Rab21WT, -Rab21DN (T22N) bzw. -Rab21CA (Q76L) Konstrukten transduziert. Maßstabsbalken 5 µm, Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

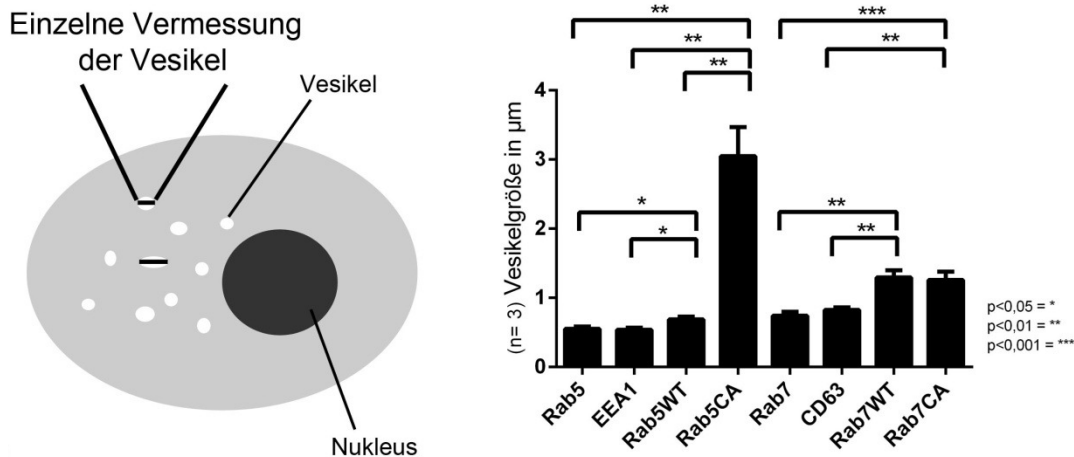


Abbildung 34: Größe von Rab5WT-, Rab5CA, Rab7WT und Rab7CA-positiven Vesikeln in HSVZ

Mikroskopische Vermessung von fluoreszenz-markierten Vesikeln in CD34⁺ Zellen. Dargestellt ist der mittlere Durchmesser von frühen Endosomen in Kontrollzellen (Rab5 und EEA1), späten Endosomen in Kontrollzellen (Rab7 und CD63), Rab5WT-, Rab5CA-, Rab7WT- sowie Rab7CA-positiven Endosomen. Signifikante Unterschiede sind entsprechend gekennzeichnet. Daten finden sich in Tabelle 51 im Anhang.

Die Untersuchungen ergaben, dass sich die Größe der EEA1- und CD63-positiven Vesikel durch die ektopische Expression von Rab5DN, Rab5CA und Rab7WT verändert. Die Expression von Rab5WT zeigte mit einer durchschnittlichen Größe von $0,62 \pm 0,17 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $0,57 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (Kontrolle EEA1) keinen erkennbaren Einfluss auf die Größe der EEA1-positiven Endosomen. Rab5DN führte zu einem verkleinerten durchschnittlichen Durchmesser der frühen EEA1-positiven Vesikel von $0,57 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (Kontrolle EEA1) auf $0,4 \pm 0,12 \mu\text{m}$ (Abbildung 35 und Abbildung 37; Anhang: Tabelle 46) und Rab5CA vergrößerte diesen auf $1,43 \pm 1,34 \mu\text{m}$ (Abbildung 35 und Abbildung 37).

Nicht transduzierten Kontrollzellen (EEA1) hatten wie zuvor erwähnt einen Durchmesser von $0,57 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (Abbildung 37; Anhang: Tabelle 48 und Tabelle 50). Durch Expression der Rab7-Varianten zeigte sich, dass sich der Durchmesser der EEA1-Vesikel durch Expression von Rab7WT ($0,65 \pm 0,16 \mu\text{m}$) vergrößert, Rab7DN ($0,57 \pm 0,15 \mu\text{m}$) und Rab7CA ($0,61 \pm 0,13 \mu\text{m}$) aber keinen Effekt auf die Größe der EEA1-Vesikel erkennen ließen (Abbildung 36 und Abbildung 37; Anhang: Tabelle 48 und Tabelle 50).

Im Weiteren ließ sich für die CD63 markierten späten endosomalen Kompartimente erkennen, dass die Expression von Rab5WT ($0,77 \pm 0,23 \mu\text{m}$) keinen Einfluss auf die Größe dieser Kompartimente hat (Abbildung 35 und Abbildung 37; Anhang: Tabelle

48). Hingegen führt Rab5DN zur Verkleinerung der CD63-Vesikel von $0,83 \pm 0,18 \mu\text{m}$ auf $0,55 \pm 0,13 \mu\text{m}$ im Durchmesser. Rab5CA führt nahezu zur Verdopplung des Durchmessers von CD63-positiven Vesikeln auf $1,57 \pm 1,22 \mu\text{m}$ (Abbildung 35 und Abbildung 37; Anhang: Tabelle 48). Dabei fand sich CD63 auf der Membran der Rab5CA markierten Endosomen aber häufig auch im Lumen der Rab5CA-Endosomen lokalisiert (Abbildung 35).

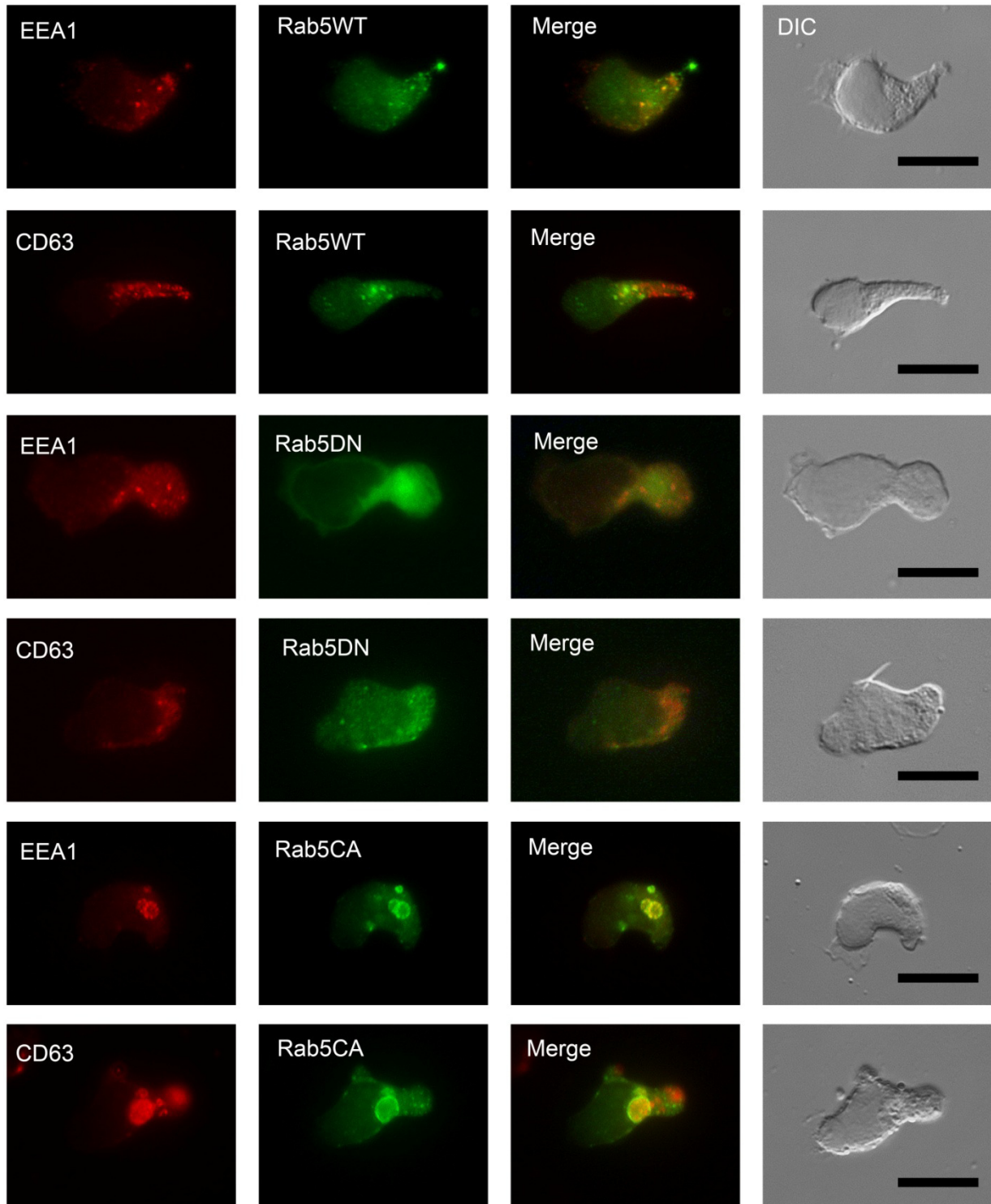


Abbildung 35: Einfluss der ektopen Expression von Rab5-Varianten auf EEA1- und CD63-Vesikel in HSVZ.

Immunfluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von CD34⁺ Zellen die ektop eGFP-Rab5WT, -Rab5DN und -Rab5CA exprimierten (grün). Die subzelluläre Verteilung der frühen (EEA1) und späten (CD63) endosomalen Kompartimente wurde durch Immunfluoreszenz-Färbung (rot) untersucht. Maßstabsbalken 5 μ m, Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

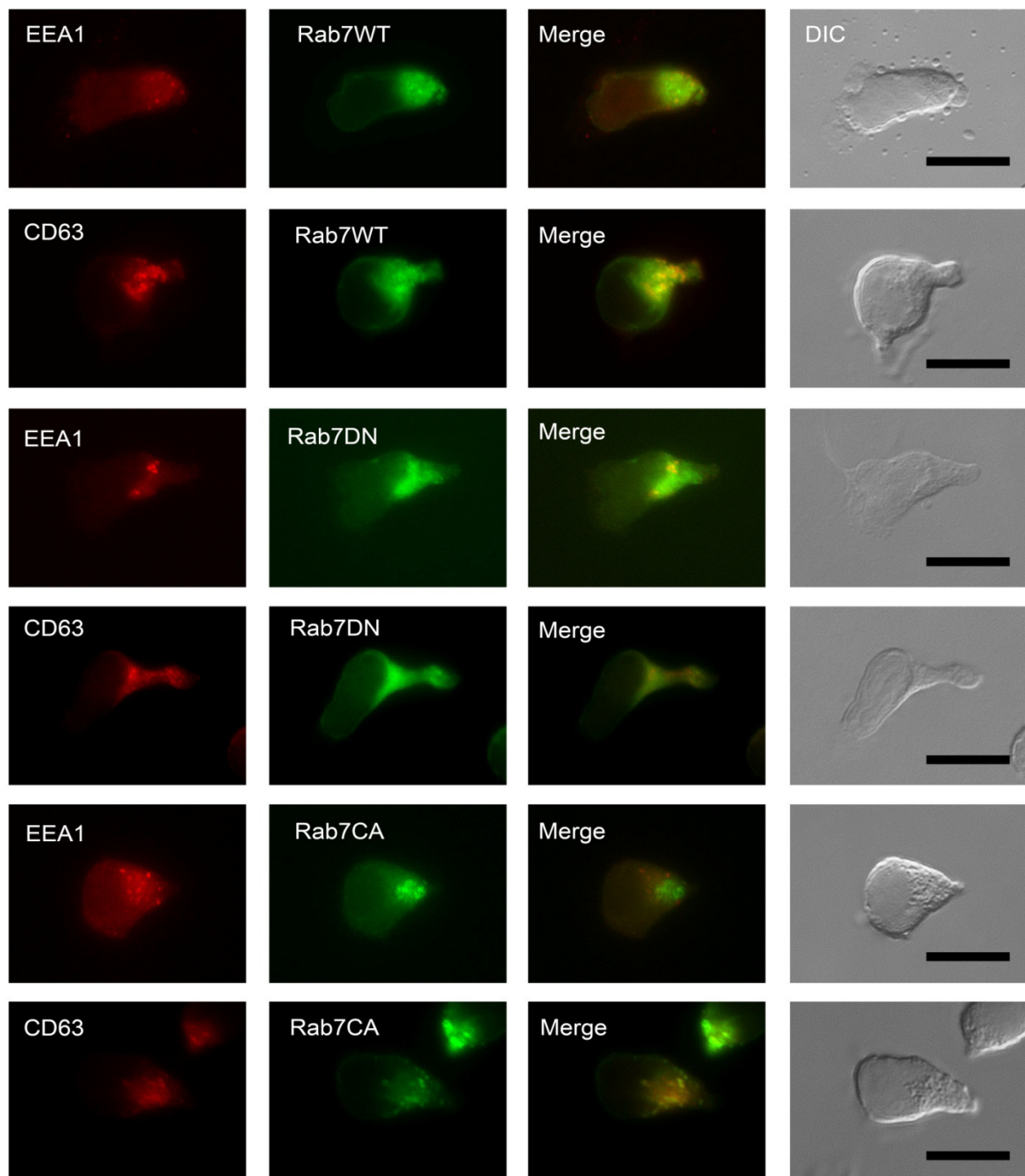


Abbildung 36: Einfluss der ektopen Expression von Rab5-Varianten auf EEA1- und CD63-Vesikel in HSVZ

Immunfluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von CD34⁺ Zellen die ektop eGFP-Rab7WT, -Rab7DN und -Rab7CA exprimierten (grün). Die subzelluläre Verteilung der frühen (EEA1) und späten (CD63) endosomalen Kompartimente wurde durch Immunfluoreszenz-Färbung (rot) untersucht. Maßstabsbalken 5 μ m, Objektiv *Plan-Apochromat* 63x/1.40 Oil DIC.

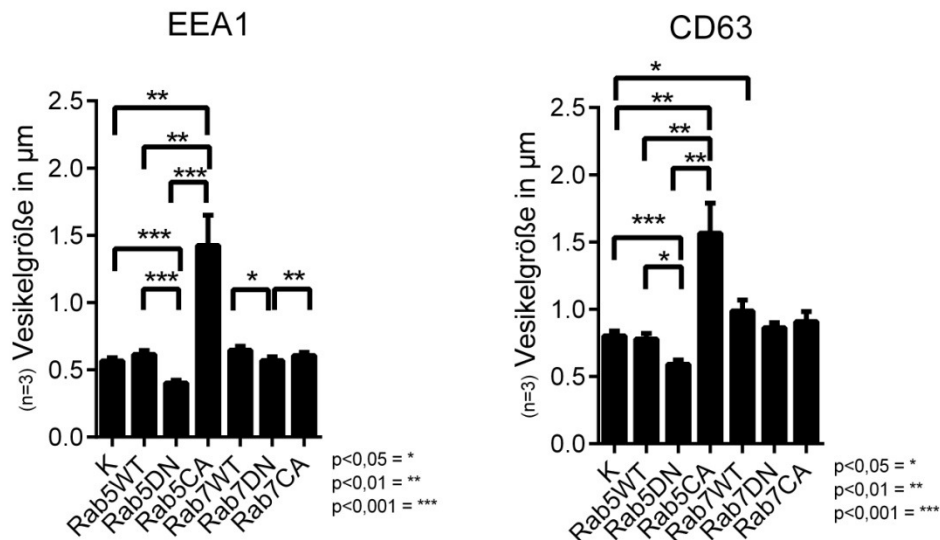


Abbildung 37: Einfluss von Rab5- und Rab7-Varianten auf die Größe von EEA1- und CD63-Vesikeln in CD34⁺ Zellen.

Größenanalyse früher EEA1 und später CD63 markierter Endosomen nach ektopter Expression von eGFP-Rab5WT, -Rab5DN, -Rab5CA, -Rab7WT, -Rab7DN und -Rab7CA in 72-80 h kultivierten CD34⁺ Zellen und an nicht genetisch manipulierten Zellen (K). Färbungen wurden an 3 unabhängigen Nabelschnurlutern durchgeführt und jeweils 15 Vesikel vermessen (n=3; Anhang: Tabelle 48, Tabelle 47, Tabelle 49 und Tabelle 50).

Die Immunfluoreszenz-Färbungen in Kombination mit den Vesikelvermessungen ergaben, dass die Expression der Rab5- und Rab7- Varianten in den CD34⁺ Zellen nicht nur eine unterschiedliche Lokalisation der einzelnen funktionellen eGFP-Rab-Proteine zur Folge hat, sondern auch zu Veränderungen in der subzellulären Verteilung anderer Endosomen-assoziiierter Proteine führte (Abbildung 35 und Abbildung 37). Vor allem hatte die Expression von Rab5DN, Rab5CA, Rab7WT und Rab7CA eine Veränderung der Größe von endosomalen Kompartimenten zur Folge (Abbildung 37). Im Falle von Rab5CA führt dessen Expression neben der Endosomenvergrößerung auch zu einer Relokalisation des späten endosomalen Proteins CD63, welches sich nicht nur auf der Membran der Rab5CA-markierten Vesikel findet sondern auch in deren Lumen. In Rab5WT exprimierenden Zellen fand sich hingegen nur vereinzelt eine ko-lokalisierung der beiden Protein (Rab5WT und CD63) auf einem Vesikel (Abbildung 35).

Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der eGFP-Rab-Fusionsproteine, sowie die durch Rab5DN, Rab5CA und Rab7WT ausgelöste Größenänderung der Endosomen und durch Rab5CA strukturelle Reorganisation anderer endosomaler Markerproteine zeigt, dass diese Proteine die endosomalen Transportprozesse und Signalwege der CD34⁺ Zellen beeinflussen könnten.

Ob die Beeinflussung der endosomalen Maschinerie durch die Rab-GTPase Varianten Effekte auf weitere zelluläre Eigenschaften wie Zellmotilität und Endozytose von CD34⁺ Zellen hat, wurden diese Prozesse im Folgenden analysiert.

3.2.6. Analyse von Effekten auf die Zellbiologie von CD34⁺ Zellen durch Expression von eGFP-Rab-GTPase Fusionsproteinen

Aus Inhibitor-Analysen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Motilität und migratorischen Eigenschaften der CD34⁺ Zellen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben (Görgens *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob die Motilität der Rab-GTPase exprimierenden HSVZ verändert ist wurden Zeitrafferaufnahmen der Zellen analysiert.

Bei der über die Zeitrafferaufnahmen analysierten Motilität von CD34⁺ Zellen wurde deren Fähigkeit, sich ohne externen Reiz (Chemokine) und somit zufällig innerhalb eines Zeitraumes zu bewegen ermittelt. Als Maß für die Beweglichkeit (Motilität) der Zellen kann die gesamt Distanz oder die Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Motilität von mit eGFP-Rab-GTPasen transduzierten CD34⁺ Zellen, wurden diese an Tag 2 (50-60h) der Kultivierung mittels Zeitrafferaufnahmen über 2-3 Stunden beobachtet. Es wurden alle 90 sek. eine Aufnahme im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal gemacht. Für die Ermittlung der Motilität anhand der Zeitrafferaufnahmen wurden pro Film 8-15 Zellen einzeln in ihrer Bewegung verfolgt, wodurch die Geschwindigkeit über die Dauer der Aufnahmen ermittelt werden konnte. Als Kontrollen wurden nicht manipulierte (Kontrolle) und eGFP-exprimierende Zellen (eGFP) in allen Versuchen mitgeführt.

Die erhaltenen Daten ließen keine Veränderungen in der Zellmotilität durch Expression der verschiedenen Rab-GTPasen erkennen. In allen untersuchten Ansätzen zeigten die CD34⁺ Zellen eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 3 - 4 $\mu\text{m}/\text{min}$ (n=4, Rab5-, Rab7- und Rab11-Varianten; n=2, Rab21-Varianten; Tabelle 33) welche vergleichbar mit der von Kontrollzellen ($2,9 \pm 0,24 \mu\text{m}/\text{min}$) sowie eGFP-exprimierenden Zellen ($2,5 \pm 0,41 \mu\text{m}/\text{min}$) ist. Die ektopische Expression einiger Rab-GTPasen, wie Rab5WT ($3,16 \pm 0,48 \mu\text{m}/\text{min}$; p(K)= 0,43; p(eGFP)= 0,06), Rab5DN ($2,97 \pm 0,19 \mu\text{m}/\text{min}$; p(K)= 0,65; p(eGFP)= 0,04), Rab5CA ($3,2 \pm 0,61 \mu\text{m}/\text{min}$; p(K)= 0,37; p(eGFP)= 0,09), Rab7DN ($3,4 \pm 0,45 \mu\text{m}/\text{min}$; p(K)= 0,54; p(eGFP)= 0,33), Rab11CA ($3,5 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$; p(K)= 0,06; p(eGFP)= 0,06), Rab21WT ($3,9 \pm$

0,14 $\mu\text{m}/\text{min}$; $n=2$) und Rab21CA ($4,05 \pm 0,07 \mu\text{m}/\text{min}$; $n=2$) führte im Vergleich zu nicht transduzierten Kontrollzellen ($2,9 \pm 0,24 \mu\text{m}/\text{min}$) sowie eGFP-exprimierenden Zellen ($2,5 \pm 0,41 \mu\text{m}/\text{min}$) zu einer tendenziell höheren durchschnittlichen Motilität der Zellen.

Tabelle 33: Messung der *in-vitro* Motilität von CD34⁺ Zellen die verschiedene Rab-Proteine exprimieren nach 50-60h Kultivierung

Motilität $\mu\text{m}/\text{min}$	K	eGFP	Rab6 WT	Rab5 DN	Rab5 CA	Rab7 WT	Rab7 DN	Rab7 CA	Rab11 WT	Rab11 DN	Rab11 CA	Rab21 WT	Rab21 DN	Rab21 CA
V1	2,80	2,50	3,65	3,00	4,00	4,40	5,50	3,80	3	n.b	n.b	3,80	3,80	4,00
V2	3,00	3,00	3,50	3,20	3,60	2,70	2,60	3,00	3,2	3,3	3,6	4,00	2,80	4,10
V3	3,22	2,70	2,82	2,95	2,80	2,69	2,61	3,29	2,7	3	3,5			
V4	2,65	2,02	2,69	2,74	2,74	1,90	3,04	2,75	3,6	3	3,4			
MW	2,92	2,55	3,16	2,97	3,28	2,92	3,44	3,21	3,13	3,10	3,50	3,90	3,20	4,05
Stabw	0,25	0,41	0,48	0,19	0,62	1,05	1,39	0,45	0,38	0,17	0,10	0,14	0,57	0,07
p (K)		0,08	0,43	0,65	0,37	0,99	0,54	0,30	0,54	0,51	0,06	n.b	n.b	n.b
p (eGFP)			0,06	0,04	0,09	0,53	0,33	0,09	0,20	0,15	0,06	n.b	n.b	n.b
p (WT)				0,36	0,24		0,24	0,43		0,83	0,37		n.b	n.b
p (DN)					0,31			0,70			0,02			n.b

Alle Werte geben die durchschnittliche Geschwindigkeit von 8-10 Zellen aus 2-4 Versuchen über den Zeitraum von 2-3h an. Abkürzungen: K = nicht transduzierte Zellen; MW = Mittelwert; n. b. = nicht bestimmbar/kontaminiert/weniger als 3 Experimente; WT= wildtypische Proteinvariante; DN= dominant-negative Proteinvariante; CA=konstitutiv-aktive Proteinvariante; Stabw: Standardabweichung; p (K) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Kontrollzellen; p (eGFP) = Signifikanzberechnung im Vergleich zur CD34⁺eGFP⁺ Zellen; p (WT) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Zellen, die wildtypisches Protein exprimieren; p (DN) = Signifikanzberechnung im Vergleich Zellen, die dominant-negatives Protein exprimieren. (t-Test, zweiseitig, gepaart)

Aus den Ergebnissen lässt sich erkennen, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen die CD34⁺ Zellen nur tendenziell eine beschleunigte Motilität durch die Expression von Rab5WT, Rab5CA, Rab7DN, Rab11CA, Rab21WT und Rab21CA zeigen. In Zusammenhang mit den Daten der morphologischen Polarisierung der Zellen die durch die Rab-GTPasen mit Ausnahme von Rab11DN nicht beeinflusst war, ließ sich folgern, dass die Proteine auch auf die Motilität der Zellen keinen direkten Einfluss haben. Aus einer Studie unserer Arbeitsgruppe ist bereits bekannt, dass der Prozess der Zellpolarisierung im Zusammenhang mit der Motilität und Migrationsfähigkeit steht und dieses Prozesse wichtig für das *Homing* der CD34⁺ Zellen nach Transplantation im *Xenograft*-Modell sind (Görgens *et al.*, 2012). Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass alle wildtypischen und konstitutiven Varianten der hier verwendeten Rab-GTPasen die Polarität (Abschnitt 3.2.5) und Motilität von CD34⁺ Zellen nicht erkennbar beeinflussen. Bei der dominant-negativen Variante von Rab11 liegt ein leichte Verminderung der morphologischen Zellpolarisierung vor, diese scheint jedoch

keinen feststellbaren Einfluss auf die Motilität auszuüben. Woraus angenommen werden kann, dass die hier untersuchten Rab-GTPasen an diesen Prozessen eine untergeordnete Rolle einnehmen.

3.2.7. Analyse der Wirkung ektop exprimierter Rab-GTPasen auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von CD34⁺ Zellen

Wie bereits im Abschnitt 1.3 beschrieben, regulieren Rab-GTPasen viele endosomale Transportwege. Darunter auch die Endozytose, den Transport und das Recycling von Plasmamembranrezeptoren wie z.B. dem Transferrinrezeptor (CD71), dem EGF-Rezeptor und dem LDL-Rezeptor (Ren *et al.*, 1998, Straley und Green, 2000, Chen und Wang, 2001).

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen in CD34⁺ Zellen exprimierten eGFP-Rab Konstrukte endozytotische Prozesse der Zellen stören wurde stellvertretend die Aufnahme zweier Rezeptorliganden (Transferrin und LDL) untersucht. Hierzu wurden CD34⁺Zellen die wildtypische, dominant-negative oder konstitutiv-aktive Rab5-, Rab7-, Rab11- oder Rab21-Proteine exprimieren für 30 min mit Alexa Fluor® 555-konjugiertem Transferrin (Transferrin) bzw. Dil-markiertem acetylierten LDL (Dil acLDL) behandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zeitgleich wurde bei den durchflusszytometrischen Analysen die Transduktionseffizienz der viralen Partikel durch den Anteil der eGFP-positiven Zellen ermittelt. Diese lag zwischen 29,03% ± 26,06 für Rab11DN bis 56,77% ± 17,99 für Rab7WT (Tabelle 34). Vor den durchflusszytometrischen Analysen wurde nicht gebundenes Transferrin bzw. LDL aus den Zellsuspensionen rausgewaschen. Die Aufnahme von Transferrin bzw. Dil acLDL in CD34⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt indem die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen nach Aufnahme der Liganden analysiert wurde (Abschnitt 2.4.1). Als Kontrolle wurden nicht manipulierte Zellen (K) und eGFP exprimierende Zellen bei jedem Experiment mitgeführt. In allen Experimenten wurde die MFI der Kontrollzellen nach Ligandenaufnahme auf 100% normiert (Tabelle 35, Tabelle 36, Abbildung 38 und Abbildung 39). Dadurch wurde die relative Änderung der Ligandenaufnahme in den Ansätzen bestimmt.

Es zeigte sich, dass CD34⁺ Zellen, die Rab5DN (61,08% ± 14,01; n=6) bzw. Rab21DN (50,11% ± 17,43; n=4) exprimierten weniger Liganden aufgenommenen hatten als entsprechende nicht transduzierte Kontrollzellen (K) und rein eGFP exprimierende Zellen (85,12% ± 20,32; n=4), was durch eine relative Abnahme der MFI nachzuweisen war (Tabelle 35; Abbildung 38). Die anderen Rab-GTPasen übten

keinen erkennbaren Effekt auf die Transferrinaufnahme aus was sich in einer ähnlichen MFI im Vergleich zu den Kontrollzellen ($100,00\% \pm 13,88$; $n=4$), zeigte (Tabelle 35; Abbildung 38).

Tabelle 34: Transduktionseffizienz der Endozytoseversuche

Transduktionseffizienz (%)	V1	V2	V3	V4	MW	Stabw
eGFP	33,90	71,30	34,90	28,60	42,18	19,61
Rab5WT	41,20	71,20	41,50	15,00	42,22	22,97
Rab5DN	66,70	47,40	60,50	20,80	48,85	20,36
Rab5CA	58,90	68,00	67,70	13,80	52,10	25,88
Rab7WT	67,30	36,00	67,00	n.d.	56,77	17,99
Rab7DN	63,00	21,00	62,40	n.d.	48,80	24,08
Rab7CA	32,00	38,80	31,60	n.d.	34,13	4,05
Rab11WT	n.d.	79,00	18,80	16,30	38,03	35,50
Rab11DN	n.d.	58,60	19,10	9,40	29,03	26,06
Rab11CA	n.d.	75,00	19,90	15,00	36,63	33,37
Rab21WT	n.d.	70,00	19,00	24,50	37,83	27,99
Rab21DN	n.d.	85,00	29,50	29,00	47,83	32,19
Rab21CA	n.d.	70,00	24,50	27,20	40,57	25,53

Alle Werte stellen den prozentualen Anteil eGFP-positiver CD34⁺ Zellen nach 50-60h Kultivierung dar. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.d.=nicht durchgeführt für diese Konstrukte.

Tabelle 35: MFI der von Rab-GTPase exprimierenden HSVZ nach Aufnahme von Transferrin-Alexa555

MFI (Trf) %	V1	V2	V3	V4	V5	V6	MW	Stabw	p (K)	p (eGFP)
K	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	13,88		
eGFP	89,52	106,82	53,33	96,17	79,76	n.b.	85,12	20,32	0,18	
Rab5WT	90,64	97,87	66,32	83,95	123,99	n.b.	92,55	21,11	0,47	0,51
Rab5DN	70,19	78,72	55,44	46,05	45,58	70,50	61,08	14,01	0,001	0,04
Rab5CA	85,45	105,32	103,16	102,96	67,02	107,91	95,31	15,98	0,50	0,52
Rab7WT	95,63	103,19	n.b.	78,27	104,16	n.b.	95,31	11,98	0,49	0,82
Rab7DN	84,44	104,26	n.b.	85,68	80,43	n.b.	88,70	10,61	0,12	0,16
Rab7CA	95,63	104,26	98,60	81,23	92,09	n.b.	94,36	8,59	0,22	0,41
Rab11WT	101,02	76,60	n.b.	110,62	116,22	n.b.	101,11	17,51	0,91	0,61
Rab11DN	101,02	101,06	n.b.	62,96	116,09	n.b.	95,28	22,68	0,71	0,89
Rab11CA	101,02	105,32	n.b.	83,33	115,15	n.b.	101,21	13,30	0,87	0,49
Rab21WT	101,02	105,32	n.b.	115,56	93,97	n.b.	103,97	9,03	0,44	0,09
Rab21DN	91,84	70,21	n.b.	40,99	39,14	n.b.	50,11	17,43	0,05	0,08
Rab21CA	79,59	105,32	n.b.	107,53	105,63	n.b.	106,16	1,20	0,95	0,48

Alle Werte repräsentieren die Änderung der MFI in %. Die MFI repräsentiert die Aufnahme von Alexa Fluor® 555-konjugiertem Transferrin in transduzierte CD34⁺ Zellen. Die Aufnahme in nicht transduzierte Zellen wurde auf 100% normiert. Abkürzungen: MW= Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; MFI= mean fluorescence intensity.

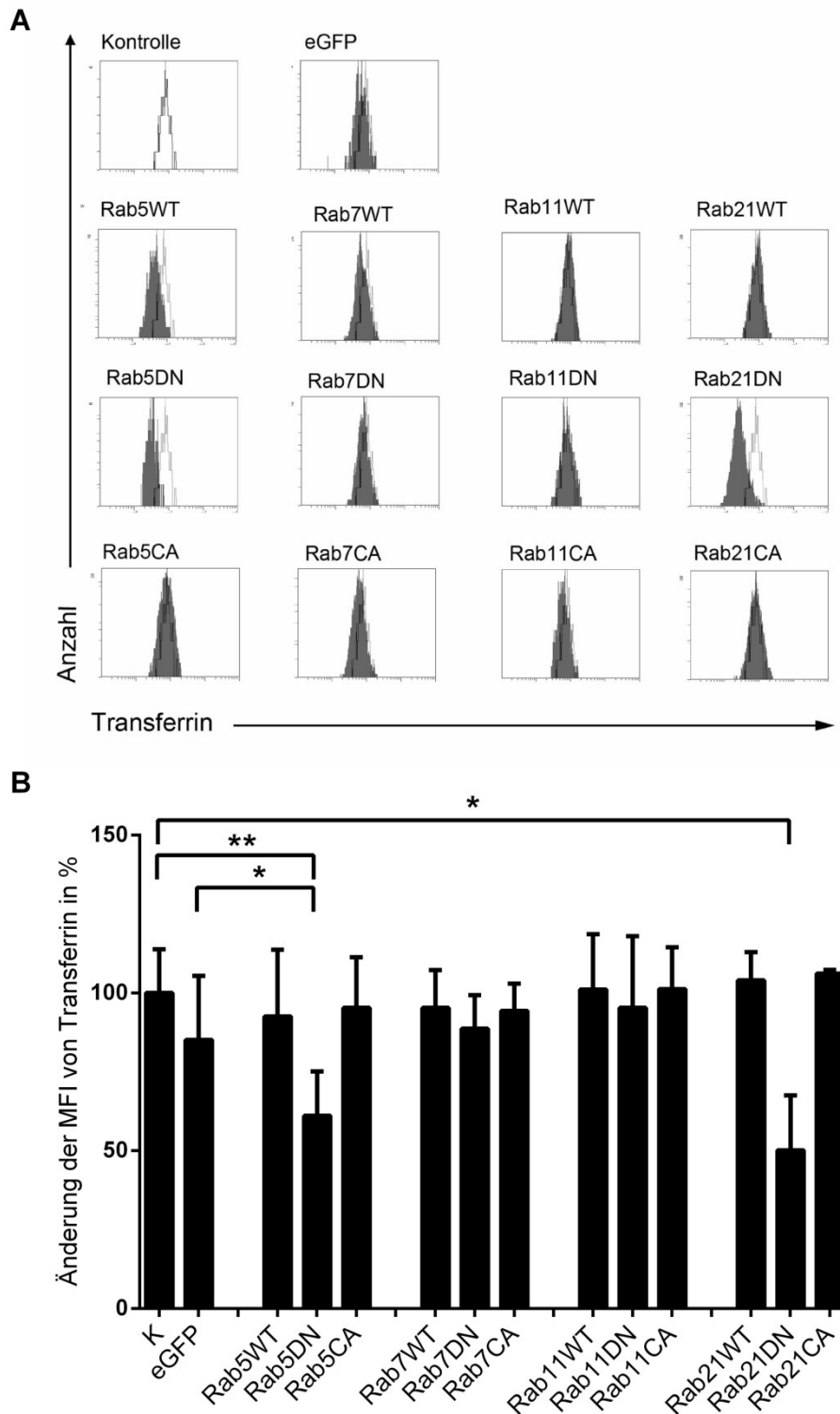


Abbildung 38: Endozytische Aufnahme von Transferrin in CD34⁺ Zellen

A) Durchflusszytometrische Analyse transduzierter CD34⁺ Zellen (grau) die Transferrin aufgenommenen hatten im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (weiss) eines Ansatzes. B) Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Transferrin-Alexa555 in eGFP-exprimierenden Zellen, sowie GFP- und nicht transduzierte Kontrollzellen. (Rab5: n=6, Rab7: n=4, Rab11: n=4, Rab21: n=4). p-Werte siehe Tabelle 35; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

Es zeigte sich, dass Rab5DN (MFI: 60,35% \pm 15,01; n=4) die Endozytose von Dil acLDL vermindert im Vergleich zu nicht transduzierten Kontrollzellen (MFI: 100,00% \pm 44,02; n=4) und eGFP-Zellen (MFI: 96,45% \pm 30,03; n=4) führte (Abbildung 39). Rab11WT (MFI: 128,76% \pm 20,50, n=3) ließ eine erhöhte Aufnahme von Dil acLDL in die Zellen erkennen. Eine ähnliche Erhöhung der Aufnahme von Dil acLDL ließ sich bei Rab11CA (MFI: 135,21% \pm 37,92; n=3), Rab21WT (MFI: 166,44% \pm 3,27; n=2) und Rab21CA (MFI: 166,73% \pm 7,91; n=2) erkennen im Vergleich zu den eGFP-Kontrollzellen (MFI: 111,65% \pm 24,85; n=2) und transduzierten Kontrollzellen (MFI: 100,00% \pm 44,02; n=4) (Tabelle 36; Abbildung 39).

Tabelle 36: MFI der von Rab-GTPase exprimierenden HSVZ nach Aufnahme von Dil acLDL

MFI (LDL) %	V1	V2	V4	V4	MW	Stabw	p (K)	p (eGFP)
K	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	44,02		
eGFP	87,94	137,50	65,71	94,66	96,45	30,03	0,83	
Rab5WT	94,91	119,64	61,22	55,34	82,78	30,13	0,88	0,26
Rab5DN	n.b.	77,68	51,84	51,53	60,35	15,01	0,04	0,10
Rab5CA	106,82	113,39	60,41	58,40	84,76	29,41	0,51	0,40
Rab7WT	144,64	72,24	71,76	n.b.	95,05	41,94	0,89	0,79
Rab7DN	148,21	60,82	63,74	n.b.	105,83	49,64	0,78	0,56
Rab7CA	133,93	62,86	59,54	n.b.	96,01	42,02	0,61	0,32
Rab11WT	130,71	107,35	148,21	n.b.	128,76	20,50	0,14	0,03
Rab11DN	116,03	94,75	103,57	n.b.	104,78	10,69	0,52	0,66
Rab11CA	135,05	97,38	173,21	n.b.	135,21	37,92	0,25	0,09
Rab21WT	164,13	168,75	n.b.	n.b.	166,44	3,27	n.b.	n.b.
Rab21DN	102,99	133,93	n.b.	n.b.	118,46	21,88	n.b.	n.b.
Rab21CA	161,14	172,32	n.b.	n.b.	166,73	7,91	n.b.	n.b.

Alle Werte repräsentieren die Änderung der MFI in %. Die MFI repräsentiert die Aufnahme von Dil acLDL in transduzierte CD34⁺ Zellen. Die Aufnahme in nicht transduzierte Zellen wurde auf 100% normiert. Abkürzungen: MW= Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; MFI= mean fluorescence intensity; n.b.=nicht bestimmt bzw. kontaminiert

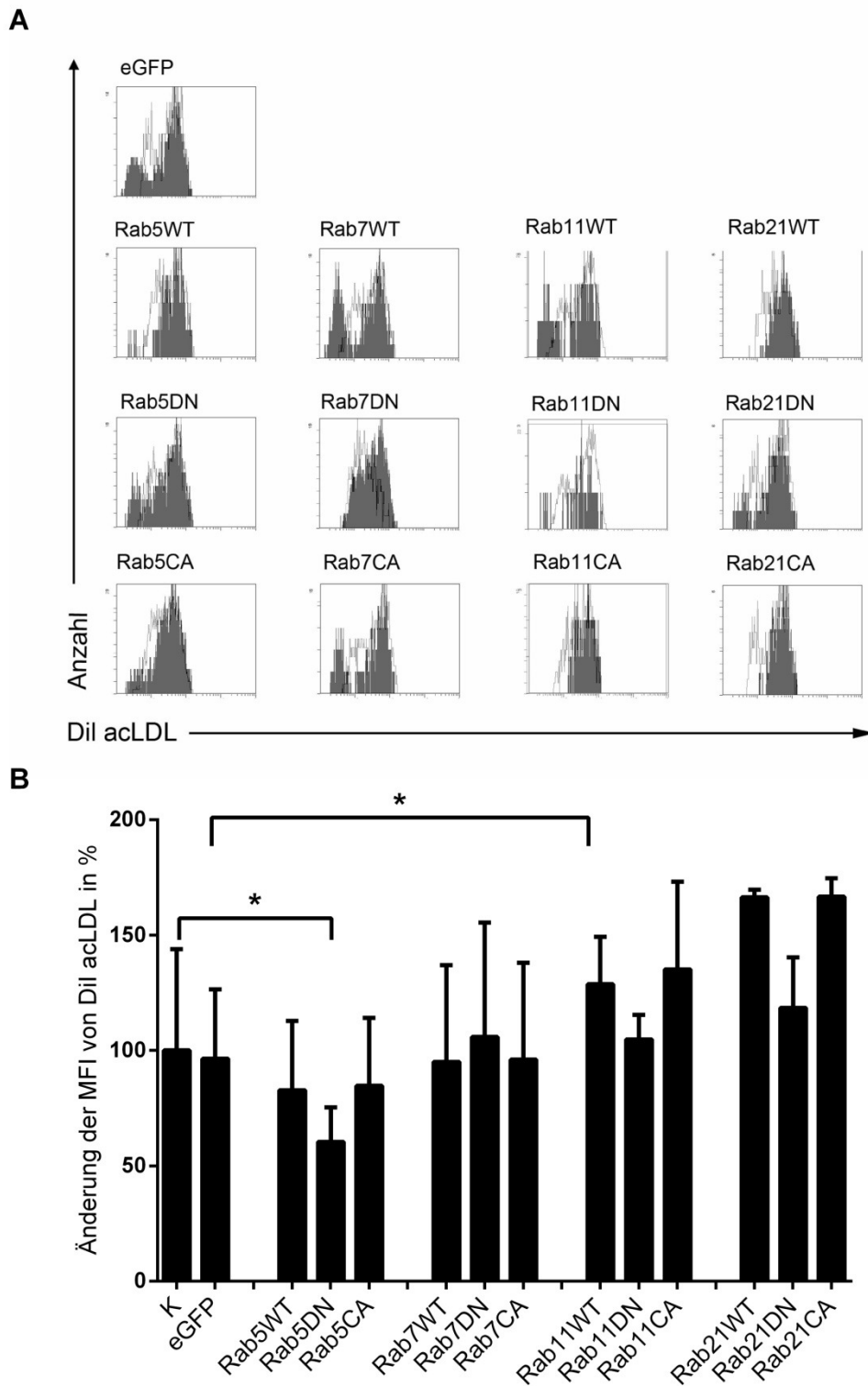


Abbildung 39: Endozytische Aufnahme von Dil acLDL in CD34⁺Zellen

A) Durchflusszytometrische Analyse transduzierter CD34⁺ Zellen (grau) die Dil acLDL aufgenommenen hatten im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (weiss) eines Ansatzes. B) Prozentuale Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Dil acLDL in eGFP-Rab-GTPasen exprimierende Zellen, sowie GFP- und nicht transduzierte Kontrollzellen. (Rab5: n=4, Rab7: n=3, Rab11: n=3, Rab21: n=2). p-Werte Tabelle 36; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zusammenfassend ließen sich aus den Aufnahmeversuchen erkennen, dass Rab5DN und Rab21DN die Endozytose von Transferrin in CD34⁺ Zellen vermindern. Außerdem wirkte sich Rab5DN auch hemmend auf die Endozytose von LDL aus. Das deutet darauf hin, dass die Expression dominant-negativer Rab-GTPasen die Funktion endogener Proteine, die an frühen endosomalen Schritten wirken beeinträchtigen. Die Beeinträchtigung der Endozytose von Transferrin oder LDL durch Rab5DN ist auch in HeLa und BHK-21 Zellen beschrieben (Stenmark *et al.*, 1994, Vitelli *et al.*, 1997). Die vermehrte Aufnahme von LDL in Rab11WT exprimierende CD34⁺Zellen lässt weiter vermuten, dass neben frühen endosomalen Prozessen auch die Recycling-Wege eine Rolle in der Verarbeitung des aufgenommenen LDL spielen. In HEK293 Zellen ist gezeigt, dass die Expression von Rab11WT den lysosomalen Abbau von aufgenommenen β_2 -adrenergischen Rezeptoren inhibiert (Moore *et al.*, 2004).

Zusammengenommen führten diese Erkenntnisse aus den Endozytoseversuchen zur Vermutung, dass die Expression der Rab-GTPasen auch endosomale Signaltransduktionswege stören und so die Zellschicksalsspezifikation von CD34⁺ Zellen beeinflussen könnten.

