

Robert Fuchs

***„Charakterisierung der adrenergen
Beeinflussung von adulten hämatopoetischen
Stammzellen“***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizinischen Wissenschaften
an der
Medizinischen Universität Graz

Durchgeführt am
Institut für Pathophysiologie und Immunologie
(Leiter: Univ.Prof. Dr. Anton Sadjak),
Zentrum für Molekulare Medizin,
Medizinische Universität Graz

April 2009

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und mich auch sonst keiner unerlaubten Hilfe bedient habe.

Diese Dissertation ist meinem Mentor
o. Univ.-Prof.Dr.med. Konrad Schauenstein,
der am 22.05.2007 nach schwerer Krankheit verstorben ist,
gewidmet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, dass sie mir eine Hochschulausbildung ermöglicht haben.

Bei meiner Freundin Mayte möchte ich mich für ihre Geduld und für ihr Verständnis bedanken.

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Sadjak, der nach dem Tod von Prof. Schauenstein die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht und die fachliche Betreuung der Dissertation übernommen hat.

Bei Dr. Ingeborg Stelzer, Dr. Elisabeth Schraml und Helga Susanne Haas möchte ich mich für zahlreiche inspirative Diskussionen sowie für ihre mannigfaltige Unterstützung bedanken.

Ein Dankeschön gebührt auch Herrn Dr. Gerd Leitinger vom Institut für Histologie und Embryologie der Med. Uni. Graz, der sich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen in dieser Arbeit verantwortlich zeichnet.

Bei den BMAs Elfgard Heintz, Elke Schwarzenberger, AR Veronika Siegl, Brigitte Poncza, und Gertrud Havlicek möchte ich mich für geleistete technische Hilfestellungen und wertvolle Ratschläge bedanken. Auch allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Pathophysiologie, die in irgendeiner Weise am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei dafür ein herzliches Danke ausgesprochen.

Ein großes Danke ist auch an die zahlreichen Frauen gerichtet, die das Nabelschnurblut für die wissenschaftliche Forschung gespendet haben und auch den Hebammen der Geburtshilflich-Gynäkologischen Universitätsklinik des LKH Graz, die das Blut gesammelt haben.

Diese Arbeit wurde durch den Fond für wissenschaftliche Forschung (FWF, Projekt P16060) und durch ein Forschungsstipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der Medizinischen Universität Graz unterstützt.

Einige verwendete Reagenzien wurden aus Projektmitteln des FWF-Forschungsprojektes S9310 finanziert.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Zielsetzung	9
1.2 Crosstalk zwischen Nervensystem und Immunsystem	9
1.3 Sympathische Innervation des Knochenmarks	10
1.4 Die Hämatopoietische Stammzelle – Hämatopoiese	10
1.5 Die sympathische Transmittersubstanz Noradrenalin beeinflusst unreife hämatopoietische Progenitorzellen über adrenerge Rezeptoren	13
1.6 Katecholamine/Adrenerge Signaltransduktion	15
1.7 Verwendete Zellen und Zelllinien	18
1.7.1 Mononukleäre Zellen aus humanem Nabelschnurblut (UCB)	18
1.7.2 Human Erythroleukemia (HEL)	21
1.7.3 K-562-Zellen	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Sammeln des Nabelschnurblutes und Isolation von mononukleären Zellen	23
2.2 Adrenerge Agonisten und Antagonisten	24
2.3 Zellkultur	26
2.3.1 Zellkultur der Erythroleukämiezellen	26
2.3.2 Kultivierung der UCB-Stamm- und Progenitorzellen in semiliquidem Medium	26
2.4 Alkalischer Comet-Assay	28
2.5 Detektion von Apoptose in Erythroleukämiezellen	31
2.5.1 DAPI-Staining	31
2.5.2 Aktive Caspase 3-Assay	31
2.6 Nachweis der Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	32
2.6.1 Nachweis der Generierung von intrazelluläre Sauerstoffradikalen (ROS) durch Bestimmung der Oxidation von 2,7- Dichlorodihydrofluorescein-diacetat	32
2.6.2 Induktion und Inhibition von Sauerstoffradikalbildung in K-562 Zellen durch Behandlung mit dem ROS-Generator Menadion und Antioxidantien	33
2.7 Bestimmung der Expression des erythroiden Markers Glycophorin- a	34

2.8	Nachweis einer möglichen autokrinen/parakrinen adrenergen Regulation von Erythroleukämiezellen	35
2.8.1	Nachweis der Expression der Dopamin-beta-Hydroxylase mittels RT-PCR	35
2.8.2	Nachweis von intrazellulären Katecholaminen in Erythroleukämiezellen mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	36
2.9	Ultrastrukturanalyse von humanen Erythroleukämiezellen	37
2.10	DNA-Gehalts-Messungen mit Propidiumiodid	39
2.11	Statistik	39
3	Resultate	40
3.1	Der adrenerge Agonist Naphazolin hemmt das <i>in vitro</i> Wachstum von erythroiden Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut	40
3.2	Die Behandlung von K-562-Zellen mit dem α 1-adrenergen Agonisten Naphazolin führt zu Wachstumshemmung, ROS-induziertem Zelltod, sowie zum Verlust des erythroiden Markers GPA	53
3.2.1	Die adrenergen Agonisten Naphazolin und Oxymetazolin hemmen das Wachstum von humanen Erythroleukämiezellen	53
3.2.2	Naphazolin verursacht einen Autophagie-induzierten Zelltod	55
3.2.3	Naphazolin bewirkt eine reversible Abnahme der Expression des erythroiden Markers Glycophorin-a in den K-562-Zellen	60
3.2.4	Die Behandlung von K-562-Zellen mit Naphazolin führt zur Generierung von ROS	62
3.2.5	Das Antioxidans NAC schützt die K-562-Zellen effizient vor der toxischen Wirkung von Naphazolin und auch von Menadion	63
3.2.6	ROS-Generierung durch Menadion und NO-Freisetzung durch Nitroprussid können den Effekt von Naphazolin auf die Expression von GPA nicht imitieren	65
3.2.7	Der NO-Generator SNP hebt die durch Naphazolin induzierte Aggregation der K-562-Zellen auf	66
3.2.8	Der PLC-Inhibitor U-73122 schützt die K-562-Zellen vor der toxischen Wirkung von Naphazolin	67
3.2.9	Calcium schützt die K-562-Zellen vor der toxischen Wirkung von Naphazolin	69

3.3 Die Behandlung von humanen Erythroleukämiezellen mit α 1-adrenergen Antagonisten führt zu Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose, sowie zu einem Switch in Richtung megakaryozytärer Differenzierung	71
3.3.1 Die α 1-adrenergen Antagonisten Prazosin und Benoxathian inhibieren die Proliferation und induzieren Apoptose in humanen Erythroleukämiezellen	71
3.3.2 Prazosin bewirkt eine Zunahme der Zellgröße, Endomitose, sowie Alterationen in der Expression von Linien-spezifischen Expressionsmarkern	75
3.4 Die Wirkungen der adrenergen Modulatoren auf die Erythroleukämie Zelllinien erfolgen in Abhängigkeit von der Aktivierung, bzw. der Blockade von α 1-adrenergen Rezeptoren	80
3.4.1 Naphazolin attenuiert die von Prazosin induzierte Größenzunahme, Endomitose und Apoptose in den K-562-Zellen	80
3.4.2 Die HEL-Zelllinie exprimiert das Schlüsselenzym der Synthese von Noradrenalin, β -Dopamin Hydroxylase	84
3.4.3 Ergebnisse des Nachweises von Katecholaminen mittels HPLC In hämatopoietischen Zelllinien	84
3.4.4 Unter serumfreien Bedingungen verstärkt sich die wachstumsinhibierende Wirkung der adrenergen Agonisten und Antagonisten auf die K-562-Zellen	85
4 Diskussion	88
4.1 α 1-adrenerge Agonisten hemmen das <i>in vitro</i> Wachstum von erythroiden Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut	88
4.2 α 1-adrenerge Agonisten hemmen das <i>in vitro</i> Wachstum, induzieren Autophagocytose und supprimieren die Expression des erythroiden Markers Glycophorin-a in humanen Erythroleukämiezellen	91
4.3 Die Wirkung von Naphazolin auf Wachstum und Differenzierung der K-562-Zellen erfolgt in Abhängigkeit von der Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen	96
4.4 α 1-adrenerge Antagonisten hemmen das <i>in vitro</i> Wachstum, induzieren Apoptose und verändern das Differenzierungsverhalten von humanen Erythroleukämiezellen in Richtung megakaryozytärer Linie	106
4.5 Medizinisch relevante Aspekte der Dissertation und Ausblick	114
5 Anhang	118
5.1 Abkürzungsverzeichnis	118
5.2 Publikationen	120
5.3 Lösungen, Medien und Puffer	120

5.4 Literaturverzeichnis	123
5.5 Kurzzusammenfassung der Dissertation	138
5.5.1 Deutsche Kurzzusammenfassung	138
5.5.2 Englische Kurzzusammenfassung (Abstract)	139
5.6 Posterpräsentationen	141
5.6.1 Poster bei der Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Graz, 12/2005	141
5.6.2 Poster bei der 9. Multinationalen Konferenz für Mikroskopie, Graz, 08/2009	142

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

In einer *in vitro* Studie sollen mögliche Wirkungen von Rezeptor-Subtyp-spezifischen adrenergen Agonisten auf die Proliferation und das Differenzierungsverhalten von humanen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSC) erforscht werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, Aufschlüsse über die Signalwege potentieller adrenerger Effekte in den HSC zu gewinnen.

1.2 Crosstalk zwischen Nervensystem und Immunsystem

Elenkov et al. [1] beschreiben das Zentralnervensystem (ZNS) und das Immunsystem als Supersysteme, die miteinander in enger Kooperation stehen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl primäre als auch sekundäre lymphatische Organe von autonomen Nerven innerviert werden und dort über Nervenendigungen auch Neurotransmitter sezernieren [2]. Die Zellen des Immunsystems empfangen die Signale des Nervensystems über spezielle Neurotransmitter-Rezeptoren, die sie auf der Zellmembran exprimieren. Die Wechselwirkungen ZNS-Immunsystem sind jedoch nicht einseitiger Natur, sondern bidirektionell. So werden nicht nur auf Immunzellen Rezeptoren für neuronale Transmittersubstanzen exprimiert, sondern in spezifischen Arealen des ZNS auch Rezeptoren für primär immunomodulatorische Cytokine [1].

In dieser Arbeit wird vor allem auf die regulatorische Funktion des sympathischen Nervensystems und dessen Transmittersubstanzen Noradrenalin und Adrenalin auf die Hämatopoese und im speziellen auf die Erythropoese eingegangen. Das sympathische Nervensystem bildet zusammen mit dem Parasympathicus das vegetative Nervensystem. Antagonistisch zum Parasympathicus wirkt der Sympathicus ergotrop. Über sympathische Aktivierung kann die Herzleistung gesteigert, der Blutdruck erhöht werden sowie Glycogen mobilisiert werden. Neben der Funktion als Neurotransmitter haben Noradrenalin und Adrenalin auch eine wichtige Funktion als Stresshormone.

In den letzten Jahrzehnten wurde der Focus der Forschung über die potentielle Vernetzung Sympathicus - Immunsystem auf den Einfluss von Noradrenalin auf Zellen und Funktionen des peripheren Immunsystems gelegt [1-6]. Durch die Verfügbarkeit rekombinanter Cytokine und Wachstumsfaktoren, sowie der Etablierung von Techniken zur Identifikation und Isolation von hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen, wurde es in den letzten Jahren auch möglich, die Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren und die Wirkungen von neuroendokrinen Mediatoren auf Stamm- und Progenitorzellen-Ebene zu untersuchen.

1.3 Sympathische Innervation des Knochenmarks

In mehreren Studien an Ratten und Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass das Knochenmark, der Ort der Hämatopoiese und Heimstätte der hämatopoietischen Stammzellen, von efferenten und afferenten adrenergen Nervenfasern innerviert wird [7-10]. Maestroni et al. konnten mittels HPLC das Vorhandensein von Dopamin, Adrenalin wie auch von Noradrenalin im murinen Knochenmark zeigen [8]. Als Quelle dieser nachgewiesenen Katecholamine konnten sowohl Nervenfasern, als auch Knochenmarkszellen selbst identifiziert werden [8]. Die Freisetzung der Katecholamine im Knochenmark erfolgt in einem zyklischem Tagesrhythmus mit maximaler Freisetzung in der Nacht und reagiert dynamisch auf externe Einflüsse wie Kältestress oder bakterielle Infektionen [8, 9]. Alle diese Fakten weisen auf eine funktionelle sympathische Innervation des Knochenmarks hin.

Benestad et al. zweifeln 1998 nach einer Studie an Mäusen eine Funktionalität der neuronalen Innervation des Knochenmarks an [11], ändern ihre Meinung jedoch 2000 nach einer Humanstudie mit querschnittgelähmten Personen [12]. Querschnittsgelähmte wiesen im Vergleich zu Gesunden nicht nur eingeschränkte Lymphozytenfunktionen auf, sondern auch das Wachstum ihrer unreifen hämatopoietischen Progenitoren war beeinträchtigt [12].

1.4 Die Hämatopoietische Stammzelle-Hämatopoiese

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie sich einerseits selbst replizieren können (= Self renewal) und andererseits spezialisierte (differenzierte) Progenitorzellen generieren. Während embryonale, totipotente Stammzellen nur im Embryo in der inneren Zellmasse der Blastocyste vorkommen und die Fähigkeit haben, jeden Körperzelltyp zu generieren, findet man die so genannten adulten Stammzellen in definiten adulten Geweben, wo sie die Funktion der kontrollierten Substitution von seneszenten und degenerierten Zellen innehaben [13]. Das Differenzierungsvermögen dieser Stammzellen ist im Vergleich zur embryonalen Stammzelle stark eingeschränkt.

In den letzten Jahren wurde experimentell versucht, die Pluripotenz von fertig ausdifferenzierten somatischen Zellen durch Modulation von einzelnen Genen wieder herzustellen. Durch Induktion der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 and Myc konnte in humanen Hautfibroblasten Pluripotenz induziert werden [14]. Man hofft aus diesen, mittels genetischer Manipulation entstandenen Stammzellen (= iPS cells/ induced pluripotent stem cells), einen möglichen Ersatz für die ethisch heiß diskutierten embryonalen Stammzellen gefunden zu haben.

Das Erschaffen der iPS-Zellen kann als ein Höhepunkt der derzeit florierenden Stammzellforschung gesehen werden. Die Errungenschaften der Stammzellforschung

schüren auch große Hoffnungen für mannigfaltige medizinische Anwendungen, die von der Behandlung von Herzinfarkt bis hin zu neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson reichen [15].

Der Stammzelltyp der in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, ist die adulte Hämatopoetische Stammzelle (HSC), bzw. weiter ausdifferenzierte Hämatopoetische Progenitorzellen (HPC) der myeloiden Reihe.

Die HSC und HPC sind die am besten charakterisierten Stammzellen und werden in der Klinik routinemäßig in Transplantationen zur Behandlung von Defekten der zellulären Komponenten des Blutes, des Immunsystems und bei Krebs eingesetzt.

