

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Molekulares Profiling des hämatopoetischen Supports
Interleukin stimulierter Endothelzellen“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gürkan Bal

aus Trabzon, Türkei

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Salama
2. Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski
3. Prof. Dr. R. Lauster

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung der Publikationen	1
Abstract	1
Einleitung	2
Material und Methoden	3
Ergebnisse	6
Diskussion	10
Referenzen	14
Zugrundeliegende Publikationen und Anteilserklärung	15
Druckexemplare der ausgewählte Publikationen	16
Publikation 1	16
Moldenhauer A, Genter G, Lun A, Bal G , Kiesewetter H, Salama A. <i>Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors</i> . BMC Immunol. 2008 Oct 1;9:56.	
Publikation 2	30
Bal G , Kamhieh-Milz J, Futschik M, Haupl T, Salama A, Moldenhauer A. <i>Transcriptional profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)</i> . Cell Transplant. 2011 Jun 7	
Publikation 3	70
Moldenhauer A, Futschik M, Lu H, Helmig M, Götze P, Bal G , Zenke M, Han W, Salama A. <i>Interleukin 32 promotes hematopoietic progenitor expansion and attenuates bone marrow cytotoxicity</i> . Eur J Immunol. 2011 Jun;41(6):1774-86.	
Lebenslauf	84
Publikationsliste	85
Selbständigkeitserklärung	86
Danksagung	87

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Tumormedizin

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Zusammenfassung

„Molekulares Profiling des hämatopoetischen Supports

Interleukin-stimulierter Endothelzellen“

Gürkan Bal

Abstract

Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) werden zunehmend zur Behandlung zahlreicher maligner und nicht-maligner hämatopoetischer Erkrankungen eingesetzt. Zu den wichtigsten Einschränkungen derartiger Behandlungen zählen u.a. die häufig geringe Zahl verfügbarer Zellen sowie das unzureichende Engraftment transplantierte Zellen. Ziel dieser Arbeit war es, den bekannten hämatopoetischen Nutzen von Endothelzellen (EC) durch bestimmte Modifikationen zu verbessern, sowie neue hämatopoetische Wachstumsfaktoren mithilfe der genomweiten Genexpressionsanalyse zu identifizieren. Um den hämatopoetischen Support von EC zu erhöhen, wurden die EC mit unterschiedlichen Konzentrationen von Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-3 und IL-6 stimuliert. Die Interaktion zwischen EC und HSPC wurde mit drei unterschiedlichen Systemen (direkter, indirekter Zellkontakt sowie ohne Zellkontakt) und mit Hilfe der klassischen Stammzellfunktionsassays untersucht. Durch die IL-1 β und die IL-3 Stimulation von EC konnte in allen drei Systemen eine deutliche Steigerung des hämatopoetischen Support nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte weiter gesteigert werden, wenn die HSPC von den EC getrennt kultiviert wurden und deren Zellkulturüberstände eingesetzt wurden. Durch die Genexpressionsanalyse IL-stimulierter EC sowie durch den Einsatz komplexer Stammzellfunktionsassays konnten neue proteinogene (IL-32, Gro-1, OPG) sowie nicht-proteinogene (PGE2 und NO/Spermidine) hämatopoetische Wachstumsfaktoren identifiziert werden. Die Zellkulturüberstände IL-stimulierter humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurrvene (HUVEC) stellen für die *ex vivo* Expansion von Stammzellen bessere Kulturbedingungen dar, als Zytokin supplementierte Flüssigkulturen sowie bereits beschriebene Kokultursysteme, die ebenfalls EC als Feederzellen nutzen.

Einleitung

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) sind durch ihre Fähigkeit definiert, sich selbst zu regenerieren und sich in alle Zelltypen des blutbildenden Systems zu entwickeln. Sie bilden die Grundlage der Zelltherapie zur Behandlung zahlreicher maligner und nicht-maligner hämatopoetischer Erkrankungen.^{1,2} Darüber hinaus stellen sie ein vielversprechendes Ziel der Gentherapie dar, wodurch möglicherweise eine Vielzahl von Krankheiten behandelt werden könnte.³ Zu den wichtigsten Einschränkungen derartiger Behandlungen zählen u.a. die häufig geringe Anzahl verfügbarer Zellen sowie das unzureichende Engraftment transplantierte Stammzellen.⁴

Die experimentellen *ex vivo* Kultivierungen von HSPC dienen als Basis zur Erfindung weiterer Maßnahmen zur Steigerung der Zellzahl und des Engraftmentpotenzials der zu transplantierte Stammzellen. In diesem Zusammenhang ist die Kokultur mit Feederzellen ein vielversprechendes Werkzeug. Zahlreiche Zelltypen wurden bereits untersucht, einschließlich der mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark⁵, Wharton's-jelly-Zellen (WJC) aus dem Bindegewebe der Nabelschnur⁶, Endothelzellen (EC) aus dem Schweine⁷- und menschlichen Gehirn⁸, sowie Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC).⁹ HUVEC sind dafür bekannt, zahlreiche Zytokine zu produzieren, die bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen spielen.⁸⁻¹² Dazu gehören u.a. G-CSF, Interleukin-1 (IL-1), IL-3, IL-6, IL-11, Leukämie hemmender Faktor (LIF), Stem Cell Factor (SCF) sowie basische Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (bFGF).