3.2.8. Durchflusszytometrische Analysen von Rab-GTPasen exprimierenden CD34⁺Zellen

Werden durch genetische Manipulation Effektoren (z.B. Rab-GTPasen) in frisch isolierte CD34⁺ Zellen eingebracht, können diese Einfluss auf die Entwicklung bzw. Reifung der Zellen haben. Erste Einflüsse von Effektoren lassen sich anhand der Proliferation manipulierter Zellen in Kultur erkennen. Die Zu- bzw. Abnahme des relativen Anteils von eGFP⁺ Zellen über die Dauer der Kultivierung gibt erste Hinweise auf einen Proliferationsvor- oder Nachteil durch die jeweiligen exprimierten Transgene. Vermindert sich der Anteil eGFP-positiver Zellen über die Zeit, so kann das auf eine Blockierung der Proliferation der Zellen durch das Transgen oder einen durch dieses ausgelösten apoptotischen Effekt auf die Zellen hindeuten. Im Weiteren ist bekannt, dass ca. 80% der frisch isolierten CD34⁺Zellen auch CD133⁺ ko-exprimieren. Über die Dauer der Kultivierung entwickeln sich CD34⁺Zellen weiter, so dass auf einigen Zellen CD34 und CD133 von der Oberfläche verschwinden (Giebel *et al.*, 2004, Giebel *et al.*, 2006). Beide Proteine dienen als phänotypische Marker von primitiven HSVZ (Giebel *et al.*, 2004, Giebel *et al.*, 2006, Görgens *et al.*, 2013b). Demnach würde das exprimierte Transgen die Reifung der Zellen fördern, wenn der

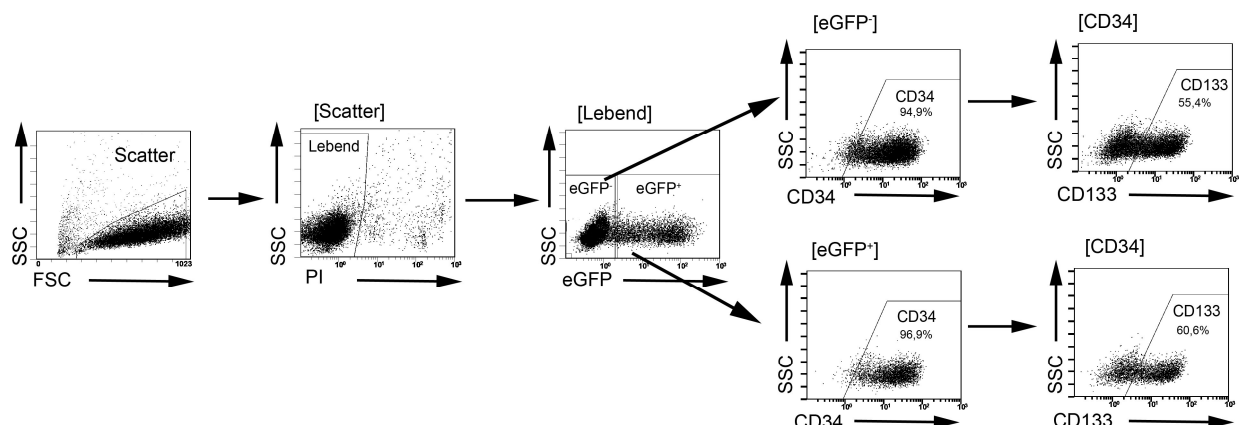
Anteil von CD34⁺ bzw. CD133⁺ Zellen schneller abnimmt als in nicht manipulierten Zellen. Wirkt ein Effektor der Zellreifung entgegen würde ein höherer Anteil von CD34⁺ oder CD133⁺ Zellen in den transduzierten im Vergleich zu nicht manipulierten Zellen erwartet werden.

Um zu untersuchen, ob Rab-GTPasen die Zellschickssalspezifikation der CD34⁺Zellen beeinflussen, wurden durchflusszytometrische Analysen der transduzierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden initial 50.000 CD34⁺ Zellen transduziert und bei den ersten durchflusszytometrischen Analysen (Tag 3) die Transduktionseffizienzen ermittelt (Tabelle 37). Die transduzierten Zellen (eGFP-positive: eGFP⁺) konnten in den durchflusszytometrischen Analysen durch die Expression von eGFP von nicht transduzierten Zellen (eGFP-negative: eGFP⁻) unterschieden werden. Des Weiteren wurden Fluoreszenz-konjugierte Antikörper gegen CD34 und CD133 in den Analysen verwendet, um in den Messungen auch die Entwicklung primitiver HSVZ zu analysieren. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 6 und Tag 10) durchgeführt. Dabei wurde sowohl der relative Anteil der eGFP⁺, eGFP⁺CD34⁺ und eGFP⁺CD133⁺CD34⁺ Zellen als auch die absolute Zellmenge der einzelnen Zellpopulationen in den Ansätzen bestimmt (Abbildung 40). Langsam teilende primitive HSVZ würden bei der Betrachtung des relativen Anteils der Zellpopulationen den Eindruck erwecken, dass sie einen Proliferationsnachteil haben oder die Zellen schneller reifen im Vergleich zu den Kontrollen. Durch die absoluten Zellzahlen konnten auch geringe Effekte auf die Proliferation von HSVZ festgestellt werden. Als Kontrolle in allen Versuchen dienten CD34⁺Zellen die nur eGFP-exprimierten und die eGFP⁻-Subpopulation in den jeweiligen Ansätzen (interne Kontrolle). Die interne Kontrolle diente zum Ausschluss eines parakrinen Einflusses durch die Effektoren. An allen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 6 und Tag 10) wurde zunächst der relative Anteil an eGFP-positiven (eGFP⁺) Zellen ermittelt. Um die Änderung des relativen Anteils von eGFP⁺ Zellen in allen Ansätzen an allen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 6 und Tag 10) zu vergleichen, wurden die Werte von Tag 3 auf 100% normiert. So konnten Zu- und Abnahme des Anteils der eGFP⁺ Zellen bestimmt werden (Abbildung 41).

Tabelle 37: Transduktionseffizienz von CD34⁺ Zellen in den einzelnen Versuchen

Transduktionseffizienz Kinetik %	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V8	V9	MW	Stabw
eGFP	40,6	48,1	79	65	89	70	63	77	65,96	17,29
Rab5WT	83,7	78,2	77,8	66,8	27	29	76	74	64,06	22,76
Rab5DN	90	83	84,4	73,3	35	37	68	76	68,34	21,11
Rab5CA	93,9	84,6	85,3	86,1	84	88	73	23	77,24	22,67
Rab7WT	n.b	n.b	n.b	n.b	40	39	27	93	49,75	29,43
Rab7DN	86,8	62,5	39	n.b	6	10	42	6	36,04	31,10
Rab7CA	n.b	n.b	n.b	84,7	32,2	29	86	88	63,98	30,52
Rab11WT	83,1	79,5	n.d	63,8	18	30	79	67	60,06	25,83
Rab11DN	86,7	71,5	n.d	48,6	14	16	28	55	45,69	27,81
Rab11CA	89	72,9	n.d	50,2	10,3	17,8	31	54	46,46	28,72
Rab21WT	62,6	82,6	48,5	44,4	27	34	50	38,5	48,45	17,54
Rab21DN	76	88,9	87,3	85,9	49	54	52	43	67,01	19,36
Rab21CA	84,5	86,4	88,4	86,6	43	52	n.b	n.b	73,48	20,36

Alle Werte repräsentieren den prozentualen Anteil eGFP-positiver CD34⁺ Zellen nach 50-60h Kultivierung. V1-V6=durchgeführte Versuche; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmbar/kontaminiert; n.d.=nicht durchgeführt

**Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analysestrategie zur Ermittlung des Anteils der verschiedenen Zellpopulationen von CD34⁺ Zellen**

Strategie für die durchflusszytometrische Analyse des Anteils an eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellen sowie CD34⁺ und CD34⁺CD133⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellpopulationen über die Dauer der Kultivierung. Die Zellen wurden zunächst auf eine Zellpopulation im SSC/FSC eingegrenzt und dann mit Propidiumiodid (PI) auf tote und lebende Zellen aufgetrennt. Durch die weitere Auftrennung der lebenden Zellen in eGFP⁺ und nicht transduzierten eGFP⁻ Zellen innerhalb der Ansätze ließen sich diese zwei Zellpopulationen getrennt auf den CD34⁺CD133⁺ Anteil analysieren.

Es zeigte sich, dass in Transduktionsansätzen, in denen CD34⁺ Zellen lediglich mit eGFP kodierenden viralen Partikeln transduziert worden sind, der Anteil der eGFP⁺ Zellen über die 10 tägige Kulturdauer hinweg nahezu konstant blieb Tag 10 (97,37% ± 4,94; n=4) (Abbildung 41; Tabelle 55). Im Vergleich hierzu reduzierte sich der Anteil der eGFP⁺ Zellen in den Transduktionsansätzen mit Rab5WT auf 87,03% ± 6,59 (n=4), Rab5DN auf 81,61% ± 7,78 (n=4), Rab5CA auf 69,24% ± 12,04 (n=4), sowie

bei Rab11DN auf $64,32\% \pm 4,65$ ($n=4$) (Abbildung 41; Tabelle 55). Die anderen Rab-GTPasen (Rab7WT, Rab7DN, Rab7CA, Rab11WT, Rab11CA, Rab21WT, Rab21DN und Rab21CA) hielten den Anteil der eGFP⁺ Zellen über die Kultur als auch in den Kontrollansätzen konstant (Abbildung 41; Tabelle 55).

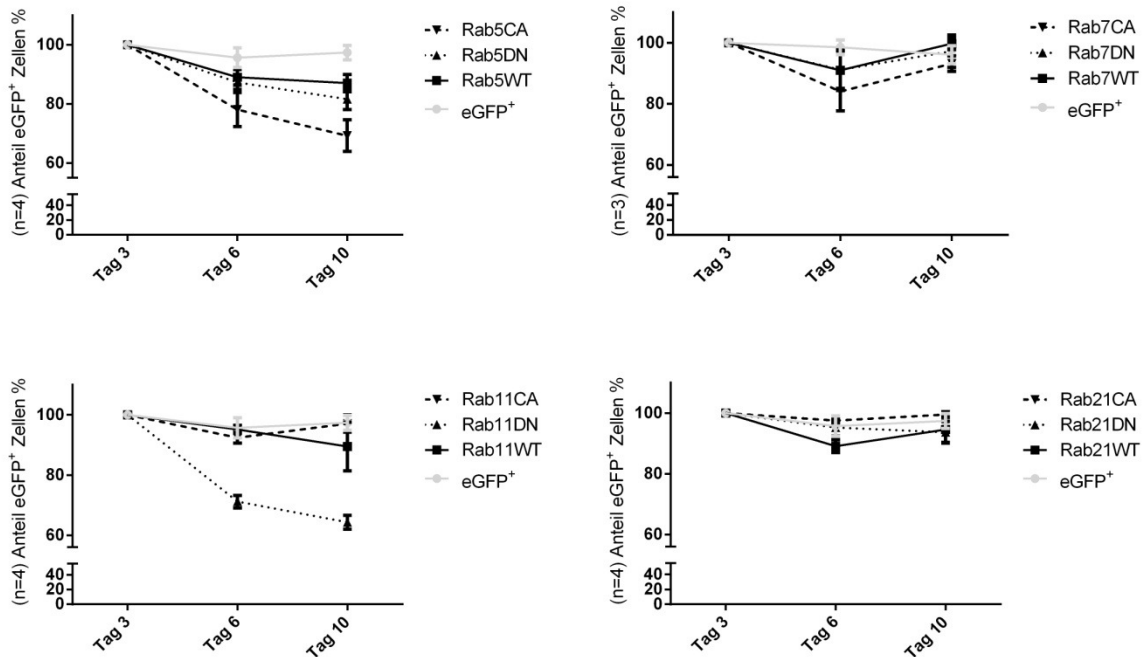


Abbildung 41: Änderung des relativen Anteils an eGFP-positiven Zellen

Graphische Darstellung der Entwicklung des Anteils der rein eGFP exprimierender (eGFP⁺) Zellen, im Vergleich zu eGFP-Rab-GTPasen exprimierenden Zellen an Tag 3, Tag 6 und Tag 10. Es wurden Zellen, die eGFP-Rab5WT, eGFP-Rab5DN, eGFP-Rab5CA, eGFP-Rab7WT, eGFP-Rab7DN, eGFP-Rab7CA, eGFP-Rab11WT, eGFP-Rab11DN, eGFP-Rab11CA, eGFP-Rab21WT, eGFP-Rab21DN und eGFP-Rab21CA exprimieren, analysiert.

Somit lässt sich aus den Veränderungen des Anteils von eGFP⁺ Zellen schließen, dass die Rab5 Varianten und Rab11DN die Proliferation der Zellen vermindern. Ursache könnte ein apoptotischer Effekt dieser Rab-GTPasen sein oder eine Beeinflussung des Zellzyklus. Um zu untersuchen, ob die festgestellte Änderung des Anteils von eGFP⁺Zellen in den verschiedenen Rab-GTPase Ansätzen mit Veränderungen in der Expansion von CD34⁺ oder CD34⁺CD133⁺ Zellen korreliert, wurden diese Zellpopulationen durchflusszytometrisch in den Ansätzen quantifiziert (Abbildung 40). Als Referenz wurden in allen Versuchen eGFP-exprimierende Kontrollzellen mitgeführt. Zusätzlich dienten nicht transduzierte Zellen von jedem Ansatz als interne Kontrolle und hatten den Zweck mögliche parakrin vermittelte Effekte zu identifizieren. Mittels Propidiumiodid wurde der Anteil toter Zellen ermittelt und aus den Analysen ausgeschlossen. Zur Analyse der Daten wurden lebende

Zellen auf den Anteil von eGFP⁺ und eGFP⁻ untersucht (Abbildung 40). In diesen zwei Populationen (eGFP⁺ und eGFP⁻) wurde die Anzahl von CD34⁺ Zellen und CD34⁺CD133⁺ Zellen bestimmt und zur Ermittlung der Expansion der Zellen der Quotient aus den Tag 3 und Tag 10 Werten bestimmt (Abbildung 42; Anhang: Tabelle 52).

Durch interindividuelle Unterschiede in den Nabelschnurbluten und unterschiedlichen Transduktionseffizienzen in den einzelnen Versuchen, kam es zu hohen Streuungen der Werte. Die Proliferationsanalysen der CD34⁺ Zellen zeigten für Rab11WT und Rab21CA eine erhöhte Expansion im Vergleich zur internen Kontrolle (Abbildung 42). Rab5CA zeigte in zwei von fünf Versuchen eine erhöhte Expansion der internen Kontrollzellen. Die anderen Ansätze wiesen keinen Unterschied in der Expansion zu den internen Kontrollzellen auf. Eine Korrelation der vermehrten Expansion mit einer erhöhten oder verminderten Transduktionseffizienz konnte nicht festgestellt werden (V8 und V9 in Tabelle 37). Im Vergleich der Expansion der Rab-exprimierenden Zellen zu den nur eGFP-exprimierenden Zellen ließen sich keine Unterschiede erkennen. Negative Effekte auf die Expansion der Zellen im Vergleich zu den internen Kontrollzellen waren durch die Expression der Rab5-Varianten festzustellen (Abbildung 42).

Expansionsanalysen der CD133⁺CD34⁺ Zellpopulation ließen erkennen, dass Rab5DN, Rab7CA und Rab21DN exprimierende Zellen eine geringere Expansion im Vergleich zu den internen Kontrollzellen zeigten (Abbildung 42; Anhang: Tabelle 52). Im Weiteren übten Rab11WT und Rab21CA tendenziell einen positiven Effekt auf die Expansion von CD133⁺CD34⁺ Zellen aus (Abbildung 42; Anhang: Tabelle 52).

Den Ergebnissen der Expansion von CD34⁺ Zellen und CD133⁺CD34⁺ Zellen in den Ansätzen kann entnommen werden, dass die Expression der meisten Rab-GTPasen keine erkennbaren Auswirkung auf die Proliferation der Zellpopulationen hat. Alleine die Expression von Rab11WT und Rab21CA vermittelt einen geringen Expansionsvorteil im Vergleich zu den internen Kontrollzellen. Anders herum wurde durch die Expression von Rab5DN und Rab21DN eine verringerte Expansion der CD34⁺ Zellen festgestellt. Demnach deuten die Daten tendenziell an, dass durch die dominant-negativen Proteine ein negativer Effekt auf die Proliferation auf CD133⁺CD34⁺ Zellen vermittelt wird.

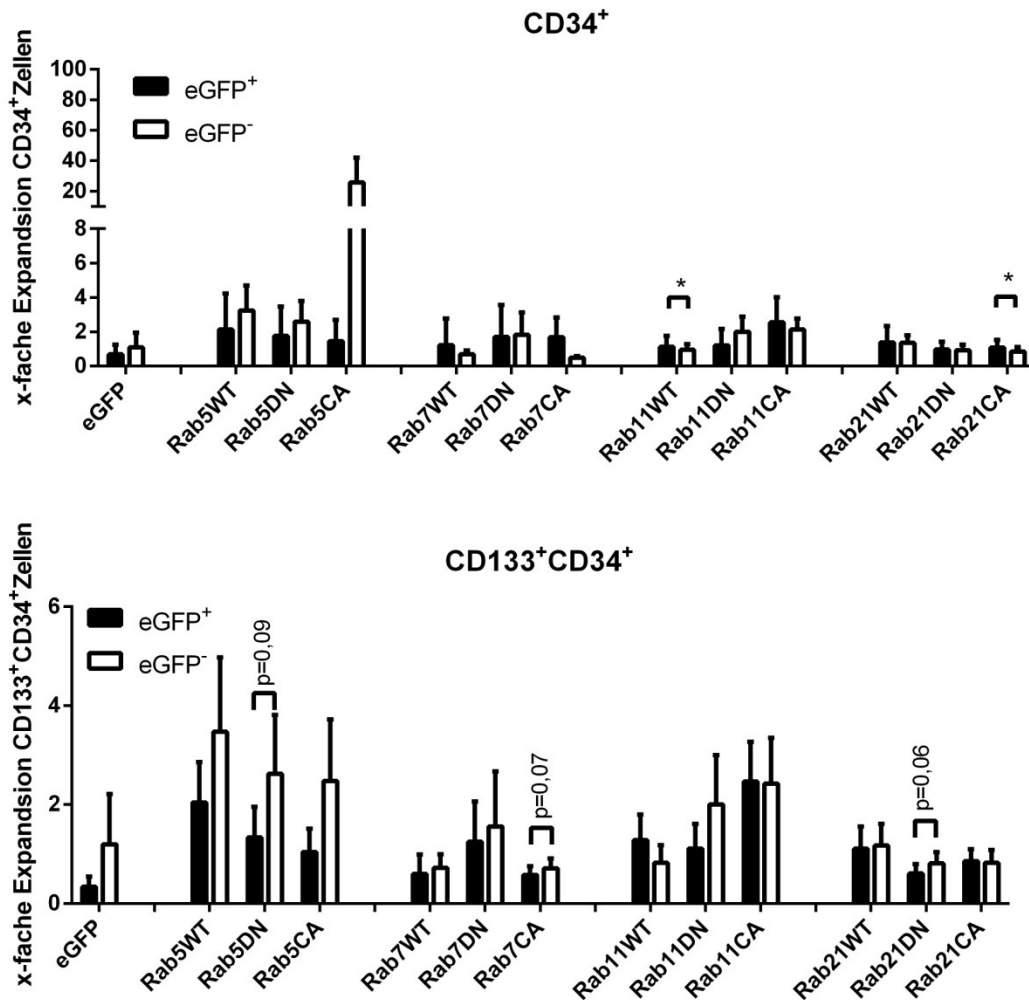


Abbildung 42: Expansion von eGFP⁺CD34⁺ Zellen und eGFP⁺CD133⁺CD34⁺ Zellen

Expansionsfaktor von CD34⁺ Zellen und CD133⁺CD34⁺ Zellen ermittelt aus dem Quotienten der Zellzahl an Tag 10 zu Tag 3 der Kultivierung. Zellen die exprimierten verschiedene eGFP-Rab-GTPasen oder nur eGFP (Kontrolle) sind als eGFP⁺ gekennzeichnet (schwarze Balken). Expansion der internen Kontrollzellen (eGFP⁻: weiße Balken). Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben (Rab5-Varianten n=5; Rab7-Varianten n=3; Rab11-Varianten n=4 und Rab21-Varianten n=4), Signifikante Änderungen zwischen eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellen sind durch (*) gekennzeichnet (*=p<0,05).

3.2.9. Untersuchung des Koloniebildungspotenzials nach ektopter Expression der eGFP-Rab-GTPase Konstrukte

Kultivierte CD34⁺ Zellen lassen sich phänotypisch in die CD133⁺CD34⁺ und die CD133^{low}CD34⁺ Zellen unterteilen (Giebel *et al.*, 2006, Beckmann *et al.*, 2007, Görgens *et al.*, 2013b). Durch spezifische Analysen der unterschiedlichen Zellpopulationen in dem sogenannten *Colony-forming-cell Assay* (CFC-Ansatz), in dem durch spezifische Zytokine das erythrozytäre und myeloische Differenzierungspotenzial der HSVZ stimuliert wird, wurde gezeigt, dass sich in den zwei Zellpopulationen Progenitoren befinden, die unterschiedliches Differenzierungspotenzial besitzen (Görgens *et al.*, 2013b). Multipotenten Progenitoren (MPP) die Differenzierungspotenzial für alle hämatopoetischen Zellen besitzen sowie

lymphatisch-myeloischen Progenitoren und Granulozyten-Makrophagen Vorläufer finden sich bei frisch isolierten und für kurze Zeit kultivierten CD34⁺ Zellen in der CD133⁺CD34⁺ Zellpopulation. Die erythrozytären-myeloischen Vorläufer sind vorwiegend in der CD133^{low}CD34⁺ Zellpopulation enthalten (Görgens *et al.*, 2013b). Durch diese spezifischere Auftrennung der CD34⁺ Zellen, lassen sich durch die verschiedenen Rab-GTPasen vermittelte Effekte auf das Linienpotenzial der CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen untersuchen.

Die Analyse der Zellpopulationen im CFC-Ansatz bietet zudem den Vorteil, dass das Potenzial einzelner Zellen untersucht wird, da wenige Zellen in ein semisolid Medium eingebracht werden. Jede entstehende Kolonie nach 14 Tagen geht demnach auf jeweils eine der 200 eingesetzten Zellen zurück. Durch die Anzahl der gebildeten Kolonien kann dementsprechend das Koloniebildungspotenzial der eingebrachten Zellpopulation bestimmt werden. Bei den gebildeten Kolonien kann zwischen fünf verschiedenen Typen unterschieden werden: CFU-E (*colony-forming-unit-erythrocyte*), BFU-E (*burst-forming-unit-erythrocyte*), CFU-G (*colony-forming-unit-granulocyte*), CFU-M (*colony-forming-unit-macrophage*), CFU-GM (*colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*) und CFU-MIX oder -GEMM (*colony-forming-unit granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte*)-Kolonien. Über die gebildeten Kolonietypen können Rückschlüsse auf die jeweiligen Progenitoren geschlossen werden, die die Kolonie gebildet haben. So werden BFU-E und CFU-E nur aus Progenitoren gebildet, die erythrozytäres Differenzierungspotenzial enthalten. CFU-GM, CFU-G und CFU-M koloniebildende Zellen besitzen dementsprechend Potenzial zur Bildung von Granulozyten und Makrophagen besitzen bzw. nur für einen der beiden Zelltypen. Die CFU-MIX Kolonien gehen von Progenitoren hervor, die das Potenzial haben sich in alle Zellen der erythrozytären-myeloischen Linie zu differenzieren und werden daher als die unreifsten Ausgangszellen in diesem Ausleseverfahren angesehen.

Nach dem Einbringen von Effektoren in die Zellen lassen sich durch den CFC-Ansatz Veränderungen im Differenzierungspotenzial der eingebrachten Zellpopulationen analysieren. So können durch Effektoren ausgelöste Änderungen im Koloniebildungspotenzial und im Anteil verschiedenen Kolonietypen im Vergleich zu dem von Kontrollzellen Hinweise auf Einflüsse von Zellschicksalsentscheidungen geben. Die Reduktion des Koloniebildungspotenzials kann z.B. auf eine Blockierung der Differenzierung hindeuten und die Erhöhung des Anteils einzelner Kolonietypen

könnte auf einen Differenzierungsvorteil für eine Zelllinie hinweisen, die durch eine Verschiebung des Linienpotenzials der Zellen in eine Richtung hervorgerufen wird.

Um den Effekt von Rab-GTPasen und den damit verknüpften endosomalen Prozessen auf das myeloische und erythrozytäre Differenzierungspotenzial von CD34⁺ Zellen zu untersuchen, wurden CFC-Ansätze von den transduzierten und Kontrollzellen angesetzt. Dafür wurden wie in den Abschnitten zuvor die frisch isolierten CD34⁺ Zellen genetisch mit den Rab-GTPase-Konstrukten manipuliert und für drei Tage kultiviert. Die mittlere Transduktionseffizienz für die verschiedenen Rab-GTPase Konstrukte ist in Tabelle 18 aufgeführt. Am dritten Tag wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert, und in CD133⁺CD34⁺ (*high*) und CD133^{low}CD34⁺ (*low*) Zellen aufgetrennt. Die beiden sortierten Zellpopulationen (CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺) wurden getrennt voneinander in CFC-Ansätze eingebracht und für 14 Tage weiter kultiviert (Abbildung 43 A). Durch das Auftrennen der Zellen in die *high*- und *low*- Populationen sollen Einflüsse auf Zellschicksalsentscheidungsprozesse durch die Rab-GTPasen einfacher anhand der Änderungen im Differenzierungspotenzial der Zellen analysiert werden.

Tabelle 38: Transduktionseffizienz von CD34⁺ Zellen

Transduktionseffizienz CFC-Ansätze %	V1	V2	V3	V4	V5	V6		
							MW	Stabw
eGFP	15,60	56,50	72,00	80,80	33,90	77,00	55,97	28,89
Rab5WT	41,70	21,20	20,90	69,70	34,90	27,00	35,90	23,04
Rab5DN	64,70	27,80	28,50	46,20	60,50	37,00	44,12	17,48
Rab5Ca	33,10	16,70	17,20	73,50	59,00	23,00	39,90	26,69
Rab7WT	23,70	32,40	36,30	38,20	67,80	n.d.	39,68	6,44
Rab7DN	12,20	4,50	8,10	18,90	61,10	n.d.	20,96	6,18
Rab7CA	20,30	28,80	25,80	38,20	31,10	n.d.	28,84	7,49
Rab11WT	n.d.	15,80	28,80	79,90	n.d.	n.d.	41,50	33,88
Rab11DN	n.d.	10,40	46,50	52,30	n.d.	n.d.	36,40	22,70
Rab11CA	n.d.	9,00	47,80	77,40	n.d.	n.d.	44,73	34,30
Rab21WT	n.d.	21,80	25,30	78,60	n.d.	n.d.	41,90	31,83
Rab21DN	n.d.	42,50	11,50	86,60	n.d.	n.d.	46,87	37,74
Rab21CA	n.d.	38,20	14,50	78,10	n.d.	n.d.	43,60	32,14

Alle Werte stellen den prozentualen Anteil eGFP-positiver CD34⁺ Zellen nach 50-60h Kultivierung dar. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.d.=nicht durchgeführt für diese Konstrukte.

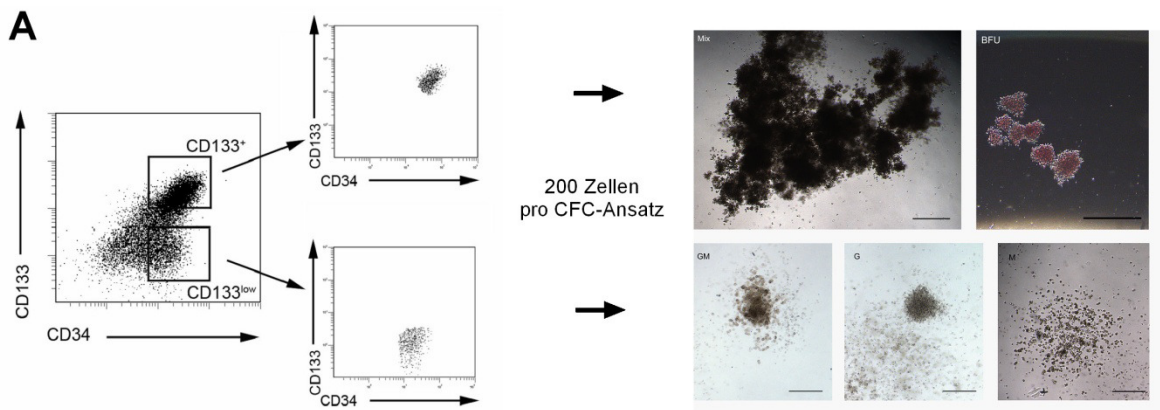
Zunächst wurde die gesamte Koloniebildungsrate nach Expression der einzelnen Rab-GTPasen für die CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellpopulationen im CFC-Ansatz quantifiziert (Abbildung 43). Dabei wurde die Frequenz der gebildeten

Kolonien aufgrund der in den Ansatz eingebrachten Zellmenge bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass durch die Expression von Rab5DN und Rab21DN in beiden Zellpopulationen das Koloniebildungspotenzial vermindert wurde (Abbildung 43, Tabelle 53 und Tabelle 54). Im Falle von Rab5DN sank in den CD133^{low}CD34⁺-Ansätzen das Koloniebildungspotenzial von 41,75% ± 7,60 (Kontrolle, n=6) und 37,96% ± 2,77 (eGFP, n=6) auf 28,08% ± 7,86 (Rab5DN, n=6). In den CD133⁺CD34⁺-Ansätzen sank es von 37,45% ± 9,18 (Kontrolle, n=6) und 32,92% ± 10,34 (eGFP, n = 6) auf 24,67% ± 5,46 (Rab5DN, n=6) ab. Bei Rab21DN (n = 3) exprimierenden Zellen, verminderte sich die Koloniebildungsrate in der CD133⁺CD34⁺-Zellfraktion auf 22,58% ± 8,71 und in der CD133^{low}CD34⁺-Zellfraktion auf 24,33% ± 5,01. Auch die Expression von Rab11WT und Rab11DN in der CD133⁺CD34⁺ Zellfraktion führte zu einer Beeinflussung des Koloniebildungspotenzials. Hier reduzierte sich die Koloniebildung auf 21,50% ± 7,13 (Rab11WT, n=3) und auf 21,50% ± 4,83 (Rab11DN, n=3). Die anderen Rab-GTPasen hatten keine Effekte auf das gesamt Koloniebildungspotenzial der beiden Zellpopulationen (Abbildung 43 B).

Um die Einflüsse der Rab-GTPase Konstrukte auf das Differenzierungspotenzial der CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen detaillierter darzustellen, wurden die Frequenzen der einzelnen Kolonietypen in den Balkendiagrammen aufgezeigt (Abbildung 44). Es wurde zwischen gesamt roten (BFU-E und CFU-E), weißen (CFU-G, CFU-M und CFU-GM) und gemischten (CFU-MIX) Kolonien unterschieden. Es fiel auf, dass neben der Reduktion des gesamten Koloniebildungspotenzials durch Rab5DN und Rab21DN die gleichen Kolonietypen beeinflusst waren. In der CD133⁺CD34⁺-Zellpopulation führte die Expression von Rab5DN zum fast völligen Verlust der CFU-M und CFU-MIX Kolonien (Abbildung 44 A). Durch Rab21DN waren ebenfalls die CFU-M, aber auch die CFU-G und CFU-MIX betroffen. Die CFU-G reduzierten sich von 10,00% ± 1,00 (Kontrolle, n=3) und 10,13% ± 0,18 (eGFP, n=3) auf 8,33% ± 3,00 (Rab21DN, n=3) (Abbildung 44), die CFU-M und CFU-MIX waren mit 0,83% ± 1,01 und 0,08% ± 0,14 kaum vorhanden (CFU-M: Kontrolle 2,83% ± 1,26, n=3; eGFP 0,88% ± 0,53, n=3 und CFU-MIX: Kontrolle 0,17% ± 0,14, n=3; eGFP 0,25% ± 0,00, n=3). Rab11WT und Rab11DN beeinflussten jeweils die CFU-G Koloniebildung und verminderten sie auf 9,17% ± 3,33 (Rab11WT, n=3) und 9,42% ± 2,65 (Rab11DN, n=3). Bei den anderen eGFP-Rab-Konstrukten Rab5WT, Rab5CA, Rab7WT, Rab7DN, Rab7CA, Rab11CA, Rab21WT und Rab21CA wurden

weder auf die Gesamt-Koloniebildung noch auf einzelne Kolonietypen der Zellen aus der CD133⁺CD34⁺-Zellpopulation eindeutige Effekte gefunden (Abbildung 44 A).

Die erhaltenen Koloniebildungsfrequenzen aus der CD133⁺CD34⁺-Zellpopulation deuten an, dass die Rab-GTPasen vorwiegend bei der Makrophagen- und erythrozytären Differenzierung involviert sein könnten. Mit Ausnahme von eGFP-Rab11WT wurden die hervorgerufenen Effekte von den dominant-negativen Rab-GTPase Varianten ausgelöst, so dass anzunehmen ist, dass die funktionell aktive Form der frühen endosomalen Rab-GTPasen und die damit zusammenhängenden endozytotischen Prozesse notwendig für die Ausreifung von HSVZ in reife Blutzellen der myeloischen und erythrozytären Linien sind. Allerdings könnten durch die Expression der dominant-negativen Varianten auch Rab-GTPase Effektorproteine beeinflusst worden sein, die indirekt zu diesen Effekten geführt haben.



B

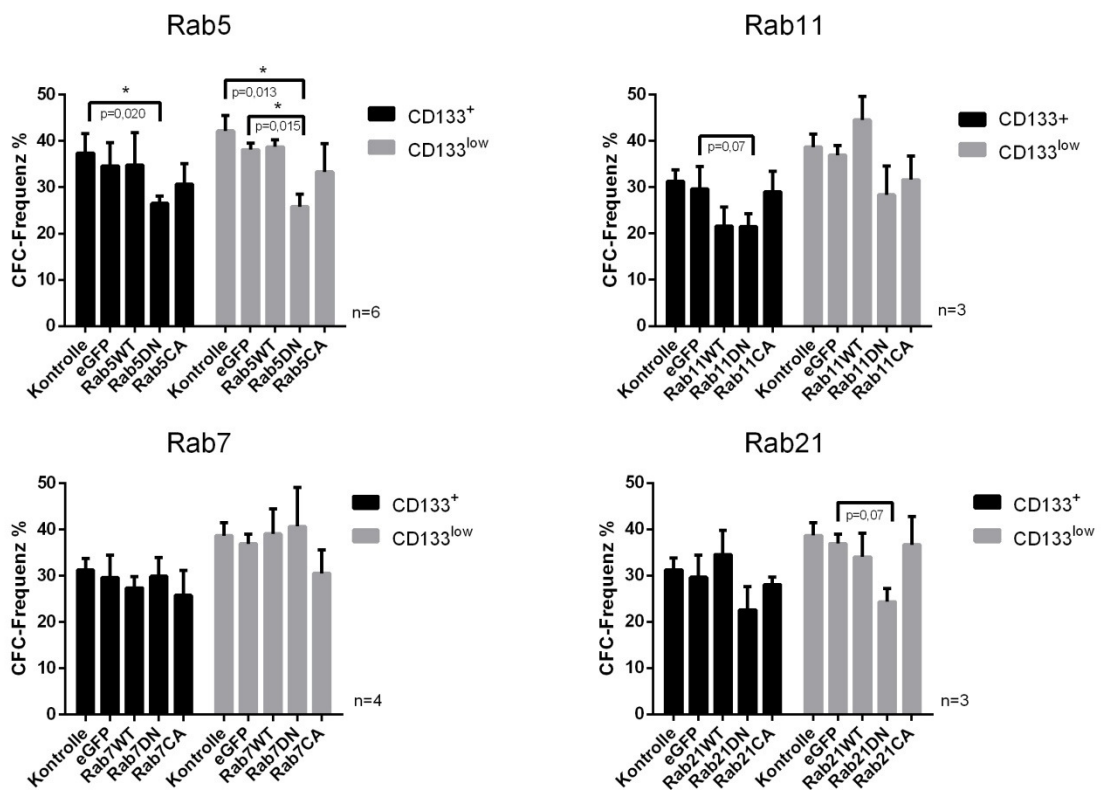


Abbildung 43: Rab5DN und Rab21DN vermindern das Koloniebildungspotenzial von HSVZ

Sortierschema für die CFC-Ansätze. Die Zellen wurden auf die Zellpopulation im FSC/SSC eingegrenzt und auf Doubletten gegatet. Dann wurden die Zellen auf eGFP- und CD34-positive Zellen gegatet bevor die Zellpopulation auf CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen aufgetrennt wurde und diese in CFC-Ansätze sortiert wurden. Nach 14 Tagen wurden die entstandenen Kolonien mikroskopisch analysiert. Es wurde zwischen Mix-, BFU-E, CFU-G, CFU-GM und CFU-M Kolonien unterschieden. Maßstabsbalken 50 µm, Objektiv *Plan-Apochromat 5x*. B) Analysiertes Koloniebildungspotenzial von 3-6 Versuchen für CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen die die verschiedenen Konstrukte von Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 exprimierten. Änderungen der Koloniebildung durch die Rab-GTPasen, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigten sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Unterschiede mit p-Werten $\geq 0,1$ sind ebenfalls dargestellt.

In BHK21-Zellen ist beschrieben, dass die dominant-negative Variante von Rab5 mit spezifischen GEF-Proteinen interagieren kann, welche für die Aktivität der endogenen Rab5-Proteine notwendig sind und so indirekt deren Funktion durch Rab5DN beeinflusst wird (Li *et al.*, 1994).

Die Koloniefrequenzen der einzelnen gebildeten Kolonietypen aus der CD133⁺CD34^{low}-Zellpopulation zeigten, dass die frühe endosomale Rab-GTPase Rab5WT zu einer Erhöhung des CFU-MIX Koloniebildungspotenzials von $11,46\% \pm 4,66$ (Kontrolle: n=6) auf $14,21\% \pm 6,91$ (n=6) führte (Abbildung 44 B). Wohingegen die funktionell inaktiven Varianten von Rab5, Rab21 und Rab11DN zu einer Verminderung der erythrozytären CFU-MIX ($6,08\% \pm 3,27$ Rab5DN, n=6; $4,58\% \pm 2,88$ Rab11DN, n=3; $2,50\% \pm 1,75$ Rab21DN, n=3) Kolonien führten (Abbildung 44 B). Bei den Analysen der Frequenzen der verschiedenen Kolonietypen fiel im Weiteren auf, dass die Expression von Rab5WT und Rab7DN den Anteil der Progenitoren mit CFU-MIX Potenzial (Kontrolle: $11,46\% \pm 4,66$, n=6; eGFP: $10,92\% \pm 4,93$; Rab5WT: $14,21\% \pm 6,91$) bzw. BFU-E Potenzial (Kontrolle: $9,17\% \pm 3,64$, n=4; eGFP: $6,88\% \pm 4,67$, n=4; Rab7DN: $13,13\% \pm 6,35$, n=4) zwar erhöhten, dieses aber keinen Einfluss auf das gesamt Koloniebildungspotenzial ausübte (Abbildung 43 B und Abbildung 44 B). Die erhöhten CFU-MIX bzw. BFU-E Frequenzen führten zu keiner erkennbaren Verringerung von anderen Kolonietypen. Die anderen Rab-Varianten (Rab7WT, Rab7CA, Rab11WT, Rab11CA, Rab21WT und Rab21CA) zeigten keine eindeutigen Auswirkungen auf die Koloniebildungsfrequenz unterschiedlicher Kolonietypen (Abbildung 44 B).

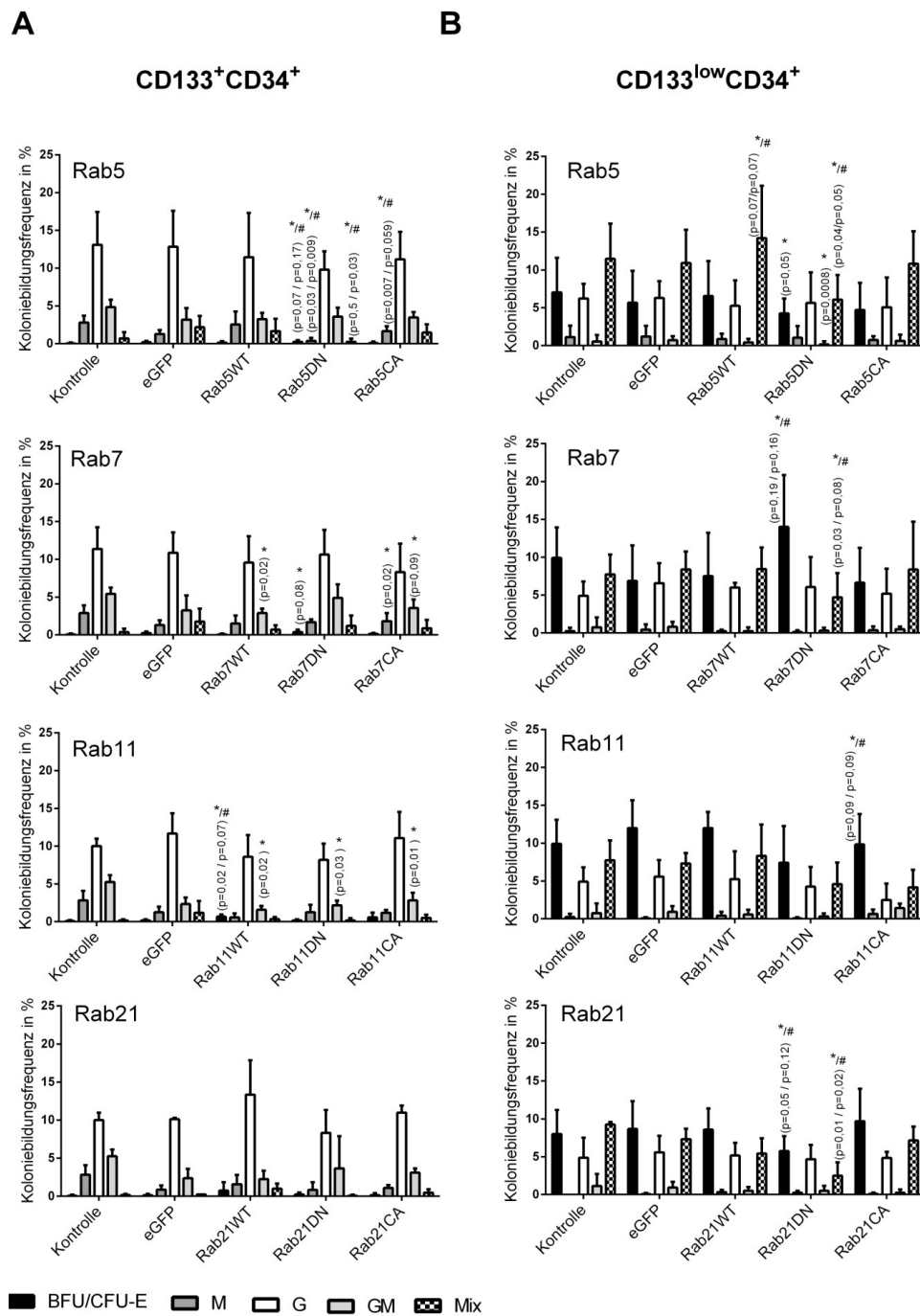


Abbildung 44: Ektop exprimierte Rab-GTPasen beeinflussen die Differenzierung von HSVZ

A) Anteile der Kolonietypen für die CD133⁺CD34⁺ Zellen, die die Rab5-Varianten (WT, DN, CA; n = 6), Rab7-Varianten (WT, DN, CA; n = 4), Rab11-Varianten (WT, DN, CA; n = 3) und Rab21-Varianten (WT, DN, CA; n = 3) exprimieren. B) Darstellung der Anteile der einzelnen Kolonietypen für die CD133^{low}CD34⁺ Zellen, die die Rab5-Varianten (WT, DN, CA; n = 6), Rab7-Varianten (WT, DN, CA; n = 4), Rab11-Varianten (WT, DN, CA; n = 3) und Rab21-Varianten (WT, DN, CA; n = 3) exprimieren. In der Legende ist der Farbkode für die einzelnen Kolonietypen (BFU-E, CFU-G (G), CFU-M (M), CFU-GM (GM) und CFU-MIX (Mix)) angegeben. Kontrolle = nicht transduzierte Zellen der jeweiligen Fraktion und eGFP = nur eGFP exprimierende Zellen. Veränderungen in der Koloniebildung zu den Kontrollen sind mit Sternchen (* = Kontrolle) und Raute (# = eGFP) gekennzeichnet und die p-Werte p<0,1 sind mit angegeben.

Gemeinsam deuten die erhaltenen Daten aus den CFC-Ansätzen darauf hin, dass die getesteten Rab-GTPasen funktionell vor allem in der erythrozytären und myeloischen Entwicklung der HSVZ eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang ließen die verschiedenen exprimierten Varianten der Rab-GTPasen Rab5, Rab7 und Rab21 einige Effekte auf die Differenzierung der analysierten HSVZ in den CFC-Ansätzen erkennen. Wie bereits erwähnt, sind Rab5 und Rab21 an den frühen endosomalen Schritten in Zellen beteiligt und Rab7 repräsentiert eine GTPase, deren Funktion an späten Endosomen wichtig ist (Abschnitt 3.1). Da Rab5 und Rab21 sich funktionell und evolutiv sehr ähnlich sind, und um einen ersten spezifischeren Überblick über die Funktion früher und später endosomaler Prozesse in HSVZ zu bekommen, wurde entschieden zunächst nur einen Vertreter für frühe endosomale Wege (Rab5) und einen für die späte endosomale Wege (Rab7) zu untersuchen. Daher wurden die durch Rab21DN hervorgerufenen Effekte auf die Differenzierung der Zellen hier nicht weiter analysiert. Um die durch die ektope Expression von Rab5WT, Rab5DN, Rab5CA und Rab7DN hervorgerufenen Effekte zu spezifizieren, wurden weitere durchflusszytometrische Analysen der CFC-Ansätze und erythrozytäre und megakaryozytäre Flüssigkulturansätzen durchgeführt.

3.2.10. Durchflusszytometrische Analyse von CFC-Ansätzen nach ektope Expression von Rab5-Varianten

Um eine spezifischere Aussage über die aus den CFC-Ansätzen erhaltenen Effekte der Rab5-Konstrukte auf die Differenzierung der HSVZ zu treffen, wurden Zellen aus den CFC-Ansätzen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen wie von Görgens et al., 2013 beschrieben aus dem semisoliden Medium rausgelöst und durchflusszytometrisch auf die Expression von Linien spezifischen Zelloberflächenproteinen analysiert (Görgens et al., 2013b).