Die Heimstätte der HSC und der frühen hämatopoetischen Progenitoren stellt das die Markhöhlen der Knochen ausfüllende Knochenmark (Medulla ossium) dar. Während beim Neugeborenen fast alle Knochen mit rotem (blutbildenden) Knochenmark gefüllt sind, findet man beim Erwachsenen rotes Knochenmark nur in wenigen Knochen wie dem Sternum, den Rippen, dem Becken und den Wirbelkörpern. Das rote Knochenmark wird im Zuge des Altersprozesses durch Fettmark ersetzt. Im Knochenmark liegen die HSC nicht frei vor, sondern sind in so genannten Stammzell-Nischen eingebettet. Die HSC stehen hier über Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptor-Liganden-Interaktionen mit Zellen in Verbindung, die helfen, die Funktionen der Stammzellen aufrechtzuerhalten [16]. Neben Zell-Zell-Kontakten spielen auch Cytokine und andere Wachstumsfaktoren, die in das Knochenmark gelangen oder dort von Stromazellen selbst sezerniert werden, eine essentielle Rolle um Stammzellfunktionen zu regulieren. Ein sehr gutes Beispiel für solch eine adaptive Steuerung der Hämatopoese stellt die Erythropoese dar. Das Glycoprotein-Hormon Erythropoietin, das in den peritubulären Zellen der Niere produziert wird, kontrolliert sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von erythroiden Progenitoren [17]. Die Synthese von EPO erfolgt in der Niere unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors HIF (= hypoxia inducible factor). Herrscht im Körper ein hypoxischer Zustand vor, zum Beispiel ausgelöst durch einen starken Blutverlust, wird dieser Transkriptionsfaktor aktiviert. Es wird HIF-induziert in den Nieren mehr EPO produziert, das über die Blutbahn ins Knochenmark gelangt, wo es die Erythropoese ankurbelt, um den hypoxischen Zustand des Organismus durch eine Mehrproduktion von Erythrocyten zu beheben [17].

Das Spektrum der Cytokine und Wachstumsfaktoren, die die Hämatopoese regulieren, ist sehr umfangreich [18]. Einige dieser Faktoren wie Interleukin-3 (IL-3) oder der Stem Cell Factor (SCF) haben Einfluss auf die Entwicklung mehrerer hämatopoetischer Linien, während andere Faktoren wie Erythropoietin (Erythropoese) oder Thrombopoietin (Thrombopoese) eine primär Linien-abhängige Wirkungsweise zeigen. Das intrazelluläre Signalsystem vieler Wachstumsfaktoren zeigt Überschneidungen, was die synergistische Wirkung von manchen Faktoren erklärt. Zum Beispiel stimuliert EPO synergistisch mit SCF die Erythropoese [19].

Wie adulte Stammzellen in anderen Gewebetypen auch, verbleibt die Hämatopoietische Stammzelle stets in einem undifferenzierten Zustand und durchläuft Zyklen von Self renewal und asymmetrischen Mitosen, aus denen jeweils eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle hervorgeht. Es wird vermutet, dass durch die Balance zwischen symmetrischen und asymmetrischen Teilungen die Zahl der Stammzellen moduliert und reguliert wird [20, 21]. Die asymmetrischen Teilungen dienen hierbei der Homöostase, während die symmetrischen Teilungen der Aufrechterhaltung des Stammzellpools dienen [20]. Über die Mechanismen wie das Wechselspiel zwischen Self Renewal und asymmetrischen Teilungen reguliert wird, gibt es kaum gesichertes Wissen.

Die Hämatopoese wird generell als ein Multi-Step-Prozess gesehen, in dem zelluläre Replikation und Differenzierung Hand in Hand gehen [22]. Ausgehend von der so genannten LT-HSC (long- time-repopulating-HSC) bis hin über mehrere Stufen von Progenitorzellen zur reifen Zelle einer bestimmten Linie, nimmt die Geschwindigkeit der Replikation parallel zur Differenzierung zu, bis hin zum Stadium der Precursorzellen, die schließlich zur Endform der jeweiligen Linie ausreifen (siehe Abb.1). Die LT-HSC stellt die ultimative Hämatopoietische Stammzelle dar. Ohne diesen Zelltyp wäre keine Stammzell-Transplantation erfolgreich, da nur diese Zelle zu einem langfristigen Self-Renewal befähigt ist.

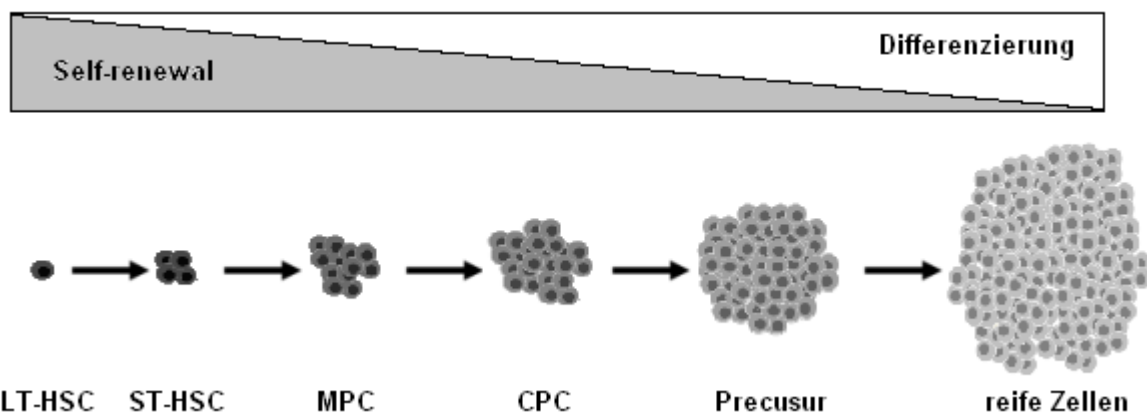


Abb.1: Die Ausreifung von HSC erfolgt über mehrere Stufen. In mehreren Stadien, in denen der Grad der Differenzierung und die Rate der Replikation stetig zunehmen, entstehen ausgehend aus der Long-Time Repopulating-HSC (LT-HSC) schließlich die reifen Zellen einer bestimmten hämatopoietischen Linie. ST-HSC: Short Time-Repopulating-HSC, MPC: Multipotent Progenitor-Cell, CPC: Committed Progenitor Cells. Abb. verändert nach [22].

Die Fähigkeit zum lebenslangen Self-Renewal wird durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten um eine „Erschöpfung“ des Stammzellpools zu verhindern [16].

Die in der Hierarchie der Hämatopoese der LT-HSC bzw. der ST-HSC nachfolgenden Progenitorzellen weisen nicht nur stufenweise einen höheren Differenzierungsgrad auf, sondern zeigen auch nur eine eingeschränkte Self-Renewal-Kapazität und haben prinzipiell die Fähigkeit verloren, lebenslang das volle Spektrum von hämatopoietischen Zellen generieren zu können.

1.5 Die sympathische Transmittersubstanz Noradrenalin beeinflusst unreife hämatopoietische Progenitorzellen über adrenerge Rezeptoren

Die Expression von adrenergen Rezeptoren auf HSC und Progenitoren wurde von Maestroni und Conti schon 1994 postuliert [23]. Mittels Radio-Ligand-binding Assays konnten sie nachweisen, dass Knochenmarkszellen α 1-adrenerge Rezeptoren exprimieren. Als Rezeptor-tragende Populationen konnten sie einerseits lymphoide Progenitoren sowie andererseits Granulozyten-Makrophagen generierende Progenitoren (CFU-GM) identifizieren. Der definitive, molekularbiologische Nachweis der Expression von adrenergen Rezeptoren auf Stamm- und Progenitorzellen wurde erst 2007 erbracht. Muthu et al. [24] wiesen die Expression von α 1-, α 2-, sowie β 2-adrenergen Rezeptoren auf murinen myeloiden Progenitoren nach.

Die Idee der adrenergen Modulation von Stammzellen und der Hämatopoiese beschäftigt die Wissenschaft nicht erst seit den Neunzigern des 20. Jahrhunderts sondern es existieren bereits Studien aus den Siebzigerjahren die schon in die selbe Richtung laufen. 1971 konnte Byron beobachten, dass murine hämatopoietische Progenitoren nach Zugabe von Katecholaminen in den Zellzyklus eintraten oder den Zellzyklus verkürzten [25]. Ebenfalls in den Siebzigern entdeckten Fink und Fisher im Tiermodell, dass adrenerge Agonisten *in vivo* die Erythropoiese stimulieren können [26, 27]. Mladenovic, Brown und Adamson [28, 29] konnten diese stimulierende Wirkung der adrenergen Agonisten als β 2-Rezeptor-vermittelten Effekt bestimmen und erkannten eine Abhängigkeit der stimulierenden Wirkung von der Gegenwart von Erythropoietin. Der Einfluss von Noradrenalin auf die Erythropoiese wurde in einer amerikanischen Studie 2004 wieder aufgegriffen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhten peripheren Katecholamin Konzentrationen in Trauma-Patienten und der Ausprägung von Anämie zu finden [30, 31]. Diese Studie kam über die Erkenntnis, dass das *in vitro* Wachstum von erythroiden Kolonien über β -adrenerge Rezeptoren durch Noradrenalin angeregt wird, zur Annahme, dass Noradrenalin die Erythropoiese stimuliert. Die stimulierende Wirkung von Noradrenalin scheint über einen sekundären Stimulus von Stroma-Zellen des Knochenmarks vermittelt zu werden, da nach Depletion dieser Zellen, auch die wachstumsstimulierende Wirkung von Noradrenalin auf die erythroiden Kolonien aufgehoben wurde.

Den Umstand, dass dieses Ergebnis der ursprünglichen Annahme einer adrenergen Hemmung der Erythropoiese durch erhöhte Katecholaminlevel widerspricht, erklären die Studienautoren mit einem Konzentrationseffekt. Die Studienautoren postulierten einen stimulatorischen Effekt in niedrigen Konzentrationen und einen inhibierenden Effekt bei höheren Konzentrationen von Noradrenalin auf die Erythropoiese. Eine hemmende Wirkung auf das Kolonienwachstum konnte allerdings erst bei nicht-physiologischen mM-

Konzentrationen von Noradrenalin gesehen werden, was der Hypothese widerspricht. Generell muss festgestellt werden, dass in der bisherigen Forschung auf dem Gebiet der adrenergen Beeinflussung der Erythropoiese Hauptaugenmerk auf β -Rezeptor-medierte Effekte gelegt wurde. Über eine mögliche Beeinflussung über α_1 oder α_2 -adrenerge Signalwege existieren noch keine Informationen. Jedoch konnten in der fetalen Leber der Ratte eine massive Expression von α_2 -adrenergen Rezeptoren nachgewiesen werden, die primär erythroiden Zellen und Progenitoren zugeordnet werden konnte [32]. Auch die humane erythroide Zelllinie HEL (Human Erythroleukemia) exprimiert nachweislich α_2 -adrenerge Rezeptoren [33]. Die Expression der α -adrenergen Rezeptoren auf Zellen erythroiden Ursprungs weist auf eine mögliche Funktion von α -adrenergen Signalwegen auch in der Erythropoiese hin.

Generell kann eine wichtige Funktion des sympathischen Nervensystems in der Erythropoiese angenommen werden, da Krankheiten die mit Dysfunktion des autonomen Nervensystems verbunden sind, als typische Symptome das Auftreten von Anämie zeigen [34]. Ob die Wirkung des Sympathicus auf die Erythropoiese, wie von Obayashi et al. postuliert wird, indirekt über die Steuerung der renalen Erythropoietin-Produktion [35], oder wie Fonseca et al. vorschlagen, über die Wirkung von Stromazellen [30], oder über adrenerge Rezeptoren auf den Zellen selbst funktioniert, muss noch geklärt werden.

In den 90er-Jahren des 20. Jahrhunderts war die Arbeitsgruppe rund um den Schweizer Maestroni federführend in der Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Sympathicus und Hämatopoiese. Maestroni und dessen Mitarbeiter erweiterten das Bild der sympathischen Modulation der Hämatopoiese um eine primär α_1 -adrenerge vermittelte Kontrollfunktion der Lymphopoiese und der Myelopoiese.

Maestroni et al. zeigten, dass chemische Sympathektomie oder die Administration des α -adrenergen Antagonisten Prazosin in Mäusen zur Suppression der Lymphopoiese und zu einer parallelen Stimulation der Myelopoiese führt [8, 23, 36, 37]. Obwohl von Maestroni et al. nicht beschrieben, hat die Applikation von Prazosin auch Auswirkungen auf die Erythropoiese. Izaguirre et al. beobachteten, dass Prazosin in Mäusen, gemessen am Hämatokrit und an der Aufnahme von radioaktivem Eisen in erythroide Zellen, die Erythropoiese hemmt [38].

Auch *in vitro* konnte Maestroni beobachten, dass α -adrenerge Agonisten das Kolonienwachstum von myeloischen Progenitoren primär über α_1 -adrenerge Rezeptoren inhibiert [23]. Eine frühere Studie konnte zeigen, dass in Mäusen durch Unterdrückung des sympathischen Tonus durch Sympathektomie oder durch Verabreichung von Prazosin, die Rekonstruktion der Hämatopoiese nach synergistischer Knochenmarktransplantation gesteigert wird [36]. Der Effekt wurde primär durch eine gesteigerte Myelopoiese bewirkt. Neben diesem hemmenden Effekt des Sympathicus auf die Hämatopoiese wurde von

Maestroni et al. auch ein schützender Effekt von Noradrenalin auf die blutbildenden Zellen des Knochenmarks beobachtet. Die Injektion von Noradrenalin in Mäuse, die mit dem Chemotherapeutikum Carboplatin behandelt wurden, konnte die Überlebensrate dieser Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängern [39].

Kürzlich wurde entdeckt, dass Signale des sympathischen Nervensystems notwendig sind, um die Migration von HSC aus den Nischen des Knochenmarks nach Stimulation mit Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) in die Peripherie zu steuern [40]. G-CSF wird in der Klinik dazu verwendet, um Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark eines Donors in das periphere Blut zu mobilisieren, wo die HSC für Transplantationszwecke geerntet werden können. Der beschriebene Effekt funktioniert durch eine postulierte Aktivierung von adrenergen Neuronen im Knochenmark durch G-CSF und einer folgenden Suppression von Osteoblasten, die in engem Kontakt mit den HSC stehen. Die Wirkung von Noradrenalin auf die Migration von HSC wird als über β -adrenerge Rezeptoren vermittelter Effekt erklärt und erfolgt nicht direkt über adrenerge Rezeptoren auf den HSC selbst.

Spiegel et al. konnten die Ergebnisse von Katayama et al. bestätigen, dass Noradrenalin an der Mobilisierung von HSC aus dem Knochenmark beteiligt ist [41]. Neben β -adrenergen Rezeptoren konnte die Gruppe auch Rezeptoren für Dopamin auf unreifen, humanen CD34⁺ HSC nachweisen. Wie schon 1992 Maestroni [36] konnten auch Spiegel et al. einen positiven Effekt von Noradrenalin auf das Engraftment von HSC in Knochenmarkstransplantationen nachweisen und den Effekt durch die Aktivierung des Wnt-Pathways durch Noradrenalin in den HSC erklären.