In der hämatopoetischen Nische spielen Endothelzellen (EC) eine wichtige Rolle bei der Regulation der hämatopoetischen Zellproliferation sowie bei der Zellwanderung.^{10,12-14} Die Sekretion hämatopoetischer Faktoren durch EC und/oder der direkte zelluläre Kontakt, kann zur Aufrechterhaltung der Progenitorzellen und Stammzellen beitragen. EC können erfolgreich zur Erhaltung und Erhöhung der Zahl primitiver HSPC *in vitro* eingesetzt werden.¹⁵ Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass die Kokultur von HSPC mit EC als Feederzellen in Zellkontaktsystemen gegenüber der Zytokin-supplementierten Flüssigkulturen deutlich überlegen sind.¹⁶ Allerdings ist die *ex vivo* Expansion der HSPC durch die bislang beschriebenen Verfahren für Stammzelltransplantationen unzureichend, sodass weitere Optimierungen notwendig sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den hämatopoetischen Support von HUVEC durch die proinflammatorische Zytokine IL-1 β , IL-3 und IL-6 weiter zu steigern. Durch die Änderung des Aktivierungsgrades der HUVEC sollten diese zur Produktion weiterer hämatopoetischer Faktoren stimuliert werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss des direkten-, des indirekten Zellkontakt sowie die Effekt der Zellkulturüberstände IL-stimulierter HUVEC untersucht werden. Diesbezüglich sollten die klassische Stammzellfunktionsassays (Delta-Assay, Methylzellulose-Assay und Cobblestone-Assay) angewendet werden. Um die Interaktionen zwischen EC und HSPC zu entschlüsseln und weitere bislang unbekannte lösliche hämatopoetische Faktoren zu identifizieren, sollte ein genomweites Genexpressionsprofiling IL-stimulierter EC durchgeführt werden. Der Einfluss neu identifizierter Faktoren sollte anschließend auf die HSPC Proliferation und Differenzierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie sowie mit Stammzellfunktionsassays charakterisiert werden.

Material und Methoden

Isolation und Zellkultur von HUVEC

HUVECs wurden aus frischen Nabelschnüren mit 0.1 % Collagenase (Sigma-Aldrich, Deutschland) abgelöst und isoliert. Die Zellen wurden im Endothelzell-Vollmedium (EC-VM) kultiviert. (*siehe erste Publikation*)

Isolation von CD34+ HSPC

CD34 positive HSPCs wurden aus dem frischem Nabelschnurblut isoliert. Dabei wurden zuerst periphere mononukleare Zellen (PBMC) mithilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und anschließend mittels magnetischen Anti-CD34-Antikörper-Bead-Komplexes und der magnetischen Zellsortierung (MACS) isoliert. Die Reinheit wurde mithilfe der Durchflusszytometrie unter Verwendung von Anti-CD34-FITC, Anti-CD45-PE und den entsprechenden Isotypkontrollen überprüft. Für die weitere Kultivierung der HSPCs wurde ein Stammzell-Vollmedium (SZ-VM) angewendet. (*siehe erste Publikation*)

HSPC und EC-Zellkultursysteme

Erste Pilotexperimente umfassten Kokulturen von 10^4 bis 10^5 HSPCs mit IL-stimulierten konfluenten HUVEC entweder direkt oder indirekt auf $0.4 \mu\text{m}$ mikroporösen Transmembranen. Für den Ansatz mit den Zellkulturüberständen (ZKÜ) wurden 10^4 bis 10^5 HSPCs in 1.5 mL SC-VM in einer 6-Well-Platte vorgelegt und mit 1.5 mL (1:2) der

jeweiligen Zellkulturüberstände inkubiert. Zur Herstellung der ZKÜ wurden konfluente HUVECs der dritten Passage mit unterschiedlichen Konzentrationen von Interleukinen (1-, 10-, 100-, 1 000, 10 000 U/mL) und über eine Zeitreihe von 0, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 Stunden stimuliert. (*siehe erste Publikation*)

Stimulation von HUVECs mit Interleukinen

Für die Mikroarray-Analyse wurden konfluente HUVECs der dritten Passage von insgesamt sieben biologischen Replikaten mit je 100 U/mL IL-1 β -, IL-3- oder IL-6-Stimulationen stimuliert. Die Stimulation für das Mikroarray erfolgte über die Zeitreihe von 0, 4, 8, 16 und 48 Stunden. Als Negativkontrolle wurden HUVECs mit 0.1 % BSA in PBS stimuliert. (*siehe zweite Publikation*)

Mikroarray

Total-RNA von insgesamt 126 Proben wurde mithilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits (Qiagen, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers isoliert und mit dem Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) quantifiziert. Die Qualitätskontrolle erfolgte mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Germany). Um die biologische Varianz zu minimieren, wurden die RNA-Proben anschließend zu 18 Pools zusammengefügt, wobei jeder Pool aus einem Stimulanz und einem Zeitpunkt der 7 biologischen Replikate bestand. Für die Mikroarray-Analyse wurden genomweite HG-U133-plus-2.0-Mikroarrays verwendet (Affymetrix, Santa Clara, USA). Dabei wurde aus 2 μ g Total-RNA vom jeweiligen Pool cRNA synthetisiert. Nach der Hybridisierung auf dem Mikroarray-Chip mit 10 μ g fragmentierter cRNA für 16 Stunden wurde diese mit dem Gene Array Scanner ausgelesen. Unter Verwendung der Affymetrix GCOS 1.4 Software wurden die ausgelesenen Rohdaten nach der MAS5.0-Normalisationsmethode prozessiert. (*siehe zweite Publikation*)

Bioinformatische Auswertung

Für die Mikroarray-Analysen wurden die Fluoreszenzintensitäten der IL-1 β , IL-3, IL-6 sowie der Kontrollkonditionen mithilfe einer Reihe von BioConductor-R-Paketen verglichen. Dabei wurden die Algorithmen „locally pooled error estimate“ (LPE) und „fuzzy c-means clustering“ angewendet, um die differenziell exprimierten Gene zu identifizieren. Des Weiteren erfolgten klassische Gen-Ontologie-Analysen (GO-Analysen) sowie eine KEGG-Pathway-Analyse. Die metabolische Pathway-Analyse wurde mit PathExpress durchgeführt. (*siehe zweite Publikation*)

Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit Taqman Gene Expression Assay

Quantitative Genexpressionsanalysen (Real-Time, RT-PCR) der ausgewählten, differenziell exprimierten Gene wurden mithilfe des Taqman Gene Expression Assays durchgeführt. Dabei wurde zuerst die isolierte RNA mithilfe der High Capacity RNA-to-cDNA Kits (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Damit die Expressionswerte in alle Proben normalisiert werden können, wurden relative Expressionslevel zu einem Housekeeping-Gen (β -Microglobulin, β -2M) ins Verhältnis gesetzt. Relative Genexpressionen wurden als „Fold-Change“ zur Negativkontrolle ins Verhältnis gesetzt. *(siehe zweite und dritte Publikation)*