Zum Analysieren der durch Rab5-Konstrukte vermittelten Effekte auf die Makrophagen und Granulozyten Entwicklung der CD133⁺CD34⁺ Zellen in den CFC-Ansätze wurden von den in den Kolonien enthaltenen Zellen nach 14 Tagen Differenzierung durchflusszytometrische Analysen und klassische hämatologische histologische Färbungen nach Pappenheim durchgeführt. Dazu wurden Antikörper gegen CD14, CD15, CD16 und CD45 verwendet, um Granulozyten (CD15⁺CD16⁺CD14⁻CD45⁺) und Makrophagen (CD16⁺CD14⁺CD45⁺) Vorläufer zu unterscheiden. CD45 diente der Markierung aller hämatopoetisch determinierten

Zellen. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Kolonien aus der Methylzellulose rausgelöst (Abbildung 45 B) und anschließend mit den oben genannten Antikörpern gefärbt.

Durch die durchflusszytometrische Analyse der Zellen aus den CFC-Kolonien der CD133⁺CD34⁺-Ansätze wurde festgestellt, dass der Anteil an Makrophagen (CD14⁺CD16⁺) in den eGFP-Rab5DN exprimierenden Zellen auf 1,6% ± 1 von 7,9% ± 5,1 vermindert war (Abbildung 45 B). Die Expression der anderen Rab5Varianten (eGFP-Rab5WT und eGFP-Rab5CA) führte zu keiner sichtbaren Änderung des Makrophagenanteils in den analysierten Kolonien (Abbildung 45 B). Durch die parallel durchgeführte morphologische Untersuchung der Zellen mittels hämatologischer Pappenheim-färbung bestätigten sich die Ergebnisse, dass die Expression von eGFP-Rab5DN die Ausreifung von Makrophagen vermindert, da in den gefärbten Zytospinpräparaten kaum typische Makrophagen zu finden waren (Abbildung 45 C). Die Makrophagen ließen sich durch die Größe (> 50 µm) und die Bildung sehr vieler Vakuolen erkennen. Bei den eGFP-Rab5WT, eGFP-Rab5CA und eGFP exprimierenden Zellen wurden reife Makrophagen gefunden (Abbildung 45 C).

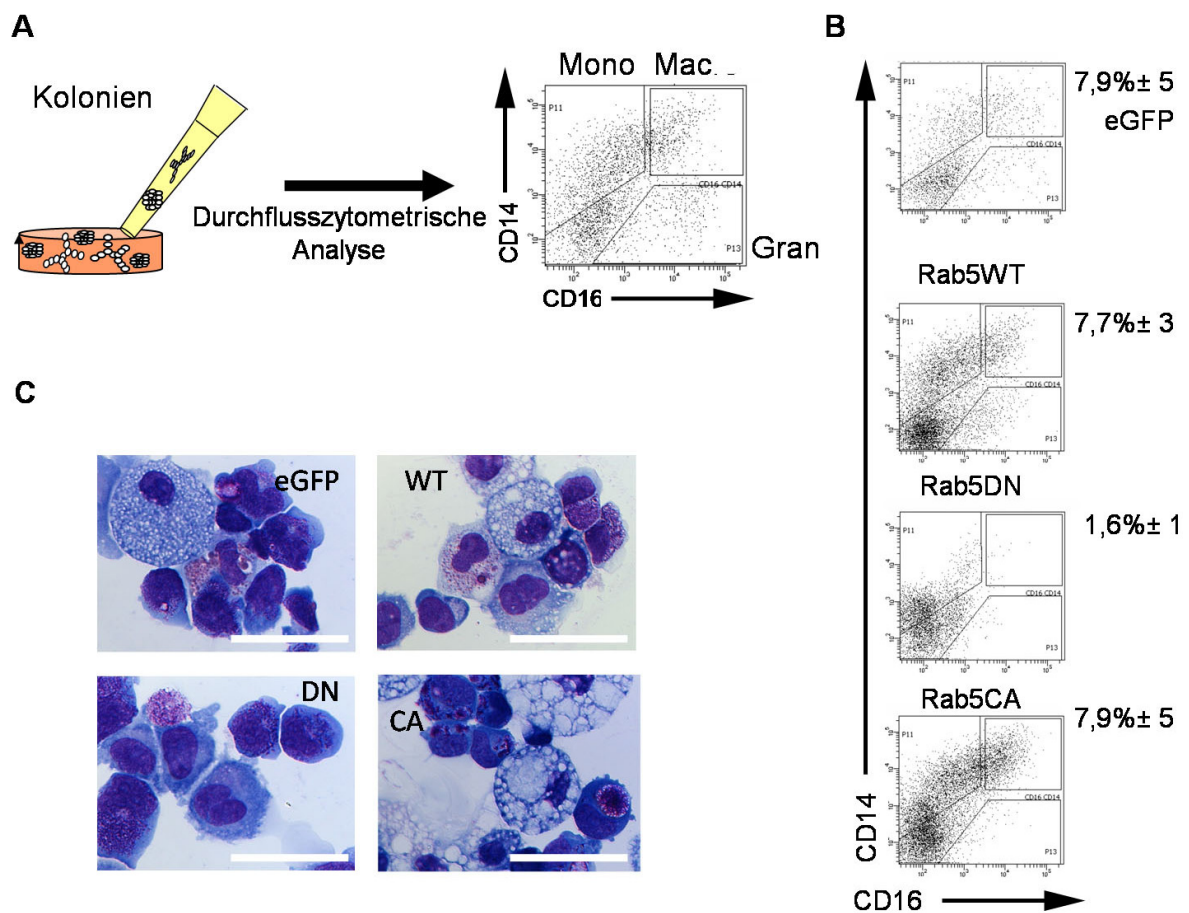


Abbildung 45: Durchflusszytometrische Analysen und Zytospin von CFC-Kolonien

A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und beispielhafter Plot. Der Plot stellt CD14 gegen CD16 dar. In den Quadranten sind Granulozyten (Gran), Monozyten (Mono) und Makrophagen (Macro) aufgeführt. Reife Makrophagen sind CD14 und CD16 positiv. B) Durchflusszytometrische Analysen von Kolonien aus high-Ansätzen von eGFP, Rab5WT, Rab5DN und Rab5CA exprimierenden Zellen. Die schwarzen Zahlen stellen den prozentualen Anteil an reifen Makrophagen in den Kolonien dar (n=2). C) Repräsentativer Zytospin von Zellen der durchflusszytometrisch analysierten CFC-Kolonien von eGFP, Rab5WT (WT), Rab5DN (DN) und Rab5CA (CA) exprimierenden Zellen (n=2). Die Pappenheimfärbung der mittels Zytospin aufgebrachten Zellen zeigt reife Makrophagen, Granulozyten und Monozyten und myeloische Vorläufer. Objektiv *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC*.

Somit bestätigen diese Analysen den zuvor in den CFC-Ansätzen beobachteten Effekt der verringerten Makrophagen-Differenzierung nach ektopter Expression von eGFP-Rab5DN und bestärken die Annahme über eine mögliche regulatorische Funktion von Rab5 beim Ausreifungsprozess von Makrophagen.

3.2.11. Untersuchung des erythrozytären und megakaryozytären Differenzierungspotenzials von CD34⁺ Zellen

Im Folgenden wurden die zuvor bei den CFC-Ansätzen der CD133⁺CD34^{low}-Zellpopulation detektierten Effekte von Rab-GTPasen auf die erythrozytäre Zellreifung spezifischer analysiert, um herauszufinden auf welcher Ebene der

Progenitoren die Rab-GTPasen Zellschicksalsentscheidung der HSVZ beeinflussen könnten. Um ein spezifischeres Verständnis über die Aufspaltung der erythrozytären und megakaryozytären Linie innerhalb der CD34⁺ Zellpopulation sowie die Wirkweise der ektop exprimierten Rab5- und Rab7-Varianten auf diese Differenzierungsprozesse zu bekommen, wurden zwei in unserer Arbeitsgruppe von Stefan Radtke modifizierte *in vitro* Differenzierungsansätze verwendet. In diesen wurde durch die Verwendung bestimmter Zytokine die Ausreifung der Zellen in Richtung Erythrozyten oder Megakaryozyten induziert und nach 14 Tagen durchflusszytometrisch analysiert und quantifiziert (siehe Abschnitt 2.3.8). Die zuvor durchgeführten CFC-Ansätzen zeigten bereits, dass das erythrozytäre Differenzierungspotenzial aus der CD133⁺CD34⁺ Zellpopulation in allen Ansätzen an Tag 3 fast vollständig verschwunden war. In der CD133^{low}CD34⁺ Zellfraktion hingegen wurde durch die Expression von Rab5WT und Rab7DN die Bildung erythrozytärer Kolonien gefördert.

Zur spezifischeren Untersuchung des erythrozytären Differenzierungspotenzials wurden die CD34⁺ Zellen mit den Rab5- und Rab7- Varianten transduziert (Tabelle 39) und nach drei Tagen Kultivierung in Gegenwart der Zytokine SCF (10ng/ml), TPO (10ng/ml) und FLT3L (10ng/ml) durchflusszytometrisch in CD133⁺CD34⁺ und CD34⁺CD133^{low} Zellen sortiert. Die zwei Zellpopulationen wurden getrennt voneinander in Richtung Erythrozyten- oder Megakaryozyten differenziert, da nach dem Revised Model von Görgens *et al.* 2013 das erythrozytäre und megakaryozytäre Potenzial vorwiegend in der CD133^{low}CD34⁺ Zellpopulation zu finden ist (Abbildung 46 und Abbildung 47 A). Durch die Untersuchungen beider Zellpopulationen sollte analysiert werden, ob es durch die Rab-GTPasen zu einer Verschiebung in diesen Differenzierungspotenzialen kommt. Zur Analyse der Qualität der differenzierten Nachkommen wurden die Zellen nach 14 Tagen aus der Kultur entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden die Erythrozyten-differenzierungsansätze hinsichtlich der Zelloberflächenexpression der Proteine CD45 und CD235a/GlycophorinA (GPA) analysiert (Abbildung 47 B). Die Zellen in den Megakaryozytendifferenzierungsansätze wurden nach 14 Tagen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Expression der Oberflächenantigene CD41 und CD61 untersucht (Abbildung 47A und Abbildung 48 A). Zur durchflusszytometrischen Quantifizierung der erythrozytär und megakaryozytär differenzierten Zellen innerhalb der jeweiligen Ansätze wurden wie zuvor die *Flow count beads*

verwendet. Da die beiden Differenzierungsansätze keine klonale Analyseverfahren darstellen, können aufgrund der durchflusszytometrisch ermittelten Anzahl reifer Erythrozyten und Megakaryozyten keine direkten Rückschlüsse auf die absolute Anzahl primitiver HSVZ mit erythrozytären und megakaryozytären Potenzial gemacht werden. Um die Ausreifung der Zellen auch morphologisch zu belegen wurden Zellen aus den Ansätzen genommen und immunzytochemisch nach Pappenheim gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert.

Tabelle 39: Mittlere Transduktionseffizienz von CD34⁺ Zellen

Transduktionseffizienz CFC-Ansätze%	V1	V2	V3	V4	V5	V6	MW	Stabw
	eGFP	15,6	56,5	72	80,8	33,9		
Rab5WT	41,70	21,20	20,90	69,70	n.d.	n.d.	38,38	23,04
Rab5DN	64,70	27,80	28,50	46,20	n.d.	n.d.	41,80	17,48
Rab5CA	33,10	16,70	17,20	73,50	n.d.	n.d.	35,13	26,69
Rab7WT	77,9	66,6	68,9	28,1	57,8	72,4	61,95	22,06
Rab7DN	45,1	27	31,3	28,3	37,5	45,5	35,78	8,31
Rab7CA	68,1	66,2	63,2	13,3	70,3	61,4	57,08	26,34

Alle Werte stellen den prozentualen Anteil eGFP-positiver CD34⁺ Zellen nach 50-60h Kultivierung dar. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.d.= Versuche nicht durchgeführt für diese Konstrukte.

In den erythrozytären Differenzierungsansätzen der CD133⁺CD34⁺ Zellen ließ sich vereinzelt erythrozytäres Differenzierungspotenzial erkennen (Abbildung 47 B; Tabelle 40). Das erythrozytäre Differenzierungspotenzial in den CD133⁺CD34⁺ Zellen wurde durch die ektope Expression der Rab-GTPasen und ihrer Varianten (Rab5; n=4 und Rab7; n=3) nicht erkennbar verändert (Abbildung 47 B).

In den Untersuchungen der CD133⁺CD34⁺ Zellpopulation zeigte sich, dass das megakaryozytäre Differenzierungspotenzial noch enthalten ist (Abbildung 48). Dieses Potenzial ist geringer als in der CD133^{low}CD34⁺ Fraktion (Abbildung 48; Tabelle 40), da weniger reife Zellen entstehen. Durch die ektope Expression der eGFP-Rab5 und eGFP-Rab7-Fusionsproteine, wurde gezeigt, dass die Rab5-Varianten keinen sichtbaren Effekt auf die Megakaryozytenreifung bei diesen Zellen haben. Die Expression von Rab7DN führte jedoch zu einer erhöhten Anzahl megakaryozytärer Zellen in den Ansätzen und Rab7WT vermindert diese (Abbildung 48). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das megakaryozytäre Differenzierungspotenzial in den CD133⁺CD34⁺ Zellen länger erhalten wird, als das erythrozytäre Differenzierungspotenzial.

Durch die Expression der verschiedenen Rab7-Varianten in den HSVZ lässt sich eine Beeinflussung der Megakaryozytendifferenzierung erkennen. Die Annahme, dass Rab7 in der erythrozytären und megakaryozytären Reifung eine Funktion hat, wurde durch Versuche mit CD133^{low} CD34⁺ Zellen bestärkt. Die durchflusszytometrischen Quantifizierungen zeigten hier, dass die ektope Expression von Rab5WT und Rab7DN in den CD133^{low} CD34⁺ Zellen die Differenzierung zu Erythrozyten erhöhte (Abbildung 47 B). Die Expression von Rab5DN, Rab7WT und Rab7CA in den CD133^{low} CD34⁺ Zellen führte einer Reduktion der Erythrozytenreifung im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 47 B).

Tabelle 40: Quantifizierung von Erythrozyten Differenzierungsansätzen CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen.

CD235a pro 1000 Zellen (CD34 ⁺ CD133 ⁺)	V1	V2	V3	V4	V5			p (K)	p (eGFP)
						MW	Stabw		
Kontrolle	165,52	8122,13	1226,00	204,50	n.b.	2429,54	3826,69		
eGFP	82,05	1637,60	3057,69	234,16	n.b.	1252,87	1392,12	0,72	
Rab5WT	361,11	9400,00	329,90	502,90	n.b.	2648,48	4501,64	0,65	0,57
Rab5DN	190,48	83,97	6,15	269,81	n.b.	137,60	116,09	0,32	0,23
Rab5CA	110,34	3885,29	883,12	126,72	n.b.	1251,37	1792,57	0,33	0,99
Kontrolle	165,52	0,00	0,00	n.b.	n.b.	82,76	117,04		
eGFP	82,05	0,00	5943,93	n.b.	n.b.	3012,99	4144,97	n.b.	
Rab7WT	30,63	0,00	0,00	n.b.	n.b.	15,31	21,66	n.b.	n.b.
Rab7DN	43,75	0,00	329,90	n.b.	n.b.	186,82	202,34	n.b.	n.b.
Rab7CA	21,88	0,00	164,95	n.b.	n.b.	93,41	101,17	n.b.	n.b.

CD235a pro 1000 Zellen (CD34 ⁺ CD133 ^{low})	V1	V2	V3	V4	V5			p (K)	p (eGFP)
						MW	Stabw		
Kontrolle	84601,77	36168,22	85769,23	74172,41	n.b.	70177,91	23264,79		
eGFP	96782,66	n.b.	28016,88	90244,90	n.b.	71681,48	37955,68	0,56	
Rab5WT	123617,20	76166,66	64628,57	211200,00	n.b.	118903,11	66615,99	0,17	0,23
Rab5DN	52385,69	1538,46	1090,91	79050,00	n.b.	33516,27	38744,29	0,10	0,14
Rab5CA	94033,71	92075,47	17073,17	156443,50	n.b.	89906,46	57019,31	0,54	0,59
Kontrolle	59160,00	82400,00	322826,10	45682,76	17393,72	105492,52	123746,17		
eGFP	10462,14	139764,00	356700,00	61959,18	20105,55	117798,17	142950,56	0,50	
Rab7WT	8914,29	79542,86	132307,70	13320,00	875,00	46991,97	57115,72	0,15	0,16
Rab7DN	15096,20	128029,70	717600,00	50460,00	49145,83	192066,35	296683,07	0,36	0,33
Rab7CA	1819,26	4320,00	239333,30	20452,17	21700,00	57524,95	102036,74	0,09	0,04

Alle Werte stellen sie absoluten Zellzahlen der expandierten CD235a⁺CD45⁺ Zellen nach 14 Tagen Kultur dar. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.d.= Versuche nicht durchgeführt für diese Konstrukte.

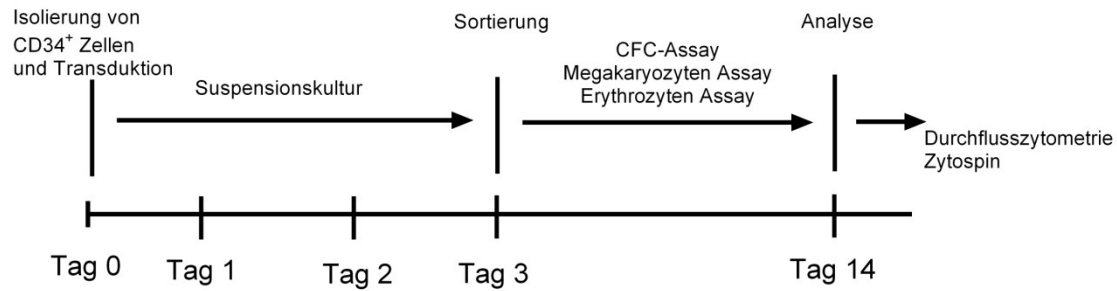


Abbildung 46: Versuchsschema für Erythrozyten- und Megakaryozyten-differenzierung von CD34⁺ Zellen.

Isolierung von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und Transduktion der Zellen mit den verschiedenen Effektoren (Tag 0). Dreitägige Kultivierung der Zellen in Suspension unter Zugabe von SCF, TPO und FLT3L. An Tag 3 durchflusszytometrische Sortierung der CD34⁺ Zellen auf CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen. Einbringen der zwei Zellfraktionen in Megakaryozyten- oder Erythrozytendifferenzierungsansätze. Nach 14 Tagen Differenzierung werden die Nachkommen durchflusszytometrisch und mikroskopisch (Zytospin) analysiert.

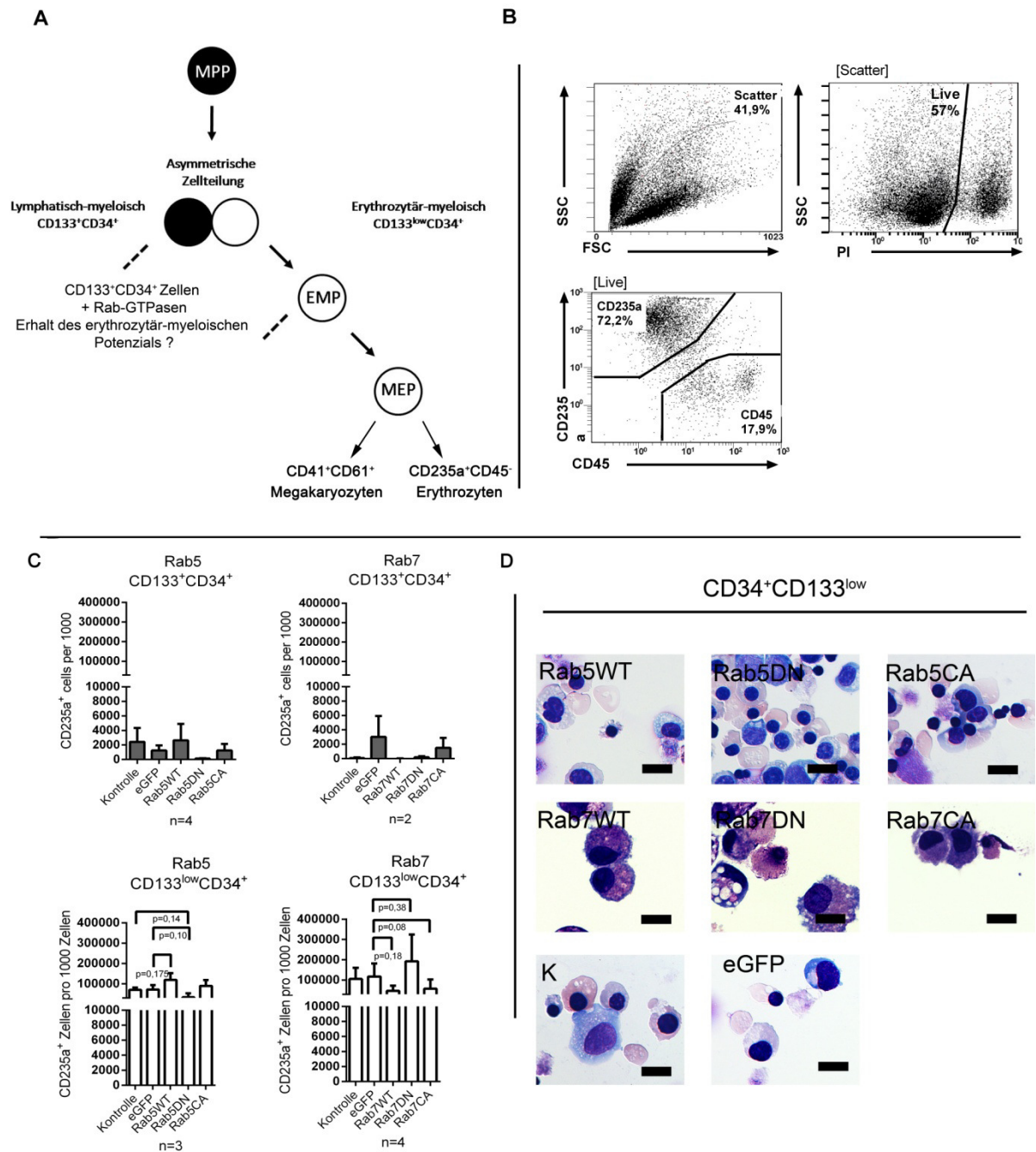


Abbildung 47: Quantifizierung der erythrozytären Differenzierung von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen.

A) Angenommenes Modell der Entwicklung erythrozytärer und megakaryozytärer Zellen. B) Analyseschema der erythrozytären Differenzierung von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen. C) Quantifizierung von Erythrozyten nach 14 Tagen Differenzierungskultur. Anzahl der erythrozytären Nachkommen von CD133⁺CD34⁺ Zellen (graue Diagramme) und von CD133^{low}CD34⁺ Zellen (weiße Diagramme). Signifikante Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen sind mit (*) gekennzeichnet und p<0,05. P-Werte für weitere Änderungen sind unter den Klammern angegeben. Rohdaten finden sich in Tabelle 41. D) Zytospin Präparate nach Pappenheimfärbung. Maßstabsbalken 10 µm, Objektiv *Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil DIC*.

Ein vergleichbarer Effekt durch die Expression von Rab5WT und Rab7DN wie auf die Erythrozytenreifung konnte für die Differenzierung in Megakaryozyten beobachtet

werden (Abbildung 48 und Tabelle 41). Hier wurde durch die Expression von Rab5DN eine Verminderung der Reifung megakaryozytärer Progenitoren hervorgerufen. Die Expression von Rab5WT in den Zellen hatte dagegen keinen erkennbaren Effekt auf die Megakaryozytendifferenzierung. Auch die Expression der Rab7-Varianten ließ einen vergleichbaren Effekt wie zuvor bei der Erythrozytenreifung erkennen. So zeigten die Zellen, die Rab7DN exprimierten eine erhöhte Anzahl an megakaryozytären Zellen als die Kontrollzellen (unmanipulierte und eGFP-exprimierende Zellen), Rab7WT und Rab7CA exprimierenden Zellen (Abbildung 48). Für die Analyse der Ausreifung der Megakaryozyten in den Kulturen wurden zusätzlich Zytopins und Pappenheimfärbungen der differenzierten Zellen gemacht (Abbildung 48). Damit wurde gezeigt, dass die entstandenen Zellen auch phänotypisch Megakaryozyten enthielten. Reife Megakaryozyten sind polyploid (mehrkernig) und deutlich größer als Granulozyten und Myelozyten (Abbildung 48). In den mikroskopischen Aufnahmen ließen sich in allen Ansätzen polyploide Zellen erkennen (Abbildung 48). Die CD133⁺CD34⁺ Zellen die verschiedenen Rab5-Varianten exprimierten zeigten morphologisch kleinere polyploide Zellen als in den CD133^{low} CD34⁺ Zellansätzen (Abbildung 48).

Tabelle 41: Quantifizierung der Megakaryozyten-Differenzierungsansätze

Megakaryozyten CD133 ^{low} CD34 ⁺	V1	V2	V3	V4	V5	V6	MW	Stabw
Kontrolle	111520	192000	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	151760,00	56907,95
eGFP	84213,34	182073,9	101229,3	n.b.	n.b.	n.b.	122505,51	52284,61
Rab5WT	89626,66	331321,3	61508,77	n.b.	n.b.	n.b.	160818,91	148327,18
Rab5DN	63626,67	129744,2	75944,85	n.b.	n.b.	n.b.	89771,91	35160,67
Rab5CA	102960	311356,6	35673,82	n.b.	n.b.	n.b.	149996,81	143734,46
Kontrolle	49738,89	58265,69	81105,26	82413,12	35093,33	n.v.	61323,26	20418,53
eGFP	14701,72	37288,69	42113,49	70452,03	27747,37	101229,3	48922,10	31624,92
Rab7WT	26860,81	43965,79	89846,52	31259,26	4630,669	160730,2	59548,87	57067,09
Rab7DN	40386,86	58013,17	148080	161666,2	15824	189529,6	102249,97	72803,57
Rab7CA	20754,48	42207,01	91320	89901,18	10026,67	80904,62	55852,33	36229,66
Megakaryozyten CD133 ⁺ CD34 ⁺	V1	V2	V3	V4	V5	V6	MW	Stabw
Kontrolle	24658,23	34384	12869,12	n.b.	n.b.	n.b.	23970,45	10773,92
eGFP	29415,38	63144	28067,89	n.b.	n.b.	n.b.	40209,09	19873,64
Rab5WT	18943,89	37472	61168,09	n.b.	n.b.	n.b.	39194,66	21164,75
Rab5DN	27723,72	44184	33149,02	n.b.	n.b.	n.b.	35018,91	8387,94
Rab5CA	30186,67	33236	35697,77	n.b.	n.b.	n.b.	33040,15	2760,77
Kontrolle	13486,02	20850,37	5662,825	11325,65	5980	12869,12	11695,66	5614,12
eGFP	18275,51	27972,79	19328,95	19328,95	3946,667	28067,89	19486,79	8816,57
Rab7WT	14662,46	23657,14	13300,47	6600,9	1975,758	6687,629	11147,39	7722,23
Rab7DN	41765,55	30927,84	17182,22	14364,44	7936	22230,38	22401,07	12237,48
Rab7CA	24016,49	30251,69	16192,3	12384,59	2000	18002,73	17141,30	9722,95

Alle Werte repräsentieren die berechnete absolute Anzahl CD41⁺CD61⁺ Zellen der gesamten hämatopoetischen Subpopulation die sich aus CD133^{low}CD34⁺ oder CD133⁺CD34⁺ Zellen entwickelt haben. Abkürzungen: MW = Mittelwert; Stabw = Standardabweichung; n.b. = nicht bestimmbar/kontaminiert.

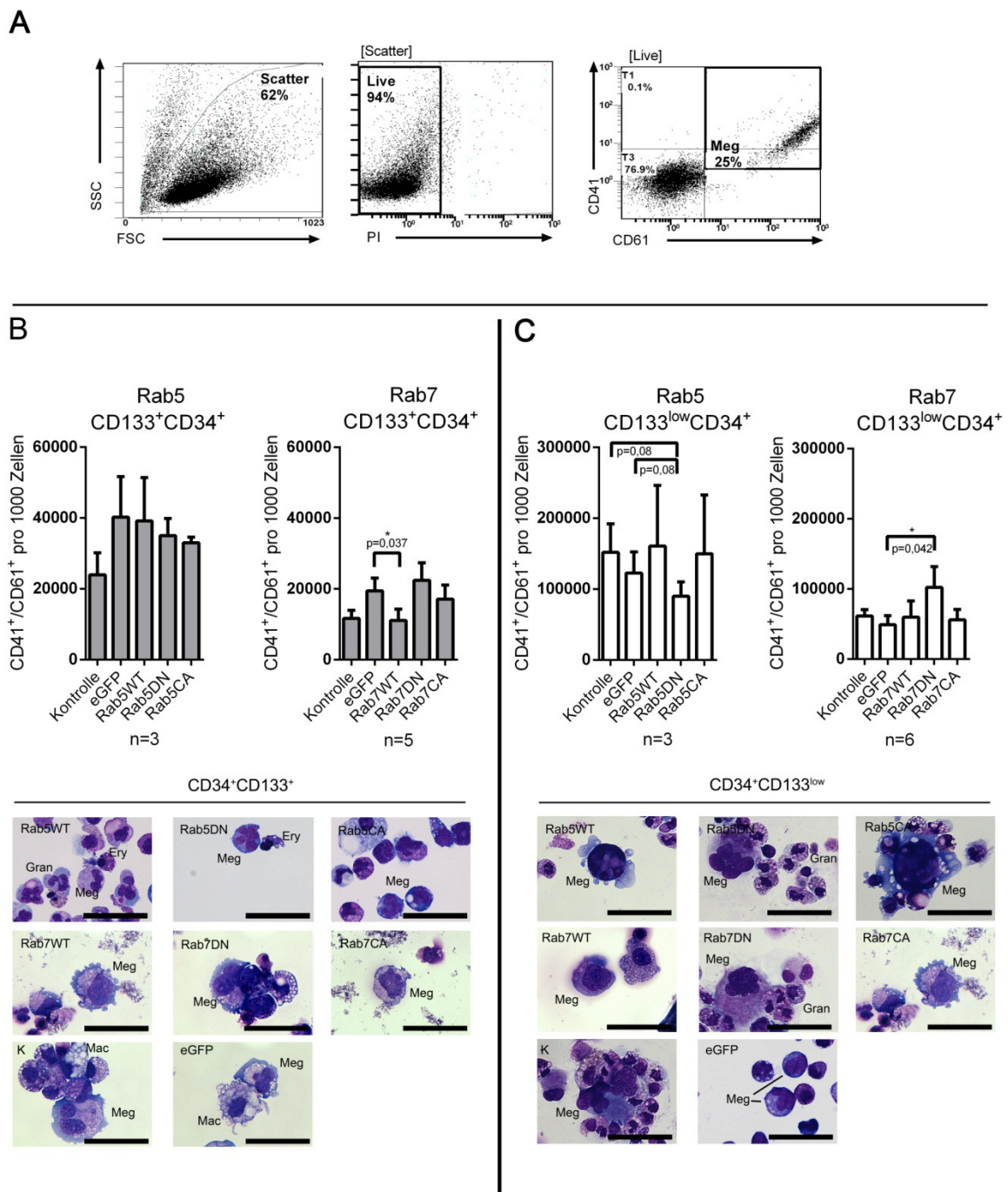


Abbildung 48: Quantifizierung der megakaryozytären Differenzierung von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen.

A) Analyseschema der megakaryozytären Differenzierung von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen. B-C) Quantifizierung von Megakaryozyten nach 14 Tagen Differenzierungskultur. Anzahl der erythrozytären Nachkommen von CD133⁺CD34⁺ Zellen (graue Diagramme) und von CD133^{low}CD34⁺ Zellen (weiße Diagramme). Signifikante Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen sind mit (*) gekennzeichnet und $p < 0,05$. P-Werte für weitere Änderungen sind unter den Klammern angegeben. Rohdaten finden sich in Tabelle 40 und Tabelle 41. Pappenheimfärbung von Megakaryozytenansätzen. Megakaryozyten (Meg), Granulozyten (Gran), Makrophagen (Mac) sind gekennzeichnet. Maßstabsbalken 50 μm .

Die weitere Analyse der aus den CFC-Daten gewonnenen Erkenntnisse, durch die erythrozytären und megakaryozytären Differenzierungsansätze, sowie die

durchgeführten durchflusszytometrischen und morphologischen Analysen der differenzierten Zellen lassen erkennen, dass die Rab-GTPasen und somit vermutlich auch die mit ihnen verknüpften endosomalen Prozesse eine wichtige Rolle bei der Zellschicksalsspezifikation von HSVZ spielen. Ferner ist anzunehmen, dass die endozytotischen Prozesse durch die ektope Expression des eGFP-WT-Proteins zu einer verstärkten erythrozytären Reifung führen und die ektope Expression der DN-Variante diese Reifung verringern. Für die untersuchten Rab7-Varianten zeigte sich, dass die Expression von Rab7DN einen vorteilhaften Effekt auf die Reifung von Megakaryozyten ausübt, was andeutet, dass die Funktion von Rab7 während der Megakaryozytenreifung möglicherweise verringert werden muss. Diese Annahme wird durch Expressions Analysen von megakaryozytär differenzierten CD34⁺ Zellen bestärkt, bei denen Rab7 runterreguliert wird (Kim *et al.*, 2002).

Der tendenziell fördernde Einfluss von Rab5WT und Rab7DN auf die erythro-myeloische Zellspezifikation und die verminderte Wirkung von Rab5DN in der erythrozytären Spezifikation lassen schließen, dass endosomale Prozesse bei der Reifung und Differenzierung der HSVZ involviert sind.

3.2.12. Validierung des RNAi vermittelten *Knockdown* von Rab7 in K562 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Funktion von Rab7 bei der erythrozytären und megakaryozytären Differenzierung direkt involviert ist, wurde ein RNAi vermittelter *Knockdown* von Rab7 als Grundlage für die Weiterführung des Projektes etabliert.

Dazu wurden zwei kommerziell erhältliche *short-hairpin* (sh)-RNA-Sequenzen im pTRIPZ-Vektor (Open Biosystems), die gegen die Rab7A Transkripte gerichtet sind verwendet. Die shRNA-Expressionskassette wird über einen Tetrazyklin-regulierten Minimalpromotor gesteuert, so dass die Expression der shRNA in Zellen über die Zugabe von Doxyzyklin kontrolliert werden kann. Zum Testen der Funktionalität der shRNA-Konstrukte wurde die erythro-myeloische Zelllinie K562 verwendet, da mit dieser im weiteren Verlauf des Projektes die erythrozytäre und megakaryozytäre Differenzierung untersucht werden kann. Mit den shRNA tragenden Vektoren wurden lentivirale Partikel hergestellt, welche direkt an K562 Zellen getestet wurden. Die transduzierten K562 Zellen wurden durch 5 µg/ml Puromycin selektioniert. Vor und während der Experimente wurden die K562-Zellen mit 0,5 µg/ml Doxyzyklin kultiviert, um die Expression der shRNA zu gewährleisten. Als Reporter für die

Expression der shRNA-Kassette diente in diesem System eine Variante des rot fluoreszierenden Proteins (RFP; *red fluorescent protein*), das sogenannte *tourboRFP* (tRFP). Durch die Expression von tRFP, war es möglich die transduzierten Zellen spezifisch in funktionelle Ausleseverfahren zu sortieren. Dazu wurde wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben virushaltiger Überstand produziert und die K562 Zellen mit diesem transduziert. Durch eine anschließende Selektion mit Puromycin (5 µg/ml) wurden die transduzierten K562-Zellen angereichert. Zur Feststellung, ob die shRNA-Konstrukte zu einem *Knockdown* von Rab7 in den K562 führen, wurde 3 Tage nach Induktion der Expression der Konstrukte durch Doxyzyklin von den Zellen ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 49). Als Kontrolle dienten K562 Zellen, die ebenfalls mit Doxyzyklin kultiviert wurden und eine nicht gegen ein humanes Protein gerichtete shRNA (shCtrl).

Die Expression der shRNA-Konstrukte konnte durch die Expression von RFP mikroskopisch gezeigt werden (Abbildung 49 A). Der *Knockdown* von Rab7 auf Proteinebene wurde im Western Blot untersucht (Abbildung 49 B). Dabei stellte sich heraus, dass Rab7 in den Zellen nur durch eine der zwei shRNA-Konstrukte (sh243 und sh417) herunterreguliert bzw. die Expression vermindert wurde. Die sh243 hat keinen Effekt auf die Proteinexpression von Rab7 in K562 Zellen. Durch die sh417 RNA wurde die Expression von Rab7 auf ca. 27% (n=1) reduziert im Vergleich zu den Kontrollen (K562 und shCtrl). Der Western Blot zeigte, dass andere Proteine wie Rab5, Aktin und Hsp70 nicht durch die Expression der shRNA-Konstrukte verändert wurden. Aufgrund der Western Blot-Analysen wurde das shRNA-Konstrukt 417 für den RNAi vermittelten *Knockdown* von Rab7 in weiteren Versuchen verwendet. Die andere shRNA 243 eignet sich nicht, um Rab7 in den K562 Zellen herunter zu regulieren. Mit der ersten Validierung der shRNA-Konstrukte in den K562 Zellen und der Produktion der lentiviralen Überstände, wurde die Grundlage für weiterführende Analysen zur Klärung der Funktion von Rab7 während der Zellspezifikation von HSVZ gelegt.

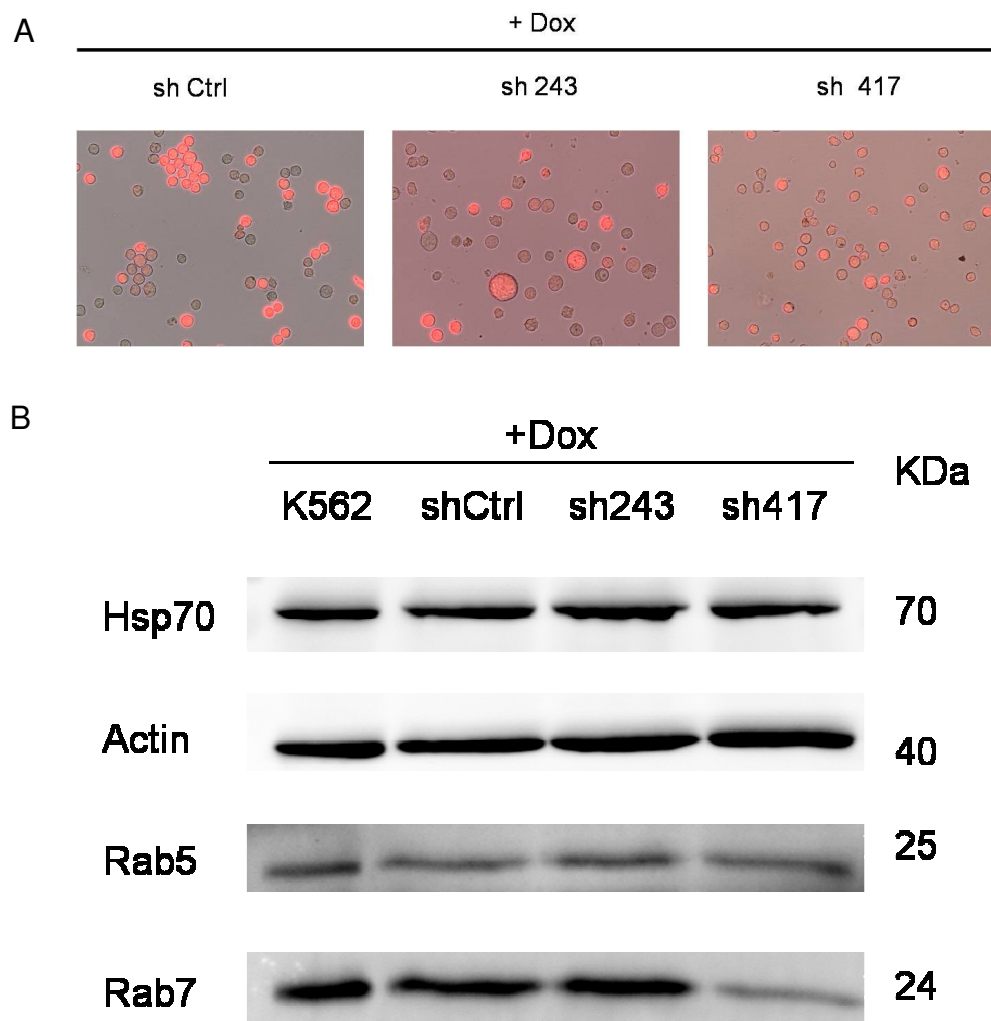


Abbildung 49: Validierung der shRNA-Konstrukte für den *Knockdown* von Rab7

A) Mikroskopische Aufnahmen von K562 Zellen bei denen die Expression der shRNA-Konstrukte durch Zugabe von Doxyzyklin über 3 Tage induziert wurde. B) Western Blot von mit Doxyzyklin induzierten shCtrl, sh243 und sh417 exprimierenden Zellen sowie K562 Zellen als Kontrolle nach 3 Tagen. Es wurde je 20 µg Protein aufgetragen. Das Vorhandensein von Rab7, Rab5, Aktin und Hsp70 in den Zellen wurde im Western Blot untersucht.

3.1. Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf Endozytose, Zellpolarität und Zellschicksalsspezifikation von HSVZ

Wie bereits durch die ektope Expression von eGFP-Rab-GTPasen in CD34⁺ Zellen festgestellt (Abschnitt 3.2), sind endosomale Prozesse an der Entwicklung und Reifung erythrozytärer und myeloischer Zellen beteiligt. Um die ermittelten Effekte der endosomalen Prozesse auf die Zellbiologie und Zellschicksalsspezifikation der HSVZ zu untermauern, wurden im Folgenden Endozytosewege durch pharmazeutische Inhibitoren in CD34⁺ Zellen inhibiert.

Hierzu wurden folgende Inhibitoren gewählt: Chlorpromazin (Chpz), Dynasore (Dyna), Monodansylcadaverin (MDC), Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), Cytochalasin B (CytB), *Clostridium Toxin B* (CDTxB) und Spautin-1 (Spautin). Die Wirkweise der einzelnen Inhibitoren ist sehr unterschiedlich und wird daher kurz beschrieben: Chpz ist ein kationischer, amphiphatischer Inhibitor, der die Clathrin-vermittelte Endozytose verschiedener Proteine blockiert, in dem es zum Verlust der Plasmamembran-Assoziation des Adaptor-Proteins 2 (AP2) führt (Wang *et al.*, 1993, Yao *et al.*, 2002, Tulapurkar *et al.*, 2005). Chpz ist als Inhibitor der Clathrin-abhängigen Endozytose sowie der Phagozytose von Leukozyten und Monozyten beschrieben (Elferink, 1979, Baynes *et al.*, 1987, Ivanov, 2008). Aufgrund seiner amphiphatischen Eigenschaft kann es sich in die Plasmamembran einlagern und somit ihre Fluidität verändern (Ogiso *et al.*, 1981). MDC wirkt anders als Chpz stabilisierend auf die Clathrin-umhüllten Einstülpungen an der Plasmamembran (Wang und Liu, 2003). Es ist ein lysosomotropisches Agens, das sich in sauren Kompartimenten der Zellen anlagert. Daher wird es nicht nur als Inhibitor für die Clathrin-vermittelte Endozytose sondern auch als Marker für Autophagosomen verwendet (Biederbick *et al.*, 1995, Niemann *et al.*, 2001). Dynasore (Dyna) ist ein spezifischer Inhibitor der GTPase Dynamin-2 (Macia *et al.*, 2006). Dynamin-2 ist ein Hauptregulator der Vesikelabschnürung von Clathrin-umhüllten Membraneinstülpungen an der Plasmamembran (Macia *et al.*, 2006) und inhibiert daher sowohl Dynamin-abhängige als auch der Clathrin-vermittelte Endozytosewege. Zur Inhibition von Cholesterol-, Lipid-raft- und Caveolin-abhängigen Endozytosewegen wurde M β CD verwendet. M β CD ist ein zyklisches Heptasaccharid, das einen hydrophoben Kern besitzt, der eine hohe Affinität zu Cholesterol aufweist (Irie *et al.*, 1992). Durch diese Eigenschaft löst es Cholesterol aus der Plasmamembran von Zellen, was zur Bildung löslicher M β CD/Cholesterol-Komplexe führt und die Änderung der Membranbeschaffenheit zur Folge hat

(Kilsdonk *et al.*, 1995). Durch diese, wird neben der Cholesterol-abhängigen Endozytose auch die *lipid-raft* und Caveolin-vermittelten Rezeptor-Liganden-Internalisation von z.B. Cholera Toxin und Glukose beeinflusst (Shigematsu *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2005, Westermann *et al.*, 2005). Spautin-1 (Spautin) ein sogenanntes *small molecule* inhibiert den als Autophagie bezeichneten Prozess zum Abbau von zytoplasmatischen Proteinen und Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) (Liu *et al.*, 2011). Als letzter Inhibitor in dieser Arbeit wurde *Clostridium Toxin B* (CDTxB) verwendet, ein Inhibitor der Rho-GTPasen (Just *et al.*, 1994, Hausding *et al.*, 2000, Ando *et al.*, 2007). In HeLa Zellen stört CDTxB den Übergang von G2 zur M Phase während des Zellzyklus (Ando *et al.*, 2007). Bei CD34⁺ Zellen beeinflusst CDTxB die morphologische Zellpolarisierung was Effekte auf die Zellmotilität, Migration und das *Homing* der Zellen hat (Görgens *et al.*, 2012).