1.6 Katecholamine/Adrenerge Signaltransduktion

Die natürlich in höheren Organismen vorkommenden Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin werden in den Neuronen des sympathischen Nervensystems und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks synthetisiert. Neben Neuronen und Nebennieren konnten auch Zellen des Immunsystems als Syntheseort von Katecholaminen identifiziert werden. Marino et al. wiesen die Synthese, den Metabolismus, die Lagerung und die Aufnahme von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin in peripheren humanen mononukleären Zellen nach [42]. Qiu et al. demonstrierten, dass diese endogen produzierten Katecholamine zur parakrinen oder autokrinen Regulation von Lymphozyten-Funktionen dienen [43].

In der murinen Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 konnte *in vitro* der Nachweis für Katecholaminsynthese erbracht werden [44].

Die Ausgangssubstanz für die Katecholaminsynthese (Abb.2) stellt die Aminosäure Tyrosin dar. Durch Anhängen eines Hydroxylrestes durch das Enzym Tyrosin-Hydroxylase entsteht Dopa. Tetrahydrobiopterin fungiert bei diesem Prozess als Cofaktor. In einem Pyridoxalphosphat-abhängigen Prozess wird die Carboxylgruppe durch die Aromatische

Aminosäure Decarboxylase abgespalten und es entsteht aus Dopa Dopamin. Durch das Schlüsselenzym für die Synthese von Noradrenalin, die Dopamin β -Hydroxylase, wird mit Ascorbat als Cofaktor an Dopamin ein Hydroxylrest angehängt. Das entstehende Noradrenalin kann durch die S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Phenylethanolamin N-Methyltransferase durch Anhängen eines Methylrestes noch zu Adrenalin weiterprozessiert werden. Der Katabolismus der Katecholamine läuft ebenfalls über mehrere Stufen ab und beginnt entweder mit der Übertragung einer Methylgruppe durch die Catechol-Methyltransferase (COMT), oder durch Desaminierung durch die Monoaminoxidase (MAO).

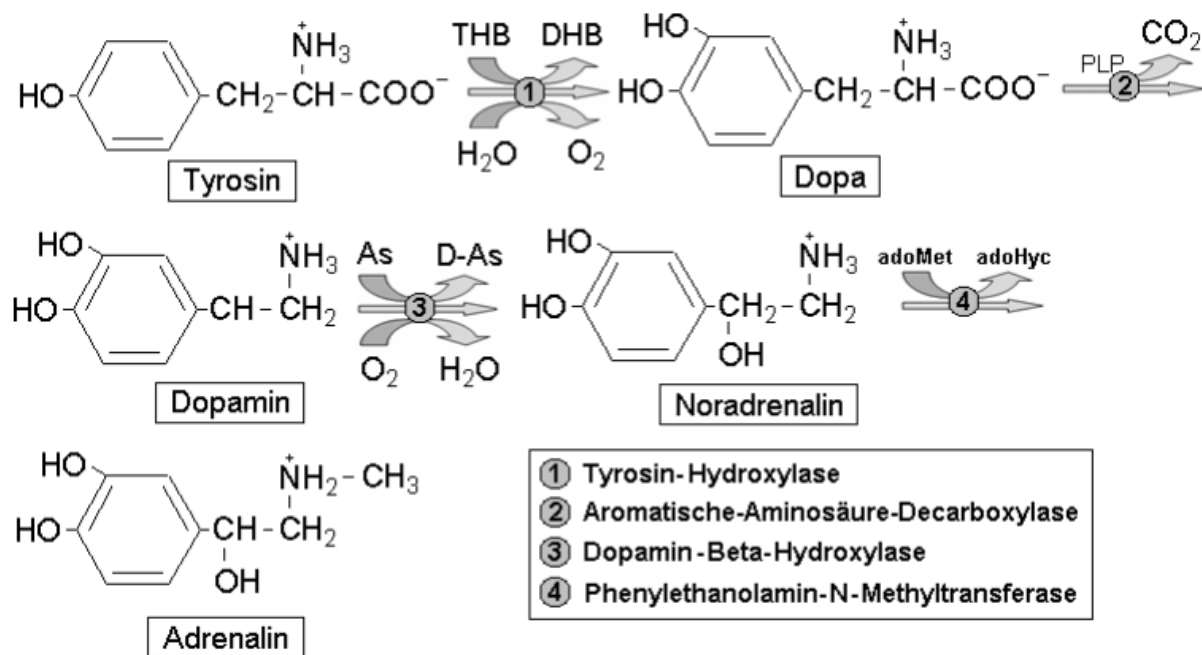


Abb.2: Syntheseweg der Katecholamine. Erklärung siehe Text. Im eingerahmten Feld sind die Enzyme der einzelnen Reaktionsschritte angegeben. THB: Tetrahydrobiopterin, DHB: Dihydrobiopterin, PLP: Pyridoxalphosphat, As: Ascorbat, D-As: Dehydroascorbat, adoMet: S-Adenosyl-L-Methionin, adoHyc: S-Adenosyl-L-Homocystein. Quelle: Die Grafik wurde nach einem Vorbild von www.biocarta.com angefertigt.

Die adrenerge Signalübertragung in den jeweiligen Zielzellen erfolgt nach Bindung von Nordrenalin beziehungsweise Adrenalin an adrenerge Rezeptoren auf der Zellmembran. Neueste Forschungen haben ergeben, dass adrenerge Rezeptoren in Myocyten auch auf der nukleären Membran exprimiert werden, wo sie extrazellulär aufgenommene Katecholamine binden [45].

Während Dopamin nur an spezifische Dopamin-Rezeptoren bindet, binden Adrenalin und Noradrenalin mit unterschiedlicher Affinität dieselben Rezeptoren. Die adrenergen Rezeptoren lassen sich anhand des nachgeschalteten Signalsystems in 2 große Subtypen (α und β) einteilen.

Die α -adrenergen Rezeptoren aktivieren G-Protein - vermittelt die Phospholipase-C, die Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5 triphosphat (IP3)

spaltet (Abb.3). IP₃ bindet und aktiviert IP₃-abhängige Calcium-Kanäle am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und erhöht dadurch den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel. DAG und Ca²⁺ aktivieren synergistisch die Proteinkinase C (PKC) die weitere intrazelluläre Targets aktiviert, beziehungsweise deaktiviert. Die α -adrenergen Rezeptoren lassen sich noch weiter in den α 1-Typ (α 1a, α 1b und α 1d) und den α 2-Typ (α 2a, α 2b und α 2c) aufgliedern. Der Unterschied zwischen den beiden α -Typen besteht darin, dass α 2-adrenerge Rezeptoren nach Aktivierung die Adenylatcyclase hemmen.

Neben den klassischen Signalwegen sind auch noch andere intrazelluläre Signalwege mit α -adrenergen Rezeptoren gekoppelt. Es konnte demonstriert werden, dass α 1-adrenerge Rezeptoren die src-Kinase [46, 47] und die Mitogen activated protein kinase (= MAPK) - Signalwege aktivieren [48-50]. Dabei werden die drei großen MAPK-Subklassen (p38-MAPK, extracellular regulated kinases/ERK und c-Jun-NH₂-terminal kinases/JNK) durch die drei α 1-adrenergen Rezeptorsubtypen mit unterschiedlicher Spezifität aktiviert [48, 49]. Weiters zeigte sich, dass die α 1-adrenerge MAPK- Aktivierung unabhängig von Calcium und PKC erfolgt [50]. In einer parallelen Studie zu dieser Arbeit im Labor von Prof. Schauenstein konnte beobachtet werden, dass durch Stimulation von murinen lin⁻/Sca⁺ myeloischen Progenitoren *in vitro* mit dem adrenergen Agonisten Oxymetazolin die p38-MAPK aktiviert wird [50]. Diese Aktivierung ging einher mit der Generierung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species/ROS). Die Generierung von Sauerstoffradikalen nach adrenerger Stimulation wurde zuvor schon, auch in der Gruppe Schauenstein, in einem *in vivo* Versuch in peripheren mononukleären Zellen der Ratte demonstriert [51].

In humanen vaskulären glatten Muskelzellen konnte man auch eine Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) durch ein über α 1-adrenerge Rezeptoren-mediertes Signal sehen [52]. Downstream der PI3K, die wie die PLC Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat als Substrat verwendet, wird durch das Produkt der PI3K Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (PIP₃) generiert, das die Proteinkinase B (PKB oder auch Akt-Kinase genannt) aktiviert.

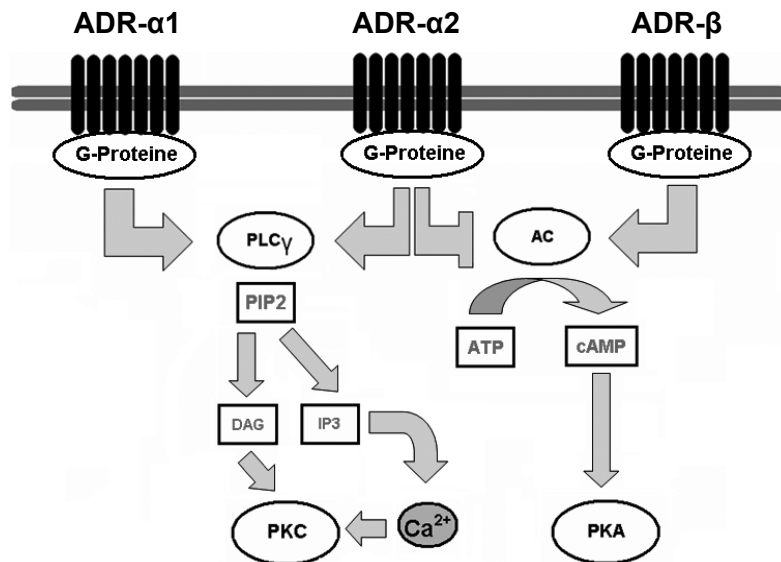


Abb.3: Der klassische Signaltransduktionsweg der adrenergen Rezeptoren. Adrenorezeptoren der Klassen $\alpha 1$ (ADR- $\alpha 1$) und $\alpha 2$ (ADR- $\alpha 2$) aktivieren G-Protein-vermittelt die membranständige Phospholipase- C γ (PLC γ) die ihr Substrat Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2) spaltet, wobei Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5 triphosphat (IP3) entstehen. IP3 bindet an IP3-abhängige Ca^{2+} -Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum was zu einem Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} führt. Ca^{2+} -Ionen aktivieren synergistisch mit DAG die PKC. ADR- $\alpha 2$ inhibieren neben der Aktivierung der PKC die Adenylatcyclase (AC) was zu einer Erniedrigung des cyclischen AMP-Spiegels (cAMP) in der Zelle führt. Adrenorezeptoren des β -Typs aktivieren die AC, was zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Quelle: Die Grafik wurde nach der gängigen Lehrbuchmeinung angefertigt.

Das Signalsystem der $\alpha 2$ -adrenergen Rezeptoren ist ebenfalls nicht auf die PLC und die Adenylatcyclase beschränkt. Es konnte auch nach Stimulation von adrenergen Rezeptoren des $\alpha 2$ -Typs Aktivierung des MAPK-Pathways [54-56] und auch des PI3K-Akt-Weges [57] in verschiedenen Zelltypen festgestellt werden.

Die β -adrenergen Rezeptoren (Subtypen: $\beta 1$, $\beta 2$, und $\beta 3$) aktivieren ebenfalls G-Protein-vermittelt, die Adenylatcyclase, die cyclisches-AMP (cAMP) aus ATP produziert (Abb.3). cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase-A. Auch in der β -adrenergen Signaltransduktion wurde eine Beteiligung der src-Kinase, sowie auch die Aktivierung des MAPK-Pathways nachgewiesen [58, 59].

1.7 Verwendete Zellen und Zelllinien

1.7.1 Mononukleäre Zellen aus humanem Nabelschnurblut (UCB)

Nabelschnurblut stellt eine einfach verfügbare und ethisch unbedenkliche Quelle von humanen HSC für Forschungszwecke und inzwischen auch für medizinische Zwecke dar. Dass in humanem UCB hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen vorkommen, wurde bereits in den 70er-Jahren des vorigen Jahrhunderts entdeckt. Knudtzon [60] und Fausner/Messner [61] konnten das Wachstum von granulozytären Kolonien bzw. granulozytären und erythroiden Kolonien nach Kultivierung von mononukleären Zellen aus

dem humanen Nabelschnurblut nachweisen. Neben den hämatopoietischen Progenitoren kann man aus dem UCB auch mesenchymale Stammzellen, sowie endotheliale Stammzellen gewinnen [62, 63].

In den 80er-Jahren des vorigen Jahrhunderts wurde das UCB als potentielle Quelle für transplantierbare Stamm- und Progenitorzellen erkannt [64]. Gluckman et al. setzten 1989 erstmalig geschwisterliches Nabelschnurblut ein, um durch Transplantation von UCB-Stammzellen die Faconi-Anämie bei einem Kind zu heilen [65]. Aufgrund der nicht ausreichenden Anzahl von Stamm- und Progenitorzellen sind hämatopoietische Progenitoren primär auf pädiatrische Anwendungsgebiete beschränkt, obwohl es schon erfolgreiche Transplantationen in Erwachsenen gab [66]. Die Forschung zur *in vitro* Vermehrung von HSC generell und aus dem UCB im speziellen, konnte bisher noch kein Standardprotokoll etablieren, während die wesentlich einfachere *in vitro* Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem UCB bereits erfolgreich gelungen ist [67, 68]. Um über ein möglichst großes Repertoire an verschiedenen UCB-Samples mit verschiedenen HLA-Spezifitäten für Transplantationszwecke zur Verfügung zu haben, wurden in den letzten Jahren öffentliche und auch kommerzielle Nabelschnurblut-Banken für die Einlagerung von UCB gegründet [69].

D'Arena et al. [70] charakterisierten die im UCB vorkommenden Stamm- und Progenitorzellen die positiv für den humanen Stammzellmarker CD34 waren. Von den gemessenen, durchschnittlich 116 ± 121 CD34⁺ Zellen/ μ l UCB wies die Mehrheit der Zellen Marker der frühen myeloiden Differenzierung (CD33, CD13) auf. Ungefähr 11% der Zellen konnten aufgrund des Fehlens der Expression von HLA-DR und CD38 als primitive Progenitoren identifiziert werden. Generell konnte eine sehr große Schwankungsbreite des Gehaltes (38-564 Zellen/ μ l) und eine große Heterogenität in der Expression von Expressionsmarkern der Zellen festgestellt werden. Cardoso et al. [71] beschrieben, dass die Frequenz der primitiven CD34⁺/HLA-DR⁻/CD38⁻ Zellen aus dem UCB etwa viermal höher liegt als im adulten Knochenmark, was die CD34⁺ Zellen aus dem UCB als „unreifer“ im Vergleich zwischen den HSC-Quellen Knochenmark und UCB ausweist.