Funktionelle Analyse potenzieller hämatopoetischer Wachstumsfaktoren

Potenzielle Wachstumsfaktoren wurden mittels „Sequential Dilution Assays“ (Delta Assay) für drei bzw. vier Wochen auf ihr Expansionspotenzial untersucht. Dazu wurden 2×10^4 CD34+ HSPC in SC-VM mit oder ohne potenzielle Wachstumsfaktoren kultiviert. Jeweils 1-, 10- oder 100 ng/mL der jeweiligen potenziellen Wachstumsfaktoren wurden entweder in An- bzw. Abwesenheit von 20 ng/mL SCF untersucht. Die Zellzahlbestimmung erfolgte wöchentlich, wobei im Anschluss jeweils 10^4 der expandierten HSPCs mit der ursprünglichen Konzentration rekultiviert wurden. Die Morphologie der Zellen wurde wöchentlich mit der Diff-Quick-Färbung untersucht. Expandierte Zellen konnten unter Verwendung der Durchflusszytometrie auf CD34- und CD45-Oberflächenmarker untersucht werden. Weitere im Rahmen dieser Dissertation genutzte Antikörper sind: CD14, CD15, CD16, CD19, CD33, CD34, CD45, CD66 und CD133. *(siehe erste, zweite und dritte Publikation)*

Bestimmung der Klonogenität mit Methylzellulose-Assay

Die Differenzierungskapazität expandierter HSPCs wurde durch das Aussäen von ca. 1×10^3 CD34+ HSPCs in 1 mL Methylcellulose (Stem cell Technologies, Vancouver, BC) ermittelt, welches vorher mit 30 % FBS, 20 ng/mL SCF, 20 ng/mL IL-3, 6 U/mL Erythropoietin (Roche, Deutschland) und 100 ng/mL Granulozyten-Makrophagen-Colony-Stimulationsfaktoren (GM-CSF, Peprotech) supplementiert wurde. Nach 14 Tagen wurden die Methylzellulose-Platten hinsichtlich der Granulozyten-Makrophagen-Colony-Forming-Units (CFU-GM), der gemischten Colony Forming Units (CFU-Mix) und der Burst Forming Units - Erythrocyte (BFU-E) quantitativ erfasst. Die „Plating Efficiency“ (PE) repräsentiert die Anzahl der Kolonien, die auf eine einzige Zelle zurückgeführt werden kann. Jedes Experiment wurde als Tripletts angesetzt und drei Mal wiederholt. *(siehe erste, zweite und dritte Publikation)*

Bestimmung der BM-Rekonstitutionskapazität mit Cobblestone-Assay (CAFC Assay)

Der CAFC Assay wurde mit frisch isolierten und/oder expandierten HSPCs auf konfluenten Stromazellen (MS-5) des murinen Knochenmarks in 12.5 cm² Kulturflaschen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen wöchentlich mit α -MEM Medium (12.5 % Pferdeserum, 12.5 % FBS, 10⁻⁵ M Hydrokortison, 2 mM L-Glutamin, 50 μ g/mL Gentamycine) demi-depopuliert. Cobblestone-Kolonien wurden nach zwei und fünf Wochen mithilfe eines inversen Phasenmikroskops ausgezählt. (*siehe erste, zweite und dritte Publikation*)

Ergebnisse

Expansionseffekt IL-stimulierter HUVEC auf HSPC (*Publikation I*)

Die Untersuchung des Expansionseffekts und der Interaktion zwischen EC und HSPC erfolgte in drei unterschiedlichen Zellkultursystemen: mit dem direkten sowie indirekten Zellkontakt und über Zellkulturüberstände (kein Zellkontakt). Die Untersuchung erfolgte über eine Zeit- und Konzentrationsreihe. Die stärksten Expansionsraten und somit die optimalen Kulturbedingungen wurden nach 16 Stunden Stimulation mit jeweils 100 U/mL IL-1 β , IL-3 oder IL-6 bei den Zellkulturüberständen (ZKÜ) festgestellt. Die Expansionsraten der mit ZKÜ kultivierten HSPC sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Zugabe von Interleukinen zu unstimulierten Zellkulturüberständen (Add-Back-Kontroll-Experiment) zeigte hingegen signifikant geringere Expansionsraten.

Tabelle 1: Expansionsrate der mit Interleukin-stimulierten EC-Überständen kultivierten HSPC

	<i>Nach 7 Tagen</i>	<i>Nach 14 Tagen</i>
Unstimuliert	1.2 \pm 0.13	6.4 \pm 1.2
0.1 %BSA Kontrolle	1.3 \pm 0.17	6.8 \pm 1.6
IL-1β (100 U/mL)	15.8 \pm 2.5 ^{a,b}	136.8 \pm 23.3 ^{a,b}
IL-3 (100 U/mL)	15.5 \pm 1.6 ^{a,b}	82.9 \pm 14.5 ^{a,b}
IL-6 (100 U/mL)	1.2 \pm 0.22	5.2 \pm 1.2

a: signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle (p < 0.05), b: signifikanter Unterschied zur 0.1 % BSA-Kontrolle (p < 0.05)

Charakterisierung der expandierten HSPC (Publikation I)

Die expandierten HSPC wurden durch Durchflusszytometrie, morphologisch mit Cytospin sowie mithilfe von Stammzellfunktionsassays charakterisiert.

Durchflusszytometrisch waren mehr als 93 % der frisch isolierten HSPC CD34-, CD33- und CD45-positiv. CD33 und CD45 blieben bei allen Expansionsansätzen erhalten. Der Stammzellcharakter ging jedoch mit dem Verlust von CD34 über die Expansionszeit von sieben Tagen bei IL-1 β und bei IL-3 vollständig verloren. 34.8 ± 6.7 % der unstimulierten und der BSA-Kontrolle sowie die ZKÜ von IL-6-stimulierten EC waren CD133-positiv. 17.7 ± 5.2 % der mit den IL-6 stimulierten EC-ZKÜ expandierten HSPC waren CD34-positiv. Die Hälfte der mit IL-1 β stimulierten EC-ZKÜ expandierten Zellen waren CD16+ und 15.25 % exprimierten den Monozytenmarker CD14 auf ihrer Oberfläche.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse decken sich mit dem morphologischen Erscheinungsbild expandierter HSPC. Bei IL-1 β und IL-3 wurde eine Differenzierung in Richtung Makrophagen- und Granulozytenvorläuferzellen festgestellt, bei IL-3 sogar mit eosinophiler Granula. HSPCs, die mit IL-6-stimulierten EC-ZKÜ expandiert wurden, sahen zum Teil wie frisch isolierte aus, mit runden Nuklei und geringem zytoplasmatischen Inhalt.