CDTxB und Spautin sind keine konventionellen Endozytoseinhibitoren wurden aber im Hinblick auf eine mögliche Verknüpfung der verschiedenen zellulären Prozesse wie Zellpolarisierung, Endozytose und endosomaler Transport als Kontrollen mitgeführt. CDTxB diente als positiv-Kontrolle bei der Frage, ob Endozytose-Inhibitoren die Zellpolarität von CD34⁺ Zellen beeinflussen. Dabei wurde in den Analysen gleichzeitig geklärt, ob CDTxB die Endozytose der Zellen beeinflusst. Spautin wurde als Beispiel eines Inhibitors verwendet, welcher einen mit dem endosomalen System assoziierten Prozess inhibiert, die Autophagosomen Bildung. Dadurch sollte untersucht werden, ob spätere endosomale Prozesse nach der Endozytose von Liganden, ebenfalls Effekte auf die Zellbiologie und Zellschicksalsentscheidung der CD34⁺ Zellen ausüben. Für die Versuche mit den Inhibitoren wurden CD34⁺ Zellen mit einer mittleren Reinheit von 81,4% ± 8,2 verwendet.

3.1.1. Titration der Inhibitoren

Im Gegensatz zu vielen anderen Zellen besitzen CD34⁺ Zellen *Multi-Drug-Transporter*, was dazu führt, dass sie häufig eine höhere Pharmazeutikatoleranz besitzen als andere primäre Zellen (Chaudhary und Roninson, 1991, Chaudhary *et al.*, 1992, Chaudhary und Roninson, 1993). Daher wurden die hier verwendeten Inhibitoren Chpz, CytB, Dyna, MβCD, MDC, CDTxB und Spautin zunächst titriert. Pro Ansatz wurden wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben ca. 25.000 CD34⁺ Zellen mit jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren (Tabelle 42) und in Gegenwart von SCF, TPO und FLT3L für 16-24 h (d1) kultiviert. Morphologische

Veränderungen der Zellen wurden mikroskopisch analysiert, bevor die Zellen durchflusszytometrisch auf die Präsenz von AnnexinV hin untersucht wurden. AnnexinV bindet Calcium-abhängig an Phosphoserinreste, die sich bei prä-apoptotischen, apoptotischen und toten Zellen auf der Zellmembranoberfläche finden (Ozdemir *et al.*, 2003). Anhand der durchflusszytometrischen Analysen wurde der Anteil AnnexinV-negativer Zellen (lebende Zellen) in den Ansätzen mit und ohne Endozytose-Inhibitoren quantifiziert.

Tabelle 42: Verwendete Inhibitorkonzentrationen

Inhibitor	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration laut Literatur
Cytochalasin B	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml (Görgens <i>et al.</i> , 2012)
Chlorpromazin	25 µM	50 µM	100 µM	50 – 100 µM (Ivanov, 2008)
Clostridium Toxin B	150 nM	200 nM	250 nM	200 nM (Görgens <i>et al.</i> , 2012)
Dynasore	60 µM	80 µM	100 µM	80 µM (Macia <i>et al.</i> , 2006)
Methyl-β-cyclodextrin	2,5 mM	5 mM	10 mM	5 - 10 mM (Ivanov, 2008, Görgens <i>et al.</i> , 2012)
Spautin-1	5 µM	10 µM	20 µM	0,5 – 10 µM (Liu <i>et al.</i> , 2011)
Monodansylcadaverin	100 µM	200 µM	300 µM	100 – 300 µM (Ivanov, 2008)

Chpz vermittelte bereits nach 16-24 h bei einer Konzentration von 25 µM eine toxische Wirkung auf CD34⁺ Zellen, in entsprechenden Messungen waren 58% ± 20 der analysierten Zellen AnnexinV negativ, dieser Anteil blieb bei der Erhöhung der Konzentration auf 50 µM Chpz relativ konstant (51% ± 9) und sank bei weiterer Konzentrationserhöhung von Chpz auf 100 µM durchschnittlich auf 3,65% ± 0,07 (Abbildung 50B). Im Weiteren ließ sich erkennen, dass Chpz die Zellpolarisierung der CD34⁺ Zellen bereits in der geringsten Konzentration beeinflusste. Die Daten der Titration von CDTxB, CytB und MβCD wurden zusammen mit André Görgens erhoben (Görgens *et al.*, 2012). Dabei ließ sich keine toxische Wirkung für CDTxB und CytB mit den gewählten Konzentrationen auf die Zellen erkennen (Abbildung 50 B). Die Verwendung der Konzentration von 2 mM (89,1% ± 3,1) oder 5 mM (82,7% ±

6,9) M β CD führte zu keinem Unterschied im Anteil der AnnexinV-negativen Zellen (Abbildung 50 B). Ab einer Konzentration von 10 mM bewirkte M β CD ein starkes Absinken der Menge AnnexinV-negativen Zellen (lebender Zellen) auf $1,7\% \pm 0,85$ in der Kultur. Des Weiteren wurde eine Abnahme in der morphologischen Polarität der Zellen mit ansteigender M β CD Konzentration festgestellt. Die Inhibitoren Dyna und Spautin ließen keinen Effekt auf die lebenden Zellen mit ansteigender InhibitorKonzentration erkennen (Abbildung 50B) und auch ein Unterschied in der Zellpolarität war nicht offensichtlich zu sehen.

MDC verminderte den Anteil AnnexinV negativer Zellen bei einer Konzentration von 100 μ M auf $63\% \pm 24$, bei 200 μ M blieb der Anteil der Zellen mit $57\% \pm 7$ konstant wohingegen eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 300 μ M zu einer Minderung der AnnexinV-negativen Zellen auf $29,9\% \pm 3,8$ führte (Abbildung 50B). Zudem war eine Abnahme der morphologischen Zellpolarisierung ab einer Konzentration von 200 μ M MDC mikroskopisch zu erkennen. CDTxB und CytB hatten mit steigender Konzentration keinen Effekt auf den Anteil der lebenden Zellen (AnnexinV-negativ), allerdings nahm der Anteil der polarisierten Zellen mit steigender Inhibitor Konzentration ab (Abbildung 50 B). Um eine spezifischere Aussage über Effekte der Inhibitoren auf die morphologische Polarisierung von CD34⁺ Zellen zu treffen, wurde in späteren Versuchen diese spezifisch quantifiziert.

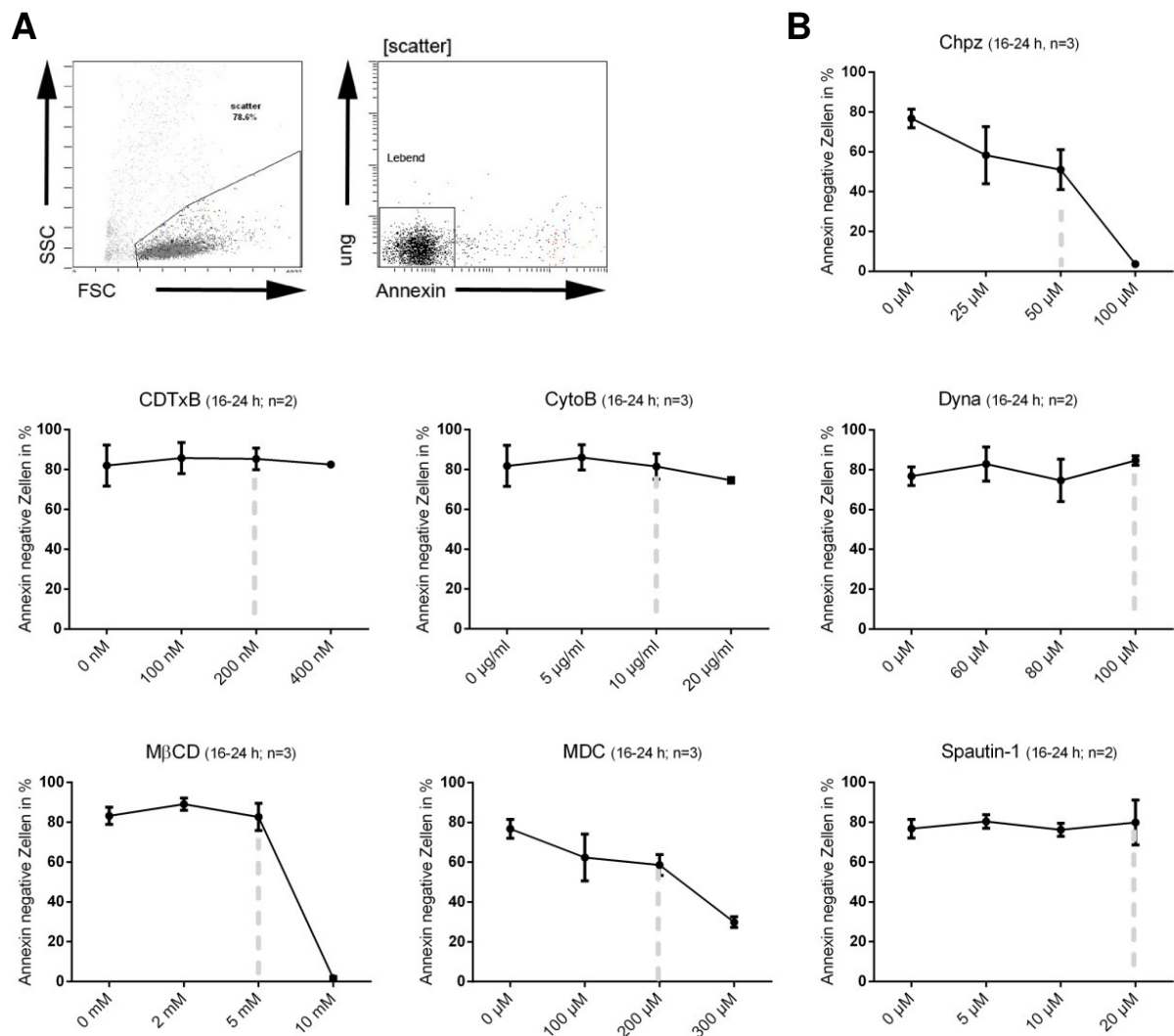


Abbildung 50: Titration der Inhibitoren auf Zytotoxizität von CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden für 16-24 h mit den in Tabelle 15 aufgelisteten Konzentrationen der Inhibitoren CDTxB, Chpz, CytB, Dyna, MβCD, MDC und Spautin behandelt und dann durchflusszytometrisch analysiert. Analyse der Vitalität mittels AnnexinV-Färbung und durchflusszytometrische Messung der CD34⁺ Zellen nach Behandlung mit den Inhibitoren. Der prozentuale Anteil an AnnexinV negativen Zellen wurde bestimmt. Die Titrations von CytoB, MβCD und CDTxB wurden in Kooperation mit André Görgens durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse wurden folgende Inhibitorkonzentrationen für die weiteren Versuche gewählt: CDTxB: 200 nM, Chpz (50 μM), CytB (10 μg/ml), Dyna (100 μM), MβCD (5 mM), MDC (200 μM) und Spautin (20 μM) (Tabelle 21). Diese Werte entsprechen im Wesentlichen den Konzentrationen mit denen üblicherweise Zelllinien behandelt werden. Eine erhöhte Resistenz wurde lediglich für Dyna (100 μM) erkannt.

Tabelle 43: Verwendete Pharmazeutikakonzentrationen.

Pharmazeutika	Konzentration
Chlorpromazin (Chpz)	50 μ M
Cytochalasin B (CytB)	10 μ g/ml
<i>Clostridium</i> Toxin B (CDTxB)	200 nM
Dynasore (Dyna)	100 μ M
Methyl- β -cyclodextrin (M β CD)	5 mM
Monodansylcadaverin (MDC)	200 μ M
Spautin-1 (Spautin)	20 μ M

3.1.2. Inhibition der Endozytose von Transferrin und Dil acLDL nach verschiedenen Zeitpunkten der Inhibitorbehandlung

Nach Ermittlung geeignet erscheinender Inhibitorkonzentrationen wurden diese im Hinblick auf ihre Endozytose inhibierende Wirkung an CD34⁺ Zellen getestet. Die Wirkung der Inhibitoren auf die Endozytose wurde anhand der Aufnahme von Alexa Fluor® 555-markierten Transferrin bzw. Dil markierten acetylierten LDL (Dil acLDL) in CD34⁺ Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Dazu wurden CD34⁺ Zellen für 16-24 h mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt, bevor für 30 min Transferrin-Alexa555 bzw. Dil acLDL zu den Zellen zugegeben wurde. Nach 30 min wurden nichtgebundene Moleküle herausgewaschen und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde die Aufnahme der jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Liganden in nicht mit Inhibitor behandelten Zellen gemessen. Als Maß für die Endozytose diente die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit Liganden behandelten CD34⁺ Zellen die durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die Änderung in der Fluoreszenzintensität der Zellen nach LDL bzw. Transferrin Aufnahme ist in den Histogrammen dargestellt (Abbildung 51 A). Das weiße Histogramm stellt die Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen und das graue Histogramm die der mit Inhibitor behandelten Zellen dar (Abbildung 51 A). Um eine Vergleichbarkeit für die Aufnahme von Transferrin und LDL zu gewährleisten, wurde die MFI der Kontrollzellen auf 100% normiert (Abbildung 51 B). Die relativen Änderungen in der MFI der Zellen, die Transferrin oder LDL nach Inhibitorbehandlung aufgenommen haben, ist dargestellt (Abbildung 51 B).

In drei unabhängigen Experimenten zeigte sich, dass die Menge an Transferrin (gemessen an der MFI), dass die Zellen nach Behandlung mit Chpz, M β CD und MDC aufgenommen haben, im Vergleich zu der aufgenommenen Menge in

Kontrollzellen um ca. 50% reduziert war (Chpz: $p=0,037$, Dyna: $p=0,041$ und MDC: $p=0,012$; M β CD: $p=0,066$; Abbildung 51 A und B). Die MFI der Chpz behandelten Zellen reduzierte sich auf $21,8\% \pm 2,9$ ($n=3$), die der mit Dyna behandelten Zellen auf $73,0\% \pm 9,7$ ($n=3$), die von M β CD behandelten Zellen auf $63,0\% \pm 7,1$ ($n=3$) und die der MDC behandelten Zellen auf $17,6\% \pm 1,3$ ($n=3$) (Abbildung 51 A und B). Die Inhibitoren CDTxB (MFI: $97,6\% \pm 5,3$; $p=0,37$, $n=3$), CytB (MFI: $92,3\% \pm 9,8$; $p=0,16$, $n=3$) und Spautin (MFI: $85,3\% \pm 14,1$; $p=0,08$, $n=3$) führten zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der MFI im Vergleich zu der Kontrollzellen (Abbildung 51 A und B).

Bei der Aufnahme von Dil acLDL in CD34⁺ Zellen wurde eine Verminderung der MFI nach Behandlung mit Chpz, Dyna, M β CD und MDC festgestellt (Abbildung 51B). Diese Verminderung war signifikant im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, für Chpz ($p=0,0038$; $59,05\% \pm 4,27$, $n=3$), CytB ($p=0,0095$; $71,6\% \pm 4,8$, $n=3$), Dyna ($p=0,013$; $66,8\% \pm 18,8$), M β CD ($p=0,007$; $68,8\% \pm 9,5$, $n=3$) und MDC ($p=0,0044$; $54,8\% \pm 4,5$, $n=3$). Die Behandlung mit CDTxB ($p=0,065$; $80,3\% \pm 9,2$, $n=3$) und Spautin ($p=0,167$; $81,5\% \pm 20,4$) führte unter diesen Bedingungen zu keiner eindeutigen Abnahme der MFI von CD34⁺ Zellen nach Behandlung mit Dil acLDL im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 51 A und B).

Mit Ausnahme von CDTxB und Spautin führten die Behandlungen von CD34⁺ Zellen mit den hier verwendeten Inhibitoren zur verringerten Aufnahme von Transferrin und acLDL. Hieraus lässt sich ableiten, dass die verwendeten Inhibitoren endosomale Prozesse in HSVZ blockieren. Die erste mikroskopische und morphologische Betrachtung der mit Inhibitoren behandelten Zellen ließ darauf schließen, dass diese ebenfalls die Ausbildung der Zellpolarität beeinflussen. Dieser Effekt wurde im Folgenden mikroskopisch quantifiziert.

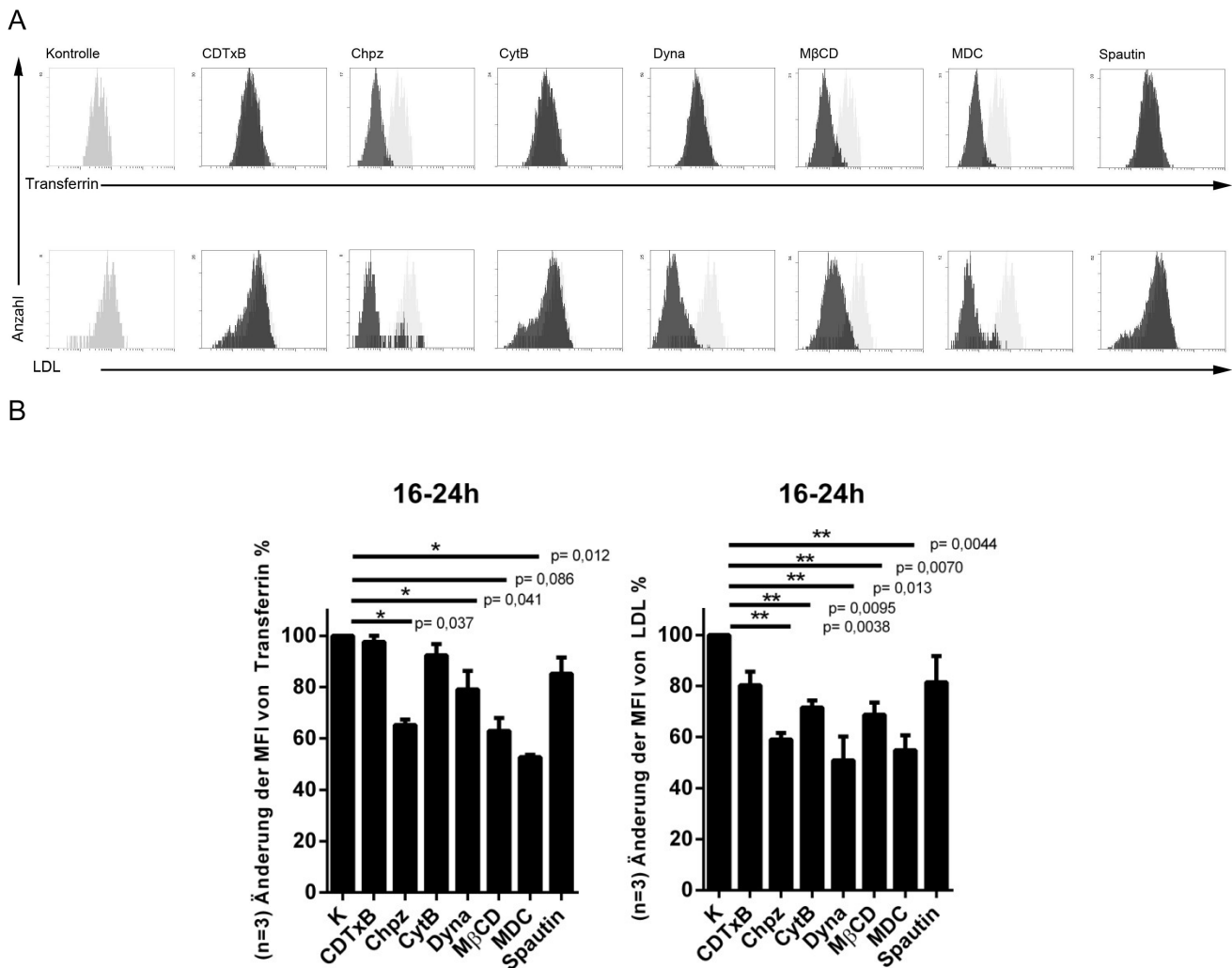


Abbildung 51: Endozytoseinhibition durch Pharmazeutika

A) $CD34^+$ Zellen wurden nach Isolierung aus Nabelschnurblut 16-24 h in Gegenwart der Inhibitoren kultiviert. Nach den jeweiligen Zeitintervallen wurde die Aufnahme von 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa Fluor555-konjugiertem Transferrin oder 1 $\mu\text{g/ml}$ Dil acetyliertem LDL durchflusszytometrisch analysiert. A) Mittlere Fluoreszenzintensität als Histogramm dargestellt. In hellgrau sind die Histogramme der Kontrollzellen dargestellt. B) Relative Quantifizierung der Endozytose von Transferrin oder acLDL nach 16-24 h anhand der MFI. $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,005 = ***$, weitere p-Werte sind angegeben. Die Standardabweichung (SD) aus 3 unabhängigen Experimenten ist als Fehlerbalken dargestellt.

3.1.3. Einfluss einzelner Endozytoseinhibitoren auf die Zellbiologie von $CD34^+$ Zellen

Im Folgenden wurde analysiert, ob die Endozytoseinhibition die Zellpolarisierung beeinflusst. In einem gemeinsamen Projekt mit André Görgens konnte bereits für CDTxB, CytB und MβCD gezeigt werden, dass sie mit der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität von $CD34^+$ Zellen interferieren (Görgens *et al.*, 2012). Bevor auf die erzielten Effekte eingegangen wird, soll hier noch einmal kurz der Zellpolarisierungsprozess humaner HSVZ beschrieben werden (Abschnitt 3.1.3).

Frisch isolierte CD34⁺ Zellen sind klein und rund und werden mit der Kultivierungsdauer größer. Dabei nehmen sie eine polarisierte Morphologie an, die dem Migrationsphänotyp von Leukozyten entspricht (Giebel et al., 2004). Hierbei bilden die Zellen am vorderen Pol eine Leitfront (*Leading Edge*) aus, und am hinteren Ende einen für Leukozyten charakteristischen Ausläufer den Uropoden. Den Arbeiten unserer Gruppe zur Folge etablieren CD34⁺ Zellen vor Ausbildung des Migrationsphänotypen zunächst eine intrinsische Polarität. Hierbei akkumulieren verschiedene Moleküle wie das Zelladhäsionsmolekül CD50 (ICAM3) und die Membran-Mikrodomänen organisierenden Flotilline Flot1 und Flot2, die zuvor zufällig verteilt erscheinen, halbmondförmig auf einer Seite von ansonsten morphologisch runden Zellen. Anschließend können sie morphologisch polarisieren, wobei viele der umverteilten Moleküle an der Spitze des Uropoden wieder zu finden sind (Giebel et al., 2004, Görgens et al., 2012; Rajendran et al., 2009) (Abbildung 52 A).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die morphologische und molekulare Polarität von CD34⁺ Zellen, die in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Inhibitoren kultiviert worden waren, nach 16-24 h mikroskopisch quantifiziert. Zunächst wurde der Anteil morphologisch polarisierter Zellen in 4 bzw. 6 unabhängigen Versuchen bestimmt. Der Anteil morphologisch polarisierter Zellen belief sich in den Kontrollansätzen auf 60,84% ± 7,82 (n=6). CD34⁺ Zellen die mit Chpz behandelt wurden, wiesen einen Anteil an morphologisch polarisierten Zellen von 9,28% ± 3,99 (p= 0,000009; n=6), mit CDTxB behandelte von 32,5% ± 12,1 (p= 0,009; n=4) mit CytB behandelte von 5,10% ± 2,18 (p= 0,001; n=4), mit Dyna behandelte von 50,15% ± 15,70 (p= 0,02; n=6), mit behandelte MβCD von 22,80% ± 18,06 (p= 0,0007; n=6), mit MDC behandelte von 17,18% ± 9,01 (p= 0,00004; n=6) und mit Spautin (n=4) behandelte von 34,05% ± 9,63 (p= 0,001; n=4) auf. Somit wurden die stärksten Effekte mit CytB, Chpz und MDC erzielt. In diesem Kontext soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Behandlung mit Chpz und MDC zur Apoptose der CD34⁺ Zellen führt (Abbildung 52 B). Diese Ergebnisse lassen schließen, dass endosomale Prozesse möglicherweise an den Polarisierungsprozessen von CD34⁺ Zellen beteiligt sind.

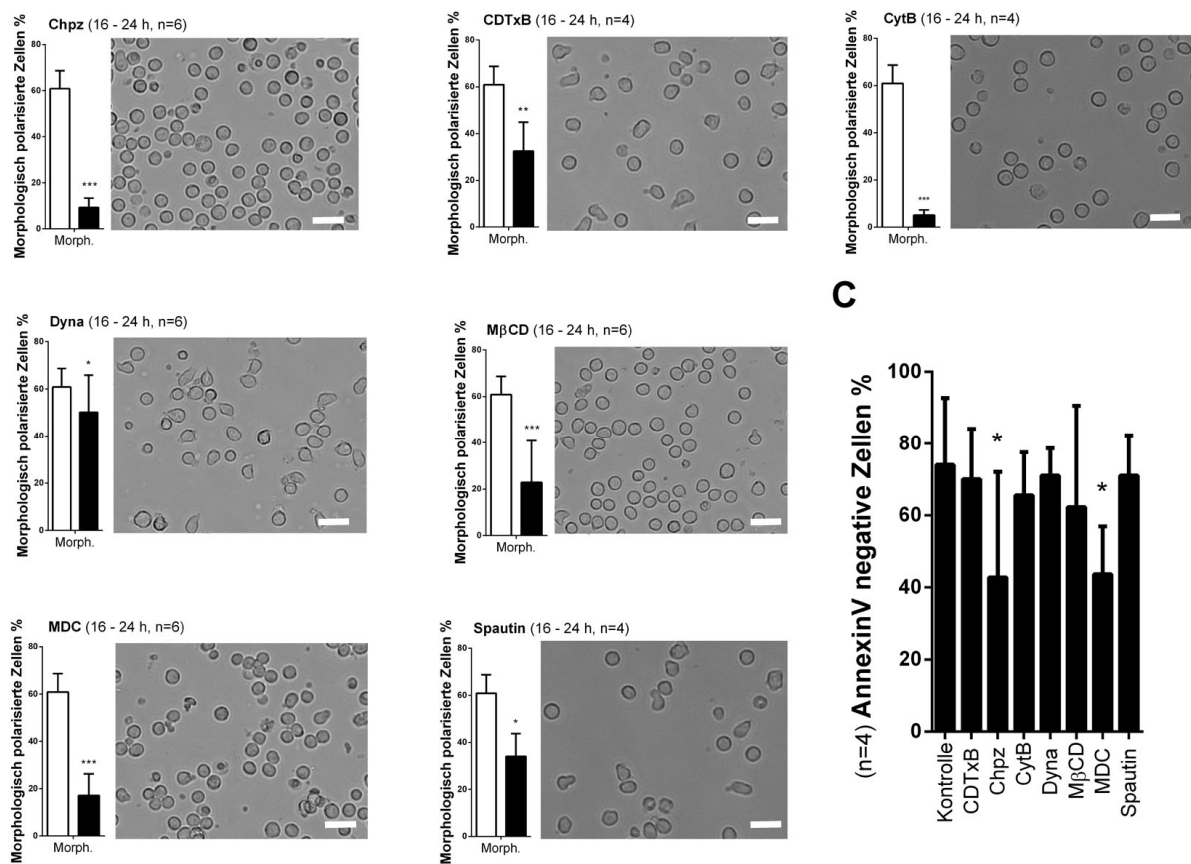


Abbildung 52: Einfluss von Inhibitoren auf die morphologische Polarität von CD34⁺ Zellen

Anteil morphologisch polarisierter CD34⁺ Zellen (Morph.) in 16–24 h Kulturansätzen, in Anwesenheit (behandelt, schwarz) bzw. in Abwesenheit (Kontrolle, weiss) der verschiedenen Inhibitoren (CDTxB, Chpz, CytB, Dyna, MβCD, MDC und Spautin). In den Graphen ist die Standardabweichung (SD) mit dem Fehlerbalken angegeben. Signifikante Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$). Maßstabsbalken 10 µm. B) AnnexinV-negative Zellen nach Inhibitorbehandlung.

Für die Bestimmung der intrinsischen/molekularen Polarität anhand der Verteilung von ICAM-3 (CD50) innerhalb der Zellen wurde das Amnis Image StreamX Durchflusszytometer verwendet. Dieses Gerät kombiniert die Eigenschaften eines konventionellen Durchflusszytometers mit denen eines Fluoreszenzmikroskopes. In diesem Gerät werden die Zellen während der durchflusszytometrischen Messung digital fotografiert. Die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten werden durch Integration der jeweiligen Pixel der mikroskopischen Aufnahme ermittelt. Das Gerät ermöglicht es, bestimmte Punkte in durchflusszytometrischen Plots bzw. Histogrammen auszuwählen und sich die dazugehörigen mikroskopischen Bilder der jeweiligen Zellen anzeigen zu lassen (Abbildung 53 und Abbildung 54). Über dieses Verfahren können Zellen in kürzerer Zeit im Hochdurchsatz mikroskopisch analysiert werden. Des Weiteren ist das Gerät mit einer Software ausgestattet, die eine Bildverarbeitung im Hochdurchsatz ermöglicht. Anhand der mikroskopischen Bilder kann zum Beispiel

die Länge gegen die Querachse von aufgenommenen Zellen als weiterer Parameter ermittelt werden. Parametrisch lassen sich diese Eigenschaften mit denen der Fluoreszenzintensität kombinieren und ebenfalls in Dotplot Diagrammen bzw. Histogrammen darstellen. Dadurch werden morphologische mit den immunphänotypischen Eigenschaften der Zellen in einer Analyse kombiniert (Basiji *et al.*, 2007). Somit ließen sich, für die hier erforderlichen Analysen sowohl Anteile an morphologisch polarisierten als auch an morphologisch nicht polarisierten Zellen im Hochdurchsatz ermitteln (Abbildung 53). Bei den morphologisch runden Zellen kann mittels Bilderkennung zwischen molekular polarisierten und nicht polarisierten Zellen unterschieden werden (Abbildung 54).

Für die Bestimmung der molekularen Zellpolarität wurden immunfluoreszente Färbungen mit CD50-FITC (ICAM-3) und CD133-PE Antikörpern an CD34⁺ Zellen die für 16 -24 h mit und ohne Inhibitoren behandelten wurden, durchgeführt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch und mikroskopisch analysiert (Amnis Image StreamX, Merck Millipore). Es wurde der Anteil von molekular und morphologisch polarisierten Zellen bestimmt (Abbildung 55 B). Dabei wurde die Verteilung von ICAM-3 und CD133 auf der Zellmembran als Marker für die molekulare Polarisierung verwendet. Bei molekular polarisierten CD34⁺ Zellen (unbehandelt) befanden sich die Proteine halbmondförmig auf einer Hälfte der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 53 B, Abbildung 55 A). Für die Quantifizierung der molekularen Polarität wurden die Zellen auf nicht polarisierte CD34⁺ Zellen eingegrenzt (Abbildung 53). Von diesen Zellen wurde ein Histogramm erstellt, das die Hauptfluoreszenzintensität von CD50 zeigt (Abbildung 54). Anhand von diesem Histogramm konnten molekular polarisierte und nicht polarisierte CD34⁺ Zellen quantifiziert werden. Zusammen mit dem Anteil der morphologisch polarisierten Zellen ließ sich der gesamt Anteil an molekular polarisierten Zellen ermitteln (Abbildung 55 B).

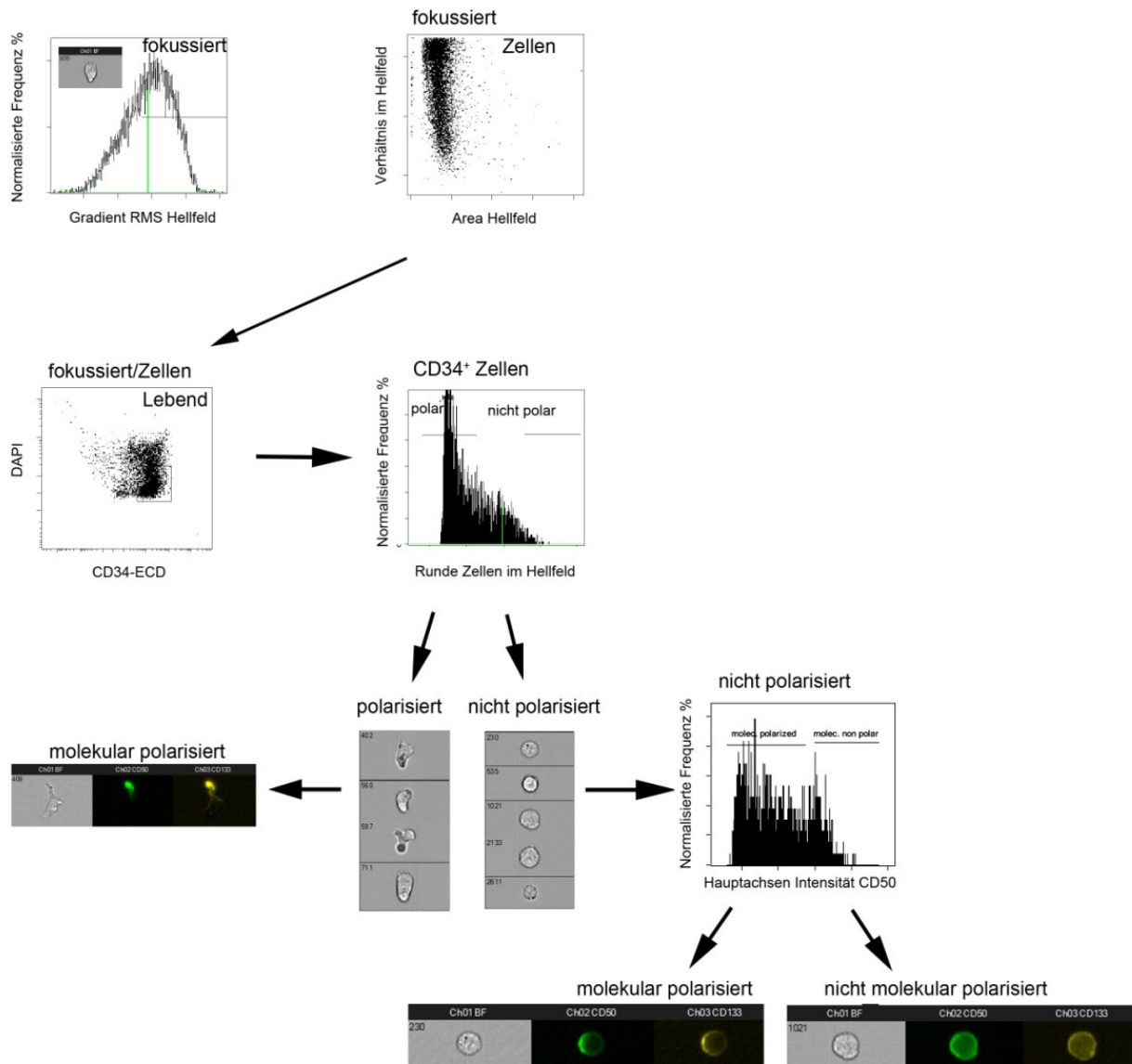


Abbildung 53: Bestimmung der molekularen Polarisation von CD34⁺ Zellen.

Auswertestrategie für die Analyse molekular polarisierter CD34⁺ Zellen nach 16-24 h Behandlung mit und ohne Endozytose-Inhibitoren in morphologisch unpolaren Zellen. Es wurde ein Gate zu Definition der Zellpopulation gewählt und diese auf mikroskopisch fokussierte Zellen eingegrenzt (Zellen/fokussiert). Durch Dapi-Färbung wurden tote Zellen aus den Analysen ausgeschlossen. Die Lebenden Zellen wurden auf CD34⁺ Zellen eingegrenzt. Durch die Darstellung der CD34⁺ Zellen gegen die Form der Zellen (Länge/Breite) ließen sich morphologisch polarisierte von unpolarisierten Zellen trennen. Die nicht polarisierten Zellen können gegen die Hauptachsenintensität einer Fluoreszenz dargestellt werden, wobei eine Trennung zwischen molekular polarisierten und molekular nicht polarisierten Zellen erfolgt. Diese wird anhand der ungleichen Verteilung des jeweiligen mit dem Fluoreszenz-konjugierten Antikörper gegengefärbten Proteins auf den Zellen bestimmt. In diesem Beispiel CD50 und CD133.

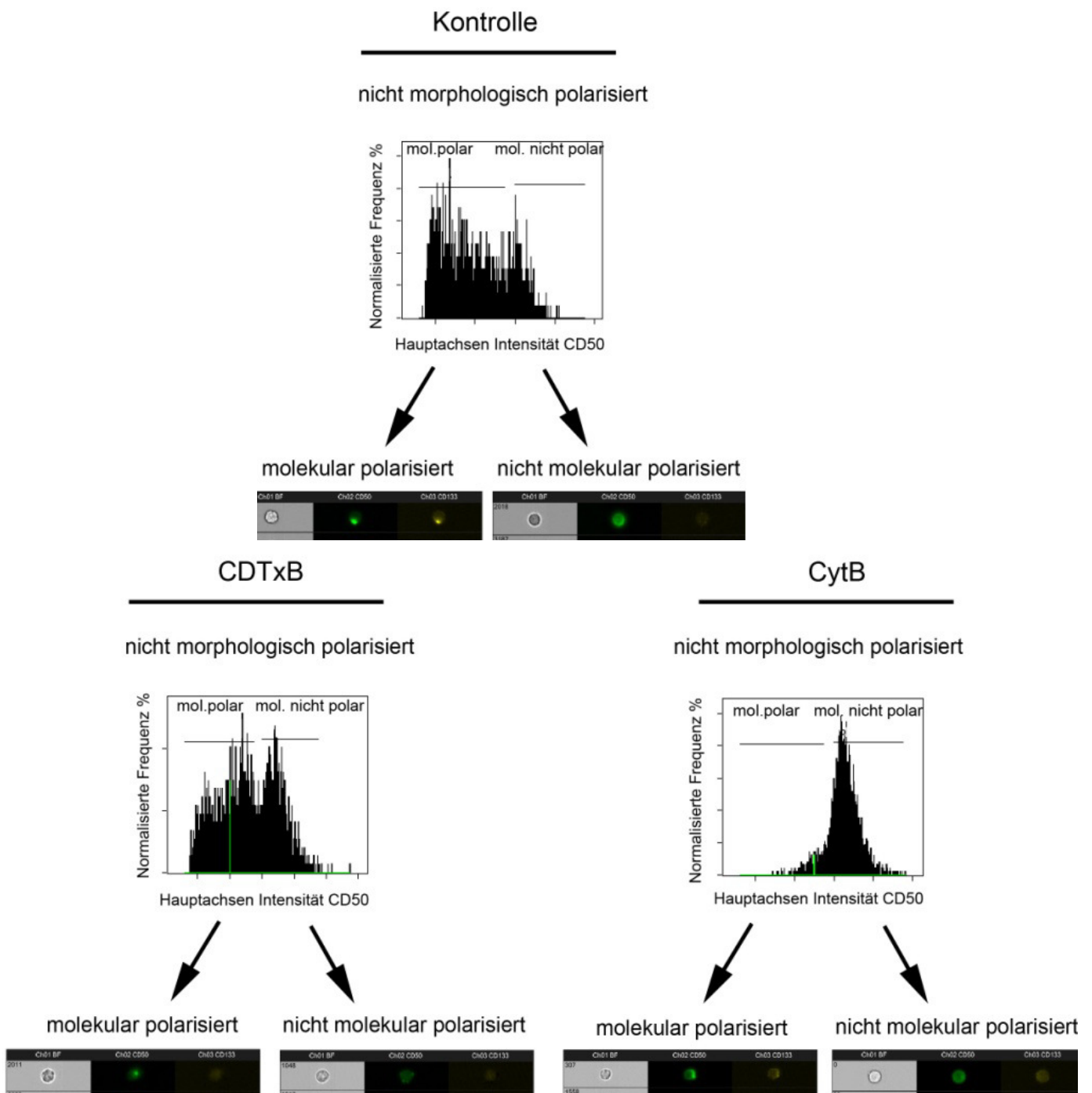


Abbildung 54: Beispiele für Inhibitoren, die die morphologische Polarisation vermindern.

Kontrollzellen und mit CDTxB und CytB behandelte Zellen. CDTxB und CytB vermindern die morphologische Polarität von $CD34^+$ Zellen zeigen, dabei aber unterschiedliche Effekte auf die molekulare Polarisation der $CD34^+$ Zellen haben. Im Vergleich sind unbehandelte Zellen dargestellt (Kontrolle). Als Polaritätsmarker wurde CD50 und CD133 verwendet.

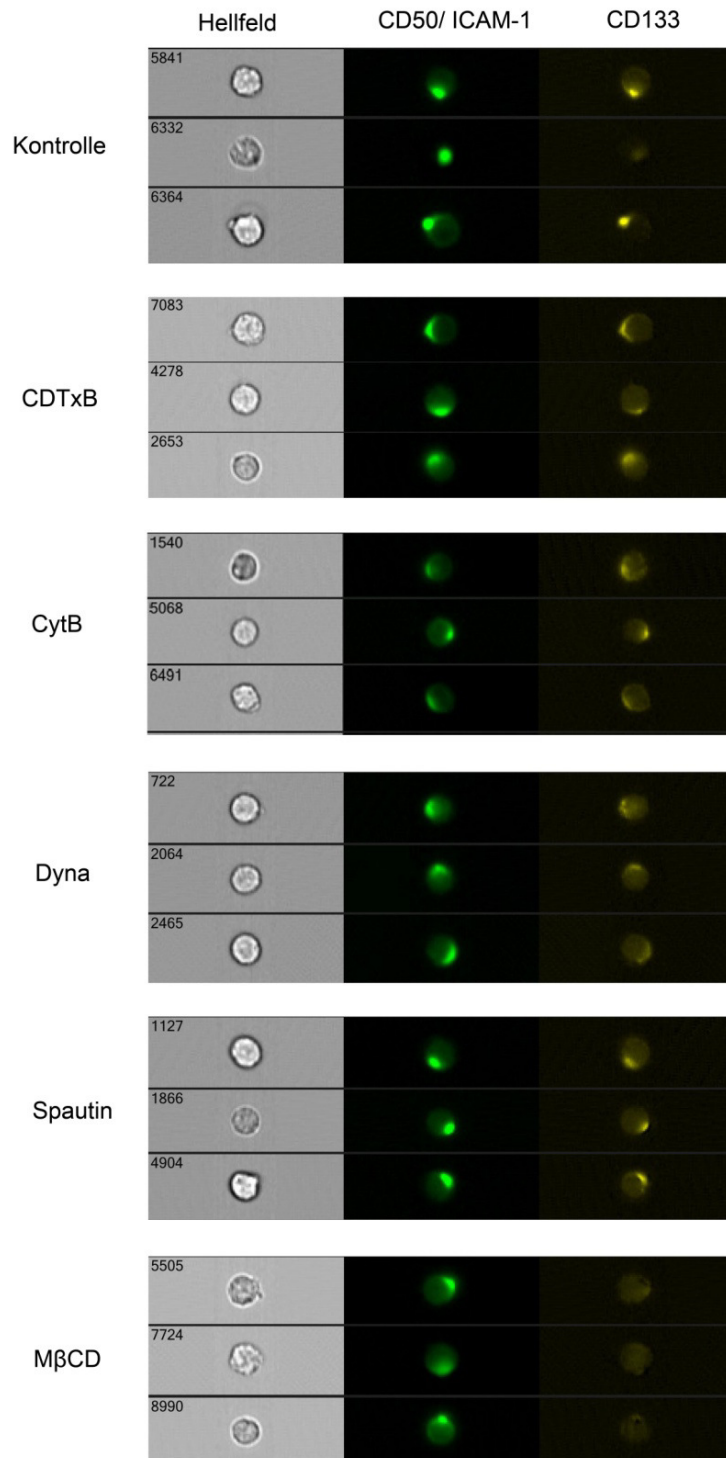
Die mikroskopischen Analysen vom Amnis Image StreamX lassen erkennen, dass mit Ausnahme von M β CD behandelten Zellen, die Zellen aus allen Ansätzen eine Ko-Lokalisation bzw. eine benachbarte Lokalisation von CD133 und CD50 am selben Pol der molekular polarisierten Zellen aufweisen (Abbildung 55 A). Der prozentuale

Anteil der molekular polarisierten CD34⁺ Zellen wurde jedoch durch die Behandlung mit CDTxB (74,5% ± 16,51; n=2), CytB (19,8% ± 7,35; n=2) und MβCD (38%; n=1) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (94,3% ± 6,61; n=2) vermindert (Abbildung 55 B). Die Inhibitoren Dynasore (88,00% ± 1,41; n=2) und Spautin-1 (90,03% ± 8,52; n=2) zeigten keinen Effekt auf die molekulare Polarisierung von CD34⁺ Zellen (Abbildung 55 B).