Zur Bestimmung der Frequenz und Qualität von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark und auch aus dem UCB werden routinemäßig semiliquide Colony-Forming-Unit-Assays (= CFU-Assays) angesetzt. Im semiliquiden Milieu, bedingt durch Zugabe von Methylcellulose zum Zellkultur-Medium, bilden myeloide hämatopoietische Progenitoren unter Stimulation von Cytokinen abhängig vom Typ und der Reife der Progenitorzelle spezifische Kolonien aus. Diese werden nach Kultivierung (typischerweise 1-2 Wochen) gezählt und aufgrund ihrer Morphologie einer spezifischen Vorläuferzelle zugeordnet.

Der einzige wirkliche Stammzelltyp der jedoch unter diesen Kulturbedingungen ausgemacht werden kann, ist die myeloide Stammzelle, die auch als **Colony Forming Unit-Granulocyte-**

Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte (CFU-GEMM) bezeichnet wird. In den von CFU-GEMM Progenitoren gebildeten Kolonien kann man unreife Formen von Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten sowie erythroide Vorstufen finden. Die restlichen Kolonietypen werden von myeloischen und erythroiden Progenitorzellen gebildet. Durch den Zusatz von Erythropoietin wird die Generierung von erythroiden Kolonietypen ermöglicht. Es werden bei den erythroiden Kolonien aufgrund der unterschiedlicher Reife der kolonienbildenden Progenitorzelle primär zwei Kolonieförmungen unterschieden: die unreifere Form **Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E)** bildet große Kolonien mit vielen einzelnen Clustern und die reifere Form **CFU-Erythroid (CFU-E)**, die nur kleine Kolonien aus einem einzelnen Cluster bildet. Der Progenitortyp **CFU-Granulocyte-Macrophage (CFU-GM)** generiert Granulozyten-Monozyten-Vorstufen. Die weiter spezialisierten Vorstufen **CFU-Macrophage (CFU-M)** und **CFU-Granulocyte (CFU-G)** bilden jeweils nur monozytäre bzw. granulozytäre Vorstufen aus. Für das Wachstum von Vorläufern der megakaryozytären Linie herrschen im CFU-Assay keine optimalen Bedingungen vor, wodurch ein eigener Assay für megakaryozytäre Progenitoren nötig wäre, um auf diesen Typ von Progenitorzellen zu screenen. Mayani et al. [72] nahmen eine umfangreiche Charakterisierung von HSC aus dem UCB vor (Tab.1). In der Studie wurde der relative Gehalt von myeloischen und erythroiden, sowie multipotenten Progenitorzellen pro 1×10^5 mononukleärer Zellen bestimmt und weiters eine weitere Sub-Klassifizierung der Progenitoren vorgenommen. Die Abb.4 zeigt die hierarchische Stellung der einzelnen Progenitorzelltypen, auf die im CFU-Assay gescreent wird.

HPC/1×10^5 MNC		
Myeloische PC	Erythroide PC	Multipotente PC
132 ± 69	153 ± 78	18 ± 6
Relative Proportion der myeloischen Progenitoren		
CFU-G	CFU-M	CFU-GM
33 ± 9	40 ± 12	29 ± 8
Relative Proportion der erythroiden Progenitoren		
CFU-E	7 ± 8	
BFU-E	94 ± 11	

Tab.1: Der Gehalt an hämatopoetischen Progenitorzellen (PC) pro 1×10^5 mononukleärer Zellen (MNC) aus humanem UCB sowie die relativen Proportionen der einzelnen Subtypen (nach [41]).

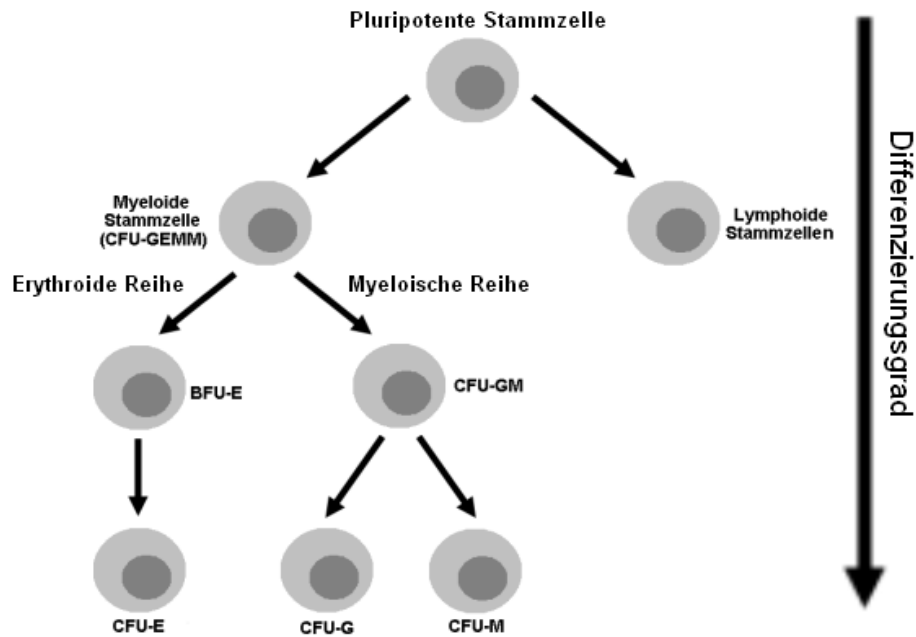


Abb.4: Colony Forming Unit -Assay. Die Abbildung zeigt hierarchisch die im klassischen CFU- Assay anzutreffenden koloniebildenden hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen. CFU-GEMM: **C**olony **F**orming **U**nit-**G**ranulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte, BFU-E: **B**urst **F**orming **U**nit-Erythroid, CFU-E: CFU-Erythroid, CFU-GM: CFU-Granulocyte-Macrophage, CFU-G: CFU-Granulocyte, CFU-M: CFU-Macrophage. Die pluripotente Stammzelle kann im CFU-Assay nicht bestimmt werden, jedoch kommt dieser Zelltyp aufgrund dessen Seltenheit in diesem Assay praktisch auch nicht vor. Die lymphoide Stammzelle wird hier nur angeführt, um die Stellung der lymphoiden Stammzelle in der Hierarchie der Hämatopoiese zu demonstrieren. Der CFU-Assay beschränkt sich auf die myeloide Reihe. Der Pfeil symbolisiert die Zunahme des Differenzierungsgrades der Progenitoren.

1.7.2 Human Erythroleukemia (HEL)

Die HEL-Zelllinie wurde 1980 aus dem peripherem Blut eines 30 jährigen Mannes etabliert, der an Erythroleukämie (AML-M6) litt [73, 74]. Neben dem erythroiden Marker Glycophorin-a (GPA) exprimieren die HEL-Zellen auch den megakaryozytären Marker CD41. Ein geringer Prozentsatz der HEL-Zellen weist einen polyploiden Zellkern auf. Typischerweise neigen einige Zellen in der Kultur dazu, am Boden der Kulturflasche oder Zellkulturplatte zu adhären.

Die Fähigkeit zur uneingeschränkten Proliferation erlangen die HEL-Zellen durch eine JAK2 V617F-Mutation. Die JAK2-Kinase (ursprünglich *just another kinase 2* oder JANUS-Kinase 2) fungiert als *die* Tyrosin-Kinase des EPO-Rezeptors, die nach Aktivierung des EPO-Rezeptors rekrutiert wird und in der Folge STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) aktiviert. Durch die V617F-Mutation erfolgt eine Daueraktivierung von JAK2 und in der Folge eine konstitutive Aktivierung von STAT5. Durch STAT5 wird die Expression einer Reihe von Genen reguliert unter anderen die des antiapoptotischen Proteins BCLx [75]. Die JAK2 V617F-Mutation konnte kürzlich auch als der Auslöser der Polycythemia vera identifiziert werden [76].

1.7.3 K-562-Zellen

Die K-562-Zelllinie wurde 1970 aus einem Zellisolat einer 53-jährigen Frau gewonnen, die an chronischer myeloischer Leukämie (CML) litt [77, 78]. Die Zellen weisen einen Erythroblasten-ähnlichen Phänotyp auf, exprimieren den erythroiden Marker Glycophorin-a und sind auch zu spontaner Hämoglobin-Produktion fähig. Die K-562-Zelllinie hat mit den HEL-Zellen gemein, dass sie ohne den Zusatz von Cytokinen und Erythropoietin proliferieren und überleben kann. Die K-562-Zelllinie weist das Philadelphia-Chromosom mit einem BCR-ABL b3-a2 Fusionsgen auf. Das Philadelphia-Chromosom entsteht durch eine Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 was zu einer Fusion zwischen dem ABL-Tyrosinkinase-Gen mit dem BCR-Gen führt. Das Vorhandensein des BCR-ABL-Fusionsgens verleiht den Zellen die Eigenschaft uneingeschränkter Proliferation und das Unterdrücken Apoptose-induzierender Mechanismen. Die molekularen Targets von BCR-ABL sind noch nicht vollständig geklärt. Fest steht jedoch, dass der PI3-Kinase-Akt-Signalweg, der RAS-MAPK-Signalweg, sowie das JAK2-STAT5 Signaling durch BCR-ABL-aktiviert werden [79-83]. Kürzlich konnte auch demonstriert werden, dass durch BCR-ABL der Gehalt von Calcium-Ionen im ER niedrig gehalten wird und dadurch der Apoptose-regulierende Mechanismus der Calcium-vermittelten Koppelung von ER mit den Mitochondrien unterbrochen wird [84].

Beiden verwendeten Zelllinien ist gemein, dass sie ihren Ursprung aus mutierten Progenitorzellen herleiten, die in einem Zyklus von Selbsterneuerung gefangen sind und ihre Fähigkeit zur terminalen Differenzierung verloren haben. Teilweise lässt sich die Fähigkeit zur Differenzierung jedoch durch verschiedene chemische Stimuli induzieren. Die Behandlung der beiden Zelllinien mit Modulatoren der PKC wie Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) oder Staurosporin verursacht megakaryozytäre Differenzierung [85-90], während die Behandlung mit Substanzen wie Hemin oder dem Chemotherapeutikum Imatinib erythroide Differenzierung induziert [91-93].

Die Verwendung von Leukämiezelllinien in dieser Studie bringt Vorteile und Nachteile mit sich. Der größte Vorteil liegt in der einfachen Kultivierung der Leukämiezellen. Beide Zelllinien weisen eine sehr hohe Proliferationsrate auf und können unter Standard-Zellkulturbedingungen ohne den Zusatz von speziellen Wachstumsfaktoren propagiert werden. Der Nachteil der Verwendung von Leukämiezellen liegt im teilweise veränderten Wachstums- und Differenzierungsverhalten im Vergleich zu nicht transformierten Progenitorzellen. Dies macht teilweise die Interpretation von Daten und die Umlegung auf physiologische Progenitorzellen schwierig.

Über eine adrenerge Beeinflussung von zellulären Funktionen der beiden Zelllinien gibt es bis dato nicht sehr viele Informationen. Es ist zwar bekannt, dass HEL-Zellen α 2-adrenerge

Rezeptoren exprimieren [33], über eine Funktion dieser Rezeptoren gibt es jedoch keine Informationen. In einer chinesischen Studie konnte gezeigt werden, dass Zellen der K-562-Zelllinie *in vitro* nach Behandlung mit dem α 1-adrenergen Antagonisten Prazosin Zeichen von Apoptose aufwiesen [94]. Gauwerky und Golde [95] konnten nachweisen dass der β -adrenerge Agonist Isoprenalin die Proliferation der K-562-Zellen stimulierte, während eine zelluläre Reaktion auf α -adrenerge Stimulation nur unter Hormon-depletierten Bedingungen messbar war.

2 Material und Methoden

2.1 Sammeln des Nabelschnurblutes und Isolation von mononukleären Zellen

Humanes Nabelschnurblut als Quelle hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen wurde von der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LKH Graz bezogen.

Die Abnahme des Nabelschnurblutes erfolgte unter Zustimmung der Mutter durch Fachpersonal der Klinik unter (semi-)sterilen Bedingungen. Ausschließlich UCB gesunder Mütter mit normaler Schwangerschaftsdauer, aus Spontangeburt wurde verarbeitet. Andere Parameter - wie z.B. das Geschlecht des Kindes - wurden nicht als Kriterium herangezogen.

Das Blut wurde in 50 ml -Tubes in denen als Anticoagulans Ammonium-Heparin-Kugeln (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorgelegt wurden, gesammelt. Die Abnahme des Blutes erfolgte unmittelbar nach der Geburt des Kindes. Vom Abfüllen der Probe bis zur Isolation der mononukleären Zellen (MNCs) aus dem Blut vergingen, abhängig vom Zeitpunkt der Geburt des Kindes, maximal 16 Stunden. Um sicherzustellen, Zellen mit möglichst guter Qualität zu verarbeiten und eine hohe Zellausbeute zu erreichen, wurde bei Verfügbarkeit mehrerer Proben die Probe verwendet die am frischesten war, bzw. ein höheres Volumen aufwies. Von der Abnahme bis zur Verarbeitung wurde das Blut bei Raumtemperatur gelagert. Zur Präparation der MNCs aus dem UCB wurde die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass MNCs im Gegensatz zu Erythrozyten und Granulozyten eine unterschiedliche Dichte aufweisen. Nach Überschichtung von Ficoll mit der spezifischen Dichte von 1,077 g/ml mit Blut und darauf folgender Zentrifugation kommt es zu einer spezifischen Separation von MNCs. Aufgrund ihrer Dichteigenschaften liegen die MNC-Fraktion und auch die Platelets nach der Zentrifugation über der Ficollschicht während Erythrozyten und Granulozyten unter das Trennmittel absinken.

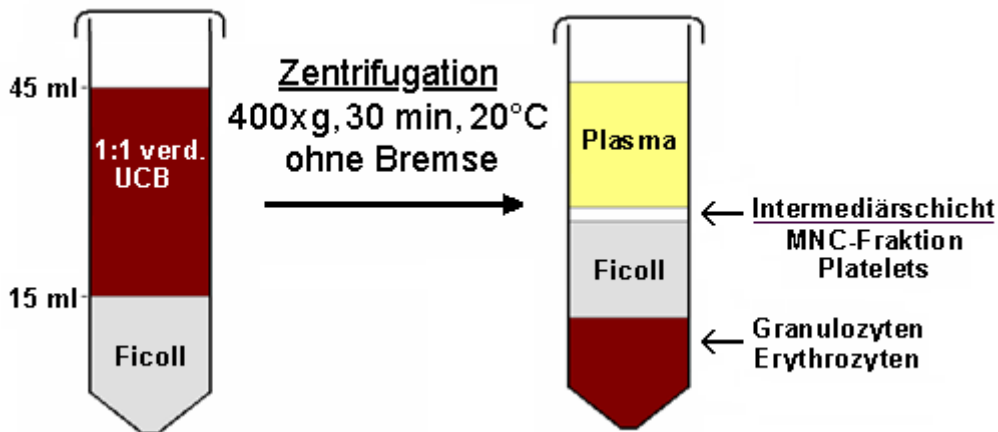


Abb.5: Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation von UCB. Erklärung siehe Text.