Im Methylzellulose-Assay konnten bei der mit IL-1 β stimulierten EC-ZKÜ expandierte Zellen eine konzentrationsabhängige signifikante Vermehrung von BFU-E-Kolonien festgestellt werden. Die Anzahl von CFU-GM und CFU-mix war mit den Stammzellen vergleichbar, die direkt nach der Isolation angesetzt wurden. IL-1 β und IL-3 zeigten eine signifikante Minderung der Plating Effizienz bei einer Konzentration von jeweils 1.000 U/mL. IL-3 zeigte jedoch die höchste Anzahl von BFU-E und CFU-mix im Vergleich zur Menge direkt nach der Isolation. Bei IL-6 konnte hingegen im Vergleich zu allen anderen Konditionen die höchste PE festgestellt werden. Sie war sogar größer als bei frisch isolierten Zellen ($p = 0.002$). Die Anzahl von BFU-E und CFU-GM war gegenüber frisch isolierten Zellen jedoch nicht signifikant verändert.

Im Cobblestone-Assay (CAFC) konnte die höchste Zahl von Cobblestone-Kolonien nach zwei Wochen bei HSPCs festgestellt werden, die mit den IL-1 β -stimulierten EC-ZKÜ kultiviert wurden. Bei einer supraphysiologischen Konzentration von 10 000 U/mL IL-1 β wurden vier Mal mehr Cobblestone-Kolonien gebildet als bei frisch isolierten Zellen. Bei allen anderen Konzentrationen von IL-1 β zeigten die Cobblestone-Kolonien mit denen von frisch isolierten Zellen vergleichbare Anzahlen. Die höchste Cobblestone-Koloniezahl wurde

nach fünf Wochen bei IL-6-Konditionen sowie bei den unstimulierten und BSA-stimulierten Kontrollen beobachtet, was ein Parameter für undifferenzierte Vorläuferzellen ist. Die Durchschnittswerte lagen jedoch leicht unter der Anzahl frisch isolierter HSPCs.

Genomweite Genexpressionsanalyse IL-stimulierter HUVEC (Publikation II)

EC wurden mit jeweils 100 U/mL IL-1 β , IL-3, IL-6 bzw. mit 0.1 % BSA als Negativkontrolle über eine Zeitreihe von 4 bis 48 Stunden stimuliert. Die Identifizierung differenziell exprimierter Gene erfolgte durch die Relation zur BSA-Kontrolle für jeden Zeitpunkt.

Die GO-Analyse ergab für **IL-1 β** -stimulierte EC eine Anreicherung der hochregulierten Gene in den Kategorien der „Zelldifferenzierung“, der „Zellproliferation“ und in den „Entwicklungsprozessen“. Die Analyse der KEGG-Signalwege ergab, dass eine Vielzahl an Genen überrepräsentativ in den Kategorien der „Signalprozesse“, der „Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktionen“, der „hämatopoetische Zellabstammung“, dem „JAK/STAT-Signalwegen“, der „Apoptose“ und der „Toll-like-Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden“ assoziiert sind. Darüber hinaus wurden auch die bereits bekannten hämatopoetischen Faktoren wie z.B. SCF, GM-CSF, G-CSF und LIF identifiziert. Durch die metabolische Pathwayanalyse der hochregulierten Gene konnten wir den „Arachidonsäure-Metabolismus“ als stark signifikant identifizieren ($p = 5.51 \times 10^{-13}$). Das Hauptprodukt dieses Pathways ist Prostaglandin E2. Durch die metabolische Pathwayanalyse der herunterregulierten Gene konnte der „Arginin- und Prolin-Metabolismus“ signifikant identifiziert werden ($p = 0.0084$).

Bei **IL-3** konnten 396 hochregulierte Gene gefunden werden. Eine signifikante Anreicherung in einer bestimmten GO-Kategorie der hochregulierten Gene konnte nur für die „Extrazelluläre Matrix-Rezeptor-Interaktionen“ festgestellt werden ($p = 0.0082$). Eine metabolische Pathway-Analyse der hoch- oder herunterregulierten Gene ergab keine signifikanten Resultate.

IL-6-stimulierte HUVEC zeigten im Vergleich zu IL-1 β und IL-3 die geringsten Expressionsänderungen. Die GO-Analyse der hochregulierten Gene ergab eine Häufung in den Kategorien der „positiven Regulation der Transkription“ sowie der „Regulation der Transkription durch RNA-Polymerase-II-Promotoren“, wobei herunter regulierte Gene in den Kategorien der „Entwicklungsprozesse“ sowie der „Stressantwort“ eingeordnet wurden. Die metabolische Pathwayanalyse bei den herunter regulierten Genen ergab nur einen signifikanten Pathway (gamma-Hexachlorocyclohexan-Degradation, $p = 0.0041$).

Vergleichsanalyse differenziell exprimierter Gene von IL-1 β -, IL-3- und IL-6-stimulierten EC (*Publikation II*)

Um Gene zu identifizieren, die für dem nachweislich hämatopoetischen Support IL-stimulierter HUVEC verantwortlich sind, wurden die differenziell exprimierten Gene mithilfe der Venn-Analyse untersucht (Abb.1). Dabei konnten 24 Gene identifiziert werden, die ausschließlich in IL-1 β und IL-3 hochreguliert sind, sowie 14 Gene, die ausschließlich in IL-1 β und IL-3 herunterreguliert sind. Von besonderem Interesse sind CCL2, miRNA-21, MLLT-4, Sulfatase1, Thrombospondin 1, TNFSF-10 und ETS1, deren Funktionen im Zusammenhang mit HSPC weitestgehend unbekannt sind.