Die Analyse der morphologischen Polarisierung der CD34⁺ Zellen nach Inhibitorbehandlung mit dem Amnis Image StreamX zeigte für die einzelnen Inhibitoren ähnliche Effekte auf die Zellpolarisierung wie bereits zuvor bei der reinen mikroskopischen Quantifizierung der Zellpolarität (Abbildung 52). CDTxB verminderte die Zellpolarität in 2 Versuchen von 58,00% ± 5 (Kontrolle; n=2) auf 40,50% ± 10,61 (n=2), CytB auf 4,50% ± 0,71 (n=2), Dyna auf 50,00% ± 0,00 (n=2), MβCD auf 8% (n=1) und Spautin auf 40,50% ± 7,80 (n=2).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Inhibitoren die Zellpolarität von CD34⁺ Zellen beeinflussen und das MβCD die Zelloberflächenexpression von CD133 vermindert. Die Ergebnisse suggerieren weiter, dass endosomale Prozesse an der Zellpolarisierung involviert sein könnten und daher auch einen Einfluss auf die Zellschicksalsspezifikation von HSVZ haben könnten. Um den Verlust der Zelloberflächenexpression von CD133 im Folgenden zu untersuchen erfolgte wie bereits bei den Rab-GTPasen die Analyse der Zelloberflächenexpression von CD133 und CD34 nach 16-24 h Inhibitorbehandlung.

A



B

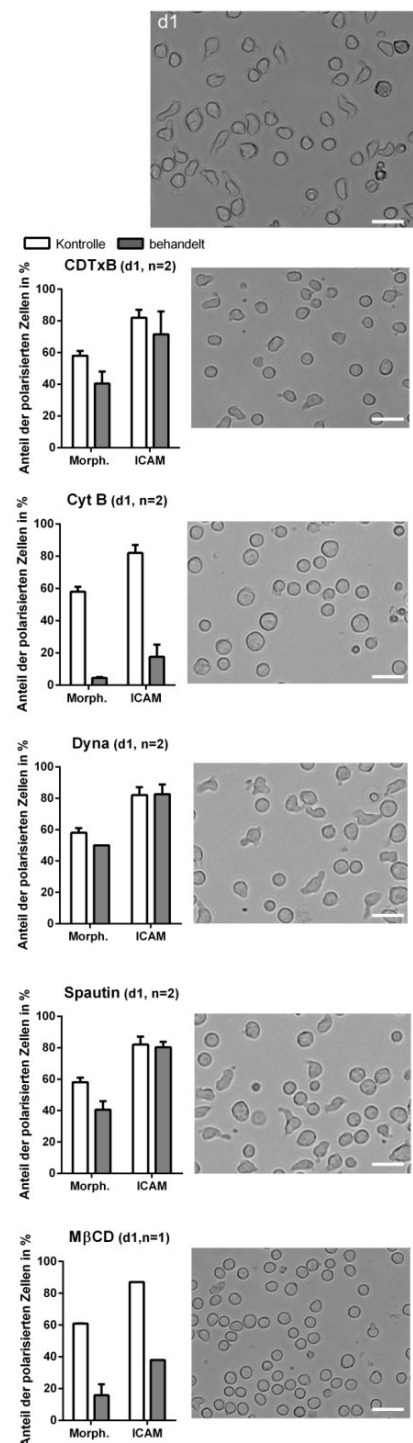


Abbildung 55: Mikroskopische Analyse der intrinsischen und morphologischen Polarität an CD34⁺ Zellen

A) Mikroskopische Aufnahmen von ICAM-1 (CD50) intrinsisch polarisierten CD133⁺ Zellen am Amnis Image StreamX nach Pharmazeutikabehandlung. B) Graphische Darstellung des Anteils an morphologisch (Morph.) und intrinsisch (ICAM) polarisierten Zellen und beispielhafte Hellfeld Aufnahme von behandelten CD34⁺ Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse. Maßstabsbalken 10 μ m.

3.1.4. Einfluss von Inhibitoren auf die Expression von CD133

Die im Amnis erhobenen durchflusszytometrischen und mikroskopischen Daten deuten einen Einfluss von M β CD auf die Zelloberflächenexpression von CD133 an (Abbildung 55 A). Da die Unterscheidung in CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ wie unter Abschnitt 3.2.10 beschrieben, in Zusammenhang mit unterschiedlichen Linienpotenzialen steht, wurde die Verminderung der CD133 Oberflächenexpression nach Inhibitor Behandlung im Folgenden durchflusszytometrisch untersucht.

Um Veränderungen des Anteils von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen nach Pharmazeutikabehandlung zu analysieren wurden CD34⁺ Zellen für 16-24 h oder 50–60 h in Gegenwart der Inhibitoren kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD34 und CD133 untersucht. Eine Veränderung des Verhältnisses des Anteils der CD133^{low}CD34⁺ zu CD133⁺CD34⁺ Zellpopulationen zueinander gibt erste Hinweise auf eine Verschiebung des Linienpotenzials an. Ändert sich das Verhältnis in Richtung CD133⁺CD34⁺ Zellen ist anzunehmen, dass in der Kultur eventuell MPP erhalten werden oder es vermehrt myeloisch-lymphatische Progenitoren gibt. Anders wäre es bei einer Verschiebung in Richtung CD133^{low}CD34⁺ Zellen, dies würde auf einer Spezifikation in erythrozytär-myeloische Progenitoren hindeuten. Demnach wurde der relative Anteil der zwei Zellpopulationen mit und ohne Inhibitoren durchflusszytometrisch ermittelt und das Verhältnis von CD133^{low}CD34⁺ zu CD133⁺CD34⁺ Zellen ($CD133^{low}/CD133^{+}$) bestimmt.

Bei den durchflusszytometrischen Messungen zeigte sich, dass der Anteil von CD133^{low}CD34⁺ zu CD133⁺CD34⁺ Zellen in unbehandelten Kontrollzellen nach 16-24 h 25,50% \pm 3,54 zu 60,00% \pm 2,83 und nach 50-60 h 41,50% \pm 4,95 zu 48,50% \pm 2,12 betrug (Abbildung 56). Dies entspricht einem $CD133^{low}/CD133^{+}$ Quotienten von $0,42 \pm 0,04$ (n=2; 16-24 h) und von $0,85 \pm 0,06$; (n=2; 50-60h). Nach 16-24 h Behandlung mit CytB sank der Anteil CD133^{low}CD34⁺ Zellen (11,00% \pm 2,83) ab und der Anteil CD133⁺CD34⁺ Zellen (77,00% \pm 10,68) stieg an (Abbildung 56 A). 16-24 h M β CD Behandlung der Zellen resultierte in einer Verminderung der CD133⁺CD34⁺ Zellpopulation (2,50% \pm 0,71; n=2) und einem Anstieg von CD133^{low}CD34⁺ Zellen (74,00% \pm 9,90) in Kultur. Dies ließ sich auch in der Erhöhung des $CD133^{low}/CD133^{+}$ Quotienten ($31,42 \pm 12,85$; n=2) erkennen. Somit führte dieser Inhibitor zu einem gegenteiligen Effekt auf die zwei Populationen verglichen mit CytB (Abbildung 56 A). Bei Behandlung mit CDTxB ($0,43 \pm 0,01$), Dyna ($0,41 \pm 0,08$), Spautin ($0,49 \pm 0,11$),

Chpz ($0,60 \pm 0,04$) und MDC ($0,53 \pm 0,06$) für 16-24 h blieb das Verhältnis $CD133^{low}/CD133^{+}$ ähnlich dem der Kontrollzellen ($0,42 \pm 0,04$) (Abbildung 56 A). Nach 50-60 h Inhibitorbehandlung zeigten neben CytB ($10,50\% \pm 0,71$ zu $81,00\% \pm 7,07$; $n=2$) und M β CD ($84,00\% \pm 11,31$ zu $2,00\% \pm 1,41$; $n=2$) auch Chpz ($77,50\% \pm 19,09$ zu $4,50\% \pm 2,12$; $n=2$) und MDC ($28,50\% \pm 6,36$ zu $53,00\% \pm 5,66$; $n=2$) Effekte auf die Zelloberflächenexpression von CD133 verglichen mit Kontrollzellen ($41,50\% \pm 4,95$ zu $48,50\% \pm 2,12$; $n=2$; Abbildung 56 B). Chpz ($18,25 \pm 4,36$; $n=2$) und MDC ($11,68 \pm 3,56$; $n=2$) ließen einen Anstieg der $CD133^{low}CD34^{+}$ Zellpopulation im Vergleich zu Kontrollzellen ($0,85 \pm 0,06$; $n=2$) erkennen, ähnlich wie M β CD ($53,33 \pm 0,06$; $n=2$). CDTxB ($0,48 \pm 0,01$; $n=2$) und Spautin ($0,55 \pm 0,01$; $n=2$) deuteten aufgrund des Verhältnisses von $CD133^{low}/CD133^{+}$ tendenziell eine Zunahme von $CD133^{+}CD34^{+}$ Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ($0,85 \pm 0,06$; $n=2$) an. Dyna ($0,82 \pm 0,09$; $n=2$) ließ keine Änderung in den Anteilen der Zellpopulationen erkennen (Abbildung 56 B).

Es ist anzunehmen, dass der von Chpz und MDC nach 50-60 h der Behandlung vermittelte vermindernde Effekt wahrscheinlich auf den Verlust der Vitalität der Zellen durch die Inhibitoren zurückzuführen ist. Diese reduzierte sich auf $5\% \pm 4$ (Chpz) bzw. auf $29\% \pm 16$ (MDC).

M β CD war der einzige Inhibitor, der zu einem kompletten Verlust der CD133 Expression auf der Zelloberfläche der $CD34^{+}$ Zellen führte. Da M β CD Cholesterol aus der Membran löst, könnte es sein, dass der Verlust von CD133 auf der Zelloberfläche auf diese Eigenschaft des Inhibitors zurückzuführen ist, und nicht direkt mit der Zellschicksalspezifikation der Zellen zusammenhängt.

Um zu klären, ob diese Annahme zutreffen könnte, wurde der Inhibitor nach 24 h aus der Kultur durch Spülen mit PBS entfernt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden durchflusszytometrische und fluoreszenz-mikroskopische Analysen der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit bzw. ohne Inhibitor behandelt wurden, durchgeführt (Abbildung 57). Die erneute Aufspaltung der $CD34^{+}$ Zellen in $CD133^{+}CD34^{+}$ und $CD133^{low}CD34^{+}$ Zellen würde zeigen, dass der Effekt reversibel ist und die Zellen phänotypisch, nicht aber unbedingt auch deren Zellschicksalspezifikation verändert.

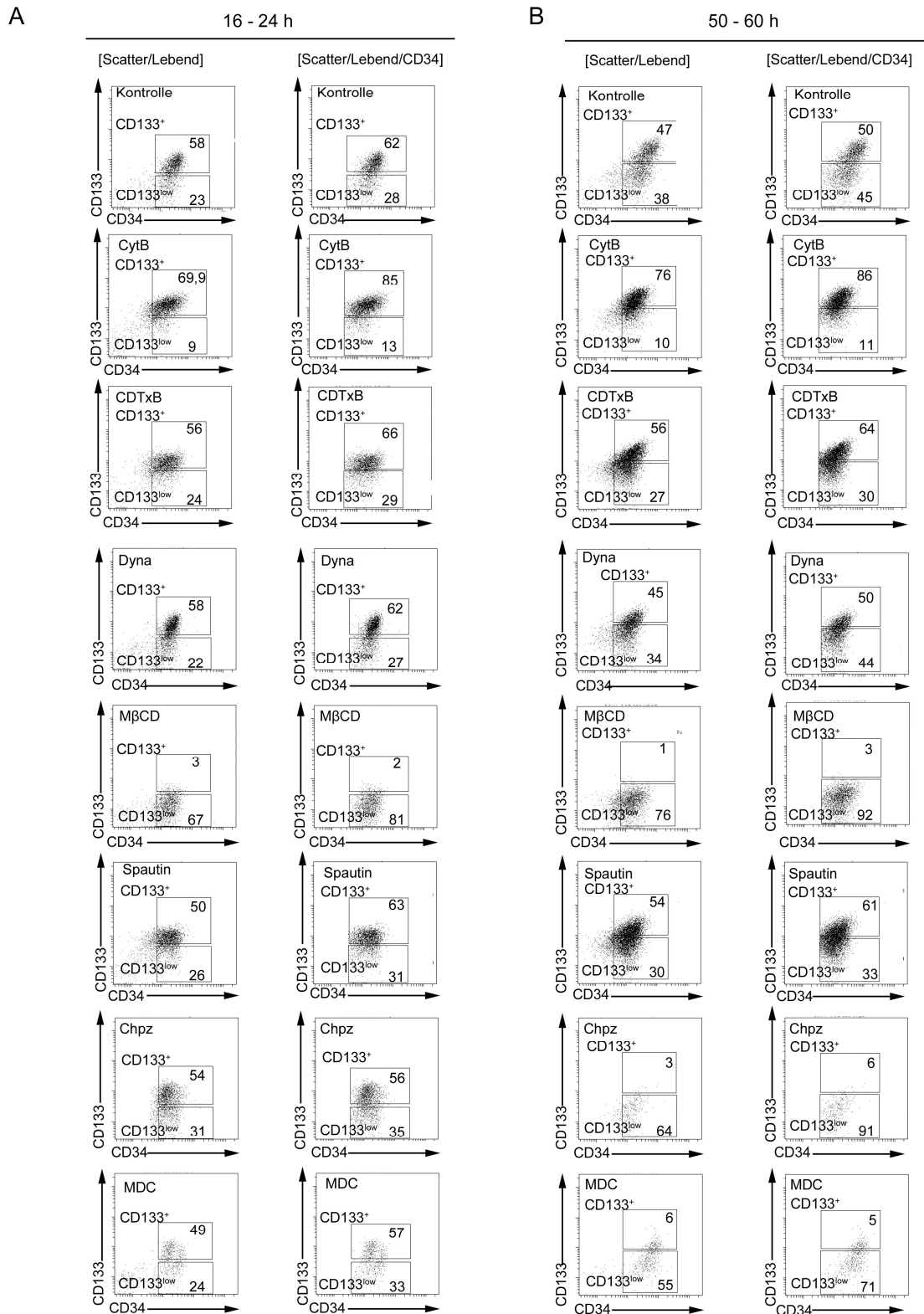


Abbildung 56: Durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenexpression von CD34 und CD133 auf HSVZ

CD34⁺ Zellen wurden für 16-24 h und für 50- 60 h in Gegenwart von CDTxB, Cyt B, Chpz, Dyna, MβCD, MDC oder Spautin-1 kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Zwei unabhängige Versuche sind dargestellt. Zellen wurden für die Analysen mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern gegen CD34-ECD und CD133-PE gefärbt. Es wurde der Anteil an CD34⁺CD133⁺ und CD34⁺CD133^{low} Zellen bestimmt. Die prozentualen Anteile der Zellpopulationen sind in den Plots dargestellt.

Bei den Analysen stellte sich heraus, dass das Entfernen von M β CD aus dem Kulturmedium dazu führte, dass die Zelloberflächenpräsentation von CD133 wieder regeneriert wird (Abbildung 57). Daher deuteten die Ergebnisse diesen Untersuchungen an, dass das Verschwinden von CD133 nach M β CD Behandlung den Immunphänotypen der Zellen verändert. Dieses aber nicht direkt mit dem Zellschicksal der CD34⁺ Zellen korrelieren muss.

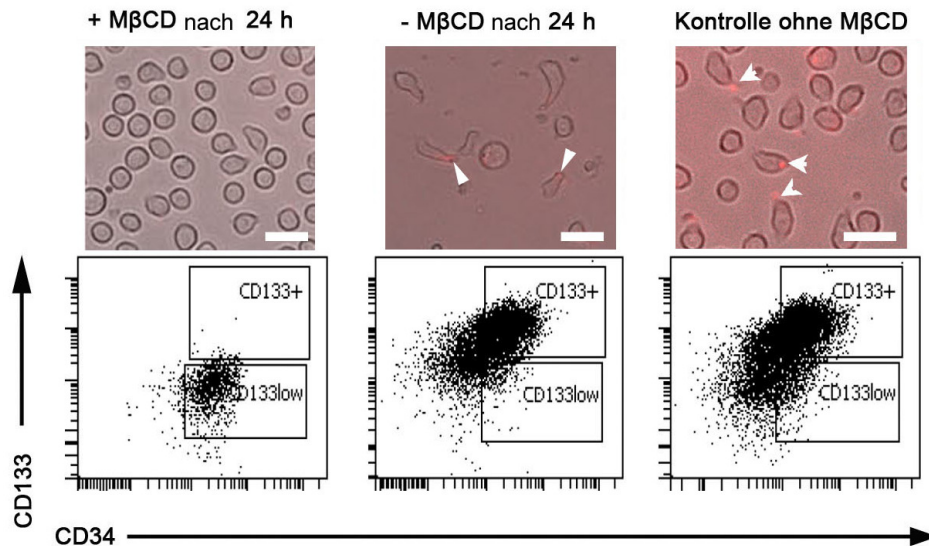


Abbildung 57: Einfluss von M β CD auf die Zelloberflächenpräsentation von CD133 auf CD34⁺ Zellen

Die CD34⁺ Zellen wurden nach der Isolation mit und ohne (Kontrolle) M β CD behandelt. Nach 24 Stunden (h) wurde das M β CD aus dem Kulturmedium entfernt und die Zellen für weitere 12 h kultiviert (- nach 24 h). Detektion von CD133 in vitro durch Zugabe von Anti-CD133-PE Antikörper ins Kulturmedium an Tag 1 der Kultivierung ohne (-) und mit (+) Zugabe von M β CD. Maßstabsbalken 10 μ m. Durchflusszytometrische Analysen von CD34⁺ Zellen nach 24 h nach Pharmazeutika Behandlung. Als Kontrolle sind unbehandelte Zellen dargestellt.

Da die Inhibitoren die Zelloberflächenexpression von CD133 und CD34 beeinflusst haben, die Zellen aber für CD34 positiv blieben, wurde für die weiteren funktionellen Analysen entschieden auf gesamt CD34⁺ Zellen sortiert und nicht zwischen CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen unterscheiden. Um im Folgenden die Erkenntnisse aus den immunphänotypischen Analysen mit den Inhibitoren funktionell zu untersuchen, wurden CFC-Ansätze der CD34⁺ Zellen durchgeführt.

3.1.5. Analyse von Endozytose inhibierenden Pharmazeutika auf die Zellspezifikation von CD34⁺ Zellen

Um die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren auf die Zellschicksalsspezifikation zu untersuchen wurden mit Inhibitor behandelte CD34⁺ Zellen in CFC-Ansätze sortiert.

Die vorhergehenden durchflusszytometrischen zur Oberflächenexpression von CD133 und CD34 wiesen darauf hin, dass M β CD die Zelloberflächenexpression von CD133 reversibel vermindert. Daher wurden anders als bei den Versuchen mit den Rab-GTPasen, bei denen zwei Subpopulationen von CD34⁺ Zellen (CD133⁺ und CD133^{low}) unterschieden wurde, die Zellen nur auf CD34⁺ Zellen sortiert und in die Ansätze eingebracht. Die CD34⁺ Zellen wurden nach Einbringen in die Differenzierungsansätze für 14 Tage (d14) kultiviert und dann wurde das Koloniebildungspotenzial der Zellen und die Frequenz der einzelnen Kolonietypen bestimmt (Abbildung 58). Die Analysen wurden an CD34⁺ Zellen durchgeführt, die jeweils 16-24 h bzw. 50-60 h mit Pharmazeutika behandelt wurden (Abbildung 58).

Zunächst wurde das Gesamtkoloniebildungspotenzial der jeweils in die Ansätze eingebrachten Zellen bestimmt. Für die analysierten Zellen, die für 16-24h mit den Inhibitoren inkubiert wurden zeigte sich durch die Verwendung von Chpz und MDC eine Reduktion der Koloniebildungsfrequenz. CD34⁺ Zellen die mit Chpz oder MDC behandelt wurden zeigten verminderte Koloniebildungsraten nach 14 Tagen (Chpz: 5,41% \pm 3,74, n=3; MDC: 15,67% \pm 6,38, n=3) im Vergleich zu Kontrollzellen (30,96% \pm 5,87, n=3) in den CFC-Ansätzen. Die vorherige Behandlung mit Dyna (24,81% \pm 4,75; n=3) oder M β CD (26,81% \pm 1,75, n=3) ließ keinen Effekt auf die Koloniebildungsfrequenz im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (30,96% \pm 5,87, n=3) erkennen. Zellen die mit CytB (24,14% \pm 5,04, n=3), CDTxB (21,03% \pm 4,21, n=3) und Spautin (22,10% \pm 5,52, n=3) behandelt wurden zeigten ebenfalls keine Änderung im Koloniebildungspotenzial im Vergleich zu den Kontrollzellen (33,56% \pm 12,98, n=3).

Bei der Betrachtung des Koloniebildungspotenzials der behandelten Zellen für die unterschiedlichen Kolonietypen wurde festgestellt, dass CDTxB (2,5% \pm 1,08, n=3) und Dyna (1,33% \pm 0,58, n=3; Kontrollzellen: 4,35% \pm 1,49, n=3) die Koloniebildung der erythrozytären Kolonien vermindern (Abbildung 58 A). Chpz und MDC Behandlung der Zellen führte zu einer Verminderung der Koloniebildungsfrequenz aller Kolonietypen (Abbildung 58 A). Durch eine längere Behandlungsdauer der Zellen 50-60 h mit den jeweiligen Inhibitoren zeigten neben Dyna auch weitere Inhibitoren wie M β CD und Spautin einen Effekt auf die Koloniebildungsrate einzelner Kolonietypen (Abbildung 58 B). Darüber hinaus zeigten die relativen Anteile der einzelnen gebildeten Kolonietypen nach 50 – 60 h, dass alle verwendeten Pharmazeutika (CytB: 1,25% \pm 2,49, n=2; CDTxB: 1,00% \pm 1,00, n=3; Dyna: 1,57% \pm

1,56, n=3; M β CD: 0,75% \pm 0,80, n=3; Spautin: 1,93% \pm 1,81, n=3) die Bildung von Makrophagenkolonien (CFU-M) im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen (3,46% \pm 2,49; n=3) beeinflussen. Des Weiteren vermindert Dyna das Koloniebildungspotenzial von BFU-E (2,19% \pm 2,68, n=3), CFU-M (1,5% \pm 1,57, n=3), CFU-GM (1,69% \pm 1,29, n=3) und CFU-Mix (4,54% \pm 3,72, n=3) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (BFU-E: 5,08% \pm 1,43, CFU-M: 3,46% \pm 2,49, CFU-GM: 3,42% \pm 2,48, CFU-Mix: 8,15% \pm 3,51; n=3). Die Behandlung mit Spautin-1 resultierte in einer verminderten erythrozytäre Koloniebildung (1,93% \pm 1,76, n=3; Abbildung 58 B).

Zusammenfassend zeigt sich, dass nach pharmazeutischer Inhibition der Endozytose ähnliche Effekte auf das Koloniebildungspotenzial von CD34⁺ Zellen zu erkennen waren wie bereits nach ektopter Expression der Rab-GTPasen festgestellt (Abschnitt 3.2). So wirkten die spezifischen Endozytose-Inhibitoren wie Dyna, Chpz und MDC auf das Gesamtkoloniebildungspotenzial der behandelten Zellen und verringerten dieses. Bei der Analyse der Anteile von aus CD34⁺ Zellen gebildeten einzelnen Kolonietypen fiel weiter auf, dass durch Behandlung mit Dyna, Chpz, MDC und Spautin die Bildung von Kolonien mit erythrozytärem Differenzierungspotenzial vermindert ist. Weitere Parallelen zu den Erkenntnissen der Experimente mit den Rab-GTPasen zeigten sich in der Beeinträchtigung der Bildung von Kolonien mit Markrophagen Differenzierungspotenzial durch die Behandlung mit allen Inhibitoren. Diese Befunde bestärken die Annahme, dass endozytotische und endosomale Transportprozesse tatsächlich an zellulären Prozessen wie der Zellpolarität und der Zellschicksalsspezifikation von CD34⁺ Zellen involviert sind.

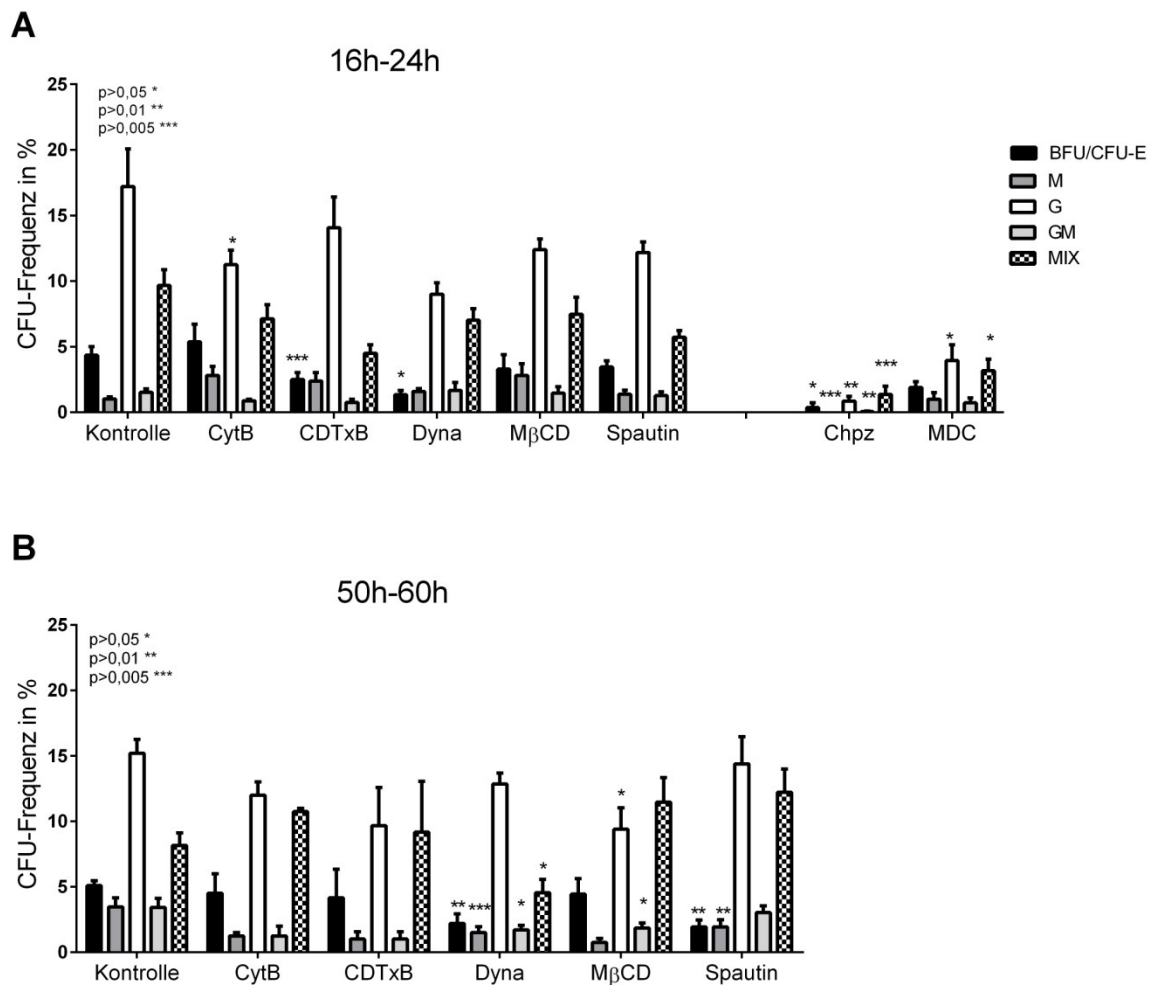


Abbildung 58: Effekt von Endozytoseinhibitoren auf die Koloniebildungsfrequenz von CD34⁺ Zellen.

Koloniebildungspotenzial von CD34⁺ Zellen die mit CytB, CDTxB, Dyna, MβCD, Spautin-1, Chpz oder MDC für 16-24 h (A) oder 50-60 h (B) behandelt wurden. Die unterschiedlichen Muster in den Diagrammen stellen den relativen Anteil der einzelnen Kolonietypen dar. Die verschiedenen Kolonien werden als koloniebildende Einheit (colony-forming unit, CFU) bezeichnet. Es werden CFU-Mix-Kolonien mit erythrozytären und myeloischen Potenzial, CFU-GM Kolonien, die Granulozyten und Makrophagen enthalten, CFU-G und CFU-M, die nur aus Granulozyten oder Makrophagen bestehen und BFU/CFU-E, die nur erythrozytäre Zellen beinhalten, unterschieden. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Veränderungen im Koloniebildungspotenzial im Vergleich zu Kontrollansätzen (nicht behandelt) sind mit (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$) gekennzeichnet.

4. Diskussion

Primäres Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des endosomalen Systems auf die Zellschicksalssteuerung humaner HSVZ zu untersuchen. Grundlage der Fragestellung ist, dass Prozesse, die die Zellpolarisierung und Zellschicksalsentscheidungen in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen steuern, bislang nur unzureichend verstanden sind. Bekannt ist, dass HSVZ sich asymmetrisch teilen können, äußere Faktoren wie die Stammzellnische den Erhalt der HSVZ fördern und dass die Zellpolarität für das *Homing* von HSVZ erforderlich ist (Zhang *et al.*, 2003, Beckmann *et al.*, 2007, Görgens *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass die asymmetrische Zellteilung ein Prozess ist, der an Zellschicksalsentscheidungen von HSVZ beteiligt ist. Eine entscheidende Voraussetzung für sich asymmetrisch teilende Zellen ist, dass diese eine Zellpolarisierung aufweisen, ohne die die asymmetrische Zellteilung nicht stattfinden könnte (Berdnik *et al.*, 2002, Giebel, 2008a, Ogawa *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010).

In der Hämatopoese ist CD133 (Prominin-1) als Stammzellmarker und Zellpolaritätsmarker von HSVZ beschrieben (Giebel *et al.*, 2004). In einem Teil der sich teilenden HSVZ segregiert endosomales CD133 gemeinsam mit CD63 asymmetrisch (Fonseca *et al.*, 2008). Arbeiten unserer Gruppe belegen, dass sich multipotente Progenitoren (MPP; CD34⁺CD133⁺CD45RA⁻) nach Kultivierung in zwei Progenitor-Subpopulationen auftrennen, in CD34⁺CD133⁺CD45RA⁺ und CD34⁺CD133^{low} CD45RA⁻ Zellen, die unterschiedliche Differenzierungspotenziale aufweisen (LMPPs bzw. EMPs) und sich unter anderem durch die Zelloberflächenexpression von CD133 unterscheiden lassen (Görgens *et al.*, 2013b). Somit besteht ein Zusammenhang zwischen der asymmetrischen Zellteilung humaner HSVZ und der asymmetrischen Segregation von Endosomen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch genetische Manipulation von Schlüsselproteinen und Verwendung Endozytose-inhibierender Substanzen endosomale Transportwege von HSVZ gezielt gestört und so entstehende Effekte auf die subzelluläre Organisation des endosomalen Systems, die Zellpolarität und die Zellschicksalsspezifikation von HSVZ untersucht.

4.1. Zelluläre Effekte ektop exprimierter eGFP-Rab-GTPasen

Mit dem Ziel durch ektop Expression von eGFP-Rab-GTPase kodierenden Konstrukten eine Beeinflussung des endosomalen System von HSVZ hervorzurufen, wurden durch lentiviralen Gentransfer die kodierende Region von wildtypischen

(WT), konstitutiv-aktiven (CA) und dominant-negativen (DN) Varianten von Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 in HSVZ eingebracht (siehe Abschnitt 3.2.5). Dabei stellte sich heraus, dass die verschiedenen eGFP-Rab Fusionsproteine nach Expression in den Zellen eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung aufweisen. Die wildtypischen Varianten der Proteine besitzen in MSZ als auch in HSVZ eine vesikuläre und zytosolische Lokalisation. Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen und subzelluläre Fraktionierungen von anderen Zelllinien (BHK-21, Caco-2, HeLa, HEK293 und CHO Zellen) ist bekannt, dass endogene Rab-GTPasen und überexprimierte wildtypische Rab-GTPasen an Vesikeln-assoziiert vorliegen, ein Teil der Proteine aber auch löslich im Zytosol der Zellen vorkommt (Chavrier *et al.*, 1990, Gorvel *et al.*, 1991, Ullrich *et al.*, 1996, Roberts *et al.*, 1999, Bucci *et al.*, 2000, Opdam *et al.*, 2000, Rosenfeld *et al.*, 2001, Simpson *et al.*, 2004). Im Weiteren ließen die wildtypischen Rab-GTPasen keinen Einfluss auf die Zellmorphologie von MSZ und HSVZ erkennen und die HSVZ zeigten eine normale Zellpolarisierung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Expression von Rab5, Rab7 und Rab11 eGFP- oder YFP-Fusionsproteine in Tiermodellen (*Drosophila melanogaster* und *Danio rerio*), die keine phänotypischen Änderungen durch die wildtypischen Rab-GTPasen erkennen ließen (Zhang *et al.*, 2007, Clark *et al.*, 2011). Durch quantitative PCR Analysen aus Geweben der transgenen Tiere zeigte sich zudem, dass die Expression der endogenen Rab-GTPasen nicht durch die zusätzliche Expression der eGFP- oder YFP- Fusionsproteine beeinflusst war (Howe *et al.*, 2013). Zusammen mit den Erkenntnissen aus den Zelllinien und Tiermodellen deuten die Ergebnisse an, dass die Expression der wildtypischen Rab-GTPasen keine gravierenden Veränderungen der Zellbiologie von MSZ und HSVZ zur Folge hat.

Anders als bei den wildtypischen Proteinen führt die Expression einiger dominant-negativer und konstitutiv-aktiver Rab-GTPasen (Rab5 und Rab7) in MSZ und HSVZ zu drastischen morphologischen Änderungen der frühen und späten endosomalen Kompartimente. Die dominant-negative Variante von Rab5 (S34N) führt zu einer Verkleinerung der frühen Endosomen, beeinflusst aber die Verteilung der frühen und späten endosomalen Marker in HSVZ nicht. Wohingegen die Expression von Rab5CA in einer starken Größenzunahme früher Endosomen und Re-Lokalisation später endosomaler Proteine (CD63) in Rab5CA positive Vesikel resultiert. Durch die Expression von Rab7CA ließ sich auch eine Größenzunahme der durch diese Proteine markierten späten Endosomen verzeichnen. Eine Umverteilung anderer Markerproteine (EEA1, CD63) wurde nicht festgestellt. Subzellulär betrachtet wiesen

alle dominant-negativen Proteine eine zytosolische Verteilung auf, wobei Rab11DN und Rab21DN in MSZ und HSVZ zusätzlich noch eine Lokalisation an einer perinukleären Struktur zeigten.

Der Verlust der Membranassoziation von dominant-negativen Rab-GTPasen, sowie die Akkumulation der Rab11DN und Rab21DN Varianten in einer perinukleären Struktur ist in anderen Zelllinien (BHK-21, Caco-2, HeLa, HEK293 und CHO) beschrieben (Ullrich *et al.*, 1996, Roberts *et al.*, 1999, Bucci *et al.*, 2000, Opdam *et al.*, 2000, Rosenfeld *et al.*, 2001, Simpson *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2007, Clark *et al.*, 2011). Die tubuläre Struktur nahe des Zellkerns, in der sich Rab11DN oder Rab21DN nach Expression angereichert finden, wurde durch indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen in BHK-21, CHO (Rab11DN) und HeLa Zellen (Rab21DN) als Trans-Golgi-Netzwerk identifiziert (Chen *et al.*, 1998, Simpson *et al.*, 2004). Da die Proteine in den verschiedenen Zellen die gleiche Anreicherung an einer perinukleären Struktur zeigen und auch sonst ähnliche Effekte vermitteln, ist anzunehmen, dass sich Rab11DN und Rab21DN auch in MSZ und HSVZ im Trans-Golgi-Netzwerk verstärkt anreichern. Dies deutet darauf hin, dass die dominant-negativen Varianten in MSZ und HSVZ ähnliche Effekte vermitteln wie in anderen Zellsystemen und Modellorganismen. Somit kann vermutet werden, dass Effekte die in anderen Modellsystemen festgestellt wurden eventuell auch bei HSVZ eine Rolle spielen könnten.

So ist aus Untersuchungen in *Drosophila* bekannt, dass die Expression der dominant-negativen Rab-Varianten einen *loss-of-function* Phänotypen und die von konstitutiv-aktiven Rab-Proteinen einen *gain-of-function* Phänotypen hervorrufen können (Zhang *et al.*, 2007). Demnach führt zum Beispiel die Expression von DN-Varianten zu gleichen Effekten, die normalerweise durch den *Knockout* des Gens hervorgerufen wird. So zeigt die Expression von Rab11DN die gleichen Defekte in der Entwicklung des externen sensorischen Organs wie die Mutation des *Rab11* Gens, die in einem Verlust der Haarzellen resultiert (Zhang *et al.*, 2007). Daher ist anzunehmen, dass im Zebrafisch die Expression der dominant-negativen Rab-Varianten von Rab5c und Rab11 zur Missbildungen der Körperform von Fischembryonen ähnlich wie Rab5c und Rab11 *Knockout* Tieren führt (Clark *et al.*, 2011). Der morphogene Effekt durch Rab5DN in Fischembryonen kann durch die zusätzlich Expression von Rab5WT nicht aber von Rab7WT vermindert werden (Clark *et al.*, 2011). Der Effekt der jeweiligen Rab-Varianten (DN und CA) kommt auch durch die Beeinflussung der Funktion anderer endogener Rab-GTPasen

zustande. Hier ist beschrieben, dass die DN- und CA-Varianten ebenfalls mit Effektorproteinen (GAP, GEF, GGT und GDI) interagieren, welche die endogen exprimierten Rab-Proteine zur Regulierung ihrer Funktion benötigen (Li und Stahl, 1993, Sanford *et al.*, 1993) (Li *et al.*, 1994). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den HSVZ lässt sich vermuten, dass die dominant-negativen und konstitutiv-aktiven Rab-Varianten auch in HSVZ die endogene Rab-Funktion stören.

Die Daten aus den subzellulären Analysen der konstitutiv-aktiven eGFP-Rab-GTPase Varianten von Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 in MSZ und HSVZ deuten darauf hin, dass Rab5CA oder Rab7CA auch in diesen Zellen zu einer deutlichen Vergrößerung der endosomalen Kompartimente führen. Weshalb von einer erhöhten Rab5 und Rab7 Aktivität in den Zellen ausgegangen werden kann. Nach Expression von Rab11CA und Rab21CA in HSVZ oder MSZ konnte fluoreszenzmikroskopisch keine eindeutige Vergrößerung der endosomalen Kompartimente erkannt werden. Rab11CA zeigte jedoch eine enge Zusammenlagerung der vorhandenen Vesikelstrukturen. Die morphologischen Veränderungen der endosomalen Kompartimente in MSVZ und HSVZ durch die konstitutiv-aktiven Varianten der Rab-Proteine entsprechen denen aus anderen Zelllinien und Modellorganismen.

Stenmark und Kollegen stellten fest, dass Rab5CA eine stark verminderte GTPase-Aktivität besitzt und vorwiegend in der GTP-gebundenen Form vorliegt. Weiter zeigten sie, dass die Expression von Rab5CA in BHK-21 und HeLa Zellen zu einer dramatisch veränderten Zellmorphologie und einer abnormalen Vergrößerung von frühen endosomalen Strukturen führt (Stenmark *et al.*, 1994).

Im Bezug auf Rab21CA decken sich die Befunde aus den MSZ und HSVZ mit fluoreszenzmikroskopischen Analysen an HeLa Zellen (Simpson *et al.*, 2004).

Die Expression von konstitutiv-aktiven (CA) Varianten von Rab5, Rab7 und Rab11 in *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* und verschiedenen Säugetierzellen (BHK-21, Caco-2, CHO, HeLa und HEK293) führte zu einer Vergrößerung der jeweiligen durch die Proteine markierten Endosomenstrukturen (Stenmark *et al.*, 1994, Feng *et al.*, 2001, Rosenfeld *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2007, Wegner *et al.*, 2010, Clark *et al.*, 2011). In Ko-Expressionsversuchen mit dsRed-Rab5WT und YFP-Rab5CA in S2R⁺ Zellen (aus einem *Drosophila* Embryo gewonnene Zelllinie) zeigte sich, dass beide Proteine an den gleichen frühen Endosomen lokalisieren (Zhang *et al.*, 2007). Dadurch sowie durch weitere fluoreszenzmikroskopische Analysen mit anderen Endosomen spezifischen Markern konnte festgestellt werden, dass die wildtypischen

Proteine und konstitutiv-aktiven Proteinvarianten mit den gleichen Membrankompartimenten interagieren und ein ähnliches Verteilungsmuster innerhalb der Zellen zeigen (Zhang *et al.*, 2007).

Durch indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen gegen frühe (EEA1) und späte (CD63) endosomale Proteine in MSZ und HSVZ, die die Rab5- und Rab7-Varianten (WT, DN, CA) exprimierten, wurde eine Umverteilung der frühen und späten endosomalen Proteine durch Rab5CA festgestellt. Rab5DN führte dabei zu deutlich verkleinerten frühen (EEA1) und späten (CD63) Endosomen und Rab7WT und Rab7CA zu einer leichten Vergrößerung der späten CD63-positiven Endosomen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Daten aus HEp2 und HEK293 Zellen, in denen Rab5CA zu einer Reorganisation von späten und lysosomalen Proteinen (CD63, Rab7 und CD107a) führt, welche sich meist im Lumen der vergrößerten Vesikel anreichern. Das frühe endosomale Protein EEA1 findet sich in diesen Zellen meist an der Membran von vergrößerten Rab5CA-positiven Vesikel lokalisiert (Rosenfeld *et al.*, 2001, Wegner *et al.*, 2010). Neben Rab5CA zeigt auch Rab5DN in anderen Zellen einen Einfluss auf die Struktur des frühen endosomalen Kompartiments (Gorvel *et al.*, 1991, Bucci *et al.*, 1992, Stenmark *et al.*, 1994). So führen Rab5DN-Varianten (S34N und N133I) zu einer verringerten Aufnahme von Transferrin in BHK-21 und HeLa Zellen und zu kleineren frühen Endosomen (Gorvel *et al.*, 1991, Bucci *et al.*, 1992, Stenmark *et al.*, 1994). Die Expression von Rab7CA resultiert in einer Vergrößerung der späten Endosomen, zeigt jedoch keine Änderung in der Verteilung später endosomaler Proteine (Bucci *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2001).

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die endosomalen Verbindungen zwischen den Kompartimenten in MSZ und HSVZ genauso organisiert sind wie in anderen Zellsystemen. Was im Weiteren auf eine hohe Konservierung der endosomalen Maschinerie innerhalb der Eukaryoten hindeutet. Diese Annahme findet Bestätigung im ubiquitären Vorkommen von Rab-GTPasen in Eukaryoten. Besonders einige Rab-GTPasen (Rab5, Rab7, Rab11) finden sich von der Hefe bis zum Menschen hin konserviert (Pereira-Leal und Seabra, 2001). Durch Ko-Expressionsversuche mit Fluoreszenzproteinen gekoppelten Rab5, Rab7 und Rab11 Fusionsproteinen aus Maus und Drosophila in Säugetierzellen zeigte sich, dass die jeweiligen homologen Rab-GTPasen aus beiden Spezies an den selben endosomalen Kompartimenten lokalisierten. Dies lässt annehmen, dass die Funktion

und Kompartimentalisierung der Proteine über die Spezies hinweg hoch konserviert ist (Zhang *et al.*, 2007). Unter Berücksichtigung, dass das endosomale System evolutiv hoch konserviert ist, kann angenommen werden, dass funktionelle Effekte in Signalwegen, die durch dominant-negative oder konstitutiv-aktive Varianten von Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 in anderen Zellen ausgelöst werden, möglicherweise auch in HSVZ betroffen sein könnten. Bestärkt wird diese Annahme durch die Daten der Endozytoseversuche mit Transferrin, in denen zu erkennen ist, dass die zwei dominant-negativen Varianten von Rab5 und Rab21 zu einer verminderten Endozytose von Transferrin um 40 - 50% führten. Die Befunde stehen in gutem Einklang mit Analysen zur Transferrinaufnahme in BHK-, HeLa- und HEK293-Zellen, in denen ebenfalls eine Reduktion der Transferrinendozytose nach Rab5DN oder Rab21DN Expression beobachtet worden ist (Stenmark *et al.*, 1994, Rybin *et al.*, 1996, McCaffrey *et al.*, 2001, Simpson *et al.*, 2004). Anders als die Analysen zur Aufnahme von Transferrin ließ die Aufnahme von Dil acLDL eine große Schwankungsbreite erkennen, welche auf die Expression des Rezeptors für acLDL zurückzuführen sein könnte. Ein bekannter Rezeptor für acLDL ist CLA-1/CD36 (Calvo *et al.*, 1997) und wird innerhalb der CD34⁺ Zellpopulation vorwiegend auf der Zelloberfläche erythroider Progenitoren exprimiert. Die Menge der erythroiden Progenitoren ist abhängig von der Kulturdauer primitiver CD34⁺ Zellen und reifen erst während dieser nach ca. 5 Tagen heran (Nakahata und Okumura, 1994, Thoma *et al.*, 1994). Die für die Experimente verwendeten CD34⁺Zellen wurden aus Nabelschnurbluten isoliert, die unterschiedliche Lagezeiten nach Abnahme aufwiesen (0-2 Tage nach Abnahme). Daher besaßen die Zellen möglicherweise unterschiedliche Reifestadien zu Beginn der Kultivierung, wodurch die größeren Schwankungen erklärt werden können. Aus den Experimenten ließ sich nur für Rab5DN erkennen, dass tendenziell eine verringerte Aufnahme des acLDLs in die Zellen vorlag. Ähnliche Ergebnisse für Rab5DN sind für radioaktiv markiertes LDL in HeLa Zellen beschrieben (McCaffrey *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse aus den Endozytoseversuchen und den subzellulären Analysen in Verbindung mit den Erkenntnissen aus der Literatur sprechen dafür, dass Rab-GTPasen eine wichtige Funktion bei vesikulären Transportmechanismen in HSVZ einnehmen und dass diese durch Expression dominant-negativer oder konstitutiv-aktiver Rab-GTPasen gestört werden.