Frisches UCB wurde mit Calcium/Magnesium-freiem Phosphatpuffer (CMF-PBS, Zusammensetzung siehe Anhang) 1:1 verdünnt. In 50 ml Tubes wurden je 15 ml Histopaque 1077 (Sigma/Aldrich, St.Louis, MO/USA) vorgelegt und mit 30 ml verdünntem UCB vorsichtig überschichtet (siehe Abb.5). Die Tubes wurden schließlich für 30 min bei 20°C bei 400 x g ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die Intermediärschicht der einzelnen Röhrcchen einer UCB-Probe mit einer Plastik-Pasteurpipette abgehoben und in ein frisches Tube überführt. Die Zellsuspension wurde mit CMF-PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 450 x g bei 10°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt.

Das erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml Minimum Essential Medium-Alpha (α -MEM, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY/USA) mit 15% fetalem Rinderserum (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) resuspendiert. Mittels CASY® Cellcounter & Analyser (Modell TTC, Innovatis-AG, Reutlingen, Deutschland) wurde nach Lyse der restlichen Erythrozyten mittels ZAP-OGLOBIN II Lytic Reagent (Beckman/Coulter, Fullerton, CA/USA) die Zellzahl bestimmt.

In der erhaltenen MNC-Fraktion sollten neben Lymphozyten und Monozyten die Stamm- und Progenitorzellen angereichert vorliegen.

2.2 Adrenerge Agonisten und Antagonisten

In dieser Arbeit wurde vorwiegend die Wirkung von α -adrenergen Agonisten und Antagonisten auf das Wachstum von hämatopoetischen Progenitoren bzw. Leukämiezellen untersucht, da die große Vielzahl von verschiedenen adrenergen Rezeptortypen eine Spezialisierung auf eine Rezeptorklasse nötig machte.

Anstelle der natürlichen adrenergen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin wurden rezeptorspezifische α -adrenerge Agonisten und Antagonisten eingesetzt. Alle adrenergen Mediatoren außer Oxymetazolin (ICN Biomedicals, Aurora, OH/USA) wurden von

Sigma/Aldrich (St.Louis, MO/USA) bezogen. Die α -Agonisten Naphazolin (α 1-spezifisch), Oxymetazolin (α 1-spezifisch) und Clonidin (α 2-spezifisch) wurden jeweils als 0,1M Stocks in RPMI 1640 Zellkulturmedium gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die adrenergen Antagonisten Benoxathian (α 1-spezifisch), Prazosin (α 1-spezifisch) und Yohimbin (α 2-spezifisch) wurden ihrer Löslichkeit entsprechend in Aqua bidest (Fresenius-Kabi, Graz, Österreich) gelöst. Die Benoxathian (0,025M) - und Yohimbin (0,01M) Stocks wurden filtriert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Wegen der äußerst geringen Löslichkeit von Prazosin in Aqua bidest wurde für jeden Ansatz eine 0,002M Lösung des Wirkstoffes frisch vorbereitet und sterilfiltriert.

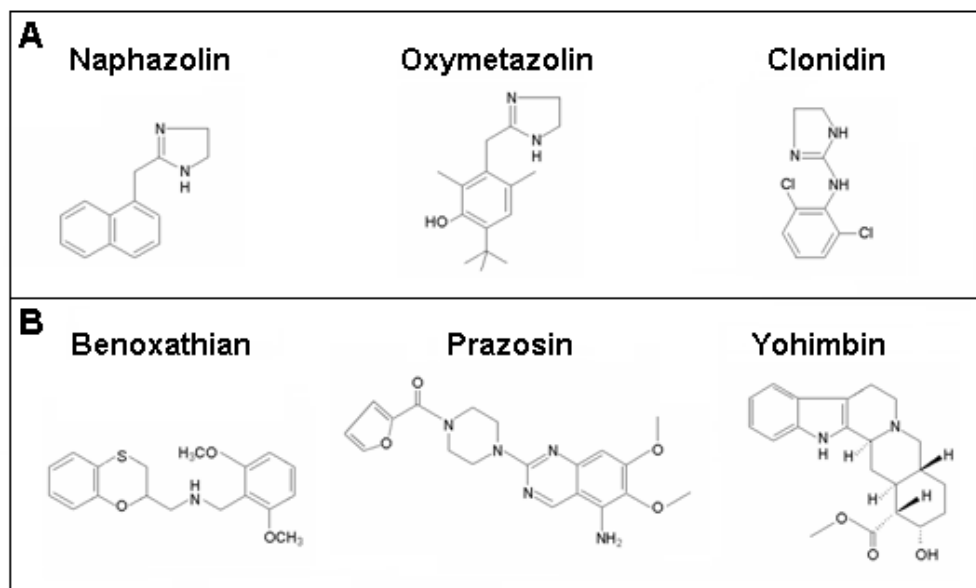


Abb.6: Strukturformeln der in den Experimenten eingesetzten α -adrenergen Agonisten (**A**) und Antagonisten (**B**).

Um erste Aufschlüsse über die Signalwege zu erhalten, die in Erythroleukämiezellen nach Stimulation mit adrenergen Agonisten aktiviert werden, wurden pharmakologische Inhibitoren eingesetzt, um spezifische Komponenten der adrenergen Signaltransduktion zu blockieren. Die Inhibitoren (Tab.2) wurden jeweils mit 100 μM Naphazolin kombiniert um den Effekt auf die GPA-Expression zu überprüfen. Um den Effekt auf die Proliferation und die Viabilität zu testen, wurden die Inhibitoren mit 200 μM Naphazolin kombiniert.

Substanz	Target	Solvent	Hersteller
U-73122	PLC	DMSO	Cayman
SB203580	p38-MAPK	DMSO	Sigma
U-0126 PD-98059	MEK1/2	DMSO	Cayman
LY-294,002	PI3-Kinase	DMSO	Sigma
Ouabain	Na-K-ATPase	RPMI 1640	Sigma

Tab.2: In den Versuchen verwendete Signaltransduktions-Inhibitoren, die in Kombination mit den adrenergen Agonisten eingesetzt wurden. Abkürzungen: PLC: Phospholipase-C, p38-MAPK: p38-Mitogen Activated Protein Kinase, PI3-Kinase: Phosphatidylinositol 3-Kinase, MEK1/2: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase1/2, DMSO: Dimethylsulfoxid, Sigma: Sigma/Aldrich, St.Louis, MO/USA, Cayman: Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI/USA.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zellkultur der Erythroleukämiezellen

Die HEL-Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig/Deutschland) bezogen, die K-562-Zelllinie von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA/USA) verwendet. Beide Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium (Lonza, Verviers/Belgien) supplementiert mit 2mM L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 10% fetalem Rinderserum (PAA) und 100 IU Penicillin/100 µg/ml Streptomycin („Penstrep“, PAA) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für nicht-adhärenente Zellen, da beide Zelllinien in Suspension wachsen. Die Kultivierung erfolgte standardgemäß in einem Brutschrank, bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Feuchtigkeit.

In den experimentellen Ansätzen wurden beide Zelllinien in 24 Well oder 12 Well Microtiter-Platten mit flachem Boden (Greiner, Kremsmünster/Österreich oder Costar, Cambridge, MA/USA), mit einer Startzellzahl von 1x10⁴ oder 2x10⁴ Zellen/ml inkubiert. Die Kultivierungsdauer betrug je nach Experiment 48h oder 72h. Die Zellzahlen und die Viabilität der Kulturansätze wurden mit einem CASY® -Cellcounter & Analyser (Modell TTC, Innovatis-AG, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. In einigen Experimenten wurde statt dem fetalem Rinderserum ein Serumersatz aus Insulin, Selen und Transferrin (IST Supplement, PAA) dem RPMI 1640-Medium zugesetzt und das Medium zusätzlich mit 1mg/ml bovinem Serumalbumin (Sigma) supplementiert.

2.3.2 Kultivierung der UCB-Stamm- und Progenitorzellen in semiliquidem Medium

Zur Kultivierung der Stamm- und Progenitorzellen aus dem Nabelschnurblut wurde METHOCULT™ GF H4434 (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) ein Methylcellulose enthaltendes, semiliquides Medium verwendet. Da die Herstellung eines semiliquiden Stammzellmediums sehr aufwendig ist, wurde dieses Fertigmedium verwendet. Das Medium METHOCULT™ GF H4434 auf der Basis von Iscove's Modified Dulbecco's-Medium (IMDM) enthält die rekombinanten humanen Cytokine Stem Cell Factor (SCF), GM-CSF, IL-3 und auch das Glycoproteinormon Erythropoietin (EPO). Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang zu entnehmen.

Für einige Experimente wurde ein ähnliches Medium (*Human Methylcellulose Complete Media without Epo*, R&D Systems, Minneapolis, ME/USA) ohne Erythropoietin-Zusatz verwendet. Dieses Medium wurde gewählt, um die Auswirkungen auf das Wachstum der Progenitoren mit und ohne Erythropoietin zu testen. Um auch erythroides Wachstum in diesem Medium zu ermöglichen, wurde gegebenenfalls humanes rekombinantes

Erythropoietin-alpha (Cell Systems, St. Katharinen, Deutschland) in einer Konzentration von 3IU/ml zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist dem Anhang zu entnehmen.

Für den Kulturansatz wurden 1×10^4 UCB-isolierte MNCs pro ml Methocult eingesetzt. Jede einzelne Kulturbedingung wurde als Duplikat angesetzt. Da das Methocult-Medium sehr zäh ist, muss es prinzipiell mit einer Spritze und einer Kanüle gehandhabt werden. In 2 ml-Reaktionsgefäße wurde pro Ansatz jeweils 1 ml Methocult vorgelegt und die Zellsuspension + adrenerge Agonisten/Antagonisten zugesetzt. Um die optimale Viskosität des Mediums zu erhalten, mussten insgesamt 100 μ l Flüssigkeitsvolumen/ml Medium zugesetzt werden. Wurde dieses Volumen nicht durch die Zellsuspension und die Zusätze erreicht, wurde dieses restliche Volumen mit α -MEM (Gibco/Invitrogen) aufgefüllt. Durch kräftiges Vortexen wurde eine Vermischung des Kulturansatzes erreicht. Der Kulturansatz wurde schließlich mit einer Spritze in non-adhäsive 35 mm Petri-Schalen (Cell-Systems, St. Katharinen, Deutschland) überführt und luftblasenfrei ausplattiert. Die Kulturansätze wurden daraufhin in Petri-Schalen mit 140 mm Durchmesser mit einer zentralen Schale mit sterilem Aqua bidest als Feuchtigkeitsspender 13 - 14 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Feuchtigkeit kultiviert (Abb.7).

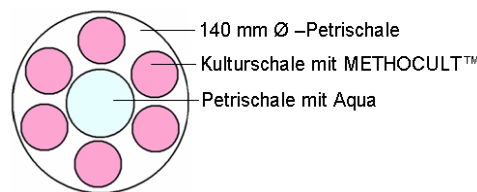


Abb.7: Modell des Kulturansatzes der CFU-Assays.

Nach der Kultivierung wurden die Kolonien im semiliquiden Medium mit einem inversen Mikroskop gezählt und einem Kolonietyp zugeordnet. CFU-GM, CFU-G,- und CFU-M-Kolonien wurden in der Auswertung als CFU-GM-Kolonien zusammengefasst. CFU-E-Kolonien wurden aufgrund ihrer geringen Häufigkeit nicht getrennt von den BFU-Kolonien gezählt und beide Kolonietypen zusammen als erythroide Kolonien bzw. BFU-E gewertet.

Nach der Zählung der Kolonien wurden die Methylcellulose-Kulturansätze mit 3 ml CMF-PBS aufgeschwemmt, eine homogene Zellsuspension hergestellt, die Zellen pelletiert und einmal in CMF-PBS gewaschen um die restliche Methylcellulose zu entfernen. Daraufhin wurde mittels CASY die Gesamtzellzahl in den einzelnen Dishes bestimmt und anschließend der Phänotyp der enthaltenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert bzw. die Zellen auf einen Objektträger für eine hämatologische Färbung aufzentrifugiert.

2.4 Alkalischer Comet-Assay

Um zu testen, ob durch Naphazolin- Applikation in den Erythroleukämiezellen DNA-Schäden verursacht werden, wurden HEL- und K-562-Zellen bei einer Einsaat von 2×10^4 Zellen/ml 48h mit und ohne Naphazolin (100 μM und 200 μM) in 24 Well-Platten in Triplicates inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit 10 μM des Sauerstoffradikal-Generators Menadion (Sigma/Aldrich) behandelt. Menadion, auch als Vitamin K_3 bekannt, wird synthetisch hergestellt und zählt zu den Chinonen [96]. Der intrazelluläre Metabolismus von Menadion (hauptsächlich in den Mitochondrien) durch reduzierende Enzyme generiert ein instabiles Semichinon-Radikal das durch weitere Reduktion in ein stabiles Hydrochinon übergeführt wird. Die Rückoxidation generiert das Sauerstoffradikal Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) wenn molekularer Sauerstoff anwesend ist [96]. Superoxid ist ein sehr reaktives Sauerstoffradikal das Strangbrüche in die DNA einführt [97].

Nach der Kultivierung wurde mittels CASY die Zellzahl bestimmt, 2×10^5 Zellen pro Kulturbedingung entnommen, der Überstand abzentrifugiert (300 x g, 5°C), die Zellen in 20 μl CMF-PBS resuspendiert und mittels Comet-Assay analysiert.

Der Comet-Assay, entwickelt von Singh et al., 1988 [98], ist ein Testverfahren, um DNA-Strangbrüche auf Ebene von Einzelzellen zu detektieren. Zellen werden dabei in einem Agarosegel eingebettet auf einen Objektträger aufgebracht und Spannung angelegt. Durch die Spannung tritt geschädigte, in Bruchstücken vorliegende DNA, aus der Zelle aus, während die chromosomale DNA in der Zelle zurückbleibt. Durch Färbung des Slides mit DNA-affinen Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) kann man die DNA sichtbar machen. Nach der Färbung erscheinen die Zellen mit geschädigter DNA als „Kometen“. Der Kopf des Kometen wird vom Zellkern gebildet, der Schweif des Kometen von den ausgetretenen DNA -Fragmenten (siehe Abb.8). Im alkalischen Comet Assay können im Gegensatz zum neutralen Comet Assay auch Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden.

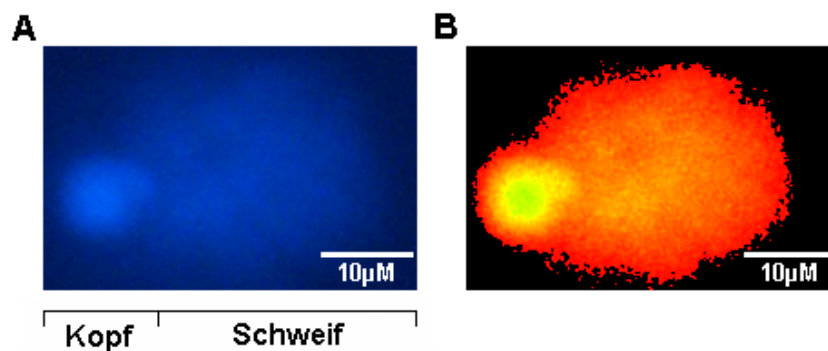


Abb.8: Comet Assay. **A:** Die Abbildung zeigt eine mit Naphazolin [200 μM] behandelte K-562-Zelle deren DNA geschädigt wurde, nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI; Originale Vergrößerung: 100x. **B:** Es wird dieselbe Zelle gezeigt wie in A, jedoch prozessiert durch das Comet Analyse-Programm CometScore v1.5.