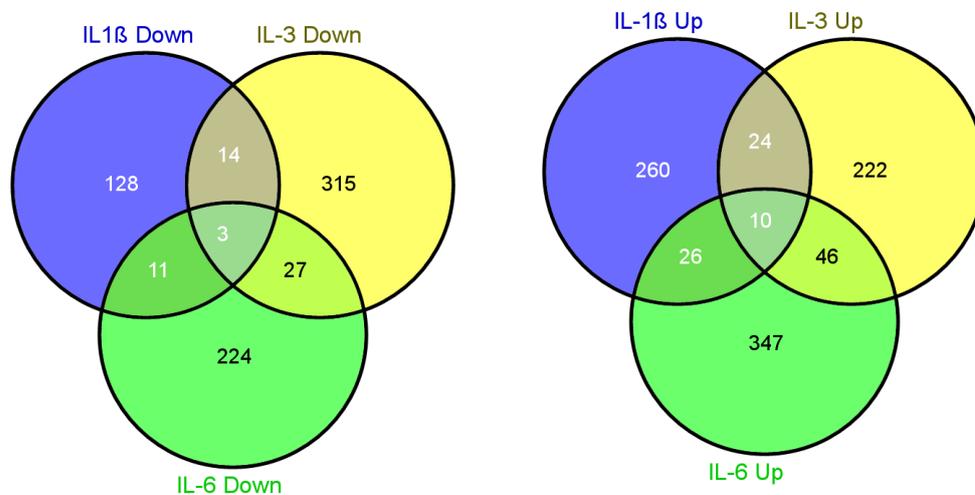


Abbildung 1: Venn-Analyse von IL-1 β -, IL-3- und IL-6 hoch- und herunterregulierten Genen

Funktionelle Analyse potenzieller hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (*Publikationen II und III*)

Anhand der Mikroarray-Analyse und deren GO-Analysen konnte eine Reihe von Faktoren identifiziert werden. Von diesen wurden 13 Faktoren auf ihr hämatopoetisches Potenzial funktionell analysiert. Proteinogene Faktoren sind Gro 1-3, Osteoprotegerin (OPG), IL-32, GCP-2, IL-8, ENA-78, CCL2, CCL20, FGF-18, nicht-proteinogene Faktoren sind Prostaglandin E2 (PGE2) und Stickstoffmonoxid (NO). Die differenzielle Genexpression aller Faktoren bzw. der verantwortlichen Enzyme für die Metabolite konnte mithilfe der TaqMan Real Time PCR validiert werden.

Die Faktoren *GCP-2*, *ENA-78*, *CCL2*, *CCL20* und *FGF-18* zeigten keine signifikante HSPC-Expansion im Delta-Assay, wobei IL-8 die SCF-induzierte Proliferation signifikant inhibierte. *OPG*, *Gro 3* sowie *IL-32* zeigten abhängig von der An- und/oder Abwesenheit von SCF einen signifikanten konzentrationsabhängigen HSPC-Expansionseffekt.

Der proliferative Effekt von **PGE2 und NO** auf HSPC wurde ebenfalls via Delta-Assay untersucht. Beide Konzentrationen von PGE2 (10 ng/mL und 100 ng/mL) zeigten ab der zweiten Woche eine signifikante expansionsfördernde Eigenschaft in Abwesenheit von SCF ($p = 0.006$ und $p = 0.001$) Hingegen konnte in Anwesenheit von SCF nur bei der niedrigeren Konzentration eine Expansion festgestellt werden ($p = 0.037$). 100 ng/mL NO in Abwesenheit von SCF zeigten bereits in der ersten Woche eine Expansion ($p = 0.047$), jedoch nicht in der zweiten Woche. Beide Konzentrationen (10 ng/mL und 100 ng/mL) von NO mit SCF zeigten deutlich eine Expansion in der ersten Woche ($p = 0.029$ und $p = 0.005$), nicht jedoch nach zwei Wochen.

Durchflusszytometrisch wiesen die mit PGE2 und NO expandierten HSPC keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle hinsichtlich CD34 und CD45 auf. NO-expandierte Zellen weisen im Methylzellulose-Assay keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle auf. PGE2-expandierte (10 ng/mL) Zellen mit 20 ng/mL SCF erhöhten die Anzahl von Cobblestone-Kolonien nach zwei und fünf Wochen signifikant ($p = 0.012$ und $p = 0.013$), wobei 10 ng/mL NO hingegen die Anzahl von CAFC signifikant minderte ($p = 0.025$).

Diskussion

Endothelzellen sind Teil der hämatopoetischen Nische des Knochenmarks, interferieren mit den Stammzellen und regulieren ihre Proliferation und Differenzierung *in vivo*.^{10,14} *Ex vivo* Kultivierungstechniken können dazu verwendet werden, die *in vivo* ablaufenden Prozesse *in vitro* zu simulieren. In dieser Arbeit wurde zunächst eine direkte sowie eine indirekte Kokultur von HSPC mit HUVEC unter pro-inflammatorischen Bedingungen untersucht. Im Gegensatz zu anderen Studien, die EC als Feederzellen für HSPC verwendeten^{6,10,11,16,17}, konnten wir durch die IL-Stimulation den Aktivierungsgrad der EC ändern und eine deutliche Steigerung des hämatopoetischen Supports bewirkt.

Adhäsionsmoleküle können die HSPC Proliferation und Differenzierung zusätzlich beeinflussen. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden die HSPC im direkten Zellkontaktsystem mit HUVEC ko-kultiviert und unstimulierte Konditionen mit denen unter pro-inflammatorischen Konditionen verglichen. Eine Steigerung des hämatopoetischen Supports konnte durch die Zugabe von IL-1 β und IL-3 erzielt werden, wobei die IL-6 Konditionen im Wesentlichen mit den unstimulierten Konditionen vergleichbar waren.

Um die Räumliche Nähe von HSPC und EC unabhängig von Adhäsionsmolekülen weiter zu charakterisieren, wurde das indirekte Zellkontaktsystem verwendet. In diesem System werden

die HSPC mit HUVEC ko-kultiviert, sind jedoch durch eine Membran voneinander getrennt. Die Interaktion erfolgt über lösliche Faktoren. Die Beobachtung, dass ein vergleichbarer hämatopoetischer Effekt im indirekten Zellkontaktsystem erzielt werden konnte, deutet darauf hin, dass eine direkte Kokultur nicht zwingend notwendig ist, sondern über lösliche Faktoren erfolgt.