4.2. Beeinflussung der Endozytose durch Inhibitoren in CD34⁺ Zellen

Zur Analyse des Einflusses von endosomalen Prozessen auf Zellpolarisierung und Zellschicksalsspezifikation von HSVZ wurde in diesem Zusammenhang auch die Wirkung von Endozytose-Inhibitoren untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die als Endozytose-Inhibitoren an HeLa, Makrophagen, MDCK und HEK293 Zellen beschriebenen pharmazeutischen Substanzen Chlorpromazin (Chpz), Monodansylcadaverin (MDC), Dynasore (Dyna), Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) und Cytochalasin B (CytB) (Elferink, 1979, Athlin *et al.*, 1988, Rikihisa *et al.*, 1994, Macia *et al.*, 2006, Ivanov, 2008) alle sehr unterschiedlich auf die Endozytose von acetylierten LDL (acLDL) und Transferrin-Alexa555 (Transferrin) wirken. Die Pharmazeutika, Clostridium Toxin B (CDTxB), bekannt als Inhibitor für die Zellpolarisierung von CD34⁺ Zellen (Görgens *et al.*, 2012) und Spautin-1 (Autophagosomeninhibitor) (Liu *et al.*, 2011) zeigten wenig (Spautin-1) bis keine Effekte auf die hier analysierten Endozytose Prozesse von CD34⁺ Zellen. CDTxB ein Rho-GTPase Inhibitor diente als positiv Kontrolle bei der Analyse der Beeinflussung von Zellpolarität in CD34⁺ Zellen, da dieser dadurch auch die Polymerisation des Aktinzytoskeletts beeinflusst und damit auch die Ausbildung und den Erhalt der Zellpolarität (Görgens *et al.*, 2012). Bei Spautin-1 handelt es sich um einen Autophagosomeninhibitor, der durch den Abbau von vps34 die Bildung von Autophagosomen beeinträchtigt (Liu *et al.*, 2011). Durch diesen Inhibitor wurde spezifisch ein endosomaler Prozess blockiert, der nicht direkt mit der Endozytose im Zusammenhang steht, wodurch untersucht werden sollte, ob spätere endosomale Prozesse ebenfalls einen Einfluss auf Endozytose der Zellen besitzen.

Da es sich bei CDTxB und Spautin-1 um keine klassischen Endozytose Inhibitoren handelte, waren auch keine drastischen Effekte auf die Endozytose erwartet worden. Die Endozytose von Transferrin und Dil acLDL war durch die Behandlung mit CDTxB und Spautin-1 nur leicht verändert. So zeigte sich nach Behandlung mit CDTxB, dass die Aufnahme von Transferrin und LDL im Vergleich zu den Kontrollzellen konstant geblieben war, was die vorherige Annahme von keinem Einfluss von CDTxB auf die Endozytose bestätigte. Allerdings war dieses Ergebnis etwas verwunderlich, da an peripheren Leukozyten und Makrophagen aus humanen und caninen Blut, sowie murinen Dendritischen Zellen aus der Milz gezeigt wurde, dass CDTxB aufgrund der Inhibition von Rho-GTPasen die Aktinpolymerisierung stört und dadurch auch die

Phagozytose und Makropinozytose der Zellen beeinflusst (Just *et al.*, 1995, West *et al.*, 2000, Kang *et al.*, 2009). Daraus lässt sich schließen, dass entweder die Liganden (Transferrin und Dil acLDL) nicht über Phagozytose oder Makrozytose in die CD34⁺ Zellen aufgenommen werden oder die verwendete Methode nicht sensitiv genug ist. Spautin-1 zeigte unter den gewählten Bedingungen ebenfalls kaum einen Effekt auf die Endozytose der zwei Liganden. Ein Effekt auf Endozytose ist bisher für Spautin-1 nicht beschrieben (Liu *et al.*, 2011). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Pharmazeutika möglicherweise andere endosomale Transportwege beeinflussen. Bei den anderen verwendeten Endozytose-Inhibitoren deutet sich an, dass Chpz und MDC am stärksten die Endozytose beider Liganden in CD34⁺ Zellen beeinflussen. Allerdings waren Chpz und MDC die Inhibitoren mit der höchsten Zelltoxizität (Abbildung 50), was diese Inhibitoren für eine dauerhafte bzw. länger andauernde Anwendung ausschloß. Dyna und M β CD führten auch zu einer reduzierenden Endozytose beider Liganden (Transferrin und LDL). Nur CytB zeigte entgegen der Erwartungen keinen sichtbaren Effekt auf die Endozytose der Liganden, obwohl eine Inhibition der Transferrinaufnahme durch CytB für Monozyten beschrieben ist (Baynes *et al.*, 1987). Effekte auf die Transferrinaufnahme in anderen Zellen wie HEK293T, HeLa, Fibroblasten und Monozyten durch Chpz, MDC und Dyna sind untersucht und gezeigt worden (Baynes *et al.*, 1987, Macia *et al.*, 2006). Dabei wirken Chpz und MDC auf die Clathrin-vermittelte Endozytose (Ivanov, 2008) und Dyna ist ein spezifischer Inhibitor der Dynamin-2-abhängigen Endozytose (Macia *et al.*, 2006). Die Wirkung von M β CD auf die Endozytose ist zum Einen auf die Extraktion von Cholesterol aus der Zellmembran zurückzuführen, welches für die Integrität von *Lipid rafts* notwendig ist und die Plasmamembran Fluidität ändert (Fukasawa *et al.*, 2000, Awasthi-Kalia *et al.*, 2001, Shogomori und Futerman, 2001). Zum anderen zerstört es gebildete Clathrin-Einstülpungen an der Plasmamembran und inhibiert so die Clathrin-vermittelte Endozytose (Rodal *et al.*, 1999). Die durch Chpz, MDC und M β CD hervorgerufene Reduktion in der Aufnahme von Transferrin und LDL war jeweils stärker (mehr als 50% Reduktion der MFI) für beide Liganden als bei den dominant-negativen Varianten von Rab5 und Rab21 hervorgerufene Verminderung der Endozytose. Dyna zeigte nur für LDL eine Verminderung der Endozytoserate gemessen an der MFI auf weniger als die Hälfte im Bezug zu unbehandelten Zellen. Für Transferrin reduzierte sich die MFI auf 54% \pm 24 im Vergleich zu nicht pharmazeutisch behandelten Zellen. Daher war anzunehmen, dass mit Chpz, MDC,

M β CD und Dyna die Endozytose der CD34⁺ Zellen gestört werden konnte und somit auch eine Manipulation des endosomalen Systems in den Zellen vorlag. Daher war anzunehmen, dass durch die Verwendung der Pharmazeutika auch die Involvierung endosomaler Prozesse bei der Ausbildung von Zellpolarität und die Zellschicksalspezifikation von HSVZ untersucht werden konnte.

4.3. Wirkung von Rab-GTPasen und Endozytose-Inhibitoren auf die Zellpolarität von HSVZ

Nachdem das endosomale System der CD34⁺ Zellen mit beiden Ansätzen (genetisch und pharmazeutisch) manipuliert werden konnte, zeigten sich teils erhebliche Unterschiede in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität von CD34⁺ Zellen.

Interessanter Weise zeigten die Rab-GTPasen nur milde Effekte auf die Zellpolarisierung und Motilität von CD34⁺Zellen, was anders als bei den chemischen Inhibitoren war. Die Ausbildung und der Erhalt der Zellpolarität wurde durch die Expression von Rab11DN um ca. 13% gemindert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Rab11WT und Rab11CA zeigten in den subzellulären Analysen an morphologisch polarisierten Zellen häufig eine Anreicherung am apikalen Pol der Zelle dem Uropoden. Diese Befunde deuten auf eine mögliche Funktion von Rab11 bei der Zellpolarisierung hin, da in vorhergehenden Analysen unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt wurde, dass Polaritätsmarker wie CD50, CD133 und Flotilline in morphologisch polarisierten Zellen im Uropoden angereichert sind (Giebel *et al.*, 2004, Rajendran *et al.*, 2009, Görgens *et al.*, 2012). In *Xenopus* Epidermis Zellen und in Epithelialen Zellen von *C. elegans* ist Rab11 an der Ausbildung und dem Erhalt der planaren bzw. apikal-basalen Polarität beteiligt (Kim *et al.*, 2012, Winter *et al.*, 2012). Die Expression von Rab11DN in *Xenopus* Epidermiszellen führt trotz einer intrinsischen apikal-basalen Polarität der Zellen zu einer zufälligen Orientierung der Zellen zum angrenzenden Gewebe und verhindert das Einwandern der Zellen in die oberflächliche Zellebene (Kim *et al.*, 2012). In *C. elegans* ist Rab11 unterhalb von PAR-5 (*partitioning defective protein*) am Erhalt der apikal-basalen Polarität involviert (Winter *et al.*, 2012). Die Erkenntnisse über andere apikale Polaritätsmarker in CD34⁺ Zellen zusammen mit den Daten aus den Tiermodellen lassen schließen, dass Rab11 in Prozesse die die Zellpolarisierung von CD34⁺ Zellen regulieren involviert ist. Die eher milden Effekte auf die Polarität, die durch Rab11DN ausgelöst und festgestellt worden, könnten auf die noch vorhandene Aktivität der endogenen

Rab11 Proteine zurückzuführen sein. Durch einen *Knockdown* von Rab11 könnte eine direkte Funktion von Rab11 am Polarisierungsprozess festgestellt werden. Eine andere mögliche Erklärung für den geringen Effekt durch Rab11DN könnte sein, dass die Expression des Proteins in den Zellen erst nach der Etablierung der Zellpolarität stattfindet. Da ein Effekt von Rab11DN auf die Ausbildung der Zellpolarität von CD34⁺Zellen unter diesen experimentellen Bedingungen nur unvollständig erfasst würde.

Somit lässt sich aus den Daten vermuten, dass Rab11 die einzige hier untersuchte Rab-GTPase ist, die in HSVZ an der Ausbildung der Zellpolarität direkt beteiligt ist und eventuell mit weiteren Proteinen die an diesem Prozess beteiligt sind, wie PAR-Proteine und aPKC, interagiert.

Ein deutlicher Effekt auf die Zellpolarisierung konnte bei der Verwendung der verschiedenen Endozytose-Inhibitoren erzielt werden. Eine Reduktion der morphologisch polarisierten CD34⁺ Zellen um mehr als 50% konnte nach Behandlung mit CDTxB, Chpz, CytB, M β CD und MDC festgestellt werden. Geringere Effekte wurden durch Dyna und Spautin detektiert. Dabei handelt es sich bei CDTxB, Chpz, CytB und M β CD um Inhibitoren, die auch andere zelluläre Prozesse und Beschaffenheiten verändern, weshalb ein direkter Effekt von endosomalen Prozessen auf die Zellpolarität fraglich ist.

CDTxB ist ein Rho-GTPase Inhibitor, der durch die Inhibition von Rho zur Destabilisierung des Aktin Zytoskeletts führt und so zum Verlust der morphologischen Polarisierung von CD34⁺Zellen (Görgens *et al.*, 2012). Die molekularen Polaritätsmarker ICAM-3 und Flotillin bleiben in den behandelten CD34⁺Zellen trotz Verlust der morphologischen Polarität in den Zellen polarisiert verteilt (Görgens *et al.*, 2012). Die Befunde von Görgens *et al.*, 2012 konnten in dieser Arbeit belegt werden. Im Weiteren wurde bei diesen Analysen auch CytB verwendet, welcher zur Depolymerisierung des Aktin-Zytoskelett führt (Athlin *et al.*, 1988, Rikihisa *et al.*, 1994, Görgens *et al.*, 2012).

Daher ist klar, dass die Effekte von CDTxB und CytB auf die Zellpolarität nicht im näheren Zusammenhang mit endozytotischen Prozessen und dem endosomalen System stehen, sondern eher auf die Depolymerisation des Aktin Zytoskeletts und der damit verbundenen Änderung der zellulären Form zurückzuführen sind. Chpz wurde als Inhibitor der Phagozytose von Neutrophilen und Makrophagen

beschrieben (Elferink, 1979). Es besitzt amphiphatische Eigenschaften wodurch es sich in die Plasmamembran von Zellen einlagern kann und deren Fluidität Konzentrationsabhängig erhöht (Ogiso *et al.*, 1981, Maruoka *et al.*, 2007). Chpz bindet zudem an Phosphoinoside der Membranen und führt zu deren Permeabilisierung sowie morphologischen Änderungen der zellulären Form (Chen und Huestis, 1997, De Filippi *et al.*, 2007, Maruoka *et al.*, 2007, Suwalsky *et al.*, 2008). Seine Wirkung als Endozytose Inhibitor liegt vorwiegend an der Blockierung der Plasmamembran-Assoziation des Adaptor-Proteins 2 (AP2), der eine wichtige Rolle in der Clathrin-vermittelte Endozytose spielt (Wang *et al.*, 1993, Yao *et al.*, 2002, Tulapurkar *et al.*, 2005). Werden die Wirkung und Eigenschaften von Chlorpromazin im Zusammenhang mit der Funktion von endosomalen Proteinen wie EEA1 und Hrs, die sogenannte FYVE Domänen besitzen worüber sie mit Phosphoinositol-3-phosphat (PI3P) in den Membranen interagieren, wird deutlich, warum Chpz auf die endozytotischen Prozesse von Zellen eine solche Wirkung hat (Gaullier *et al.*, 1998, Komada und Soriano, 1999, Gaullier *et al.*, 2000). EEA1 und Hrs sind beides Effektoren von Rab5 und wirken an frühen endozytotischen Prozessen mit (Komada und Soriano, 1999, Gaullier *et al.*, 2000, Lawe *et al.*, 2000, Raiborg *et al.*, 2001b). EEA1 spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Annäherung und Fusion früher Endosomen (Lawe *et al.*, 2002). Wird die Zusammensetzung bzw. die Bindestelle für PI3P durch Chpz blockiert ist anzunehmen, dass dadurch neben der Endozytose auch weitere endosomale Transport- und Sortierprozesse der Zellen gestört werden. In den Versuchen an HSVZ zeigte sich das Konzentrationen über 50 μM Chpz zur Apoptose der Zellen nach 2h führt. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus Gliomazellen bei denen eine Konzentration von 100 μM Chpz zur verminderten Vitalität führt (Suwalsky *et al.*, 2008). Aufgrund der Eigenschaften von Chpz ist anzunehmen, dass der Polaritätsverlust und die erhöhte Apoptose nach Behandlung mit diesem Inhibitor eher auf die Veränderungen der Membranbeschaffenheit zurückzuführen ist als auf den inhibitorischen Effekt der Endozytose.

M β CD besitzt eine hohe Affinität zu Cholesterol wodurch es Cholesterol aus der Zellmembran rauslöst und wie Chpz zu einer Änderung der Membranbeschaffenheit führt (Irie *et al.*, 1992, Kilsdonk *et al.*, 1995). Damit ist seine Wirkung auf die Zellpolarität ähnlich wie beim Chpz vorwiegend auf eine Änderung der Membranintegrität zurückzuführen als auf einen endozytotischen Effekt.

Dyna, MDC und Spautin sind Inhibitoren die direkt auf endosomale Prozesse einwirken (Biederbick *et al.*, 1995, Niemann *et al.*, 2001, Macia *et al.*, 2006). Dynasore (Dyna) als ein spezifischer Inhibitor der GTPase Dynamin-2 wirkt spezifisch auf die Dynamin-abhängige Endozytose (Macia *et al.*, 2006). MDC stabilisiert Clathrin-umhüllten Einstülpungen an der Plasmamembran und lagert sich in Autophagosomen ein und Spautin-1 hemmt durch Abbau von vps-34 die Autophagosomenentstehung (Biederbick *et al.*, 1995, Niemann *et al.*, 2001, Wang und Liu, 2003, Liu *et al.*, 2011). Mit Ausnahme von MDC welches ähnlich wie Chpz zur Apoptose und zum Verlust der morphologischen Polariät von CD34⁺Zellen führt, zeigen Dyna und Spautin nur eine geringe Minderung im Anteil der morphologisch polarisierten Zellen und keinen Effekt auf die molekulare Polarisierung der Zellen.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass endozytotische und endosomale Prozesse nicht alleine bzw. nur indirekt Einfluss auf den Prozess der Zellpolarisierung von HSVZ nehmen. So scheinen neben Rab11 auch Autophagieprozesse zum Teil Einfluss auf den Erhalt der Zellpolarität in HSVZ zu haben. Die Untersuchungen mit Rab-GTPasen und Inhibitoren an HSVZ bestätigen somit die Annahme, dass die Zellpolarität der Zellen von mehreren Faktoren abhängt. Zum einen scheint Rab11 wie in Modellorganismen an der Ausbildung der Zellpolarität beteiligt zu sein, zum anderen ließ sich durch die Behandlung mit CDTxB, Chpz und CytB erkennen, dass die Membranbeschaffenheit und das Aktin-Zytoskelett notwendig für die Ausbildung und den Erhalt der Zellpolarität sind. Einen weiteren Einfluss auf den Erhalt der Zellpolarität scheinen späte endosomale bzw. Autophagieprozesse in den Zellen zu spielen. In diesem Zusammenhang könnten degradative Prozesse von Proteinen involviert sein, die die Zellpolarität regulieren. Um diesen Aspekt zu klären müsste der Abbau von weiteren Proteine wie PAR, cdc42 und aPKC untersucht werden, die direkt an dem Prozess der Ausbildung der Zellpolarität von CD34⁺ Zellen beteiligt sind.

4.4. Auswirkung endozytotischer und endosomaler Prozesse auf die Zellschicksalsspezifikation

Die Zellpolarität ist eng mit der asymmetrischen Zellteilung in Modellorganismen verknüpft, bei denen gezeigt wurde, dass die asymmetrische Segregation von Endosomen zu einer unterschiedlichen Zellspezifikation der Tochterzellen führt. Auch HSVZ können eine Zellpolarität ausbilden, die durch die Verteilung von CD133,

Flotillinen und CD50 molekular beschrieben ist (Giebel *et al.*, 2004, Rajendran *et al.*, 2009, Görgens *et al.*, 2012). Zusammen mit dem Befund der asymmetrischen Verteilung von CD133 auf intrazellulären Vesikeln in HSVZ (Fonseca *et al.*, 2008) kann die Annahme entstehen, dass Zellpolarisierung, asymmetrische Zellteilung und Zellschicksalsspezifikation auch in HSVZ zusammenhängen. Daten unserer Arbeitsgruppe deuten an, dass CD133 in diesem Zusammenhang ein wichtiges Schlüsselprotein ist, dass bei diesen Prozessen als Marker von entscheidender Bedeutung ist (Görgens *et al.*, 2013b). Bei der *in vitro* Kultivierung von HSVZ zeigte sich, dass die Zellen zu Beginn fast alle CD133⁺CD34⁺ sind. Über die Dauer der Kultivierung entstehen dann zwei Subpopulationen an Zellen, die sich immunphänotypisch hauptsächlich in der Zelloberflächenpräsentation von CD133 (CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺) unterscheiden lassen (Giebel *et al.*, 2004, Giebel *et al.*, 2006, Beckmann *et al.*, 2007, Görgens *et al.*, 2013b).

Die getesteten Rab-GTPasen hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD133 oder CD34. Daher wurde in Zellansätzen mit den Rab-GTPasen, die die Zellschicksalsspezifikation von HSVZ untersuchten die CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellpopulationen getrennt voneinander analysiert.

Funktionelle Analysen dieser Zellpopulationen an verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung, weisen darauf hin, dass die CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen sich in ihrem Differenzierungspotenzial (lymphatisch-myeloisch und erythrozytär-myeloisch) unterscheiden (Görgens *et al.*, 2013b). Da bislang noch nicht gezeigt wurde, dass eine extrazelluläre, asymmetrische Segregation von CD133 auf sich teilenden Tochterzellen vorkommt, wird diese bisher nur vermutet. Erste noch unveröffentlichte Daten von extrazellulären Immunfluoreszenz-Färbungen an CD34⁺Zellen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen eine asymmetrische Verteilung von CD133 auf sich teilenden Tochterzellen in ca. 30% der Mitosen. Die Verwendung von CD133 als weiteren Marker für die spezifischere Beschreibung weiterer HSVZ-Subpopulationen führte in dieser Arbeit zu einer besseren Auflösung bei der Untersuchung des Einflusses endosomaler Prozesse auf die Zellschicksalsspezifikation von HSVZ. Diese Auftrennung in CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen konnte nicht in allen experimentellen Ansätzen beibehalten werden, da die Beeinflussung endosomaler Transportwege durch einige Inhibitoren auch Effekte auf die Zelloberflächenexpression der Proteine hatte.

Die durchflusszytometrischen Analysen der Rab-GTPasen exprimierenden CD34⁺ Zellen an Tag 3, Tag 6 und Tag 10 der Kulturdauer deuten an, dass die Proliferation der Zellen mit den Rab5-Konstrukten (WT, DN und CA) sowie Rab7CA und Rab11DN vermindert ist im Vergleich zu eGFP-Kontrollzellen. RNAi-vermittelter *Knockdown* von Rab5 und Rab7 in glatten Muskelzellen und in den Krebszelllinien A431 und MCF7 führt auch zu einer verringerten Proliferation der Zellen (Ma *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2012). Auch in MCF10A Zellen führt die Transfektion von Rab11DN zu einer Reduktion der Proliferation um 50-60% (Palmieri *et al.*, 2006). Für Rab11DN ist zudem in *Drosophila* beschrieben, dass eine hohe Expression des Proteins während der Entwicklung zum Verlust der Augen oder direkt letal wirkt (Emery *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2007). Diese Befunde deuten an, dass die in den HSVZ beobachtete verminderte Expansion der transduzierten CD34⁺Zellen mit der Expression der verschiedenen Rab-Varianten (Rab5WT, DN, CA, Rab7CA und Rab11DN) zusammenhängt. Die weiteren funktionellen Analysen der beiden Subpopulationen CD133⁺CD34⁺ (LMPPs) und CD133^{low}CD34⁺ (EMPs) in CFC-Ansätzen nach genetischer Manipulation mit den unterschiedlichen Rab-GTPase-Varianten deuteten an, dass die Funktion von Rab-GTPasen bei der Ausreifung von HSVZ involviert ist. Dominant-negative Varianten von Rab5 und Rab21 beeinflussten die Progenitoren insoweit, dass es zu einer geringeren Ausreifung von Makrophagen in der LMPP-Fraktion. Dies ließ zum einen vermuten, dass sich keine Vorläufer wie z.B. GMPs entwickeln konnten. Dagegen spricht jedoch der Befund, dass Granulozyten in den entstandenen Kolonien zu finden waren. Daher wird eher angenommen, dass durch die gestörte endosomale Maschinerie und im Fall von Rab5DN und Rab21DN vor allem die Beeinflussung von Endozytose/Phagozytose dazu führt, dass Makrophagen nicht terminal ausreifen können. Ganz auszuschließen ist jedoch nicht, dass die Expression dieser Rab-GTPase-Varianten evtl. zum völligen Verlust der Makrophagen-Progenitoren führt. Einen ähnlichen Effekt auf die Differenzierung in Makrophagen zeigten Zellen der EMP-Fraktion, die Rab5DN und Rab21DN exprimierten. Rab-GTPasen sind an den Prozessen der Phagozytose und Makropinozytose in Makrophagen beteiligt (Via *et al.*, 1997, Egami und Araki, 2009, Feliciano *et al.*, 2011, Egami und Araki, 2012, Egami und Araki, 2013, Mustafi *et al.*, 2013). Eine Studie zeigt, dass während der Differenzierung der leukämischen Myeloblasten Zelllinie HL60 in Richtung Monozyten und Granulozyten die Expression von Rab-GTPasen wie Rab1a, Rab2, Rab4, Rab5 und Rab6 ansteigt (Maridonneau-Parini *et al.*, 1991). Diese Befunde bekräftigen die Annahme, dass durch die

dominant-negativen Varianten von Rab5 und Rab21 wahrscheinlich die Ausreifung der Zellen gestört ist. Des Weiteren ließen sich in der Differenzierung der LMPP- und EMP-Fraktion noch vermindernde Effekte auf die erythrozytäre Differenzierung erkennen, weil in beiden Populationen weniger erythrozytäre Kolonien (BFU-E und CFU-Mix) gebildet wurden. Da Rab5 und Rab21 wie bereits erwähnt, an den endozytotischen Prozessen der Zellen beteiligt sind, ist zu vermuten, dass diese Prozesse notwendig für die gezielte myeloische Differenzierung von HSVZ sind.

Die Ursache für die Beeinflussung der myeloisch-erythrozytären Differenzierung, durch die Expression von Rab5DN und Rab21DN könnte auf eine Blockierung der Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren zurückzuführen sein. In Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* ist gezeigt, dass Rezeptor-vermittelte Signalwege wie z.B. *Wnt* oder *Hedgehog* durch Rab5 *Knockdown* oder die Expression von Rab5DN beeinträchtigt werden, was zu Fehlbildungen von Organen führt (Seto und Bellen, 2006, Callejo *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse deuten daher an, dass die Funktion der Rab-GTPasen, die direkt an endozytotischen Prozessen beteiligt sind wie Rab5 und Rab21 entscheidend für die erythrozytäre und Makrophagen Differenzierung sind. Eine Beeinflussung der Granulozytendifferenzierung ist nicht auszuschließen, wurde jedoch nicht genauer analysiert. Differenzierungsansätze in Richtung Makrophagen und Neutrophile mit einer leukämischen Monoblasten Zelllinie (U937) sowie einer leukämischen Myeloblasten Zelllinien (HL60) zeigten, dass die Differenzierung zu einer vermehrten Expression von Rab5 führt (Maridonneau-Parini *et al.*, 1991). Dies lässt vermuten, dass Rab5 und hier auch Rab21 für die Ausreifung und Funktion von Makrophagen und Granulozyten notwendig sind und eine verminderte Funktion der Proteine zu keiner Ausreifung der Zellen führt. Ferner deutet der Effekt der dominant-negativen Rab5 und Rab21 Proteine darauf hin, dass die frühen endosomalen Prozesse bei der Differenzierung in Makrophagen und Granulozyten wichtig sind.

Die gesamte Verminderung des Koloniebildungspotenzials von Rab5DN und Rab21DN exprimierenden Zellen weist zudem daraufhin, dass die Differenzierung evtl. aller Linien beeinflusst ist, oder dass die Zellen sich entweder langsamer teilen oder vermehrt Apoptose betreiben. Das Vorhandensein solcher Effekte durch Rab5DN oder Rab21DN auf die Zellen wurden in Suspensionskultur nur für Rab5DN im geringen Maße festgestellt. Ein toxischer Effekt konnte nicht festgestellt werden. Weitere Hinweise, dass der Verlust der Rab5 Aktivität bzw. die Rab5 Funktion einen

Einfluss auf die Proliferation von Zellen hat wurde durch RNAi basierten *Knockdown* von Rab5 in glatten Muskelzellen gezeigt (Ma *et al.*, 2010). Der Verminderung der Rab5 Funktion durch die Expression von Rab5DN ist möglicherweise nicht so gravierend wie ein *Knockdown* des endogenen Proteins, wodurch der nur geringe Effekt auf die Proliferation der Zellen zu erklären wäre. Rab5DN zeigte in den CFC-Ansätzen eine Des Weiteren deutete sich an, dass durch die Expression von Rab5WT und Rab7DN in der EMP-Fraktion die erythrozytäre Differenzierung unterstützt wurde, was sich in der vermehrten Anzahl von CFU-MIX und BFU-E Kolonien äußerte. Dabei könnte der Effekt auf eine bessere Ausreifung der Zellen oder einen proliferativen Effekt der Progenitoren zurückzuführen sein. Des Weiteren war unklar, ob nur die erythrozytäre Reifung oder auch die Megakaryozytäre Differenzierung durch die Expression der Rab-GTPasen beeinflusst wird, da beide Zellen von einem gemeinsamen Vorläufer dem MEP hervorgehen (Görgens *et al.*, 2013b).

Zur genaueren Analyse der Einflüsse von Rab5 und Rab7 auf die Differenzierung von EMP wurde die erythrozytäre und megakaryozytäre Differenzierung spezifischer untersucht. Dabei zeigte sich aufgrund von immunphänotypischen Analysen, dass die Expression von Rab5WT und die Verminderung der Rab7 Aktivität durch Rab7DN die erythrozytäre und megakaryozytäre Ausreifung der Zellen begünstigt. Dass die Aktivität einiger endosomaler Proteine bei der Differenzierung von Megakaryozyten spielt, ist bereits durch Genexpressions-Analysen von megakaryozytär differenzierten CD34⁺ Zellen angedeutet. In diesen zeigt sich, dass während der Differenzierung zu Megakaryozyten *RAB7*, *RAB11A* und *dynamin-2* in den Zellen herunterreguliert werden (Kim *et al.*, 2002). Dem entsprechend war anzunehmen, dass die Funktion endozytotischer Prozesse während der Differenzierung zu Erythrozyten und Megakaryozyten notwendig ist. Die späten endosomalen und lysosomalen Transportwege, an denen Rab7 beteiligt ist, scheinen eher hinderlich für die Ausreifung der Zellen zu sein. Somit wurde aufgrund der hier erhaltenen Daten vermutet, dass endosomale Prozesse und Rab-GTPasen an Zellschicksalsspezifikationen auf Ebene der Progenitoren teilnehmen und eventuell die Proliferation von Progenitoren und ihrer Ausreifung positiv (Rab5) oder negativ (Rab7) begünstigen. Erste Untersuchungen von CFU-Mix Kolonien aus der CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Fraktionen in Zytospin-Präparaten (Daten nicht dargestellt) bestärken die Annahme, dass die Expression von Rab5WT und Rab7DN

die Ausreifung der Erythrozytären Zellen fördert, da anteilig weniger unreife Zellen (Myeloblasten) und mehr reifere Progenitoren (Retikulozyten) in den Präparaten gefunden wurden.

Paralell zu den Rab-GTPasen wurde in einem anderen Ansatz mit Endozytose-Inhibitoren ebenfalls die endosomale Maschinerie manipuliert. Bei den Versuchen mit den Inhibitoren verhielt es sich im Vergleich zu den Rab-GTPasen etwas anders, einzelne Inhibitoren starke Effekte auf die Oberflächenexpression von CD133 und CD34 hatten. Um bei den funktionellen Analysen möglichst geringe Unterschiede der verwendeten Zellen zu bekommen wurde in diesen Versuchen nur auf CD34⁺ anstelle von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen sortiert. CytB schien den Anteil der CD133⁺CD34⁺ Zellen aufrecht zu erhalten bei ca. 80% wohingegen MβCD zu einem Verlust von CD133 auf der Zelloberfläche führte, so dass nur die CD133^{low}CD34⁺ Zellpopulation vorhanden war. Nach 50-60 h Kulturdauer war auch bei Chpz und MDC die CD133⁺CD34⁺ Zellpopulation verschwunden, was vermutlich auf die Toxizität der beiden Pharmazeutika zurückzuführen ist. Das Verschwinden von CD133 bei der MβCD Behandlung wurde durch das Auswaschen des Inhibitors genauer untersucht, da MβCD Cholesterol aus der Plasmamembran fällt und dies möglicherweise der Faktor für den Verlust von CD133 auf der Plasmamembran der Zellen sein könnte. Das Experiment zeigte, dass die Zelloberflächenpräsentation nach dem Entfernen von MβCD aus dem Medium wieder hergestellt wird. Dennoch konnte, damit die Experimente in sich konstant blieben bei den Pharmazeutika nicht zwischen CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen unterschieden werden, sondern es wurden gesamt CD34⁺Zellen untersucht.

Trotz der nicht so guten Auflösung der verwendeten Ausgangszellpopulation für die CFC-Ansätze, waren ähnliche Effekte auf die einzelnen Kolonietypen erhalten worden wie bei der genetischen Manipulation mit Rab-GTPasen. Dabei zeigte sich, dass durch Dyna, MβCD und Spautin die Makrophagen und erythrozytären Kolonien reduziert waren. Diese drei Inhibitoren blockieren die frühen endosomalen und autophagosomalen Prozesse, die zuvor bereits durch Rab5DN und Rab7DN beeinflusst worden und zu ähnlichen Ergebnissen in der Koloniebildung von HSVZ geführt haben. Rab5 und Rab7 sind bei der Bildung des endolysosomalen Systems und der Autophagosomen in anderen Zellen wie BHK- und CHO- Zellen beteiligt (Su *et al.*, Stein *et al.*, 2003). In der hämatopoetischen Zelllinie K562 zeigte sich, dass die Bildung von multivesikulären Körpern (MVB) Rab11 abhängig ist, und dass dieser

Prozess mit der Bildung von Autophagosomen bei der erythrozytären Differenzierung der K562 in Verbindung steht (Savina *et al.*, 2005, Fader und Colombo, 2006). Daher ließ sich anhand der Inhibitor Daten vermuten, dass auch in primären Zellen HSVZ der Prozess der Autophagie für die Differenzierung der Zellen notwendig ist.

Zusammengefasst lässt sich aus den Daten erkennen, dass die endosomalen Prozesse für die korrekte Differenzierung der erythrozytären-myeloischen Zelllinien notwendig sind und dass ein Verlust bzw. eine Verminderung der endozytotischen Wege auch die Vitalität der Zellen auf Dauer verringert. Des Weiteren ließen die Aufnahmeversuche und Zellpolaritätsanalysen mit den Rab-GTPasen und Inhibitoren schließen, dass die frühen endosomalen Prozesse eher nur Einfluss auf die Endozytose und den Transport der verwendeten Liganden (Transferrin und acLDL) hatten und Rab11 sowie Autophagosomen beeinflussende Inhibitoren auch die Zellpolarität der Zellen veränderten. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass eine Veränderung des endosomalen Systems das Zellschicksal einiger hämatopoetischer Linien dramatisch beeinflusste, jedoch mit keiner der hier durchgeführten Manipulationen des endosomalen Systems ein Erhalt des Stammzellpotenzial der HSVZ erzielt wurde.

4.5. Ausblick

Die Ergebnisse legen nahe, dass das endosomale System in HSVZ an Zellschicksalspezifizierungen der Zellen beteiligt ist. Anders als erwartet führte weder die genetische Manipulation der endosomalen Maschinerie durch ektope Expression von Rab-GTPasen noch die durch die Endozytoseinhibitoren hervorgerufene Störung zu einem Erhalt des Stammzellpotenzials. Stattdessen ließen sich durch die Blockierung der Endozytosewege von CD34⁺ Zellen, maßgeblich Defekte bei der Ausreifung von Makrophagen und Erythrozyten hervorrufen. Eine vermehrte Aktivität durch die Expression von Rab5WT und Rab5CA führte hingegen zu einer verbesserten erythrozytären Ausreifung der CD34⁺ Zellen. Somit legen die Ergebnisse nahe, dass vorallem die endosomalen Transportwege von besonderer Bedeutung bei Differenzierungsprozessen der Zellen zu sein scheinen. Da durch die Verwendung von Endozytose-Inhibitoren die wie die dominant-negativen Varianten von Rab5 und Rab21 die frühen endosomalen Prozesse beeinflussen, zeigte ähnliche blockierende Wirkung auf die Ausreifung der CD34⁺ Zellen in Richtung Makrophagen und Erythrozyten. Anders war es für die Aktivität der späten endosomalen Wege, wo die Expression von Rab7WT und Rab7CA also der aktiven

Rab-Varianten die Differenzierung in Richtung Erythrozyten und Megakaryozyten etwas verminderte und die dominant-negative Variante diese förderte. Da die Manipulation des endosomalen Systems durch die ektope Expression der verschiedenen Rab-GTPasen-Varianten nicht zwingend die endogene Expression und Funktion der jeweiligen Rab-GTPasen beeinflusst, sollte zur genauen Klärung der Funktion von Rab7 und Rab5 ein RNAi basierter *Knockdown* für diese beiden Rab-GTPasen in CD34⁺ Zellen durchgeführt werden. Anschließend sollte in Analogie zu den hier beschriebenen Experimenten CFC-Ansätze von den Subpopulationen CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ durchgeführt werden, um zu analysieren, ob der RNAi vermittelte *Knockdown* einen ähnlichen Effekt wie die dominant-negativen Varianten der beiden Rab-GTPasen hervorrufen. Durch anschließend durchflusszytometrische und immunzytochemische Analysen sowie Expressionsanalysen von linienspezifischen Transkriptionsfaktoren von den gebildeten Kolonien sollten die CFC-Daten verifiziert werden. Zur Klärung der Frage welche Signalwege durch die Expression der Rab-GTPasen Varianten betroffen sind, könnte durch entsprechende Transkriptionsanalysen von CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺ Zellen vor und nach Differenzierung untersucht werden. Darüber hinaus könnte in den auf diese Weise separierte Zellpopulationen die Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren näheren Aufschluss über die der hämatopoetischen Linienspezifikation zugrundeliegenden Prozesse geben und welche Rolle den Rab-GTPasen und ihren endosomalen Wegen dabei zukommt.

5. Zusammenfassung

Ein wichtiger Aspekt der Stammzellbiologie ist es zu verstehen, welche Mechanismen an der Zellschicksalsentscheidung Selbsterhalt oder Differenzierung von Stammzellen beteiligt sind. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) in der Lage sind sich asymmetrisch zu teilen (Beckmann *et al.*, 2007). Dabei segregierten drei Proteine die mit Endosomen assoziiert waren asymmetrisch in die Tochterzellen, was zu der Vermutung führte, dass eine Verbindung zwischen der endosomalen Maschinerie und Zellschicksalsentscheidungen von HSVZ besteht.

Rab-GTPasen sind Hauptregulatoren endosomaler Transportwege und endozytotische Prozesse lassen sich durch verschiedene Inhibitoren blockieren. Durch ektopische Expression von wildtypischen, konstitutiv-aktiven und dominant-negativen Varianten von Rab5, Rab7, Rab11 und Rab21 wurde der Einfluss endosomaler Transportwege auf die Zellbiologie und Zellschicksalsspezifikation von HSVZ untersucht. Zusätzlich zu der genetischen Manipulation der endosomalen Wege, wurde die Wirkung von Endozytoseinhibitoren auf die Zellbiologie und das Zellschicksal analysiert.

Ähnlich wie in anderen zellulären Systemen führte die Expression der Rab-GTPase Varianten (WT, DN und CA) zu teils drastischen Veränderungen der subzellulären Organisation von endosomalen Kompartimenten. Vor allem zeigte die Expression von Rab5CA eine abnormale Vergrößerung der Endosomen und Reorganisation von späten endosomalen Markerproteinen.

Darüber hinaus, zeigte die Expression von Rab11DN eine Verminderung der Ausbildung morphologisch polarisierter CD34⁺ Zellen. Eine Beeinträchtigung der Motilität durch Rab11DN oder eine andere Rab-GTPase-Variante war nicht erkennbar.

Die Behandlung mit Endozytose-Inhibitoren resultierte in einer gestörten Endozytose von Rezeptorliganden und verhinderte teilweise die Ausbildung und den Erhalt der Zellpolarität von CD34⁺ Zellen.

Funktionelle Analysen von genetisch und pharmazeutisch manipulierten CD34⁺ Zellen in CFC-Ansätzen zeigten, dass endosmale Prozesse, die durch Rab5WT, Rab5DN, Rab7DN und Rab21DN sowie die Inhibitoren Dynasore, M β CD und Spautin-1 verändert werden, das erythrozytäre-myeloische Linienpotenzial der

CD34⁺ Zellen beeinflussen. Rab5DN und Rab21DN sowie Dynasore, M β CD und Spautin-1 verminderten die Bildung von Makrophagen (CFU-G bzw. CFU-GM), Granulozyten (CFU-G bzw. CFU-GM) und Erythrozyten enthaltenden Kolonien (BFU-E und CFU-Mix). Die Effekte von Rab5DN und Rab21DN auf die spezifischen Kolonietypen fanden sich in beiden analysierten Zellpopulationen (CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺) der CD34⁺Zellen und verminderten zudem das gesamte Koloniebildungspotenzial der Zellen. Rab5WT und Rab7DN förderten die Bildung von erythrozytären Kolonien (BFU-E und CFU-Mix) innerhalb der CD133^{low}CD34⁺ Zellpopulation. Durch die Verwendung von erythrozytären und megakaryozytären Differenzierungsverfahren konnten die fördernden Effekte von Rab5WT und Rab7DN auf die erythrozytäre und megakaryozytäre Differenzierung von CD133^{low}CD34⁺ Zellen bestätigt werden.

Summary

An important aspect of stem cell biology is to understand the mechanisms controlling the decision of self-renewal *versus* differentiation. Previously, we confirmed the long lasting conjecture that human hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) have the capability to divide asymmetrically. In our studies we demonstrated that in a proportion of dividing HSPCs endosomal proteins segregate differently into arising daughter cells, pointing towards a relationship between organization of the endosomal compartment and cell fate specification processes in HSPCs.

Rab-GTPases are key regulators of endosomal trafficking and endocytic pathways can be interfered with different inhibitors. By means of ectopic expression, we analyzed the impacts of wild type (WT), constitutive active (CA) and dominant-negative (DN) Rab5, Rab7, Rab11 and Rab21 variants on the development of human HSPCs (umbilical cord blood (UCB) derived CD34⁺ cells). In addition impacts of different endocytic inhibitors were investigated on cell fate specification of HSPCs.

According to other cellular systems expression of Rab-GTPase variants (WT, DN and CA) was found to interfere partly drastically with the organization of the endosomal compartment. Especially, Rab5CA expression resulted in the formation of giant endosomes, which contain early as well as late endosomal marker proteins.

In addition, expression of Rab11DN results in a reduction of the formation of polarized migration phenotypes. However, we did not recognize any impact on cell motility by this or any other analyzed Rab-GTPases.

Treatment of CD34⁺ cells with endocytic inhibitors result in impaired endocytosis of receptor ligands and affected establishment and maintenance of cell polarization.

In contrast, CFC-assays revealed impacts of Rab5WT, Rab5DN, Rab7DN and Rab21DN as well as of the inhibitors Dynasore, M β CD and Spautin-1 on the erythro-myeloid lineage potential of CD34⁺ cells. Here, Rab5DN and Rab21DN as well as Dynasore, M β CD and Spautin-1 impaired colony formation potential of Macrophage (CFU-G/CFU-GM), granulocytic (CFU-G/CFU-GM) and erythroid colonies (BFU-E and CFU-Mix). Effects of Rab5DN and Rab21DN on the different colony types were detected in both analyzed cell populations (CD133⁺CD34⁺ und CD133^{low}CD34⁺) of CD34⁺ cells and decreased the total colony formation potential of the cells. Rab5WT and Rab7DN enhance erythroid colony formation (BFU-E und CFU-Mix). Using

special erythroid and megakaryocytic read out systems, we confirmed that Rab5WT and Rab7DN promote erythroid and megakaryocytic lineage differentiation.