Der Comet-Assay ist auch dafür geeignet, um zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod von Zellen zu unterscheiden [99]. Im Comet-Assay wird nur bei apoptotischen Zellen, nicht jedoch bei nekrotischen Zellen ein Kometenschweif sichtbar.

Präparation der Slides für den Comet-Assay:

Als das größte Problem bei der Durchführung der Comet-Assays stellte sich heraus, dass das erste Agarosegel nur sehr schlecht am Objektträger haften blieb, bzw. bei den einzelnen Inkubationsschritten in denen die Slides in Flüssigkeit liegen, abschwammen.

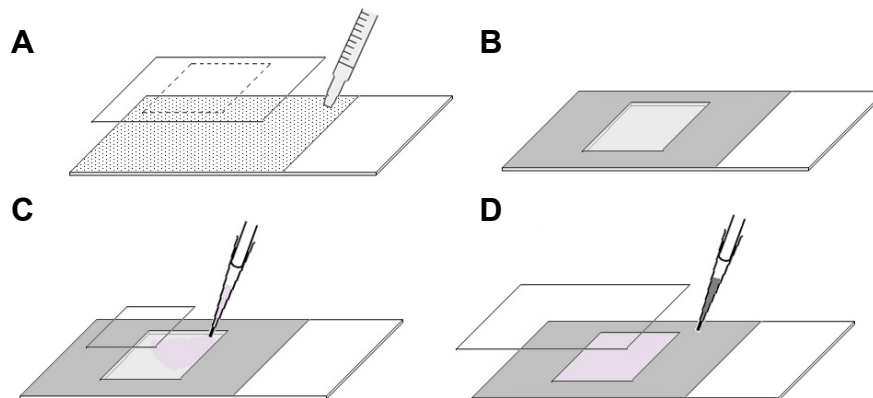


Abb.9: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Auftragens der Gele und der Zellen auf den Comet Assay-Objektträger. **A:** Auftragen der ersten Gelschicht mit einer Spritze auf den vorbereiteten Objektträger. **B/C:** Durch die Kombination zweier unterschiedlich großer Deckgläser entsteht in der ersten Gelschicht eine Kammer in der die in Low-Melting-Agarose resuspendierten Zellen eingefüllt werden. **D:** Die Zellen werden mit einer letzten Schicht von Low-Melting-Agarose überschichtet.

Um diesem Problem zu entgehen wurde folgende Modifikation eingeführt: Vor der Durchführung des Comet-Assays wurden die Slides in aufgeschmolzene 1% Normal melting Agarose (BMA, Rockland, ME/USA) getaucht, die flüssige Agarose auf der Unterseite entfernt und der Slide auf eine Heizplatte gelegt (200°C).

Durch die Hitze wird die Agarose auf dem Slide dehydriert und es entsteht eine Schicht, welche die Haltbarkeit der ersten Gelschicht am Slide derartig verbessert, sodass das Abschwimmen der Gele verhindert wird. Durch diese Modifikation wurde die Effektivität des Comet-Assays deutlich gesteigert.

Nachdem die zu analysierenden Zellen vorbereitet waren, wurden 500 µl aufgeschmolzene 1% Normal melting Agarose auf einen vorbereiteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt (Abb.9A). Bei diesem Arbeitsschritt wurde eine weitere Modifikation eingeführt. Auf das im Standardprotokoll verwendete 24 x 60 mm Deckglas wurde vor dem Bedecken des Gels zentral ein 21 x 26 mm Deckglas mit aufgeschmolzener Agarose aufgeklebt (Abb.9A). Nach dem Bedecken mit diesem doppelten Deckglas und Aushärten der Agarose für 5 min im Kühlschrank entsteht auf dem Slide eine kleine Kammer in der die Zellsuspension, resuspendiert in der Low melting Agarose, eingefüllt werden kann (Abb.9B). Durch die Kammer wurde dem Effekt, dass sich die Zellen recht unregelmäßig auf dem Slide

verteilen und tendieren an den Rändern des Deckglases zum Liegen zu kommen, erfolgreich entgegnet. Die jeweiligen Zellsuspensionen (20 µl) wurden mit 140 µl aufgeschmolzener Low melting Agarose (Promega, Madison, WI/USA) versetzt, resuspendiert und 80 µl dieses Gemisches in die entstandene Kammer eingefüllt und mit einem 12 x 26 mm Deckglas bedeckt (Abb.9C). Nach Aushärten im Kühlschrank für 10 min wurde die Zellen enthaltende Schicht noch einmal mit 100 µl Low melting Agarose überschichtet, mit einem 24 x 60 mm Deckglas bedeckt und wieder im Kühlschrank für 10 min ausgehärtet (Abb.9D). Die Slides mit den Zellen wurden danach für eine Stunde in Lysepuffer lichtgeschützt bei 10°C inkubiert. Nach 20 min Entwinden der DNA im alkalischen Elektrophoresepuffer (Rezept siehe Anhang) wurde an die verwendete Spezial- Elektrophoresekammer für Comet-Assays (Cleaver Scientific, Rugby, UK) für 30 min 20 V Spannung bei 270 mA Stromstärke angelegt. Um den alkalischen pH zu neutralisieren wurden die Slides danach für 10 min in eine Wanne mit Neutralisationspuffer (Rezept siehe Anhang) gelegt. Der Neutralisationspuffer wurde abgesaugt und durch eine 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma)-Färbelösung (0,5 µM DAPI in Aqua bidest) ersetzt. Die Färbung erfolgte lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten in Aqua bidest wurde ein Deckglas auf die Slides gelegt und die Slides im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Von den Zellen wurden unter UV-Licht bei 100x lichtmikroskopischer Vergrößerung Fotos aufgenommen. Es wurden pro Foto jeweils alle auswertbaren Zellkerne bzw. Kometen vermessen bis ca. 250 Zellen pro Ansatz analysiert waren. Die Auswertung erfolgte am Computer mit der Freeware CometScore v1.5 (TriTek Corp, Sumerduck, VA/USA).

Die wichtigsten Parameter die im Comet Assay bestimmt werden sind die Länge und die Fläche des Schweifes, der Prozentsatz der DNA im Kopf und Schweif sowie das so genannte Olive tail moment (OTM). Diese rechnerische Größe ergibt sich aus dem Prozentsatz der DNA im Schweif und der Distanz zwischen den Punkten von Kopf und Schweif mit dem jeweils höchstem DNA-Gehalt (berechnet durch die Fluoreszenzintensität) [100]. Um das Anhäufen von riesigen Datenmengen zu vermeiden, wurde als Auswerteparameter der prozentuelle Anteil der Gesamt-DNA im Kometenschweif gewählt.

2.5 Detektion von Apoptose in Erythroleukämiezellen

Um Apoptose in den Zellen nach Behandlung mit adrenergen Agonisten und Antagonisten nachzuweisen, wurde einerseits das Auftreten von Kernfragmentation beobachtet und andererseits die Aktivierung der Caspase 3 gemessen.

2.5.1 DAPI-Staining

Für den Nachweis von Kernfragmentation wurden behandelte sowie unbehandelte Zellen mittels Cytospin auf Objektträger zentrifugiert. Für diese Applikation wurden adhäsive flexiPerm-Zellkulturkammern mit jeweils acht Kammern (Greiner, Kremsmünster, Österreich) auf Objektträger gepresst, mit Zellsuspension (ca. 7×10^4 Zellen/Kammer) gefüllt und 10 min ohne Bremse bei 190 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt und die Kammer entfernt. Die Slides wurden luftgetrocknet und 5 min mit Methanol fixiert. Die Slides wurden daraufhin mit DAPI-Färbelösung (0,5 μ M DAPI in CMF-PBS) bedeckt und in einer feuchten Kammer für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Slides 5 min in CMF-PBS gewaschen. Die Objektträger wurden daraufhin mit Mounting Medium (INOVA-Diagnostics, San Diego, CA/USA) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Zellen wurden anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.5.2 Aktive Caspase 3-Assay

Caspasen sind Enzyme, die essentielle Komponenten bei der Exekution des programmierten Zelltodes (Apoptose) darstellen [101]. Die Bezeichnung Caspase rührt von der Substratspezifität dieser Proteasen her. Caspasen sind Cystein-Proteasen die ihre Proteintargets nach einem Aspartat-Rest spalten. Die Caspase 3 ist eine so genannte Effektorcaspase und nimmt eine Schlüsselrolle im Verlauf der Apoptose ein. Die Caspase 3 liegt als inaktive Form im Cytoplasma vor und wird durch Autoproteolyse oder durch andere Proteasen in eine aktive Form überführt. Aktive Caspase 3 aktiviert weitere Caspasen (Caspasen -6, -7, -9) sowie weitere Targets wie Bcl2 im Cytoplasma oder PARP im Zellkern [102].

Im gewählten Assay wird durch einen Antikörper spezifisch die aktivierte Form der Caspase 3 nachgewiesen. Für diesen Zweck wurde ein FITC-Conjugated Monoclonal Active Caspase 3 Antibody Apoptosis-Kit (BD-Pharmingen, San Diego, CA/USA) verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers des Kits nach folgendem Protokoll.

Mit adrenergen Agonisten bzw. Antagonisten behandelte Zellen wurden 2x mit CMF-PBS gewaschen und 2×10^5 Zellen in 100 μ l Cytofix/Cytoperm solution (BD) für 20 min auf Eis inkubiert um die Zellen zu permeabilisieren und zu fixieren.

Die Zellen wurden bei 450 x g pelletiert und 2x mit Perm/Wash-Puffer (BD) gewaschen (Volumen: 100 µl). Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Ansatz jeweils auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße (je 50 µl) aufgeteilt.

Nach dem Permeabilisieren, Fixieren und Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers. Ein Ansatz wurde jeweils mit dem Antikörper inkubiert und der zweite Ansatz unter denselben Bedingungen ohne Antikörper als Kontrolle.

Nach einem Waschschrift mit Perm/Wash-Puffer wurden die Zellen in 300 µl Perm/Wash-Puffer resuspendiert und anschließend im Kanal FL1 in einem FACScan-Durchflusscytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA/USA) analysiert.

2.6 Nachweis der Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

2.6.1 Nachweis der Generierung von intrazellulären Sauerstoffradikalen (ROS) durch Bestimmung der Oxidation von 2,7-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat

Um zu bestimmen, ob durch Behandlung mit adrenergen Agonisten in Erythroleukämiezellen die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert wird, wurde die Fähigkeit der Zellen gemessen, aufgenommenes 2'7-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA) intrazellulär zu oxidieren (Abb.10). DCFH-DA kann von Zellen durch die Zellmembran (begünstigt durch Acetatreste) aufgenommen werden. Intrazellulär wird DCFH-DA durch Esterasen prozessiert wodurch 2'7-Dichlorodihydrofluorescein entsteht, das im Cytoplasma akkumuliert. Durch Sauerstoffradikale wird 2'7-Dichlorodihydrofluorescein intrazellulär oxidiert und es entsteht mit dem Radikal DCF[•] als Intermediärprodukt schließlich 2'7'-Dichlorofluorescein, das ein Extinktionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 629 nm aufweist [103]. Je mehr Sauerstoffradikale in der Zelle generiert werden, desto mehr 2'7'-Dichlorofluorescein wird gebildet.

Die auftretende Fluoreszenz kann mittels Fluoreszenzmikroskop bzw. mittels Durchflusscytometrie bestimmt werden.

Für die ROS-Messung wurden K-562-Zellen in einer Einsaat von 1×10^5 Zellen/ml 24h und 48h in 24 Well-Platten in Gegenwart von 50 µM, 100 µM und 200 µM Naphazolin, jeweils in Duplicates inkubiert. Als Kontrolle wurden K-562-Zellen mit dem ROS-Generator Menadion (5 µM und 10 µM) behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen aus den Wells in jeweils zwei FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 x g bei 10°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgehoben und die Zellen eines Röhrchens in 500 µl CMF-Puffer mit 1% DMSO resuspendiert (= Kontrolle). Die Zellen des zweiten Röhrchens

wurden in 500 µl DCFH-DA Färbelösung (= 10 µl 1 mM 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate gelöst in DMSO / ml CMF-Puffer) resuspendiert. Kontrollen und Färbensätze wurden für 15 min bei 37°C lichtgeschützt in einem Wasserbad inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen in 300 µl CMF-Puffer resuspendiert und bis zur Analyse in einer Eisbox aufbewahrt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Zellen erfolgte mit einem FACscan-Durchflusscytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA/USA).

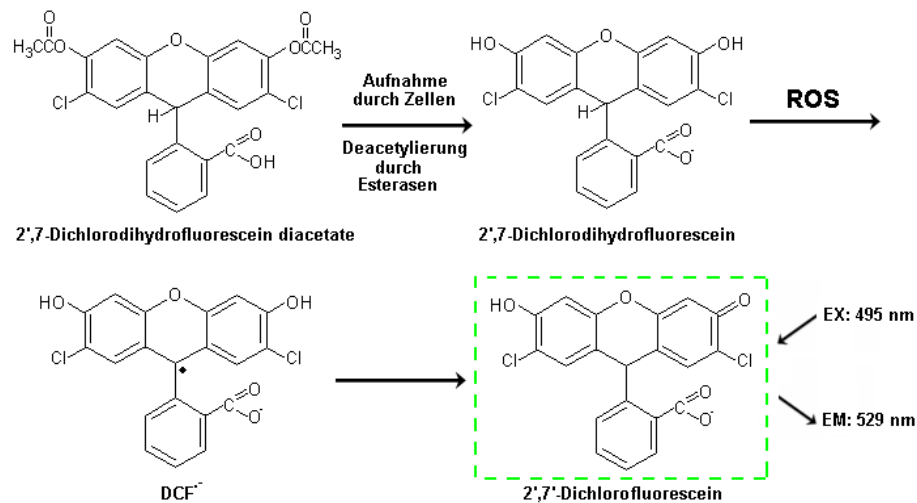


Abb.10: Schema der Umwandlung von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate in das Fluorochrom 2',7'-Dichlorofluorescein durch intrazelluläre ROS-Generierung (nach [103]).

2.6.2 Induktion und Inhibition von Sauerstoffradikalbildung in K-562-Zellen durch Behandlung mit dem ROS-Generator Menadion und Antioxidantien

Um die Rolle von Reaktiven Sauerstoffspezies weiter zu erörtern, wurde versucht den Effekt von Naphazolin durch den intrazellulären ROS-Generator Menadion zu imitieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Menadion in K-562-Zellen ROS generiert und einen Caspase 3 unabhängigen, Nekrose-ähnlichen Zelltod induziert [104, 105]. Menadion wurde in RPMI 1640 Medium als 0,1 mM Stock gelöst und der Erythroleukämie-Zellkultur in Konzentrationen zwischen 2 µM und 20 µM zugesetzt.