Um in einem weiteren Schritt eine autokrine-parakrine Rückkopplung von HSPC und HUVEC zu vermeiden, wurde der Effekt der IL-stimulierten HUVEC Zellkulturüberstände auf HSPC untersucht. Tatsächlich konnten im Vergleich zu den beiden Zellkontaktsystemen eine weitere Steigerung des hämatopoetischen Supports erreicht werden, wenn die HSPC von den IL-stimulierten HUVEC getrennt kultiviert wurden. Die genauen Mechanismen sind jedoch bislang unklar. Es wäre möglich, dass die HSPC bestimmte Faktoren sekretieren, die die Produktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren von HUVEC hemmen. Nachweislich wird jedoch der hämatopoetischer Support IL-stimulierter HUVEC, durch eine parakrine-autokrine Rückkopplung von HUVEC und HSPC in Kokultursystemen negativ beeinflusst. Mit den Zellkulturüberständen konnte bei IL-3 (100 U/mL) eine ca. 90-fache HSPC Expansion innerhalb von 14 Tagen erzielt werden, mit IL-1 β (100 U/mL) sogar eine 150-fache Expansion. IL-6 zeigte hingegen nur eine sehr geringe Expansion. Die mit IL-1 β und IL-3 expandierten HSPC entwickeln sich innerhalb von kürzester Zeit in granulozytäre Progenitorzellen. Nur bei IL-6 konnte nach zwei Wochen Expansion noch ein Anteil CD34 positiver Zellen festgestellt werden.

Um den Einfluss von HUVEC auf HSPC weiter zu charakterisieren und bislang unbekannt hämatopoetische Faktoren zu identifizieren, wurde ein genomweites Genexpressionsprofiling IL-stimulierter EC durchgeführt.

Im Vergleich zu anderen Studien, die nur die unstimulierte Kontrolle zum Zeitpunkt Null für den Vergleich verwendeten^{18,19}, haben wir eine BSA-Kontrolle zu jedem Zeitpunkt mitgeführt. Auf diese Weise konnte die Anzahl falscher Identifizierungen differenziell exprimierter Gene minimiert bzw. vermieden werden, was die Identifizierung der für den hämatopoetischen Support tatsächlich verantwortlichen Faktoren erleichtert.

Die stärkste „*Response to stimulus*“ wurde bei IL-1 β festgestellt. In Kombination mit funktionellen Annotationen und einer metabolischen Pathway-Analyse war es möglich, potenzielle proteinogene sowie nicht-proteinogene hämatopoetische Wachstumsfaktoren zu identifizieren.

Durch die metabolische Pathway-Analyse der durch IL-1 β hochregulierten Gene konnte der Arachidonsäure-Mechanismus identifiziert werden, dessen Hauptprodukt Prostaglandin E2 (PGE2) ist. Mithilfe der klassischen Stammzellfunktionsassays konnten wir den hämatopoetischen Effekt von PGE2 demonstrieren. Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von Hoggatt et al. (2009) überein, der zeitgleich den Einfluss von PGE2 auf die Stammzellfunktion untersuchte. Sie wiesen u.a. den PGE2-Rezeptor auf HSPC nach und identifizierten, dass PGE2 das „Homing“ der Stammzellen fördert und das Überleben und die Proliferation von HSPCs steigert.²⁰

Anhand der metabolischen Pathway-Analyse der durch IL-1 β herunterregulierten Gene konnte der „Arginin- und Prolin-Metabolismus“ als relevanter Pathway identifiziert werden. NO ist das Hauptprodukt dieser Pathways. eNOS und iNOS wurden durch IL-1 β zu jedem Zeitpunkt als herunterreguliert identifiziert, was mithilfe des TaqMan Assays validiert wurde. Es wurde postuliert, dass NO einen proliferationsinhibierenden Effekt auf HSPC haben und die Inhibition der NOS die Expansion fördern könnte.²¹ Somit scheint ein Inhibitor der Proliferation durch die IL-1 β -Stimulation reduziert zu werden, was sich in den Zellkulturüberständen eventuell wachstumsfördernd auswirken könnte. Um den wachstumshemmenden Effekt von NO nachzuweisen, wurde NO als Komplex mit Spermidin erworben und funktionell analysiert. Entgegen unseren Erwartungen ließ sich eine signifikante HSPC-Expansion durch NO/Spermidin feststellen. Das deutet darauf hin, dass Spermidin ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor ist. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurden Polyamine und insbesondere Spermidin als Faktoren postuliert, die bei der Proliferation und der Differenzierung von HSPC eine Rolle spielen könnten.²²

Es konnte eine Vielzahl signifikant hochregulierter Gene aus der GO-Kategorie „Receptor Binding“ und „Extracellular Space/region“ identifiziert werden, von denen insgesamt 11 proteinogene Faktoren ausgewählt und mithilfe von Stammzellfunktionsuntersuchungen analysiert wurden. Nur bei IL-32, Gro-1 und OPG konnte ein positiver hämatopoetischer Effekt nachgewiesen werden. Bislang war ein hämatopoetischer Effekt bei ihnen nicht bekannt.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass der hämatopoetische Support von Endothelzellen durch eine Interleukinstimulation gesteigert werden kann. Darüber hinaus stellten wir fest, dass nicht nur die direkte- und/oder die indirekte Kokultur den Zytokin-supplementierten Flüssigkulturen überlegen sind, sondern dass der hämatopoetische Support durch die Trennung von HSPC und IL-stimulierten HUVEC weiter gesteigert werden kann. Diese

Beobachtungen sind vom großen wissenschaftlichen Wert. Sie deuten darauf hin, dass der wachstumsfördernde Effekt von IL-stimulierten HUVEC hauptsächlich über lösliche Faktoren erfolgt. Durch die Genexpressionsanalyse IL-stimulierter HUVEC konnten neben bereits bekannten HSPC Wachstumsfaktoren, neue proteinogene sowie nicht-proteinogene Faktoren identifiziert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten durch den Einsatz komplexer Stammzellfunktionsuntersuchungen IL-32, Gro-1, OPG, PGE2 und NO/Spermidin erfolgreich als hämatopoetische Wachstumsfaktoren identifiziert werden.