6. Anhang

Tabelle 44: Immunphänotypisierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Zelltyp	Phänotyp	Quelle
Hämatopoetische Stammzelle (HSZ)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD90 ^{+/+} CD45RA ⁻ CD49f ⁺ Rho ^{low}	Notta <i>et al.</i> 2011
Multipotente Progenitoren (MPP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD90 ^{+/+} CD45RA ⁻ CD49f ⁺	Doulatov <i>et al.</i> 2010 Notta <i>et al.</i> 2011
Gemischter (Mixed) lymphatischer Progenitor (MLP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{low} CD45RA ⁺ CD10 ⁺	Doulatov <i>et al.</i> 2010 Görgens <i>et al.</i> 2013
Lymphatisch geprägter multipotenter Progenitor (LMPP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{low} CD133 ⁺ CD45RA ⁺ CD10 ⁻ CD7 ⁻	Kohn <i>et al.</i> 2012 Görgens <i>et al.</i> 2013 Gordon <i>et al.</i> 2012
Gemeinsamer myeloischer Progenitor (CMP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ CD135 ⁺ CD10 ⁻ CD7 ⁻	Doulatov <i>et al.</i> 2010 Notta <i>et al.</i> 2011
Granulozyten/Makrophagen Progenitor (GMP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁺ CD135 ⁺ CD10 ⁻ CD7 ⁻	(Manz <i>et al.</i> , 2002) Doulatov <i>et al.</i> 2010 Notta <i>et al.</i> 2011
Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitor (MEP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ CD135 ⁻ CD10 ⁻ CD7 ⁻	(Manz <i>et al.</i> , 2002) Doulatov <i>et al.</i> 2010 Notta <i>et al.</i> 2011
Erythro-myeloischer Progenitor (EMP)	Lin ⁻ CD133 ^{low} CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁻	Görgens <i>et al.</i> 2013

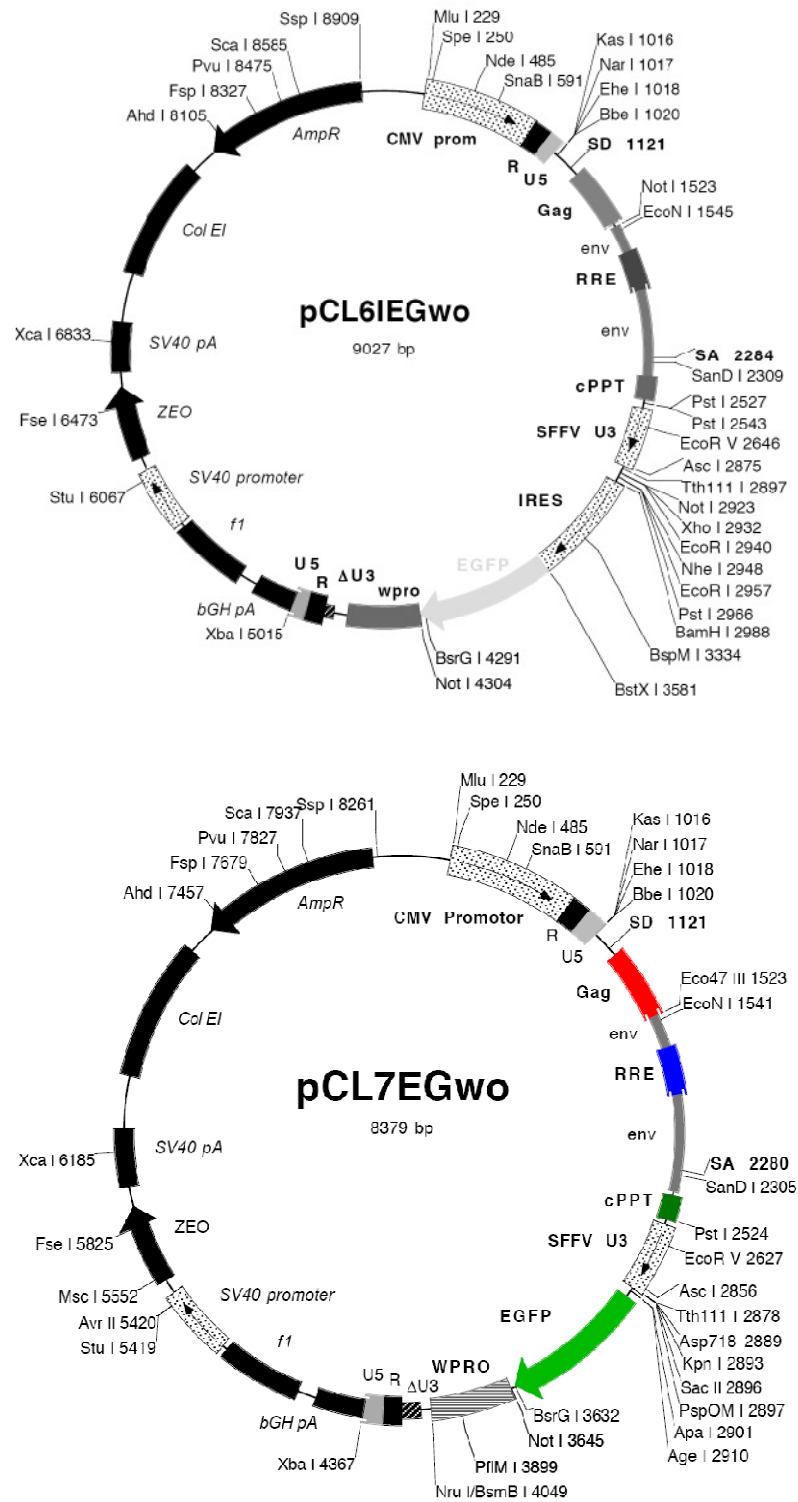


Abbildung 59: Lentivirale Expressionsplasmide pCL6IEGwo und pCL7EGwo. Plasmidgrößen 9027 bp (pCL6IEGwo) und 8379 bp (pCL7EGwo).

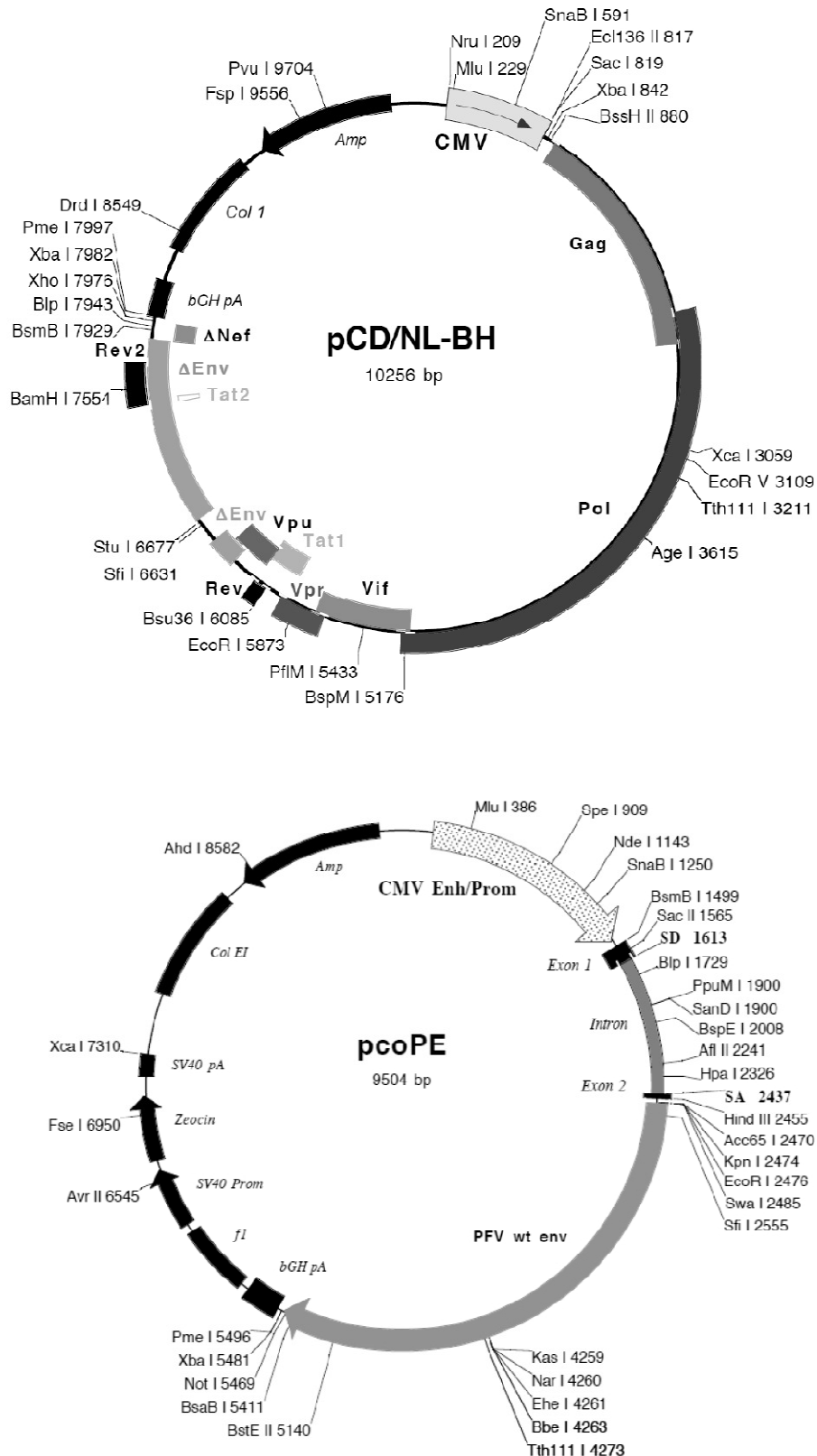


Abbildung 60: Lentivirale Strukturplasmide. Helfer Plasmid pCD/NL-BH kodiert für gag und Pol Gene. Hüllplasmid pcoPE kodiert für das Foami Hüllprotein.

96.3% identity in 651 residues overlap; Score: 3531.0; Gap frequency: 0.0%

```

homo      1 ATGGGCACCCGCGACGACGAGTACGACTACCTCTTTAAAGTTGTCCTTATTGGAGATTCT
canis     1 ATGGGCACCCGCGACGACGAGTACGACTATCTCTTCAAAGTTGTCCTTATTGGAGATTCT
          *****

homo     61 GGTGTTGGAAAGAGTAATCTCCTGTCTCGATTACTCGAAATGAGTTAATCTGGAAAGC
canis    61 GGTGTTGGAAAGAGTAATCTCTGTCTCGATTACTCGAAATGAGTTAATCTCGAAAGT
          *****

homo    121 AAGAGCACCATTGGAGTAGAGTTTGCAACAAGAAGCATCCAGGTTGATGGAAAAACAATA
canis   121 AAGAGCACCATTGGAGTAGAGTTTGCAACAAGAAGCATCCAGGTTGATGGAAAAACAATA
          *****

homo    181 AAGGCACAGATATGGGACACAGCAGGGCAAGAGCGATATCGAGCTATAACATCAGCATAT
canis   181 AAGGCACAGATATGGGACACAGCAGGGCAAGAGCGATACCGAGCTATAACATCAGCATAT
          *****

homo    241 TATCGTGGAGCTGTAGGTGCCTTATTGGTTTATGACATTGCTAAACATCTCACATATGAA
canis   241 TATCGTGGAGCTGTAGGTGCCTTACTGGTTTATGACATTGCTAAGCATCTCACATATGAA
          *****

homo    301 AATGTAGACGCATGGCTGAAAGAAGCTGAGAGATCATGCTGATAGTAACATTGTTATCATG
canis   301 AATGTAGAACGATGGCTGAAAGAAGCTGAGAGATCATGCTGATAGTAACATTGTTATCATG
          *****

homo    361 CTTGTGGGCAATAAGAGTGATCTACGTCATCTCAGGGCAGTTCCTACAGATGAAGCAAGA
canis   361 CTTGTGGGCAATAAGAGTGATTTGCGTCATCTCAGGGCAGTTCCTACAGATGAAGCAAGA
          *****

homo    421 GCTTTTGCAGAAAAGAATGGTTTGTTCATTCATTGAAACTTCGGCCCTAGACTCTACAAAT
canis   421 GCTTTTGCAGAAAAGAATGGTTTGTTCATTCATTGAGACTTCGGCTCTAGACTCTACAAAT
          *****

homo    481 GTAGAAGCTGCTTTTCAGACAATTTAACAGAGATTTACCGCATTGTTTCTCAGAAGCAA
canis   481 GTAGAAGCTGCTTTTCAGACAATTCGACAGAGATATACCGCATTGTTTCCCAGAAACAA
          *****

homo    541 ATGTCAGACAGACGCGAAAAATGACATGTCTCCAAGCAACAATGTGGTTCCTATTTCATGTT
canis   541 ATGTCAGACAGACGCGAAAAATGACATGTCTCCAAGCAACAATGTGGTTCCTATTTCATGTT
          *****

homo    601 CCACCAACCCTGAAAAACAAGCCAAAGGTGCAGTGTCTCAGAACATCTAA
canis   601 CCACCAACCCTGAAAAACAAGCCAAAGGTGCAGTGTCTCAGAACATATAA
          *****

```

Abbildung 61: DNA-Sequenzvergleich von Rab11A aus *homo sapiens* mit *canis lupus familiaris*.

Der Sequenzvergleich wurde mittels des freizugänglichen Softwareprogramm SIM auf der ExPASy Bioinformatics Resource Portal Homepage (<http://web.expasy.org/cgi-bin/sim/sim.pl?prot>) durchgeführt.

100.0% identity in 216 residues overlap; Score: 1105.0; Gap frequency: 0.0%

```

homo      1  MGTRDDEYDYLFKVVLIGDSGVGKSNLLSRFTRNEFNLESKSTIGVEFATRSIQVDGKTI
canis     1  MGTRDDEYDYLFKVVLIGDSGVGKSNLLSRFTRNEFNLESKSTIGVEFATRSIQVDGKTI
          *****

homo     61  KAQIWDTAGQERYRAITSAYYRGAVGALLVYDIAKHLTYENVERWLKELRDHADSNIVIM
canis    61  KAQIWDTAGQERYRAITSAYYRGAVGALLVYDIAKHLTYENVERWLKELRDHADSNIVIM
          *****

homo    121  LVGNKSDLRHLRAVPTDEARAFAEKNGLSFIETSALDSTNVEAAFQILTEIYRIVSQKQ
canis   121  LVGNKSDLRHLRAVPTDEARAFAEKNGLSFIETSALDSTNVEAAFQILTEIYRIVSQKQ
          *****

homo    181  MSDRRENDMSPSNNVVP IHVPPTTENKPKVQCCQNI
canis   181  MSDRRENDMSPSNNVVP IHVPPTTENKPKVQCCQNI
          *****

```

Abbildung 62: Aminosäuresequenzvergleich von Rab11A aus *homo sapiens* mit *canis lupus familiaris*.

Der Sequenzvergleich wurde mittels des freizugänglichen Softwareprogramm SIM auf der ExPASy Bioinformatics Resource Portal Homepage (<http://web.expasy.org/cgi-bin/sim/sim.pl?prot>) durchgeführt.

Tabelle 45: Vermessene Vesikelgrößen später endosomaler Markerproteine in MSZ

MSZ	Rab7- Vesikel (μm)	CD63- Vesikel (μm)	Rab7WT- Vesikel (μm)	Rab7CA- Vesikel (μm)
1	0,97	0,87	0,8	2,07
2	1,23	0,8	0,69	2,96
3	0,69	0,72	0,69	2,07
4	0,6	0,58	1,09	1,74
5	0,62	0,74	0,74	1,39
6	0,7	0,97	1,11	1,26
7	0,69	0,58	0,82	1,74
8	0,88	0,92	0,75	2,01
9	0,46	1,59	1,16	1,84
10	0,46	0,92	1,3	1,84
11	0,55	0,6	1,17	3,25
12	0,66	0,83	1,33	2,19
13	0,74	1,11	0,83	1,38
14	1,23	1,01	0,92	1,26
15	0,75	0,84	1,1	1,61
16	0,88	0,83	0,92	2,41
17	0,78	1,54	1,01	2,05
18	0,78	0,72	1,48	2,91
19	0,58	0,83	0,69	1,74
20	0,88	0,82	1,01	1,97
21	1,02	0,92	1,74	1,52
22	0,65	0,8	1,04	2,42
23	0,58	0,87	0,66	1,39
24	0,8	0,97	1,11	2,1
25	0,87	1,42	0,8	1,97
26	1,05	0,88	0,93	2,51
27	1,09	0,88	1,04	2,17
28	1,2	0,97	1,02	1,52
29	1,09	0,72	0,8	1,39
30	0,88	0,83	0,8	2,75
31	1,02	0,82	0,97	1,49
32	0,97	0,92	1,35	2,87
33	0,88	0,66	1,62	2,42
MW	0,82515152	0,89333333	1,01484849	2,00636364
Stabw	0,21485637	0,23458296	0,27105259	0,53687067
p (Rab7WT/ Rab7CA)			8,9E-12	8,9E-12
p (Rab7)		0,23	0,0043	2,7E-13
p (CD63)	0,23		0,064	1,4E-11

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte MSZ; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmbar, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung (p) wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 46: Vermessene Vesikelgröße früher endosomaler Markerproteine in MSZ.

MSZ	Rab5- Vesikel (μm)	EEA1- Vesikel (μm)	Rab5WT- Vesikel (μm)	Rab5CA- Vesikel (μm)
1	0,66	1,61	0,97	1,94
2	0,65	0,97	0,97	1,94
3	0,97	1,29	1,02	1,14
4	1,38	1,29	1,16	1,3
5	1,09	0,97	1,33	1,94
6	0,46	0,97	0,72	2,1
7	0,72	0,97	0,97	1,45
8	0,87	0,97	1,33	1,74
9	1,23	1,29	1,02	1,77
10	0,84	0,65	0,65	1,94
11	0,62	0,97	1,44	1,96
12	0,51	1,29		2,33
13	1,25	0,66		1,64
14	1,09	0,72		0,97
15	0,46	1,39		1,62
16	0,6	0,66		0,81
17	0,51	0,87		1,64
18	0,43	0,88		2,9
19	1,54	1,42		1,95
20	0,66	1,25		0,91
21	0,69	0,88		2,75
22	0,88	0,66		2,26
23	0,8	0,66		0,81
24	0,74	0,74		1,45
25	0,65	0,74		2,04
26	0,66	0,58		1,84
27	1,25	0,87		2,19
28	0,87	0,72		2,42
29	0,87	0,51		2,58
30	0,58	0,51		2,6
31	0,42	1,09		2,77
32	0,8	0,32		
33	0,55	0,66		
MW	0,7969697	0,91	1,05272727	1,861290323
SD	0,28957388	0,30719497	0,24714736	0,575903591
p (Rab5)		0,11	0,07	2,77375E-09
p (EEA1)	0,11		0,74	1,75216E-08
p (Rab5WT)				0,000277836
p (Rab5CA)				

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte MSZ; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmbar, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung (p) wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 47: Vermessung von EEA1-Vesikel in HSVZ die Rab5-Varianten exprimieren

HSVZ EEA1 Vesikel	Kontrolle	Rab5WT- Zellen	Rab5DN- Zellen	Rab5CA- Zellen
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)
1	0,39	0,27	0,23	3,69
2	0,27	0,58	0,38	3,19
3	0,33	0,71	0,38	3,84
4	0,58	0,55	0,52	1,02
5	0,39	0,52	0,59	0,97
6	0,45	0,84	0,58	1,42
7	0,67	0,71	0,32	1,14
8	0,39	0,41	0,39	2,97
9	0,70	0,41	0,43	1,48
10	0,35	0,61	0,43	0,97
11	0,47	0,65	0,41	0,46
12	0,79	0,69	0,27	0,52
13	0,55	0,97	0,26	3,88
14	0,66	0,93	0,41	3,39
15	0,58	0,74	0,36	0,39
16	0,55	0,46	0,20	0,33
17	0,55	0,43	0,46	0,46
18	0,55	0,41	0,66	0,52
19	0,52	0,65	0,52	0,78
20	0,69	0,46	0,59	0,39
21	0,52	0,84	0,32	0,45
22	0,59	0,41	0,47	0,45
23	0,55	0,43	0,20	0,52
24	0,84	0,65	0,23	0,66
25	0,79	0,64	0,33	0,72
26	0,50	0,52	0,45	0,52
27	0,65	0,66	0,41	0,65
28	0,59	0,58	0,36	4,88
29	0,55	0,84	0,50	4,99
30	0,64	0,87	0,33	0,78
31	0,59	0,94	0,41	0,7
32	0,75	0,55	0,41	1,05
33	0,74	0,52	0,39	0,9
34	0,41	0,61	0,27	1,04
35	0,47	0,74	0,65	0,75
36	0,84	0,41	0,41	0,65
37	0,50	0,55	0,41	1,23
MW	0,57	0,62	0,40	1,43
Stabw	0,14	0,17	0,12	1,34
p (K)		0,18	0,00002	0,001
p (Rab5WT)			0,0000007	0,001
p (Rab5DN)				0,000068

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte CD34⁺Zellen; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmbar, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung (p) wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 48: Vermessung von EEA1-Vesikel in HSVZ die Rab7-Varianten exprimieren

HSVZ EEA1 Vesikel	Kontrolle (nm)	Rab7WT-Zellen (nm)	Rab7DN-Zellen (nm)	Rab7CA-Zellen (nm)
1	0,39	0,53	0,59	0,38
2	0,27	0,52	0,70	0,32
3	0,33	0,58	0,43	0,79
4	0,58	0,84	0,46	0,52
5	0,39	0,82	0,43	0,65
6	0,45	0,92	0,69	0,64
7	0,67	0,69	0,55	0,53
8	0,39	0,45	0,52	0,82
9	0,70	0,59	1,24	0,52
10	0,35	0,55	0,58	0,65
11	0,47	0,78	0,49	0,55
12	0,79	0,75	0,46	0,59
13	0,55	0,88	0,52	0,58
14	0,66	0,61	0,52	0,77
15	0,58	0,87	0,46	0,59
16	0,55	0,85	0,39	0,58
17	0,55	0,61	0,64	0,49
18	0,55	0,66	0,70	0,46
19	0,52	0,59	0,55	0,58
20	0,69	0,69	0,64	0,70
21	0,52	0,84	0,64	0,64
22	0,59	0,61	0,61	0,58
23	0,55	0,92	0,61	0,59
24	0,84	0,55	0,50	0,49
25	0,79	0,38	0,46	0,65
26	0,50	0,46	0,55	0,64
27	0,65	0,47	0,43	0,87
28	0,59	0,66	0,58	0,74
29	0,55	0,59	0,52	0,61
30	0,64	0,39	0,59	0,47
31	0,59	0,41	0,59	0,84
MW	0,56	0,65	0,57	0,61
Stabw	0,14	0,16	0,15	0,13
p (K)		0,028	0,72	0,13
p (Rab7WT)			0,07	0,33
p (Rab7DN)				0,35

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte CD34⁺ Zellen; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmbar, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung (p) wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 49: Vermessung von CD63-Vesikel in HSVZ die Rab5-Varianten exprimieren

HSVZ Vesikel	CD63	Kontrolle (μm)	Rab5WT- Zellen (μm)	Rab5DN- Zellen (μm)	Rab5CA- Zellen (μm)
1		0,75	0,78	0,41	2,34
2		1,00	0,75	0,33	0,78
3		0,78	1,03	0,38	1,35
4		1,02	1,10	0,74	1,28
5		0,83	0,82	0,52	2,88
6		1,10	0,90	0,52	1,21
7		1,04	0,84	0,66	1,37
8		0,66	0,74	0,52	1,14
9		0,90	1,10	0,33	0,92
10		0,91	1,13	0,52	4,99
11		0,72	0,90	0,65	1,17
12		0,79	0,61	0,61	2,87
13		0,61	0,47	0,50	0,49
14		0,85	0,52	0,47	0,52
15		0,83	0,47	0,73	0,74
16		0,69	1,19	0,64	0,84
17		0,92	0,50	0,61	1,28
18		0,84	0,52	0,67	1,07
19		1,19	0,80	0,61	4,20
20		0,92	0,58	1,09	0,92
21		0,81	0,53	0,55	0,52
22		0,43	0,58	0,74	1,07
23		0,67	0,94	0,85	1,30
24		0,58	0,59	0,53	3,97
25		0,380	0,820	0,590	2,910
26		0,430	0,850	0,610	0,990
27		0,940	0,700	0,610	0,580
28		0,720	0,960	n.b.	0,550
29		0,980	0,910	n.b.	1,190
30		0,79	n.b.	n.b.	n.b.
MW		0,80	0,78	0,59	1,57
Stabw		0,20	0,22	0,16	1,20
p (CD63)			0,260	0,00012	0,004
p (Rab5WT)				0,011	0,002
p (Rab5DN)					0,001
p (Rab5CA)					

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte CD34⁺ Zellen; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmt, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung (p) wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 50: Vermessung von CD63-Vesikel in HSVZ die Rab7-Varianten exprimieren

HSVZ Vesikel	CD63	Kontrolle (μm)	Rab7WT-Zellen (μm)	Rab7DN- Zellen (μm)	Rab7CA- Zellen (μm)
1		0,75	0,65	0,97	0,65
2		1	0,82	1,1	0,45
3		0,78	0,55	0,69	0,9
4		1,02	0,7	0,7	0,94
5		0,83	0,69	1,19	0,74
6		1,1	0,81	0,78	0,74
7		1,04	1,41	0,7	0,7
8		0,66	0,93	0,71	0,58
9		0,9	1,53	0,84	0,61
10		0,91	2,8	0,65	0,59
11		0,72	0,52	0,82	1,13
12		0,79	1,18	0,78	0,72
13		0,61	1,46	0,61	0,91
14		0,85	0,84	0,75	0,66
15		0,83	1,03	0,61	0,84
16		0,69	0,71	1,01	0,98
17		0,92	0,78	0,91	0,64
18		0,84	0,9	0,77	0,98
19		1,19	0,92	1,28	1,41
20		0,92	0,77	0,7	0,81
21		0,81	0,83	0,72	0,64
22		0,43	1,17	0,83	0,75
23		0,67	0,97	0,9	1,04
24		0,58	1,51	1,04	1,02
25		0,380	1,18	0,91	0,64
26		0,430	0,78	1,29	1,25
27		0,940	0,7	0,93	0,75
28		0,720	0,92	1,28	2,7
29		0,980	0,98	0,72	1,45
30		0,79	0,58	0,7	1,02
MW		0,80	1,00	0,86	0,92
Stabw		0,20	0,44	0,20	0,42
p (CD63)			0,05	0,27	0,23
p (Rab7WT)				0,21	0,51
p (Rab7DN)					0,51
p (Rab7CA)					

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte CD34⁺Zellen; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmt, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 51: Vermessung von Rab5, Rab5WT, Rab5CA, Rab7WT, Rab7CA, CD63 und EEA1-Vesikel in HSVZ

HSVZ	Rab5- Vesikel (nm)	Rab5WT- Vesikel (nm)	Rab5CA- Vesikel (nm)	Rab7WT- Vesikel (nm)	Rab7CA- Vesikel (nm)	CD63- Vesikel (nm)	EEA1- Vesikel (nm)	Rab7- Vesikel (nm)
1	0,58	0,45	4,88	1,44	0,81	0,75	0,39	0,96
2	0,39	0,77	5,2	2,02	0,68	1	0,27	0,55
3	0,45	0,96	3,87	2,07	1,71	0,78	0,33	0,5
4	0,39	0,71	3,55	2,25	2,17	1,02	0,58	0,41
5	0,27	0,9	2,33	1,3	2,46	0,83	0,39	0,5
6	0,33	0,66	7,85	1,62	1,33	1,1	0,45	0,59
7	0,55	0,97	5,8	1,53	1,44	1,04	0,67	0,55
8	0,55	1,06	3,37	2,19	2,31	0,66	0,39	0,61
9	0,52	0,59	4,84	0,72	1,52	0,9	0,7	0,74
10	0,69	0,5	0,71	0,81	1,64	0,91	0,35	0,52
11	0,52	0,69	0,64	0,68	0,58	0,72	0,47	0,55
12	0,59	0,77	0,39	0,68	1,03	0,79	0,79	0,65
13	0,55	0,59	0,33	0,94	0,68	0,61	0,55	1,1
14	0,84	0,47	0,46	0,68	0,51	0,85	0,66	1,01
15	0,67	0,71	1,99	1,61	1,94	0,83	0,58	0,78
16	0,39	0,64	3,1	1,16	1,84	0,69	0,55	0,69
17	0,7	0,39	1,77	1,74	0,68	0,92	0,55	0,66
18	0,35	0,33	2,67	1,02	0,98	0,84	0,55	1,48
19	0,47	0,46	2,1	1,14	0,98	1,19	0,52	1,16
20	0,79	0,96	4,36	1,37	0,78	0,92	0,69	0,7
21	0,78	0,78	3,66	0,97	0,61	0,81	0,52	0,66
22	0,82	0,71	3,17	0,51	1,29	0,43	0,59	0,96
23	0,47	0,72	n.d	1,14	0,78	0,67	0,55	n.d
24	0,61	0,74	n.d	1,45	1,45	0,58	0,84	n.d
MW	0,55	0,69	3,05	1,29	1,26	0,83	0,54	0,74
Stabw	0,16	0,19	1,97	0,51	0,59	0,18	0,14	0,26
p (Rab5)		0,01722	0,00001	0,000003	0,00003	0,0000506	0,68943	0,00698
p (5WT)			0,00001	0,000002	0,00003	0,02367	0,00652	0,53062
p (5CA)				0,00015	0,00038	0,00002	0,00001	0,00003
p (7WT)					0,77718	0,00010	0,000002	0,00119
p (7CA)						0,00232	0,00001	0,00357
p (CD63)							0,00001	0,16884
p (EEA1)								0,00099
p (5DN)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p (7DN)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Die Werte repräsentieren den jeweiligen gemessenen Durchmesser der für die unterschiedlichen endosomalen Proteine positiven Vesikel. K= nicht transduzierte CD34⁺ Zellen; MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht bestimmt, da zu wenige Zellen vorhanden waren oder Vesikel nicht klar vermessen werden konnten. Zur Signifikanzberechnung (p) wurde der students t-test zweiseitig gepaart verwendet. Signifikante Werte sind dick gedruckt.

Tabelle 52: Expansion der CD34⁺ und CD133⁺CD34⁺ Zellen

CD34 ⁺ Zellen	V1	V2	V3	V4	V5	MW	Stabw	CD34 ⁺ Zellen intern	V1	V2	V3	V4	V5	MW	Stabw
Rab5WT	0,79	0,40	5,54	1,15	2,77	2,13	2,11	Rab5WT	1,28	0,51	8,33	1,37	4,67	3,23	3,27
Rab5DN	0,48	0,28	3,71	0,78	3,53	1,76	1,71	Rab5DN	0,67	0,33	6,50	1,19	4,22	2,58	2,68
Rab5CA	0,59	0,73	3,59	0,94	1,41	1,45	1,24	Rab5CA	40,53	1,05	83,58	1,34	2,28	25,76	36,47
Rab7WT	3,00	0,44	0,20	n.b.	n.b.	1,21	1,55	Rab7WT	0,88	0,93	0,23	n.b.	n.b.	0,68	0,39
Rab7DN	0,88	3,83	0,37	n.b.	n.b.	1,69	1,86	Rab7DN	0,80	4,40	0,25	n.b.	n.b.	1,82	2,25
Rab7CA	3,00	0,89	1,12	n.b.	n.b.	1,67	1,16	Rab7CA	0,67	0,41	0,38	n.b.	n.b.	0,49	0,16
Rab11WT	0,93	0,56	0,94	2,03	n.b.	1,11	0,63	Rab11WT	0,71	0,48	0,65	1,93	n.b.	0,94	0,67
Rab11DN	0,43	0,41	1,70	2,30	n.b.	1,21	0,94	Rab11DN	0,55	0,52	2,79	4,10	n.b.	1,99	1,76
Rab11CA	2,09	0,77	3,06	4,24	n.b.	2,54	1,47	Rab11CA	1,95	0,60	2,27	3,69	n.b.	2,13	1,27
Rab21WT	0,54	0,82	1,46	2,68	n.b.	1,38	0,95	Rab21WT	0,96	0,62	1,18	2,62	n.b.	1,35	0,88
Rab21DN	0,68	0,63	0,91	1,63	n.b.	0,96	0,46	Rab21DN	0,63	0,42	0,70	1,89	n.b.	0,91	0,66
Rab21CA	0,86	0,82	0,83	1,75	n.b.	1,07	0,46	Rab21CA	0,68	0,56	0,50	1,62	n.b.	0,84	0,52

CD133 ⁺ CD34 ⁺	V1	V2	V3	V4	V5	MW	Stabw	CD133 ⁺ CD34 ⁺ Zellen intern	V1	V2	V3	V4	V5	MW	Stabw
Rab5WT	0,95	0,25	1,03	3,50	4,48	2,04	1,84	Rab5WT	1,43	0,38	7,68	1,36	6,51	3,47	3,36
Rab5DN	0,39	0,15	2,60	0,47	3,08	1,34	1,39	Rab5DN	0,64	0,25	5,61	1,18	5,43	2,62	2,66
Rab5CA	0,37	0,55	2,81	0,30	1,18	1,04	1,05	Rab5CA	0,64	0,73	7,29	1,22	2,50	2,48	2,79
Rab7WT	1,39	0,21	0,19	n.b.	n.b.	0,60	0,69	Rab7WT	0,95	1,04	0,17	n.b.	n.b.	0,72	0,48
Rab7DN	0,55	2,88	0,31	n.b.	n.b.	1,25	1,42	Rab7DN	0,71	3,77	0,20	n.b.	n.b.	1,56	1,93
Rab7CA	0,37	0,45	0,92	n.b.	n.b.	0,58	0,30	Rab7CA	0,50	0,52	1,12	n.b.	n.b.	0,71	0,35
Rab11WT	2,61	0,82	0,21	1,48	n.b.	1,28	1,03	Rab11WT	0,49	0,41	0,49	1,90	n.b.	0,82	0,72
Rab11DN	0,30	0,31	1,47	2,37	n.b.	1,11	1,00	Rab11DN	0,61	0,39	2,27	4,73	n.b.	2,00	2,01
Rab11CA	2,79	0,42	2,37	4,29	n.b.	2,47	1,59	Rab11CA	2,61	0,34	1,90	4,83	n.b.	2,42	1,87
Rab21WT	0,43	0,60	1,00	2,41	n.b.	1,11	0,90	Rab21WT	0,93	0,52	0,77	2,47	n.b.	1,17	0,88
Rab21DN	0,45	0,32	0,49	1,17	n.b.	0,61	0,38	Rab21DN	0,65	0,34	0,85	1,42	n.b.	0,81	0,46
Rab21CA	0,78	0,50	0,59	1,56	n.b.	0,86	0,48	Rab21CA	0,88	0,44	0,42	1,54	n.b.	0,82	0,52

Alle Werte stellen die x-fache Expansion an CD34⁺ bzw. CD133⁺CD34⁺ Zellen an Tag 3, Tag 6 und Tag 10 der Kultivierung dar. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; V= Versuchsanzahl für diese Konstrukte (V1-V5); n.b.= nicht bestimmbar/nicht durchgeführt.

Tabelle 53: Koloniebildungspotenzial von CD133⁺CD34⁺ Zellen in CFC-Ansätzen

gesamte Kolonien CD133 ⁺	K	eGFP	Rab5WT	Rab5DN	Rab5CA	gesamte Kolonien CD133 ⁺	K	eGFP	Rab11WT	Rab11DN	Rab11CA
V1	26,25%	25,00%	17,00%	21,75%	25,00%	V1	26,25%	25,00%	24,25%	20,50%	22,25%
V2	33,00%	24,75%	23,25%	26,25%	18,75%	V2	33,00%	24,75%	13,50%	17,25%	27,25%
V3	34,50%	39,25%	32,25%	27,00%	28,25%	V3	34,50%	39,25%	27,00%	26,75%	37,50%
V4	49,00%	52,00%	47,50%	31,50%	43,50%	V4					
V5	44,50%	32,00%	54,00%	26,00%	38,00%	V5					
V6	n.b.	30,50%	25,00%	15,50%	31,00%	V6					
MW	37,45%	33,92%	33,17%	24,67%	30,75%	MW	31,25%	29,67%	21,58%	21,50%	29,00%
Stabw	9,18%	10,34%	14,61%	5,46%	8,93%	Stabw	4,39%	8,30%	7,13%	4,83%	7,77%
p (K)		0,44	0,49	0,02	0,03	p (K)		0,71	0,20	0,09	0,49
p (eGFP)			0,88	0,04	0,28	p (eGFP)			0,16	0,07	0,72
p (5WT)				0,15	0,52	p (11WT)				0,97	0,26
p (5DN)					0,15	p (11DN)					0,12

gesamte Kolonien CD133 ⁺	K	eGFP	Rab7WT	Rab7DN	Rab7CA	gesamte Kolonien CD133 ⁺	K	eGFP	Rab21WT	Rab21DN	Rab21CA
V1	26,25%	25,00%	25,00%	24,25%	16,75%	V1	26,25%	25,00%	24,50%	13,25%	27,19%
V2	33,00%	24,75%	25,00%	27,75%	25,00%	V2	33,00%	24,75%	42,00%	30,50%	25,75%
V3	34,50%	39,25%	32,25%	37,75%	35,50%	V3	34,50%	39,25%	37,25%	24,00%	31,25%
V4	44,00%	30,50%	21,00%	36,00%	22,50%	V4					
MW	34,44%	29,88%	25,81%	31,44%	24,94%	MW	31,25%	29,67%	34,58%	22,58%	28,06%
Stabw	7,32%	6,79%	4,69%	6,48%	7,84%	Stabw	4,39%	8,30%	9,05%	8,71%	2,85%
p (K)		0,34	0,18	0,30	0,13	p (K)		0,71	0,40	0,11	0,31
p (eGFP)			0,20	0,41	0,09	p (eGFP)			0,51	0,39	0,67
p (7WT)				0,19	0,75	p (21WT)				0,00	0,36
p (7DN)					0,09	p (21DN)					0,42

Alle Werte repräsentieren die Koloniebildungsfrequenz von CD133⁺CD34⁺ Zellen. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht verfügbar/kontaminiert; p (K) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen; p (eGFP) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu eGFP-exprimierenden Zellen; p (WT) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Zellen, die wildtypische eGFP-Rab-GTPasen (Rab5 = 5WT, Rab7 = 7WT, Rab11= 11WT oder Rab21 = 21WT) exprimieren; p (DN) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Zellen, die dominant-negative eGFP-Rab-GTPasen (Rab5= 5DN, Rab7 = 7DN, Rab11= 11DN oder Rab21 = 21DN) exprimieren (t-Test, zweiseitig, gepaart); Signifikanzen p<0,05 sind fett gedruckt dargestellt.

Tabelle 54: Koloniebildungspotenzial von CD133^{low}CD34⁺ Zellen in CFC-Ansätzen

gesamte Kolonien CD133 ^{low}	K	eGFP	Rab5WT	Rab5DN	Rab5CA	gesamte Kolonien CD133 ^{low}	K	eGFP	Rab11WT	Rab11DN	Rab11CA
V1	43,75%	35,25%	34,50%	20,00%	17,25%	V1	43,75%	35,25%	45,25%	40,50%	38,75%
V2	34,00%	34,50%	37,25%	29,25%	37,50%	V2	34,00%	34,50%	35,50%	20,25%	21,50%
V3	41,00%	39,50%	43,50%	31,50%	54,00%	V3	38,25%	41,00%	53,00%	24,50%	34,50%
V4	38,25%	41,00%	38,00%	18,25%	31,50%						
V5	54,00%	40,50%	40,50%	30,00%	26,50%						
V6	33,50%	37,00%	46,00%	39,50%	28,50%						
MW	40,75%	37,96%	39,96%	28,08%	32,54%	MW	38,67%	37,94%	44,58%	28,42%	31,58%
Stabw	7,60%	2,77%	4,25%	7,86%	12,43%	Stabw	4,89%	3,55%	8,77%	10,68%	8,99%
p (K)		0,36	0,84	0,05	0,27	p (K)		0,66	0,31	0,10	0,12
p (eGFP)			0,30	0,04	0,32	p (eGFP)			0,15	0,34	0,38
p (5WT)				0,00	0,16	p (11WT)				0,14	0,07
p (5DN)					0,42	p (11DN)					0,46

gesamte Kolonien CD133 ^{low}	K	eGFP	Rab7WT	Rab7DN	Rab7CA	gesamte Kolonien CD133 ^{low}	K	eGFP	Rab21WT	Rab21DN	Rab21CA
V1	43,75%	35,25%	40,00%	56,50%	39,25%	V1	43,75%	35,25%	43,00%	29,50%	46,56%
V2	34,00%	34,50%	48,00%	37,75%	21,50%	V2	34,00%	34,50%	25,50%	19,50%	38,00%
V3	38,25%	41,00%	29,25%	27,75%	30,75%	V3	38,25%	41,00%	33,75%	24,00%	25,50%
V4	38,25%	37,00%	27,50%	n.b.	41,50%						
MW	38,56%	36,95%	36,19%	40,67%	33,25%	MW	38,67%	37,94%	34,08%	24,33%	36,69%
Stabw	4,00%	2,51%	9,62%	14,60%	9,10%	Stabw	4,89%	3,55%	8,75%	5,01%	10,59%
p (K)		0,55	0,70	0,80	0,21	p (K)		0,66	0,44	0,01	0,11
p (eGFP)			0,91	0,74	0,48	p (eGFP)			0,65	0,07	0,98
p (7WT)				0,86	0,75	p (21WT)				0,05	0,71
p (7DN)					0,26	p (21DN)					0,15

Alle Werte repräsentieren die Koloniebildungsfrequenz von CD133^{low}CD34⁺ Zellen. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; n.b.=nicht verfügbar/kontaminiert; p (K) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen; p (eGFP) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu eGFP-exprimierenden Zellen; p (WT) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Zellen, die wildtypische eGFP-Rab-GTPasen (Rab5 = 5WT, Rab7 =7WT, Rab11= 11WT oder Rab21 = 21WT) exprimieren; p (DN) = Signifikanzberechnung im Vergleich zu Zellen, die dominant-negative eGFP-Rab-GTPasen (Rab5= 5DN, Rab7 =7DN, Rab11= 11DN oder Rab21 = 21DN) exprimieren (t-Test, zweiseitig, gepaart); Signifikanzen p<0,05 sind fett gedruckt dargestellt.

Tabelle 55: Änderung des Anteils eGFP*Zellen über die Dauer der Kultivierung

eGFP Zellen

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	95,24	92,06
V2	100,00	103,25	101,95
V3	100,00	97,14	94,29
V4	100,00	87,06	101,18
MW	100,00	95,67	97,37
Stabw	0,00	6,68	4,94
p (d3)		0,29	0,36
p (d6)			0,71

Alle Werte stellen die Änderung des Anteils eGFP-positiver HSVZ an Tag 3, Tag 6 und Tag 10 der Kultivierung in % dar. MW=Mittelwert; Stabw=Standardabweichung; V= Versuche; eGFP: n=4; Rab5: n=5; Rab7: n=4; Rab11: n=4; Rab21: n=4; p (d3)=Signifikanzberechnung im Vergleich zu Tag 3; p (d6)= Signifikanzberechnung im Vergleich zu Tag 6; (t-Test, zweiseitig, gepaart); Signifikanzen $p < 0,05$ sind fett gedruckt dargestellt.