Um die schädigende Wirkung der intrazellulären ROS-Generierung zu unterdrücken, wurden zwei verschiedene Antioxidantien der Kultur zugesetzt. N-Acetyl-Cystein (NAC) ist ein klassisches Antioxidants das schon in vielen Studien eingesetzt wurde und dessen vielfältige Wirkungen bereits gut charakterisiert sind [106]. NAC stellt auch eine essentielle Komponente der natürlichen Sythese von Glutathion dar. Das Antioxidants Pyrollidin-Dithiocarbamat (PDTC) trägt wie NAC eine Thiol (-SH) Gruppe und weist wie NAC die Eigenschaft auf, den Transkriptionsfaktor NF-κβ zu inhibieren [106]. Beide Antioxidantien wurden von Sigma bezogen und in Aqua bidest (Fresenius-Kabi, Graz, Österreich) gelöst.

PTDC wurde den K-562-Kulturen in Konzentrationen von 1 μ M - 5 μ M zugesetzt, NAC in Konzentrationen von 5 mM - 15 mM.

Neben ROS kann auch das Stickstoff-Monoxid-Radikal (NO) eine wachstumsinhibierende, schädigende Wirkung auf Zellen haben, bzw. ROS-Produktion in den Mitochondrien selbst stimulieren [107]. Aus Reaktionsprodukten aus NO mit ROS entstehen außerdem aggressive Radikale wie Peroxynitrit. Um die Wirkung von NO auf K-562-Zellen zu imitieren, wurde das NO-freisetzende Agens Natrium-Nitroprussid (SNP) den Zellen zugesetzt. Aufgrund der chemischen Instabilität wurde die SNP-Lösung vor jedem Experiment frisch gelöst, (in RPMI 1640), sterilfiltriert und den Kulturen in Konzentrationen von 1-3 mM zugesetzt. Die SNP-Kulturen wurden in einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml angesetzt und mit/ohne Naphazolin 48h inkubiert.

Um die mögliche Wirkung von generiertem intrazellulärem NO nach Naphazolin-Behandlung zu unterdrücken, wurde 1. humanes Hämoglobin und 2. die unspezifischen NO-Synthase-Inhibitoren Aminoguanidin und N^G -Nitro-L-Arginin (alle Sigma/Aldrich) den Kulturen zugesetzt.

2.7 Bestimmung der Expression des erythroiden Markers Glycophorin-a (GPA)

Zum Nachweis, ob die UCB-Progenitoren *in vitro* erythroide Zellen produziert haben, beziehungsweise, die Erythroleukämiezellen nach verschiedenen Behandlungen einen erythroiden Phänotyp aufweisen, wurde die Expression von Glycophorin-a bestimmt. GPA (CD235a) wird spezifisch auf Zellen der erythroiden Linie exprimiert und ist daher gut geeignet zur Bestimmung der Zugehörigkeit von Zellen zur roten Reihe. GPA stellt eines der Haupt-Membranproteine der Erythrocyten dar. Die genaue molekulare Funktion von GPA konnte bis jetzt noch nicht eruiert werden, diskutiert wird jedoch eine mögliche Rolle als Anti-Adhäsionsfaktor [108]. Die GPA-Expression steht unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors GATA-1 [109].

Die Expression von GPA auf Proteinebene der kultivierten Nabelschnurblut-Progenitoren und der Erythroleukämiezellen erfolgte mittels Durchflusscytometrie. Die Zellen wurden dafür mit einem Anti-Human CD235-Antikörper (BD-Pharmingen, San Diego, CA/USA), gekoppelt mit dem Tandem-Fluoreszenzfarbstoff PECy5 gefärbt.

In der Analyse der kultivierten UCB-Progenitoren wurde zusätzlich zur Bestimmung von GPA der Stammzellmarker CD34 und der Pan-Leukozytenmarker CD45 bestimmt. Für die Bestimmung dieser beiden Marker wurde die Antikörper-Kombination CD45 FITC/CD34 PE von BD Biosciences (San Jose, CA/USA) verwendet.

Die Zellen (Zellzahl: 1×10^5) wurden vor der Antikörperfärbung einmal in CMF-Puffer gewaschen und danach mit 2 μ l 1:100 verdünntem GPA Antikörper/ 1×10^5 Zellen in einem Volumen von je 100 μ l Färbepuffer (*Stain Buffer FBS*, BD-Pharmingen) resuspendiert und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Antikörper-Zusatz wurde die jeweilige Negativ-Kontrolle des Ansatzes mitbehandelt. In den UCB-Ansätzen wurden pro Ansatz noch je 2 μ l der CD45/CD34-Antikörper-Kombination zugesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit CMF-Puffer gewaschen, in Puffer resuspendiert und mit einem FACScan- Durchflusscytometer (BD) vermessen.

2.8 Nachweis einer möglichen autokrinen/parakrinen adrenergen Regulation von Erythroleukämiezellen

2.8.1 Nachweis der Expression der Dopamin-beta-Hydroxylase mittels RT-PCR

Der Nachweis einer möglichen Expression des Enzyms Dopamin-beta-Hydroxylase (DbH) in den Erythroleukämie-Zelllinien sollte mittels *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) auf Ebene der mRNA erbracht werden. Als Positivkontrolle für den Nachweis der Expression des Enzyms wurden einerseits humane mononukleäre Zellen verwendet, da bekannt ist, dass Lymphozyten DbH exprimieren [3] und andererseits humanes Nebennierengewebe das aus Operationsmaterial einer Patientin gewonnen wurde, die einer Nephrektomie unterzogen werden musste.

RNA-Isolation aus Zellen und Nebennierengewebe

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen bzw. dem Nebennierengewebe wurde mittels peqGOLD TriFastTMFL (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) nach der Phenol-Chloroform Extraktions-Methode durchgeführt. Bei der RNA Extraktion wurde gemäß der Arbeitsanleitung der Herstellerfirma vorgegangen. Die Bestimmung der erzielten RNA-Ausbeute und der Qualität der Proben erfolgte mittels photometrischer Bestimmung mit einem NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (PEQLAB).

DNase Verdau, reverse Transkription und PCR-Reaktion:

Der DNase Verdau und die reverse Transkription wurden in einem PTC-200 Gradient Cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) durchgeführt.

Vor dem Umschreiben der mRNA-Information in cDNA (= reverse Transkription) wurden die RNA-Proben einem DNase Verdau unterzogen, um restliche DNA in den Proben zu entfernen. Für den DNase Verdau wurde eine RQ1 RNase-free DNase (Promega,

Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Durchführung des DNase Verdau erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers. Nach dem DNase Verdau erfolgte anschließend in denselben Reaktionsgefäßen die reverse Transkription der RNA in cDNA mit einem Cloned AMV First-strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Lofer, Österreich) gemäß der Instruktionen des Herstellers. Die PCR-Reaktion selbst erfolgte in einem Biorad iCycler (Biorad, Wien, Österreich) in Verwendung von je 10 pmol DbH- spezifischen Primern mit folgenden Sequenzen:

Forward-Primer: (5'- 3') TCA CTT CCA GGA GAT CCG CAT GTT

Reverse- Primer: (5'- 3') TTC TGT GTT GTA CGT GCA GGA GGT

Für die PCR wurde ein *Ready to use* PCR-Reaktionsgemisch der Firma Biorad (Biorad, Wien, Österreich) verwendet.

Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurde mit einem 2% igem Agarosegel überprüft, ob sich DbH spezifische PCR-Produkte gebildet hatten.

2.8.2 Nachweis von intrazellulären Katecholaminen in Erythroleukämiezellen mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zellaufbereitung

Für den Nachweis von Katecholaminen in den Zelllinien K-562 und HEL wurden die beiden Zelllinien unter Standardzellkulturbedingungen bei einer Einsaat von 5×10^5 Zellen/ml in 75 cm² Zellkulturflaschen 72h inkubiert. Als Kontrolle für die Sensitivität der Methode wurden auch RAW 264.7-Zellen (Herkunft ATCC) unter denselben Bedingungen kultiviert. Von den RAW 264.7 Zellen ist nämlich bekannt, dass sie *in vitro* Katecholamine produzieren [44]. Die RAW 264.7-Zellen wurden wie die Erythroleukämiezellen in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% FBS, Glutamin und Penstrep kultiviert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 400 x g, bei 5°C geerntet und zweimal in eiskaltem CMF-PBS-Puffer gewaschen. Die Zellpellets (ca. 3×10^7 Zellen) wurden in 1,5%iger Essigsäure resuspendiert (200µl Essigsäure/ 1×10^7 Zellen) und mit einem Vir Sonic50 Cell Disruptor (VirTis, Gardiner, NY/USA) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellen wurden darauf bei 12.000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert, die Überstände abgehoben, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

Probenaufbereitung und Vermessung der Proben an der HPLC

Vor der Vermessung wurden die Katecholamine durch chemische Extraktion aus den Proben angereichert. Dazu wurden 250 µl der Probe mit 1 ml einer Lösung mit 2M NH₄Cl, 0,5% EDTA und 0,2% Diphenylboratethanolaminkomplex (= Extraktionslösung 1) und 5 ml einer Lösung aus 99 Teilen n-Heptan und 1 Teil n-Octanol, 0,25% Tetraoctylammoniumbromid (= Extraktionslösung 2) versetzt und auf ein Volumen von insgesamt 8ml mit Aqua bidest

aufgefüllt. Diese Lösung wurde für 5 min gut durchmischt und anschließend für 5 min bei 1200 x g abzentrifugiert.

4 ml des Überstandes dieses Reaktionsgemisches wurden mit 2 ml n-Octanol und 0,2 ml 0,08 M Essigsäure versetzt, wieder 5 min durchmischt und abermals für 5 min bei 1200 x g abzentrifugiert. Der Überstand dieses Reaktionsgemisches wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und 50 µl der restlichen, der Katecholamine enthaltenden Lösung, wurde mittels einer Hamilton-Präzisionspritze in die HPLC-Anlage injiziert.

Vermessen wurden die Proben mittels HPLC mit einem LC4B amperometric detector system (BAS, WestLafayette, IN/USA). Für die Analyse der Katecholamine wurde eine Ultrasphere®-XL 3µM Spherical 80Å Pore- Säule (Beckman Coulter, Fullerton, CA/USA) verwendet. Die Zusammensetzung des Laufmittels ist dem Anhang zu entnehmen.

Das Vorhandensein von Katecholaminen in den Proben wurde aufgrund der Katecholamin-spezifischen Retentionszeiten bestimmt und die Konzentration der Katecholamine durch Berechnen der Höhe der einzelnen Peaks. Die Retentionszeit und die Faktoren zur Berechnung der Katecholamkonzentrationen wurde durch die Messung von verschiedenen Konzentrationen eines Eichmixes aus Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin (Stock: jeweils 1mg/ml), gelöst in 0,08 M Essigsäure, bestimmt.

2.9 Ultrastrukturanalyse von humanen Erythroleukämiezellen

Um etwaige Veränderungen in der Ultrastruktur der Erythroleukämiezellen nach Behandlung mit den adrenergen Agonisten bzw. Antagonisten zu detektieren, wurden die Zellen am Institut für Histologie und Embryologie der Med.Uni. Graz mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert.

Nach der Kultivierung wurden die Erythroleukämiezellen (Zellzahl 2×10^6 - 3×10^6) geerntet und die Zellpellets in einer 2% Paraformaldehyd/ 2,5% Glutaraldehydlösung in 0,1M Cacodylatpuffer bei Raumtemperatur für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert um die Zellen zu fixieren. Nach der Fixierung wurden die Zellen pelletiert, der Überstand abgehoben und die Zellen über Nacht resuspendiert in 0,1M Cacodylatpuffer bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Cacodylatpuffer entfernt und das Pellet in einer 1%-Osmiumtetroxyd-Lösung (1 Teil 4% Osmiumtetroxyd-Lösung + 2T 0,2 M Cacodylatpuffer (pH = 7,4) + 1T A.bidest) resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden danach pelletiert und in 0,1M Cacodylatpuffer (pH = 7,4) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich pelletiert.

Um die Zellen zu entwässern, wurde das Zellpellet in sieben Arbeitsschritten stufenweise in einem Gemisch aus Aceton/Aqua bidest resuspendiert, jeweils 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert und schließlich pelletiert. Der Anteil des Acetons nahm dabei bei jedem Schritt kontinuierlich zu (siehe Tab.3).

Arbeitsschritt	Aceton
1	50%
2	70%
3	80%
4	96%
5-7	100%

Tab.3: Aceton/Aqua bidest.-Gemische, die zur stufenweisen Entwässerung der Zellen eingesetzt wurden.

Beim letzten Arbeitsschritt der Entwässerung wurden die Zellsuspensionen jeweils in 500 µl-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt in denen bereits eine kleine Menge TAAB Epoxy Resin (Epon, TAAB Laboratories, Aldermaston/UK) auspolymerisiert worden war.

In den nächsten Arbeitsschritten wurde stufenweise das Aceton aus den Zellen entfernt und durch Epon ersetzt. Die Zellen wurden in vier Arbeitsschritten mit Aceton-Epon-Gemischen überschichtet, inkubiert, pelletiert, der Überstand abgehoben und wieder mit der nächsten Lösung überschichtet. Die Tabelle 4 gibt die einzelnen Arbeitsschritte der Einbettung in das Epon-Harz wieder. Im letzten Schritt wurde das Kunstharz schließlich ausgehärtet.

Nach dem Aushärten des Epon-Harzes wurden 70nm-Ultradünnschnitte mit einem Ultramicrotom (Reichert, Wien, Österreich) angefertigt, auf Kupfernetzchen aufgebracht und jeweils für 30 min mit Uranyl-Acetat und Eisen-Citrat kontrastiert.

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationszeit/Temperatur
1	100 % Aceton: TAAB Epoxy Resin 2:1	45 min, RT
2	100 % Aceton: TAAB Epoxy Resin 1:2	1h, RT
3-4	TAAB Epoxy Resin	1h 30 min, 37°C
5	TAAB Epoxy Resin	Über Nacht im Kühlschrank
6	TAAB Epoxy Resin	3 Tage Auspolymerisieren bei 60°C

Tab.4: Arbeitsschritte der Epon-Einbettung der Zellen. RT = Raumtemperatur.

Die Präparate wurden daraufhin mit einem Zeiss EM 902 Transmissions-Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert.

2.10 DNA-Gehalts-Messungen mit Propidiumiodid

Um zu bestimmen, ob die Erythroleukämiezellen durch die Behandlung mit den adrenergen Agonisten und Antagonisten polyploid werden, wurde der DNA-Gehalt der Zellen nach der Kultivierung bestimmt. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und einmal mit eiskaltem CMF-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen (Zellzahl $2-3 \times 10^5$) in eiskaltem 70%igem Ethanol für 1h auf Eis fixiert und bis zur Färbung bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden nach der Fixierung 1x mit CMF-PBS- Puffer gewaschen und danach in je 500 μl Propidiumiodid- Färbepuffer resuspendiert und für 15 min in einem Wasserbad bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist dem Anhang zu entnehmen. Anschließend wurden die Proben auf einem FACScalibur Durchflusscytometer (BD, San Jose, CA/USA) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm WinMDI.

2.11 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte + oder - der Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz der Daten wurde bei normalverteilten Stichproben mittels Student-t-Test berechnet. Nicht normalverteilte Stichproben wurden mittels Mann-Whitney-Rangsummen-Test analysiert. Signifikanztests zum Vergleich von mehreren Gruppen untereinander wurden mittels ANOVA bei normalverteilten Stichproben nach der Methode von Holm-Sidak und bei nicht normalverteilten Stichproben mittels Rang-ANOVA nach der Methode von Dunn berechnet.