Referenzen:

1. Lim, S.H., Kell, J., al-Sabah, A., Bashi, W. & Bailey-Wood, R. Peripheral blood stem-cell transplantation for refractory autoimmune thrombocytopenic purpura. *Lancet* **349**, 475 (1997).
2. Gratwohl, A., *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. *Leukemia* **17**, 941-959 (2003).
3. Piacibello, W., *et al.* Lentiviral gene transfer and ex vivo expansion of human primitive stem cells capable of primary, secondary, and tertiary multilineage repopulation in NOD/SCID mice. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient. *Blood* **100**, 4391-4400 (2002).
4. Piacibello, W., *et al.* Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* **93**, 3736-3749 (1999).
5. Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Haynesworth, S.E., Bruder, S.P. & Gerson, S.L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 841-848 (2000).
6. Rosler, E., Brandt, J., Chute, J. & Hoffman, R. Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34+CD38- cells. *Exp Hematol* **28**, 841-852 (2000).
7. Magin, A.S., *et al.* Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood--a comparative study. *Stem Cells Dev* **18**, 173-186 (2009).
8. Chute, J.P., Muramoto, G.G., Fung, J. & Oxford, C. Soluble factors elaborated by human brain endothelial cells induce the concomitant expansion of purified human BM CD34+CD38- cells and SCID-repopulating cells. *Blood* **105**, 576-583 (2005).
9. Chute, J.P., *et al.* Molecular profile and partial functional analysis of novel endothelial cell-derived growth factors that regulate hematopoiesis. *Stem Cells* **24**, 1315-1327 (2006).
10. Kobayashi, H., *et al.* Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **12**, 1046-1056 (2010).
11. Hooper, A.T., *et al.* Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell* **4**, 263-274 (2009).
12. Mohle, R., Rafii, S. & Moore, M.A. The role of endothelium in the regulation of hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells* **16 Suppl 1**, 159-165 (1998).
13. Mohle, R., *et al.* Regulation of transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* **872**, 176-185; discussion 185-176 (1999).
14. Butler, J.M., *et al.* Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 251-264 (2010).
15. Brandt, J.E., *et al.* Bone marrow repopulation by human marrow stem cells after long-term expansion culture on a porcine endothelial cell line. *Exp Hematol* **26**, 950-961 (1998).
16. Yildirim, S., Boehmler, A.M., Kanz, L. & Mohle, R. Expansion of cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. *Bone Marrow Transplant* **36**, 71-79 (2005).
17. Moldenhauer, A., *et al.* Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors. *BMC Immunol* **9**, 56 (2008).
18. Bandman, O., Coleman, R.T., Loring, J.F., Seilhamer, J.J. & Cocks, B.G. Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci* **975**, 77-90 (2002).
19. Zhao, B., Stavchansky, S.A., Bowden, R.A. & Bowman, P.D. Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1577-1583 (2003).
20. Hoggatt, J., Singh, P., Sampath, J. & Pelus, L.M. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* **113**, 5444-5455 (2009).
21. Michurina, T., *et al.* Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity. *Mol Ther* **10**, 241-248 (2004).
22. Maeda, T., *et al.* Role of polyamines derived from arginine in differentiation and proliferation of human blood cells. *Biol Pharm Bull* **29**, 234-239 (2006).

Zugrunde liegende Publikationen und Anteilserklärung

Herr **Gürkan Bal** (geb. in Trabzon/Türkei) hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Moldenhauer A, Genter G, Lun A, **Bal G**, Kieseewetter H, Salama A. Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors. BMC Immunol. 2008 Oct 1;9:56.

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an Konzept und Design der Studie, Durchführung der Add-Back-Kontrolexperimente und Western-Blot-Experimente (Nachweis für den Reviewer der IL-6-abhängigen Phosphorylierung von STAT-3). Isolation von Endothelzellen, Isolation von Stammzellen. Beteiligung an der statistischen Auswertung,.

Publikation 2: **Bal G**, Kamhieh-Milz J, Futschik M, Haupl T, Salama A, Moldenhauer A. Transcriptional profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Cell Transplant. 2011 Jun 7. [Epub ahead of print]

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Idee, Konzeption und Design der Studie, Durchführung der Zellkultur und zeitabhängige Stimulation der HUVEC, RNA-Isolation, Design und Durchführung der Mikroarrayanalyse sowie bioinformatische Auswertung, Validierung der Ergebnisse mithilfe der TaqMan Real Time PCR, Identifizierung potenzieller hämatopoetischer Wachstumsfaktoren über die metabolische Pathway-Analyse, funktionelle Analyse von PGE2 und NO/Spermidin, Anfertigung der Publikation.

Publikation 3: Moldenhauer A, Futschik M, Lu H, Helmig M, Götze P, **Bal G**, Zenke M, Han W, Salama A. Interleukin 32 promotes hematopoietic progenitor expansion and attenuates bone marrow cytotoxicity. Eur J Immunol. 2011 Jun;41(6):1774-86. (Epub 2011 May 13).

25 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Auswertung und Herleitung potenzieller hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (proteonogene Faktoren). Validierung der differentiellen Genexpression mithilfe der TaqMan Real Time PCR, Isolation von Stammzellen, Beteiligung an der Durchführung der Zellkultur- und Stamzellfunktionstests. Beteiligung an der statistischen Auswertung, Überarbeitung des Manuskripts.

Berlin, den 02.08.2011

Unterschrift von Promovend

Publikation 1 :

Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors.

BMC Immunol. 2008 Oct 1;9:56.

Moldenhauer A, Genter G, Lun A, **Bal G**, Kieseewetter H, Salama A.

BACKGROUND: Cytokine-stimulated endothelial cells (EC) propagate hematopoietic progenitor cell (HPC) expansion. However, the effects on the functional capacities of cultured progenitors have not been evaluated. HPC were assessed by flow cytometry, colony and cobblestone assays and long-term cultures (LTC) after culturing in the supernatant of EC stimulated by IL-1beta, IL-3 or IL-6.

RESULTS: EC incubation with IL-6 did not improve cell expansion in comparison to non-stimulated EC supernatant, while the HPCs' phenotype and functional capacities were retained. In contrast, IL-1beta and IL-3 stimulation resulted in a 10- and 100-fold increase in cell numbers with more than 90% of these cells being CD33(+). Plating efficiencies and LTC initiating cells were greatest in IL-6 supernatants, whereas the highest numbers of burst-forming units were observed using IL-3. IL-1beta supernatants diminished the number of 5-week cobblestone-areas, whereas the number of 2-week cobblestone areas remained equal to freshly isolated HPC. Fewer 2-week cobblestones and greater amounts of 5-week cobblestones were observed with IL-6 and IL-3. Expanded progenitors from all interleukin conditions were further matured into functional granulocytes.