Rab5WT

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	82,14	78,57
V2	100,00	83,82	85,29
V3	100,00	90,54	91,89
V4	100,00	93,42	84,21
V5	100,00	95,24	95,24
MW	100,00	89,03	87,04
Stabw	0,00	5,80	6,59
p (d3)		0,013	0,012
p (d6)			0,380

Rab7WT

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	77,78	100,00
V2	100,00	96,77	96,24
V3	100,00	98,53	102,94
MW	100,00	97,65	99,59
Stabw	0,00	1,24	4,74
p (d3)		0,23	0,92
p (d6)			0,58

Rab11WT

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	91,38	93,10
V2	100,00	95,52	101,49
V3	100,00	97,47	65,82
V4	100,00	96,25	97,50
MW	100,00	95,16	89,48
Stabw	0,00	2,64	16,14
p (d3)		0,04	0,28
p (d6)			0,56

Rab21WT

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	85,42	104,17
V2	100,00	87,61	83,70
V3	100,00	88,24	94,12
V4	100,00	95,12	96,34
MW	100,00	89,10	94,58
Stabw	0,00	4,20	8,44
p (d3)		0,01	0,29
p (d6)			0,34

Rab5DN

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	80,00	71,43
V2	100,00	86,49	75,68
V3	100,00	85,29	83,82
V4	100,00	90,79	89,47
V5	100,00	93,83	87,65
MW	100	87,2794	81,6112
Stabw	0	5,30927	7,78056
p (d3)		0,006	0,006
p (d6)			0,040

Rab7DN

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	83,33	100,00
V2	100,00	103,23	104,84
V3	100,00	86,96	86,96
MW	100,00	91,17	97,27
Stabw	0,00	10,60	9,25
p (d3)		0,29	0,66
p (d6)			0,37

Rab11DN

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	69,23	59,23
V2	100,00	77,42	67,74
V3	100,00	69,23	61,54
V4	100,00	68,75	68,75
MW	100,00	71,16	64,32
Stabw	0,00	4,18	4,65
p (d3)		0,001	0,001
p (d6)			0,06

Rab21DN

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	88,00	86,00
V2	100,00	99,07	97,20
V3	100,00	99,88	101,73
V4	100,00	93,90	89,63
MW	100,00	95,21	93,64
Stabw	0,00	5,49	7,13
p (d3)		0,18	0,17
p (d6)			0,30

Rab5CA

	d3 =100	d6	d10
V1	100	72,7273	54,5455
V2	100	60,8696	60,8696
V3	100	75,3425	68,4932
V4	100	88,6364	78,9773
V5	100	92,8571	83,3333
MW	100	78,0866	69,2438
Stabw	0	12,8661	12,0415
p (d3)		0,019	0,005
p (d6)			0,039

Rab7CA

	d3 =100	d6	d10
V1	100	95,4545	97,7273
V2	100	93,9394	96,9697
V3	100	77,2727	91,1765
V4	100	69,697	86,9565
MW	100	84,0909	93,2075
Stabw	0	12,6464	5,0919
p (d3)		0,086	0,076
p (d6)			0,096

Rab11CA

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	96,72	103,28
V2	100,00	93,90	95,12
V3	100,00	90,00	90,00
V4	100,00	88,89	100,00
MW	100,00	92,38	97,10
Stabw	0,00	3,61	5,80
p (d3)		0,02	0,39
p (d6)			0,16

Rab21CA

	d3 =100	d6	d10
V1	100,00	96,15	98,08
V2	100,00	98,85	102,30
V3	100,00	98,82	98,82
V4	100,00	96,30	98,77
MW	100,00	97,53	99,49
Stabw	0,00	1,51	1,90
p (d3)		0,05	0,63
p (d6)			0,07



7. Literaturverzeichnis

- Abenza, J. F., Galindo, A., Pinar, M., Pantazopoulou, A., de los Rios, V. and Penalva, M. A. (2012). Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol Biol Cell* **23**, 1889-1901.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., *et al.* (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306.
- Akashi, K., Reya, T., Dalma-Weiszhausz, D. and Weissman, I. L. (2000a). Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* **12**, 144-150.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I. L. (2000b). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.
- Ando, Y., Yasuda, S., Ocegüera-Yanez, F. and Narumiya, S. (2007). Inactivation of Rho GTPases with *Clostridium difficile* toxin B impairs centrosomal activation of Aurora-A in G2/M transition of HeLa cells. *Mol Biol Cell* **18**, 3752-3763.
- Andre, P., Boretto, J., Hueber, A. O., Regnier-Vigouroux, A., Gorvel, J. P., Ferrier, P. and Chavrier, P. (1997). A dominant-negative mutant of the Rab5 GTPase enhances T cell signaling by interfering with TCR down-modulation in transgenic mice. *J Immunol* **159**, 5253-5263.
- Andrews, R. and Ahringer, J. (2007). Asymmetry of early endosome distribution in *C. elegans* embryos. *PLoS One* **2**, e493.
- Athlin, L., Domellof, L. and Norberg, B. O. (1988). Role of actin polymerization in monocyte phagocytosis of yeast cells effect of cytochalasin B. *Haematologia (Budap)* **21**, 151-158.
- Awasthi-Kalia, M., Schnetkamp, P. P. and Deans, J. P. (2001). Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 77-82.
- Barbieri, M. A., Fernandez-Pol, S., Hunker, C., Horazdovsky, B. H. and Stahl, P. D. (2004). Role of rab5 in EGF receptor-mediated signal transduction. *Eur J Cell Biol* **83**, 305-314.
- Barbieri, M. A., Li, G., Mayorga, L. S. and Stahl, P. D. (1996). Characterization of Rab5:Q79L-stimulated endosome fusion. *Arch Biochem Biophys* **326**, 64-72.
- Basiji, D. A., Ortyń, W. E., Liang, L., Venkatachalam, V. and Morrissey, P. (2007). Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clin Lab Med* **27**, 653-670, viii.
- BasuRay, S., Mukherjee, S., Romero, E. G., Seaman, M. N. and Wandinger-Ness, A. (2012). Rab7 mutants associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause delayed growth factor receptor transport and altered endosomal and nuclear signaling. *J Biol Chem* **288**, 1135-1149.
- Baynes, R., Bukofzer, G., Bothwell, T., Bezwoda, W. and Macfarlane, B. (1987). Transferrin receptors and transferrin iron uptake by cultured human blood monocytes. *Eur J Cell Biol* **43**, 372-376.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J. C. and Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* **109**, 5494-5501.
- Beggah, S., Vogne, C., Zenaro, E. and Van Der Meer, J. R. (2008). Mutant HbpR transcription activator isolation for 2-chlorobiphenyl via green fluorescent protein-based flow cytometry and cell sorting. *Microb Biotechnol* **1**, 68-78.
- Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M. and Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 221-231.
- Betschinger, J., Mechler, K. and Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-330.
- Bhatia, M. (2001). AC133 expression in human stem cells. *Leukemia* **15**, 1685-1688.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Kapp, U., Wang, J. C., Murdoch, B. and Dick, J. E. (1997a). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* **186**, 619-624.
- Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997b). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5320-5325.
- Biederbick, A., Kern, H. F. and Elsasser, H. P. (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* **66**, 3-14.
- Boettner, D. R., Chi, R. J. and Lemmon, S. K. (2011a). Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **14**, 2-10.
- Boettner, D. R., Friesen, H., Andrews, B. and Lemmon, S. K. (2011b). Clathrin light chain directs endocytosis by influencing the binding of the yeast Hip1R homologue, Sla2, to F-actin. *Mol Biol Cell* **22**, 3699-3714.
- Bökel, C., Schwabedissen, A., Entchev, E., Renaud, O. and Gonzalez-Gaitan, M. (2006). Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis. *Science* **314**, 1135-1139.
- Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G. and Herzenberg, L. A. (1972). Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* **43**, 404-409.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301.
- Boyer, L., Robert, A., Proulx, C. and Pineault, N. (2008). Increased production of megakaryocytes near purity from cord blood CD34+ cells using a short two-phase culture system. *J Immunol Methods* **332**, 82-91.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braman, J., Papworth, C. and Greener, A. (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* **57**, 31-44.
- Brugsch, J., Kubowitz, F. and Tichter, E. (1953). [Demonstration of hemoglobin and stroma stain in erythrocytes during staining of blood smears according to Pappenheim]. *Z Gesamte Inn Med* **8**, 781-782.
- Brummendorf, T. H., Dragowska, W., Zijlmans, J., Thornbury, G. and Lansdorp, P. M. (1998). Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J Exp Med* **188**, 1117-1124.
- Bruno, E., Briddell, R. and Hoffman, R. (1988). Effect of recombinant and purified hematopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation. *Exp Hematol* **16**, 371-377.
- Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., Dane, A., Cavalloni, G., Sanavio, F., Fagioli, F., Aglietta, M. and Piacibello, W. (2003). In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* **88**, 379-387.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**, 467-480.
- Bucci, C., Wandinger-Ness, A., Lutcke, A., Chiariello, M., Bruni, C. B. and Zerial, M. (1994). Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5061-5065.
- Burgess, A. W., Nicola, N. A., Johnson, G. R. and Nice, E. C. (1982). Colony-forming cell proliferation: a rapid and sensitive assay system for murine granulocyte and macrophage colony-stimulating factors. *Blood* **60**, 1219-1223.
- Callaghan, J., Nixon, S., Bucci, C., Toh, B. H. and Stenmark, H. (1999). Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem* **265**, 361-366.
- Callejo, A., Biloni, A., Mollica, E., Gorfinkiel, N., Andres, G., Ibanez, C., Torroja, C., Doglio, L., Sierra, J. and Guerrero, I. (2011). Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the Drosophila wing disk epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12591-12598.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A. and Vega, M. A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2341-2349.
- Carney, D. S., Davies, B. A. and Horazdovsky, B. F. (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol* **16**, 27-35.
- Chatzistamatiou, T. K., Papassavas, A. C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., Panagouli, E., Koussoulakos, S. L. and Stavropoulos-Giokas, C. (2014). Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*.
- Chaudhary, P. M., Mechetner, E. B. and Roninson, I. B. (1992). Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* **80**, 2735-2739.
- Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. (1991). Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85-94.
- Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. (1993). Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* **85**, 632-639.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329.
- Chen, J. W., Pan, W., D'Souza, M. P. and August, J. T. (1985). Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. *Arch Biochem Biophys* **239**, 574-586.
- Chen, J. Y. and Huestis, W. H. (1997). Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1323**, 299-309.
- Chen, M. S., Obar, R. A., Schroeder, C. C., Austin, T. W., Poodry, C. A., Wadsworth, S. C. and Vallee, R. B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586.
- Chen, Q., Liu, W. Y., Zhao, Z., Xie, Y. and Han, B. S. (2013). [Expression and significance of Rab5a and APPL1 in breast cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **34**, 838-841.
- Chen, W., Feng, Y., Chen, D. and Wandinger-Ness, A. (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* **9**, 3241-3257.
- Chen, X. and Wang, Z. (2001). Regulation of intracellular trafficking of the EGF receptor by Rab5 in the absence of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *EMBO Rep* **2**, 68-74.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. and Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625.

- Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 2172-2175.
- Civin, C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., Duffy, B., Groenewegen, I., Wiley, J., Law, P., *et al.* (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* *14*, 2224-2233.
- Clark, B. S., Winter, M., Cohen, A. R. and Link, B. A. (2011). Generation of Rab-based transgenic lines for in vivo studies of endosome biology in zebrafish. *Dev Dyn* *240*, 2452-2465.
- Cogli, L., Progida, C., Lecci, R., Bramato, R., Kruttgen, A. and Bucci, C. (2007). CMT2B-associated Rab7 mutants inhibit neurite outgrowth. *Acta Neuropathol* *120*, 491-501.
- Cogli, L., Progida, C., Thomas, C. L., Spencer-Dene, B., Donno, C., Schiavo, G. and Bucci, C. (2013). Charcot-Marie-Tooth type 2B disease-causing RAB7A mutant proteins show altered interaction with the neuronal intermediate filament peripherin. *Acta Neuropathol* *125*, 257-272.
- Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A. and Eaves, C. (1997). Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9836-9841.
- Coumailleau, F., Furthauer, M., Knoblich, J. A. and Gonzalez-Gaitan, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature* *458*, 1051-1055.
- Coumailleau, F. and Gonzalez-Gaitan, M. (2008). From endocytosis to tumors through asymmetric cell division of stem cells. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 462-469.
- Cuesta-Geijo, M. A., Galindo, I., Hernaez, B., Quetglas, J. I., Dalmau-Mena, I. and Alonso, C. (2012). Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry. *PLoS One* *7*, e48853.
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* *6*, 23-28.
- Dai, Y. and Li, J. (1995). Evidence for thrombin-induced human platelet secretion regulated by the cytoskeleton. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* *28*, 236-240.
- Daukas, G. and Zigmond, S. H. (1985). Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* *101*, 1673-1679.
- Dausend, J., Musyanovych, A., Dass, M., Walther, P., Schrezenmeier, H., Landfester, K. and Mailander, V. (2008). Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromol Biosci* *8*, 1135-1143.
- Davies, P. J., Davies, D. R., Levitzki, A., Maxfield, F. R., Milhaud, P., Willingham, M. C. and Pastan, I. H. (1980). Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. *Nature* *283*, 162-167.
- De Filippi, L., Fournier, M., Cameroni, E., Linder, P., De Virgilio, C., Foti, M. and Deloche, O. (2007). Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells. *Curr Genet* *52*, 171-185.
- Deretic, V. (2005). Ay, there's the Rab: organelle maturation by Rab conversion. *Dev Cell* *9*, 446-448.
- Ding, L. and Morrison, S. J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* *495*, 231-235.
- Doherty, G. J. and McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* *78*, 857-902.
- Dorn, I., Lazar-Karsten, P., Boie, S., Ribbat, J., Hartwig, D., Driller, B., Kirchner, H. and Schlenke, P. (2008). In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion* *48*, 1122-1132.
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J. R., Begot, L., Holy, X. and Lataillade, J. J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* *205*, 228-236.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S. and Dick, J. E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* *11*, 585-593.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. and Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* *10*, 120-136.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* *7*, 379-387.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A. and Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* *9*, 61.
- Egami, Y. and Araki, N. (2009). Dynamic changes in the spatiotemporal localization of Rab21 in live RAW264 cells during macropinocytosis. *PLoS One* *4*, e6689.
- Egami, Y. and Araki, N. (2012). Rab20 regulates phagosome maturation in RAW264 macrophages during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *PLoS One* *7*, e35663.
- Egami, Y. and Araki, N. (2013). Spatiotemporal Localization of Rab20 in Live RAW264 Macrophages during Macropinocytosis. *Acta Histochem Cytochem* *45*, 317-323.
- Ehrig, T., O'Kane, D. J. and Prendergast, F. G. (1995). Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Lett* *367*, 163-166.
- Elferink, J. G. (1979). Chlorpromazine inhibits phagocytosis and exocytosis in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* *28*, 965-968.

- Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M. G. and Knoblich, J. A. (2005). Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* *122*, 763-773.
- Fader, C. M. and Colombo, M. I. (2006). Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* *2*, 122-125.
- Farnsworth, C. C., Seabra, M. C., Ericsson, L. H., Gelb, M. H. and Glomset, J. A. (1994). Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 11963-11967.
- Fekete, N., Rojewski, M. T., Furst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J. and Schrezenmeier, H. (2012). GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS One* *7*, e43255.
- Feliciano, W. D., Yoshida, S., Straight, S. W. and Swanson, J. A. (2011). Coordination of the Rab5 cycle on macropinosomes. *Traffic* *12*, 1911-1922.
- Feng, Y., Press, B., Chen, W., Zimmerman, J. and Wandinger-Ness, A. (2001). Expression and properties of Rab7 in endosome function. *Methods Enzymol* *329*, 175-187.
- Feng, Y., Press, B. and Wandinger-Ness, A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* *131*, 1435-1452.
- Fonseca, A. V., Bauer, N. and Corbeil, D. (2008). The stem cell marker CD133 meets the endosomal compartment--new insights into the cell division of hematopoietic stem cells. *Blood Cells Mol Dis* *41*, 194-195.
- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D. and Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* *31*, 285-316.
- Fukasawa, M., Nishijima, M., Itabe, H., Takano, T. and Hanada, K. (2000). Reduction of sphingomyelin level without accumulation of ceramide in Chinese hamster ovary cells affects detergent-resistant membrane domains and enhances cellular cholesterol efflux to methyl-beta -cyclodextrin. *J Biol Chem* *275*, 34028-34034.
- Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M. and Bhatia, M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* *95*, 2813-2820.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D. and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* *3*, 459-473.
- Gao, B., Curtis, T. M., Blumenstock, F. A., Minnear, F. L. and Saba, T. M. (2000). Increased recycling of (alpha)5(beta)1 integrins by lung endothelial cells in response to tumor necrosis factor. *J Cell Sci* *113 Pt 2*, 247-257.
- Gaullier, J. M., Ronning, E., Gillooly, D. J. and Stenmark, H. (2000). Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *J Biol Chem* *275*, 24595-24600.
- Gaullier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H. and Aasland, R. (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* *394*, 432-433.
- Giebel, B. (2008a). Cell polarity and asymmetric cell division within human hematopoietic stem and progenitor cells. *Cells Tissues Organs* *188*, 116-126.
- Giebel, B. (2008b). Selbsterneuerung versus Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.
- Giebel, B. and Beckmann, J. (2007). Asymmetric cell divisions of human hematopoietic stem and progenitor cells meet endosomes. *Cell Cycle* *6*, 2201-2204.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., Hohn, J., Freund, D., Giesen, K., Fischer, J., Kogler, G. and Wernet, P. (2004). Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* *104*, 2332-2338.
- Giebel, B., Zhang, T., Beckmann, J., Spanholtz, J., Wernet, P., Ho, A. D. and Punzel, M. (2006). Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* *107*, 2146-2152.
- Gillette, J. M., Larochelle, A., Dunbar, C. E. and Lippincott-Schwartz, J. (2009). Intercellular transfer to signalling endosomes regulates an ex vivo bone marrow niche. *Nat Cell Biol* *11*, 303-311.
- Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K. A., Rout, R., *et al.* (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *19*, 138-152.
- Görgens, A., Beckmann, J., Ludwig, A. K., Mollmann, M., Durig, J., Horn, P. A., Rajendran, L. and Giebel, B. (2012). Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* *44*, 1121-1132.
- Görgens, A. and Giebel, B. (2010). Self-Renewal of Primitive Hematopoietic Cells: A Focus on Asymmetric Cell Division. *Umbilical Cord Blood: A Future for Regenerative Medicine*, 51-68.
- Görgens, A., Radtke, S., Horn, P. A. and Giebel, B. (2013a). New relationships of human hematopoietic lineages facilitate detection of multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Cycle* *12*, 3478-3482.
- Görgens, A., Radtke, S., Mollmann, M., Cross, M., Durig, J., Horn, P. A. and Giebel, B. (2013b). Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages. *Cell Rep* *3*, 1539-1552.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* *64*, 915-925.

- Greenbaum, A., Hsu, Y. M., Day, R. B., Schuettpelez, L. G., Christopher, M. J., Borgerding, J. N., Nagasawa, T. and Link, D. C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227-230.
- Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1991). The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol* **1**, 5-9.
- Grote, E. and Novick, P. J. (1999). Promiscuity in Rab-SNARE interactions. *Mol Biol Cell* **10**, 4149-4161.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I. and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766.
- Hausding, M., Witteck, A., Rodriguez-Pascual, F., von Eichel-Streiber, C., Forstermann, U. and Kleinert, H. (2000). Inhibition of small G proteins of the rho family by statins or clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. *Br J Pharmacol* **131**, 553-561.
- Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A. K., Giebel, B., Lang, S. and Brandau, S. (2010). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **19**, 693-706.
- Hiraoka, K., Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Takaishi, K., Mizuno, T., Asada, M., Menard, L., Tomhave, E., Didsbury, J., *et al.* (1992). Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 921-930.
- Hjerten, S. (1961). Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* **53**, 514-517.
- Hoogenraad, C. C., Popa, I., Futai, K., Martinez-Sanchez, E., Wulf, P. S., van Vlijmen, T., Dortland, B. R., Oorschot, V., Govers, R., Monti, M., *et al.* (2010). Neuron specific Rab4 effector GRASP-1 coordinates membrane specialization and maturation of recycling endosomes. *PLoS Biol* **8**, e1000283.
- Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., *et al.* (1997). A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**, 1149-1159.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., *et al.* (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498-503.
- Huang, S., Chen, Z., Yu, J. F., Young, D., Bashey, A., Ho, A. D. and Law, P. (1999). Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues. *Stem Cells* **17**, 265-272.
- Huotari, J. and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500.
- Hyenne, V., Desrosiers, M. and Labbe, J. C. (2008). C. elegans Brat homologs regulate PAR protein-dependent polarity and asymmetric cell division. *Dev Biol* **321**, 368-378.
- Irie, T., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1992). Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro. *J Pharm Sci* **81**, 521-523.
- Iscove, N. N. and Nawa, K. (1997). Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol* **7**, 805-808.
- Ivanov, A. I. (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* **440**, 15-33.
- Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M. R., Boquet, P., Hegenbarth, S. and von Eichel-Streiber, C. (1994). Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* **269**, 10706-10712.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. and Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**, 500-503.
- Kalejta, R. F., Brideau, A. D., Banfield, B. W. and Beavis, A. J. (1999). An integral membrane green fluorescent protein marker, Us9-GFP, is quantitatively retained in cells during propidium iodide-based cell cycle analysis by flow cytometry. *Exp Cell Res* **248**, 322-328.
- Kang, J. H., Lee, G. S., Jeung, E. B. and Yang, M. P. (2009). Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid modulates phagocytic responses of canine peripheral blood polymorphonuclear neutrophilic leukocytes exposed to Clostridium difficile toxin B. *Vet Immunol Immunopathol* **130**, 178-186.
- Kannan, K., Stewart, R. M., Bounds, W., Carlsson, S. R., Fukuda, M., Betzing, K. W. and Holcombe, R. F. (1996). Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol* **171**, 10-19.
- Kawamoto, H., Wada, H. and Katsura, Y. (2010). A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol* **22**, 65-70.
- Khosravi-Far, R., Lutz, R. J., Cox, A. D., Conroy, L., Bourne, J. R., Sinensky, M., Balch, W. E., Buss, J. E. and Der, C. J. (1991). Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6264-6268.
- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Terhorst, C. and Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-1121.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* **270**, 17250-17256.

- Kim, J. A., Jung, Y. J., Seoh, J. Y., Woo, S. Y., Seo, J. S. and Kim, H. L. (2002). Gene expression profile of megakaryocytes from human cord blood CD34(+) cells ex vivo expanded by thrombopoietin. *Stem Cells* 20, 402-416.
- Kim, K., Lake, B. B., Harembaki, T., Weinstein, D. C. and Sokol, S. Y. (2012). Rab11 regulates planar polarity and migratory behavior of multiciliated cells in *Xenopus* embryonic epidermis. *Dev Dyn* 241, 1385-1395.
- Kiss, A. L. (2012). Caveolae and the regulation of endocytosis. *Adv Exp Med Biol* 729, 14-28.
- Klein, E., Ben-Bassat, H., Neumann, H., Ralph, P., Zeuthen, J., Polliack, A. and Vanky, F. (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18, 421-431.
- Kobayashi, M., Laver, J. H., Lyman, S. D., Kato, T., Miyazaki, H. and Ogawa, M. (1997). Thrombopoietin, steel factor and the ligand for flt3/flk2 interact to stimulate the proliferation of human hematopoietic progenitors in culture. *Int J Hematol* 66, 423-434.
- Kobayashi, T., Vischer, U. M., Rosnoble, C., Lebrand, C., Lindsay, M., Parton, R. G., Kruithof, E. K. and Gruenberg, J. (2000). The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 11, 1829-1843.
- Komada, M. and Soriano, P. (1999). Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev* 13, 1475-1485.
- Krauss, M. and Haucke, V. (2011). Shaping membranes for endocytosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 161, 45-66.
- Lachmann, J., Ungermann, C. and Engelbrecht-Vandre, S. (2011). Rab GTPases and tethering in the yeast endocytic pathway. *Small GTPases* 2, 182-186.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larkin, J. M., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Anderson, R. G. (1983). Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33, 273-285.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., *et al.* (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337.
- Lawe, D. C., Chawla, A., Merithew, E., Dumas, J., Carrington, W., Fogarty, K., Lifshitz, L., Tuft, R., Lambright, D. and Corvera, S. (2002). Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem* 277, 8611-8617.
- Lawe, D. C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D. and Corvera, S. (2000). The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem* 275, 3699-3705.
- Leary, A. G., Strauss, L. C., Civin, C. I. and Ogawa, M. (1985). Disparate differentiation in hemopoietic colonies derived from human paired progenitors. *Blood* 66, 327-332.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K. E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D. A., *et al.* (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14, 509-519.
- Li, G., Barbieri, M. A., Colombo, M. I. and Stahl, P. D. (1994). Structural features of the GTP-binding defective Rab5 mutants required for their inhibitory activity on endocytosis. *J Biol Chem* 269, 14631-14635.
- Li, G. and Stahl, P. D. (1993). Structure-function relationship of the small GTPase rab5. *J Biol Chem* 268, 24475-24480.
- Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., Cai, Y., Norberg, H. V., Zhang, T., Furuya, T., *et al.* (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 147, 223-234.
- Liu, J. P. and Robinson, P. J. (1995). Dynamin and endocytosis. *Endocr Rev* 16, 590-607.
- Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183, 1394-1395.
- Lozzio, B. B. and Lozzio, C. B. (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res* 3, 363-370.
- Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.
- Lu, L., Khan, S., Lencer, W. and Walker, W. A. (2005). Endocytosis of cholera toxin by human enterocytes is developmentally regulated. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G332-341.
- Luens, K. M., Travis, M. A., Chen, B. P., Hill, B. L., Scollay, R. and Murray, L. J. (1998). Thrombopoietin, kit ligand, and flk2/flt3 ligand together induce increased numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34+Thy-1+Lin- cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone. *Blood* 91, 1206-1215.
- Ma, Z., Wang, H., Wu, L., Zhui, L., Shi, W., Ma, D., Chen, Z. and Yu, B. (2010). RNAi-mediated Rab5a suppression inhibits proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Acta Cardiol* 65, 507-514.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839-850.
- Maeda, Y. and Kawamoto, T. (1986). Pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* cells. A possible implication of cytoskeletal actin for pinocytotic activity. *Exp Cell Res* 164, 516-526.
- Majeti, R., Park, C. Y. and Weissman, I. L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* 1, 635-645.

- Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K. and Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11872-11877.
- Maridonneau-Parini, I., Yang, C. Z., Bornens, M. and Goud, B. (1991). Increase in the expression of a family of small guanosine triphosphate-binding proteins, rab proteins, during induced phagocyte differentiation. *J Clin Invest* *87*, 901-907.
- Maruoka, N., Murata, T., Omata, N., Takashima, Y., Tanii, H., Yonekura, Y., Fujibayashi, Y. and Wada, Y. (2007). Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: a dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* *31*, 178-186.
- Mayani, H., Dragowska, W. and Lansdorp, P. M. (1993). Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines. *J Cell Physiol* *157*, 579-586.
- Mayorga, L. S., Diaz, R. and Stahl, P. D. (1988). Plasma membrane-derived vesicles containing receptor-ligand complexes are fusogenic with early endosomes in a cell-free system. *J Biol Chem* *263*, 17213-17216.
- McCaffrey, M. W., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., Drummond, F. and Bucci, C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett* *495*, 21-30.
- McCray, B. A., Skordalakes, E. and Taylor, J. P. (2010). Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Human Molecular Genetics* *19*, 1033-1047.
- Mebius, R. E., Miyamoto, T., Christensen, J., Domen, J., Cupedo, T., Weissman, I. L. and Akashi, K. (2001). The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45⁺CD4⁺CD3⁻ cells, as well as macrophages. *J Immunol* *166*, 6593-6601.
- Mills, I. G., Jones, A. T. and Clague, M. J. (1998). Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr Biol* *8*, 881-884.
- Miltenyi, S. (1997). CD34⁺ Selection: The Basic Component for Graft Engineering. *Oncologist* *2*, 410-413.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W. and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* *11*, 231-238.
- Moore, K. A., Ema, H. and Lemischka, I. R. (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* *89*, 4337-4347.
- Moore, R. H., Millman, E. E., Alpizar-Foster, E., Dai, W. and Knoll, B. J. (2004). Rab11 regulates the recycling and lysosome targeting of beta2-adrenergic receptors. *J Cell Sci* *117*, 3107-3117.
- Morlot, S., Galli, V., Klein, M., Chiaruttini, N., Manzi, J., Humbert, F., Dinis, L., Lenz, M., Cappello, G. and Roux, A. (2012). Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* *151*, 619-629.
- Morlot, S. and Roux, A. (2013). Mechanics of dynamin-mediated membrane fission. *Annu Rev Biophys* *42*, 629-649.
- Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Gould, T. J., Zhang, J., Bewersdorf, J. and Verkhusha, V. V. (2010). Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy. *Biophys J* *99*, L13-15.
- Morrison, S. J., Shah, N. M. and Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* *88*, 287-298.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* *155*, 335-350.
- Mustafi, S., Rivero, N., Olson, J. C., Stahl, P. D. and Barbieri, M. A. (2013). Regulation of Rab5 function during phagocytosis of live *Pseudomonas aeruginosa* in macrophages. *Infect Immun* *81*, 2426-2436.
- Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C. and Wickrema, A. (1994). Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest* *94*, 34-43.
- Nakahata, T. and Okumura, N. (1994). Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers. *Leuk Lymphoma* *13*, 401-409.
- Nicola, N. A. and Johnson, G. R. (1982). The production of committed hemopoietic colony-forming cells from multipotential precursor cells in vitro. *Blood* *60*, 1019-1029.
- Niemann, A., Baltes, J. and Elsasser, H. P. (2001). Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *J Histochem Cytochem* *49*, 177-185.
- Nolta, J. A., Thiemann, F. T., Arakawa-Hoyt, J., Dao, M. A., Barsky, L. W., Moore, K. A., Lemischka, I. R. and Crooks, G. M. (2002). The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. *Leukemia* *16*, 352-361.
- 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.
- Novick, P. and Brennwald, P. (1993). Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* *75*, 597-601.
- Ogawa, H., Ohta, N., Moon, W. and Matsuzaki, F. (2009). Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J Cell Sci* *122*, 3242-3249.
- Ogawa, M., Suda, T. and Suda, J. (1984). Differentiation and proliferative kinetics of hemopoietic stem cells in culture. *Prog Clin Biol Res* *148*, 35-43.

- Ogiso, T., Iwaki, M. and Mori, K. (1981). Fluidity of human erythrocyte membrane and effect of chlorpromazine on fluidity and phase separation of membrane. *Biochim Biophys Acta* *649*, 325-335.
- Ogris, M., Walker, G., Blessing, T., Kircheis, R., Wolschek, M. and Wagner, E. (2003). Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release* *91*, 173-181.
- Ohmizono, Y., Sakabe, H., Kimura, T., Tanimukai, S., Matsumura, T., Miyazaki, H., Lyman, S. D. and Sonoda, Y. (1997). Thrombopoietin augments ex vivo expansion of human cord blood-derived hematopoietic progenitors in combination with stem cell factor and flt3 ligand. *Leukemia* *11*, 524-530.
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K. and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* *33*, 387-399.
- Opdam, F. J., Kamps, G., Croes, H., van Bokhoven, H., Ginsel, L. A. and Fransen, J. A. (2000). Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarised intestinal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* *79*, 308-316.
- Ozdemir, O., Ravindranath, Y. and Savasan, S. (2003). Cell-mediated cytotoxicity evaluation using monoclonal antibody staining for target or effector cells with annexinV/propidium iodide colabeling by fluorosphere-adjusted counts on three-color flow cytometry. *Cytometry A* *56*, 53-60.
- Palmieri, D., Bouadis, A., Ronchetti, R., Merino, M. J. and Steeg, P. S. (2006). Rab11a differentially modulates epidermal growth factor-induced proliferation and motility in immortal breast cells. *Breast Cancer Res Treat* *100*, 127-137.
- Papini, E., Satin, B., Bucci, C., de Bernard, M., Telford, J. L., Manetti, R., Rappuoli, R., Zerial, M. and Montecucco, C. (1997). The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by Helicobacter pylori cytotoxin. *EMBO J* *16*, 15-24.
- Park, C. Y., Majeti, R. and Weissman, I. L. (2008). In vivo evaluation of human hematopoiesis through xenotransplantation of purified hematopoietic stem cells from umbilical cord blood. *Nat Protoc* *3*, 1932-1940.
- Parton, R. G., Schrotz, P., Bucci, C. and Gruenberg, J. (1992). Plasticity of early endosomes. *J Cell Sci* *103* (Pt 2), 335-348.
- Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamero, J. and Cherfils, J. (2004). The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J Biol Chem* *279*, 11480-11488.
- Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* *313*, 889-901.
- Petzer, A. L., Hogge, D. E., Landsdorp, P. M., Reid, D. S. and Eaves, C. J. (1996). Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1470-1474.
- Punzel, M., Gupta, P., Roodell, M., Mortari, F. and Verfaillie, C. M. (1999a). Factor(s) secreted by AFT024 fetal liver cells following stimulation with human cytokines are important for human LTC-IC growth. *Leukemia* *13*, 1079-1084.
- Punzel, M., Moore, K. A., Lemischka, I. R. and Verfaillie, C. M. (1999b). The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* *13*, 92-97.
- Punzel, M., Wissink, S. D., Miller, J. S., Moore, K. A., Lemischka, I. R. and Verfaillie, C. M. (1999c). The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *Blood* *93*, 3750-3756.
- Raiborg, C., Bache, K. G., Mehlum, A., Stang, E. and Stenmark, H. (2001a). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J* *20*, 5008-5021.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E. and Stenmark, H. (2001b). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* *114*, 2255-2263.
- Rajendran, L., Beckmann, J., Magenau, A., Boneberg, E. M., Gaus, K., Viola, A., Giebel, B. and Illges, H. (2009). Flotillins are involved in the polarization of primitive and mature hematopoietic cells. *PLoS One* *4*, e8290.
- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M. and Sabatini, D. D. (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6187-6192.
- Richel, D. J., Johnsen, H. E., Canon, J., Guillaume, T., Schaafsma, M. R., Schenkeveld, C., Hansen, S. W., McNiece, I., Gringeri, A. J., Briddell, R., *et al.* (2000). Highly purified CD34+ cells isolated using magnetically activated cell selection provide rapid engraftment following high-dose chemotherapy in breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* *25*, 243-249.
- Ridler, M. A. and Smith, G. F. (1968). The response of human cultured lymphocytes to cytochalasin B. *J Cell Sci* *3*, 595-602.
- Rikihisa, Y., Zhang, Y. and Park, J. (1994). Inhibition of infection of macrophages with Ehrlichia risticii by cytochalasins, monodansylcadaverine, and taxol. *Infect Immun* *62*, 5126-5132.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* *122*, 735-749.
- Roberts, R. L., Barbieri, M. A., Pryse, K. M., Chua, M., Morisaki, J. H. and Stahl, P. D. (1999). Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci* *112* (Pt 21), 3667-3675.

- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B. and Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* *10*, 961-974.
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J., Raposo, G., van der Sluijs, P. and Bonifacino, J. S. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* *183*, 513-526.
- Ropp, J. D., Donahue, C. J., Wolfgang-Kimball, D., Hooley, J. J., Chin, J. Y., Hoffman, R. A., Cuthbertson, R. A. and Bauer, K. D. (1995). Aequorea green fluorescent protein analysis by flow cytometry. *Cytometry* *21*, 309-317.
- Rosenfeld, J. L., Moore, R. H., Zimmer, K. P., Alpizar-Foster, E., Dai, W., Zarka, M. N. and Knoll, B. J. (2001). Lysosome proteins are redistributed during expression of a GTP-hydrolysis-defective rab5a. *J Cell Sci* *114*, 4499-4508.
- Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R. and Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* *275*, 3745-3748.
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M. C., Goody, R. and Zerial, M. (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* *383*, 266-269.
- Sanford, J. C., Pan, Y. and Wessling-Resnick, M. (1993). Prenylation of Rab5 is dependent on guanine nucleotide binding. *J Biol Chem* *268*, 23773-23776.
- Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. and Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* *6*, 131-143.
- Schmid, S. L., Fuchs, R., Male, P. and Mellman, I. (1988). Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* *52*, 73-83.
- Schnatwinkel, C., Christoforidis, S., Lindsay, M. R., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Parton, R. G. and Zerial, M. (2004). The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol* *2*, E261.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7-25.
- Seto, E. S. and Bellen, H. J. (2006). Internalization is required for proper Wingless signaling in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* *173*, 95-106.
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M. and Mellman, I. (1999). The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* *145*, 123-139.
- Shen, F. and Seabra, M. C. (1996). Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J Biol Chem* *271*, 3692-3698.
- Shigematsu, S., Watson, R. T., Khan, A. H. and Pessin, J. E. (2003). The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4. *J Biol Chem* *278*, 10683-10690.
- Shimizu, Y., Ogawa, M., Kobayashi, M., Almeida-Porada, G. and Zanjani, E. D. (1998). Engraftment of cultured human hematopoietic cells in sheep. *Blood* *91*, 3688-3692.
- Shogomori, H. and Futerman, A. H. (2001). Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin blocks cholera toxin transport from endosomes to the Golgi apparatus in hippocampal neurons. *J Neurochem* *78*, 991-999.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* *394*, 494-498.
- Simpson, J. C., Griffiths, G., Wessling-Resnick, M., Fransen, J. A., Bennett, H. and Jones, A. T. (2004). A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* *117*, 6297-6311.
- Simpson, J. C. and Jones, A. T. (2005). Early endocytic Rabs: functional prediction to functional characterization. *Biochem Soc Symp*, 99-108.
- Smart, E. J. and Anderson, R. G. (2002). Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* *353*, 131-139.
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R. R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J. E. and Sollner, T. (1994). A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* *78*, 937-948.
- Sonnichsen, B., De Renzi, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* *149*, 901-914.
- Stein, M. P., Feng, Y., Cooper, K. L., Welford, A. M. and Wandinger-Ness, A. (2003). Human VPS34 and p150 are Rab7 interacting partners. *Traffic* *4*, 754-771.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* *2*, REVIEWS3007.
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J. and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo J* *13*, 1287-1296.
- Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geuze, H. J., Oorschot, V. and Schwartz, A. L. (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* *65*, 417-427.
- Straley, K. S. and Green, S. A. (2000). Rapid transport of internalized P-selectin to late endosomes and the TGN: roles in regulating cell surface expression and recycling to secretory granules. *J Cell Biol* *151*, 107-116.

- Su, W. C., Chao, T. C., Huang, Y. L., Weng, S. C., Jeng, K. S. and Lai, M. M. Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. *J Virol* **85**, 10561-10571.
- Suda, J., Suda, T. and Ogawa, M. (1984a). Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors. *Blood* **64**, 393-399.
- Suda, T., Suda, J. and Ogawa, M. (1984b). Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2520-2524.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988.
- Suwalsky, M., Villena, F., Sotomayor, C. P., Bolognin, S. and Zatta, P. (2008). Human cells and cell membrane molecular models are affected in vitro by chlorpromazine. *Biophys Chem* **135**, 7-13.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. and Kawata, M. (1992). Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* **133**, 187-230.
- Teramura, M., Kobayashi, S., Hoshino, S., Oshimi, K. and Mizoguchi, H. (1992). Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* **79**, 327-331.
- Teramura, M. and Mizoguchi, H. (1992). [The effects of cytokines on colony formation of human megakaryocytes]. *Rinsho Ketsueki* **33**, 613-618.
- Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. and Loken, M. R. (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* **77**, 1218-1227.
- Thilo, L., Stroud, E. and Haylett, T. (1995). Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**, 1791-1803.
- Thoma, S. J., Lamping, C. P. and Ziegler, B. L. (1994). Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood* **83**, 2103-2114.
- Tjelle, T. E., Brech, A., Juvet, L. K., Griffiths, G. and Berg, T. (1996). Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci* **109 (Pt 12)**, 2905-2914.
- Tomiya, K., Murase, N., Stolz, D. B., Toyokawa, H., O'Donnell, D. R., Smith, D. M., Dudas, J. R., Rubin, J. P. and Marra, K. G. (2008). Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. *Stem Cells* **26**, 330-338.
- Torok-Storb, B., Deeg, H. J. and Storb, R. (1980). Functional subsets of peripheral blood mononuclear cells in transfused dogs separated by size with the fluorescence activated cell sorter. *Exp Hematol* **8**, 906-910.
- Tulapurkar, M. E., Schafer, R., Hanck, T., Flores, R. V., Weisman, G. A., Gonzalez, F. A. and Reiser, G. (2005). Endocytosis mechanism of P2Y2 nucleotide receptor tagged with green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1388-1399.
- Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C. and Zerial, M. (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. and Parton, R. G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* **135**, 913-924.
- Ungermann, C., Price, A. and Wickner, W. (2000). A new role for a SNARE protein as a regulator of the Ypt7/Rab-dependent stage of docking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8889-8891.
- Vallee, R. B., Herskovits, J. S., Aghajanian, J. G., Burgess, C. C. and Shpetner, H. S. (1993). Dynamin, a GTPase involved in the initial stages of endocytosis. *Ciba Found Symp* **176**, 185-193; discussion 193-187.
- van Beers, E. J., Samsel, L., Mendelsohn, L., Saiyed, R., Fertrin, K. Y., Brantner, C. A., Daniels, M. P., Nichols, J., McCoy, J. P. and Kato, G. J. (2014). Imaging flow cytometry for automated detection of hypoxia-induced erythrocyte shape change in sickle cell disease. *Am J Hematol* **89**, 598-603.
- van Deurs, B., Holm, P. K., Kayser, L., Sandvig, K. and Hansen, S. H. (1993). Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol* **61**, 208-224.
- van Meel, E. and Klumperman, J. (2008). Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol* **129**, 253-266.
- Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A. and Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* **272**, 13326-13331.
- Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C. B. and Bucci, C. (1997). Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem* **272**, 4391-4397.
- von Levetzow, G. (2008). Funktionelle Untersuchung der Zellschicksalsdeterminante numb. Dissertation im Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- von Levetzow, G., Spanholtz, J., Beckmann, J., Fischer, J., Kogler, G., Wernet, P., Punzel, M. and Giebel, B. (2006). Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* **15**, 278-285.
- Wang, J. and Liu, X. J. (2003). A G protein-coupled receptor kinase induces *Xenopus* oocyte maturation. *J Biol Chem* **278**, 15809-15814.
- Wang, L. H., Rothberg, K. G. and Anderson, R. G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**, 1107-1117.

-
- Wang, Q. Z., Lu, Y. H., Jiang, N., Diao, Y. and Xu, R. A. (2010). The asymmetric division and tumorigenesis of stem cells. *Chin J Cancer* 29, 248-253.
- Wang, T., Zhang, M., Ma, Z., Guo, K., Tergaonkar, V., Zeng, Q. and Hong, W. (2012). A role of Rab7 in stabilizing EGFR-Her2 and in sustaining Akt survival signal. *J Cell Physiol* 227, 2788-2797.
- Wegner, C. S., Malerod, L., Pedersen, N. M., Progida, C., Bakke, O., Stenmark, H. and Brech, A. (2010). Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochem Cell Biol* 133, 41-55.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J. and Watts, C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* 10, 839-848.
- Westermann, M., Steiniger, F. and Richter, W. (2005). Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its re-distribution after cholesterol depletion. *Histochem Cell Biol* 123, 613-620.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. and Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol* 151, 1207-1220.
- Winter, J. F., Hopfner, S., Korn, K., Farnung, B. O., Bradshaw, C. R., Marsico, G., Volkmer, M., Habermann, B. and Zerial, M. (2012). *Caenorhabditis elegans* screen reveals role of PAR-5 in RAB-11-recycling endosome positioning and apicobasal cell polarity. *Nat Cell Biol* 14, 666-676.
- Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T. and Knoblich, J. A. (2008). Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* 135, 161-173.
- Wodarz, A. (2005). Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol* 17, 475-481.
- Wodarz, A. and Huttner, W. B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* 120, 1297-1309.
- Wood, S. A., Park, J. E. and Brown, W. J. (1991). Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* 67, 591-600.
- Wu, P. S., Egger, B. and Brand, A. H. (2008). Asymmetric stem cell division: lessons from *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* 19, 283-293.
- Yao, D., Ehrlich, M., Henis, Y. I. and Leof, E. B. (2002). Transforming growth factor-beta receptors interact with AP2 by direct binding to beta2 subunit. *Mol Biol Cell* 13, 4001-4012.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- Zhang, J., Schulze, K. L., Hiesinger, P. R., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R. A., Bellen, H. J. and Scott, M. P. (2007). Thirty-one flavors of *Drosophila* rab proteins. *Genetics* 176, 1307-1322.
- Zhao, Z., Liu, X. F., Wu, H. C., Zou, S. B., Wang, J. Y., Ni, P. H., Chen, X. H. and Fan, Q. S. (2010). Rab5a overexpression promoting ovarian cancer cell proliferation may be associated with APPL1-related epidermal growth factor signaling pathway. *Cancer Sci* 101, 1454-1462.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet haben:

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Horn bedanken, der mir die Möglichkeit gab diese Doktorarbeit am Institut für Transfusionsmedizin anzufertigen und jederzeit für mich ansprechbar war. Nicht zuletzt durch die ausgezeichnete Ausstattung und Vernetzung des Institutes waren die hier durchgeführten Experimente realisierbar.

Im Weiteren geht ein besonderer Dank an PD Dr. Bernd Giebel, der mir in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit bot mich mit dieser so mannigfaltigen und interessanten Thematik im Rahmen meiner Dissertation zu beschäftigen. Danke für die Betreuung und die stetige Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit.

Vielen Dank an alle Ärzte, Schwestern und Hebammen der Frauenklinik, besonders Prof. Rainer Kimmig, für die stetige Versorgung mit Nabelschnurblut und Prof. Dietrich Beelen für die Bereitstellung von humanem Knochenmark.

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch besonders bei Prof. Helmut Hanenberg und seinem Mitarbeiter Marcel Freund für die Hilfe und der zur Verfügungstellung des in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Expressionssystems, sowie bei den Mitarbeitern des Instituts für Hämatologie für die Hilfe bei der Herstellung der Zytospinpräparationen.

Weiter möchte ich meinen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts aussprechen für die freundliche Zusammenarbeit über die Jahre. Im Besonderen einen Dank an Dr. Vera Rebmann und Dr. Hannes Klump für einige gute Tipps und hilfreiche Gespräche.

Ganz, ganz besonders möchte ich mich bei denen bedanken, die mit mir den Laboralltag geteilt haben: Liska, André, Sören und Stefan vielen Dank für die ganzen gemeinsamen Labortage und die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen. Ich werde mich immer gerne an unsere Diskussionen, Ideen und die Freude die wir gemeinsam im Labor hatten zurückerinnern.

Auch möchte ich mich bei den Mitstreitern und Ehemaligen bedanken mit denen ich zwar nur eine Teilstrecke gemeinsam beschritten habe, die aber meine Zeit und diese Arbeit maßgeblich bereichert haben. Hier geht ein Dank an Sandra Hornung

und Dr. Thorsten Döppner, die mir bei meinem wissenschaftlichen Seitenprojekt eine große Hilfe waren. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen und Freundinnen aus den Arbeitsgruppen von Dr. Hannes Klump, Dr. Stefan Heinrichs und Prof. Dr. Monika Lindemann: Corinna, Melanie, Nadine, Kristin, Antje und Tina. Ihr ward tolle Kollegen und Freunde während all der Jahre und habt schwierige Zeiten etwas einfacher gemacht. Vielen Dank dafür.

Nicht zu vergessen sind alle ehemaligen Kollegen und Studenten, die den Laboralltag etwas aufgewirbelt haben: Charlotte, Friederike, Markus, Johannes, Matt, Stefan, Ady, Nan, Mareike, Jan, Simon und alle die ich möglicherweise jetzt vergessen habe. Danke für die schönen Zeiten im Labor.

Zum Schluss möchte ich ganz besonders meiner Familie und meinen Freunden danken. Insbesondere Julia, Dani, Ulla und Jürgen, die immer und jederzeit für mich da waren. Danke an meine Eltern und meinen Bruder für all eure Geduld, Unterstützung und aufmunternden Worte an manchen Tagen.

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

Artikel

Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Jan;44(1):11-5.

Görgens A, Beckmann J, Ludwig AK, Möllmann M, Dürig J, Horn PA, Rajendran L, Giebel B. Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Jul;44(7):1121-32.

Doepfner TR, Ewert TA, Tönges L, Herz J, Zechariah A, ElAli A, Ludwig AK, Giebel B, Nagel F, Dietz GP, Weise J, Hermann DM, Bähr M. Transduction of neural precursor cells with TAT-heat shock protein 70 chaperone: therapeutic potential against ischemic stroke after intrastriatal and systemic transplantation. Stem Cells. 2012 Jun;30(6):1297-310.

Ludwig AK, Sokolova V, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, Giebel B. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011 Oct 1;87(1):146-50.

Hemeda H, Jakob M, Ludwig AK, Giebel B, Lang S, Brandau S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2010 May;19(5):693-706.

Kongressbeiträge

Vorträge

- 2012 „Exosomen: Ein neuer Ansatz in der Zelltherapie“; 16. Jahrestagung der IGLD in Essen
- 2011 „Endosomale Maschinerie in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen“; 44. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI) in Hannover
- 2008 „The annexin-homologous $\alpha 19$ -giardin contains a myristoylation site and is localized to the ventral flagella pair of *Giardia lamblia*“; Deutsche Gesellschaft für Parasitologie (DGP) 23. Jahrestagung in Hamburg

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math. Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchung des Einflusses von Rab-GTPasen und Endozytose-Inhibitoren auf die Zellbiologie und Zellschicksalsspezifikation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anna-Kristin Ludwig befürworte.

Essen, den _____

(PD Dr. rer.nat. Bernd Giebel)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

(Anna-Kristin Ludwig)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

(Anna-Kristin Ludwig)