CONCLUSION: IL-1beta and IL-3 stimulated endothelium induces proliferation and differentiation of myeloid precursors, while IL-6 treatment induced a benefit of HPC survival.

Publikation 2 :

Transcriptional profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Cell Transplant. 2011 Jun 7. [Epub ahead of print]

Bal G, Kamhieh-Milz J, Futschik M, Haupl T, Salama A, Moldenhauer A.

Endothelial cells can be successfully used to maintain or increase the number of hematopoietic stem cells in vitro. Previously we identified hematopoietic progenitor cell (HPC) expansion or survival benefit induced by IL-1 β , IL-3 and IL-6 stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) supernatants. In order to identify molecular mechanisms that support hematopoiesis, we examined the time dependent expression profiles of IL-1 β , IL-3 and IL-6 stimulated HUVECs via microarray. Here, we present 24 common up-regulated elements and three common down-regulated elements of IL- β and IL-3 stimulated HUVECs, with these factors exhibiting great potential for the observed HPC expansion. Furthermore, metabolic pathway analysis resulted in the identification of non-proteinogenic factors such as prostaglandin E2 (PGE2) and nitric oxide (NO) and determined their HPC expansion potential via delta-, methylcellulose-and cobblestone assays. We confirmed PGE2 and spermine as hematopoietic expansion factors. Furthermore, we identified several factors such as SSAT, extracellular matrix components, microRNA21 and a microvesicle-mediated crosstalk between the endothelium and HPCs that may play a crucial role in determining stem cell fate. Our results suggest that microarray in combination with functional annotations is a convenient method to identify novel factors with great impact on HPC proliferation and differentiation.

Publikation 3 :

Interleukin 32 promotes hematopoietic progenitor expansion and attenuates bone marrow cytotoxicity.

Eur J Immunol. 2011 Jun;41(6):1774-86.

Moldenhauer A, Futschik M, Lu H, Helmig M, Götze P, **Bal G**, Zenke M, Han W, Salama A.

The identification of soluble factors involved in stem cell renewal is a major goal in the assessment of the BM niche. We have previously shown that human endothelial cell (EC) supernatants can induce the proliferation of hematopoietic progenitor cells (HPCs), especially after stimulation with IL-1 β . To identify new potential growth factors, we compared the expression profile of IL-1 β -stimulated ECs over 4, 8 and 16 h with non-stimulated ECs using oligonucleotide microarrays covering more than 46,000 transcripts. Most significant changes were detected after 4 h. Utilization of Gene Ontology annotation for the stimulated EC transcriptome indicated multiple upregulated genes encoding extracellular proteins with a cell-cell signaling function. Using flow cytometry, delta, colony and cobblestone assays, we assessed the proliferative capacities of 11 gene products, i.e. IL-8, IL-32, FGF-18, osteoprotegerin, Gro 1-3, ENA78, GCP-2, CCL2 and CCL20, which are not known to induce HPC expansion. Notably, IL-32 and to a lesser degree osteoprotegerin and Gro 3 significantly induced the proliferation of HPCs. Furthermore, IL-32 attenuated chemotherapy-related BM cytotoxicities by increasing the number of HPCs in mice. Our findings confirm that the combination of microarrays and gene annotation helps to identify new hematopoietic growth factors.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Die komplette Publikationsliste ;

1: Emmerich F, **Bal G**, Barakat A, Milz J, Mühle C, Martinez-Gamboa L, Dörner T, Salama A. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. **Br J Haematol.** **2007 Jan**;136(2):309-14. Epub 2006 Nov 30. PubMed PMID: 17156395.

2: Moldenhauer A, Genter G, Lun A, **Bal G**, Kiesewetter H, Salama A. Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors. **BMC Immunol.** **2008 Oct 1**;9:56. PubMed PMID:18826654; PubMed Central PMCID: PMC2570655.

3: Moldenhauer A, Futschik M, Lu H, Helmig M, Götze P, **Bal G**, Zenke M, Han W, Salama A. Interleukin 32 promotes hematopoietic progenitor expansion and attenuates bone marrow cytotoxicity. **Eur J Immunol.** **2011 Jun**;41(6):1774-86. doi: 10.1002/eji.201040986. Epub 2011 May 13. PubMed PMID: 21469100.

4: **Bal G**, Kamhieh-Milz J, Futschik M, Haupl T, Salama A, Moldenhauer A. Transcriptional profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Cell Transplant.** **2011 Jun 7.** [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21669038.

5: **Bal G**, Kamhieh-Milz J, Sterzer V, Al-Samman M, Debski J, Klein O, Kamhieh-Milz S, Bhakdi S, Salama, A Proteomic profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells. **Stem Cells Dev.** **2011 (Submitted)**

6: Kamhieh-Milz J, **Bal G**, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Arbach O, Salama A. Reduced antioxidant capacities in platelets from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP) **Platelets (Accepted)**

Poster :

Kamhieh-Milz J, **Bal G**, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Salama A. Modified protocol for the generation of monoclonal antibodies by the ADLib system. Berlin Immunology Day" organized by Research Center ImmunoSciences (RCIS), Thursday December 9th, 2010

Erklärung

„Ich, Gürkan Bal, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Molekulares Profiling des hämatopoetischen Supports Interleukin stimulierter Endothelzellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Unterschrift , Berlin, den 02.08.2011

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Professor Dr. med. Abdulgabar Salama herzlich bedanken, da er mich vom Anfang bis zum Ende in allen Schritten dieser Arbeit unterschützt und dessen Fertigstellung ermöglicht hat. Ebenso danke ich Frau PD. Dr. med. Anja Moldenhauer für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung des Projektes. Mein Dank gilt auch allen an den zugrunde liegenden Publikationen beteiligten Ko-Autoren, darunter insbesondere Herrn Dipl.-Ing. Julian Kamhieh-Milz für die zahlreichen Hilfsangebote und die intensive Unterstützung. Vor allem aber danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in all den Jahren motiviert und unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt auch meiner geliebten Frau Aysel für die Unterstützung und ihr Verständnis, die sie mir in den letzten Jahren entgegengebracht hat.