Für die statistische Aufbereitung der Daten wurde Microsoft Excel und SigmaPlot 11.0 verwendet. Die Signifikanztests wurden mit den Programmen Sigma Stat 3.5 oder SigmaPlot 11.0 berechnet. p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

3 Resultate

3.1 Der adrenerge Agonist Naphazolin hemmt das *in vitro* Wachstum von erythroiden Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut

Nach zwei Wochen störungsfreier Kultivierung im semiliquiden Medium wurden die CFU-Assays der mit adrenergen Agonisten behandelten UCB-Progenitoren ausgewertet.

Schon bei makroskopischer Betrachtung der Dishes sah man bei den mit 100 μM Naphazolin behandelten Kulturen einen deutlichen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. In den behandelten Dishes sah man deutlich weniger rote Spots, die von hämoglobinierten erythroiden Kolonien gebildet werden (Abb.11). Während man bei Oxymetazolin-behandelten Kulturen ein ähnliches Bild sah wie bei Naphazolin, trat der Effekt bei Clonidin nicht auf (nicht gezeigt).

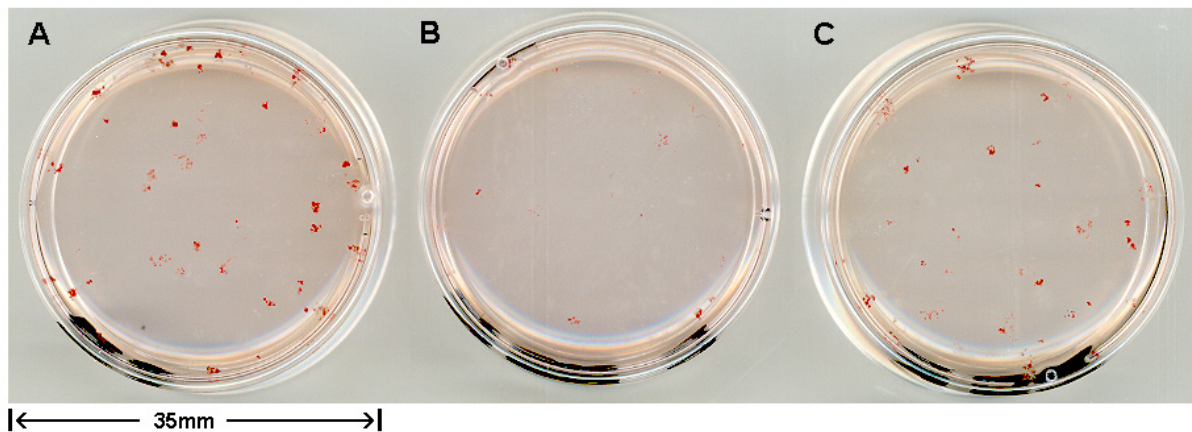


Abb.11: Durch Naphazolin wird das erythroide *in vitro* Kolonienwachstum inhibiert. Gezeigt werden eingescannte Zellkultur dishes von 2 Wochen in Methocult-Medium kultivierten UCB-MNCs. Die roten Spots werden von erythroiden Kolonien (hauptsächlich BFU-E) gebildet. **A:** Unbehandelte Kontrolle, **B:** +Naphazolin [100 μM], **C:** +Naphazolin [10 μM].

Die mikroskopische Analyse der unbehandelten Kontroll-Kolonien ergab durchschnittlich 23,95 \pm 11,20 erythroide (BFU-E), 20,85 \pm 6,77 myeloische Kolonien (CFU-GM) und 2,8 \pm 2,76 CFU-GEMM Kolonien pro 1×10^4 UCB-MNCs bei zehn ausgewerteten UCB-Proben (Abb.12). Bei drei Kontrollansätzen war keine sichere Auszählung der Kolonien möglich, da die Kolonien aufgrund der hohen Frequenz in der Probe zu dicht nebeneinander lagen. Hier spielte der Umstand eine Rolle, dass in der Studie keine aufgereinigten Progenitorzellen kultiviert wurden, sondern die Gesamtfraktion der mononukleären Zellen in die Kultur eingesetzt wurde.

Die Gesamtzellzahl pro Dish nach 14 Tagen Kultivierung ergab eine große individuelle Schwankung zwischen einzelnen UCB-Samples. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl/Dish der unbehandelten Kontrollen lag bei der Zellernte zwischen $1,12 \times 10^6$ und $8,70 \times 10^6$ Zellen, was durch die Frequenz der Progenitoren in der MNC Fraktion, der prozentuellen

Zusammensetzung der Progenitorzelltypen und dem Proliferationspotential der Progenitoren in den jeweiligen UCB-Samples abhängt.

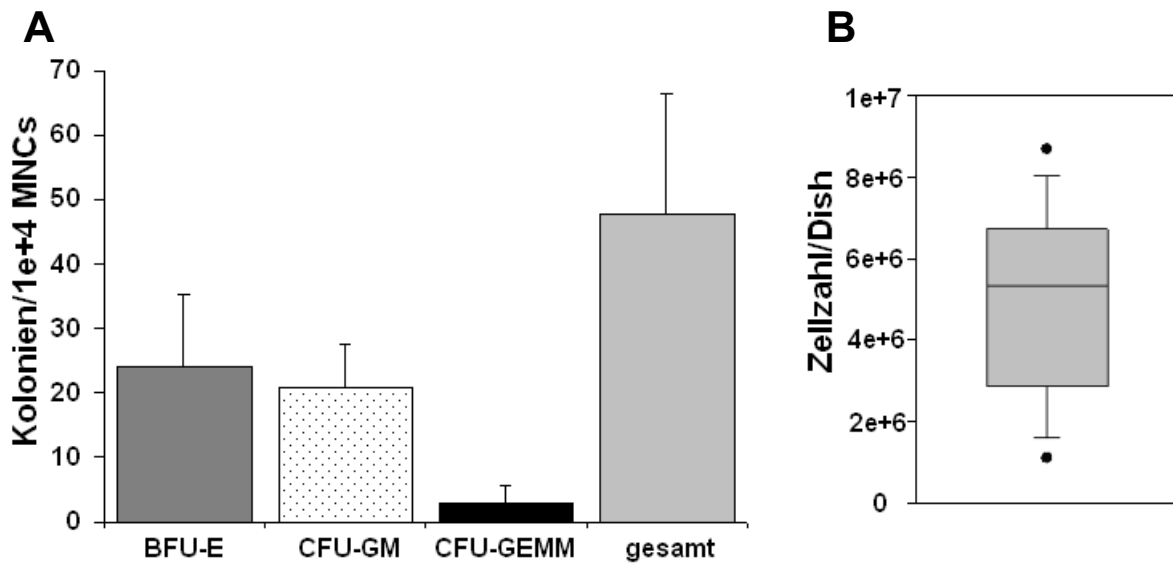


Abb.12: A: Kolonienauswertung von semiliquiden Kulturen myeloider Progenitoren aus dem humanen Nabelschnurblut nach 14 Tagen Kultivierung. n = 10 **B:** Gesamtzellzahl/CFU-Dish bestimmt mittels CASY-Cellcounter nach Aufschwemmen des semiliquiden Stammzellmediums mit Phosphat-Puffer. n = 10.

Die mikroskopische Kolonien-Auswertung der mit Agonisten behandelten Dishes bestätigte die bereits nach makroskopischer Beurteilung zu erahnde Beeinflussung des erythroiden Wachstums. Die BFU-E-Kolonien in den Naphazolin [100 μ M]-behandelten Kulturen waren kleiner, hatten weniger Kontrast und wiesen eine eher bräunliche Färbung auf (Abb.14A). Die starke Wachstumshemmung durch Naphazolin erschwerte die Diskriminierung der erythroiden Kolonien von den myeloischen Kolonien (GM-CFU), die auf die Naphazolin-Behandlung offensichtlich weniger sensitiv reagieren als die erythroiden Kolonien. Die Kolonienauswertung ergab eine signifikante ($p < 0.05$) Hemmung der erythroiden Kolonien, während die Zahl der GM-CFU-Kolonien nicht signifikant beeinflusst wird (Abb.13). Obwohl zahlenmäßig nicht signifikant beeinträchtigt, erschienen die GM-CFU-Kolonien in den Naphazolin-behandelten Kulturen dennoch weniger ausgeprägt in Morphologie und Zellzahl als in den unbehandelten Kulturen (nicht gezeigt). Im Vergleich zu Naphazolin inhibiert 100 μ M Oxymetazolin das erythroide Kolonienwachstum noch signifikant ($p < 0,05$) stärker, während Clonidin das erythroide Kolonienwachstum nicht signifikant beeinflusst. Das Wachstum der myeloischen Kolonien wird durch Oxymetazolin und auch Clonidin ebenfalls nicht signifikant beeinflusst. Die 10 μ M-Konzentrationen der Agonisten zeigten keine signifikante Beeinflussung des Kolonienwachstums. Die Zahl der CFU-GEMM-Kolonien wird durch die Agonisten-Behandlung nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Aufgrund der niedrigen Frequenz (Abb.12) spielen sie statistisch auch keine große Rolle in der Auswertung.

Nach der Auswertung der Kolonien wurde das semiliquide Medium mit Puffer aufgeschwemmt und eine homogene Zellsuspension hergestellt, die noch weiter analysiert wurde. Im CASY-Cellcounter sah man einen deutlichen Unterschied im Größenprofil der Naphazolin und Oxymetazolin-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Naphazolin-Behandlung wird ein bestimmter Peak in der Größenordnung zwischen 5 μm -10 μm stark reduziert (Abb.14B). Die Analyse der Zellzahl/CFU-Dish ergab eine dosisabhängige Hemmung der *in vitro* Generierung von Zellen der hämatopoitischen Progenitoren durch die α -adrenergen Agonisten (Abb.13B).

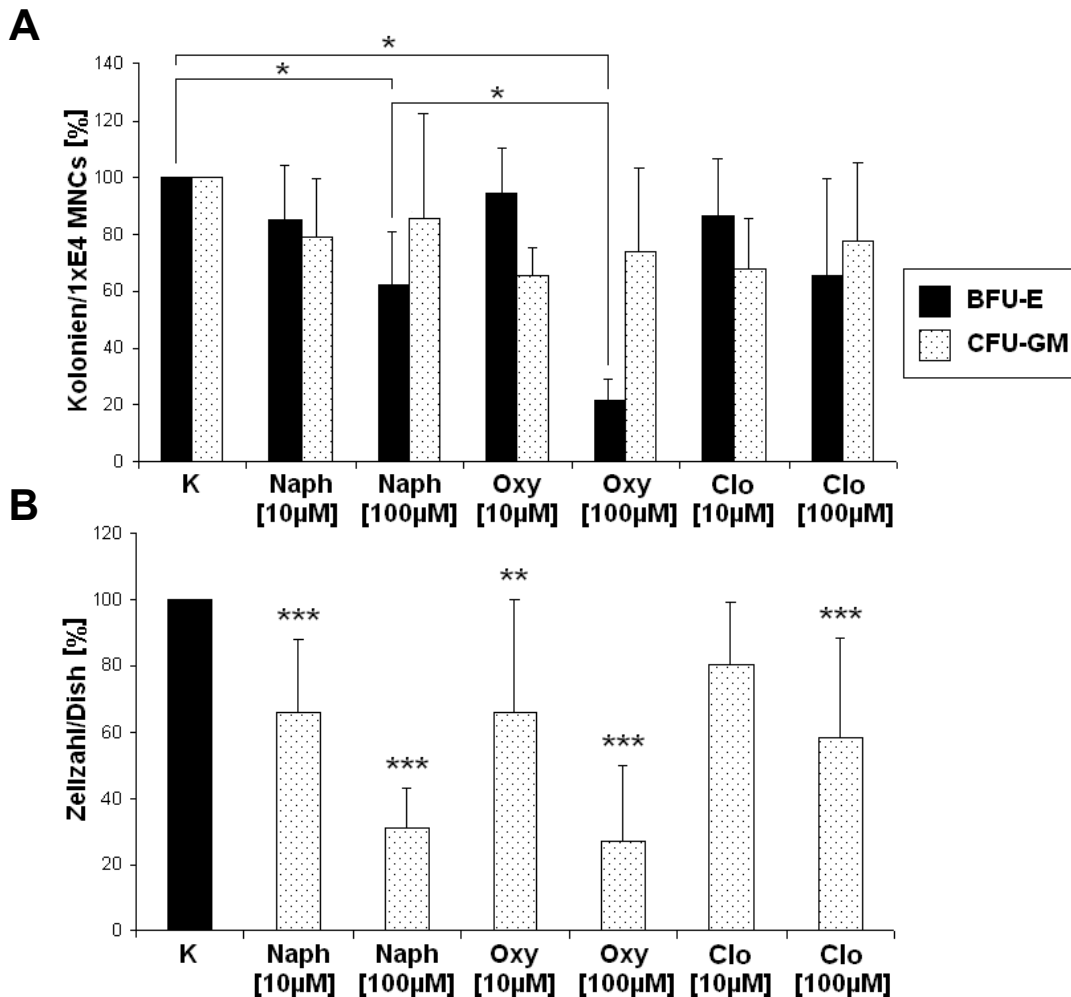


Abb.13: Ergebnisse der Colony Forming Unit Assays von UCB-Progenitoren behandelt mit den α -adrenergen Agonisten Naphazolin (Naph), Oxymetazolin (Oxy) und Clonidin (Clo) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). **A:** Kolonieauswertung der Ansätze angegeben als Prozentsatz im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (K = 100%, n = 10). Naph [10 μM]: n = 5, Naph [100 μM]: n = 9, Oxy [10 μM]: n = 4, Oxy [100 μM]: n = 4, Clo [10 μM]: n = 3, Clo [100 μM]: n = 4, *: p < 0,05 bestimmt mittels Rang-ANOVA nach der Methode nach Dunn. **B:** Analyse der Gesamtzellzahl in den CFU-Dishes mittels CASY-Cellcounter. K: n = 13 Naph [10 μM]: n = 8, Naph [100 μM]: n = 13, Oxy [10 μM]: n = 5, Oxy [100 μM]: n = 5, Clo [10 μM]: n = 4, Clo [100 μM]: n = 6, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, bestimmt mittels ANOVA nach der Methode von Holm-Sidak.

Durch 100 μM -Konzentrationen der adrenergen Agonisten Naphazolin, Oxymetazolin und auch Clonidin wird die Zellzahl/Dish hochsignifikant (p < 0,001) verringert. Bei 10 μM sieht man bei den Agonisten Naphazolin und Oxymetazolin noch eine signifikant hemmende

Wirkung (Naphazolin: $p < 0,001$, Oxymetazolin: $p < 0,01$) während Clonidin bei dieser Konzentration die Gesamtzellzahl im Dish nicht mehr signifikant beeinflusst. 10 μM Naphazolin oder Oxymetazolin verhindern generell das Aufkommen der Kolonien nicht, inhibierten jedoch die Generierung von Zellen durch die Progenitoren.

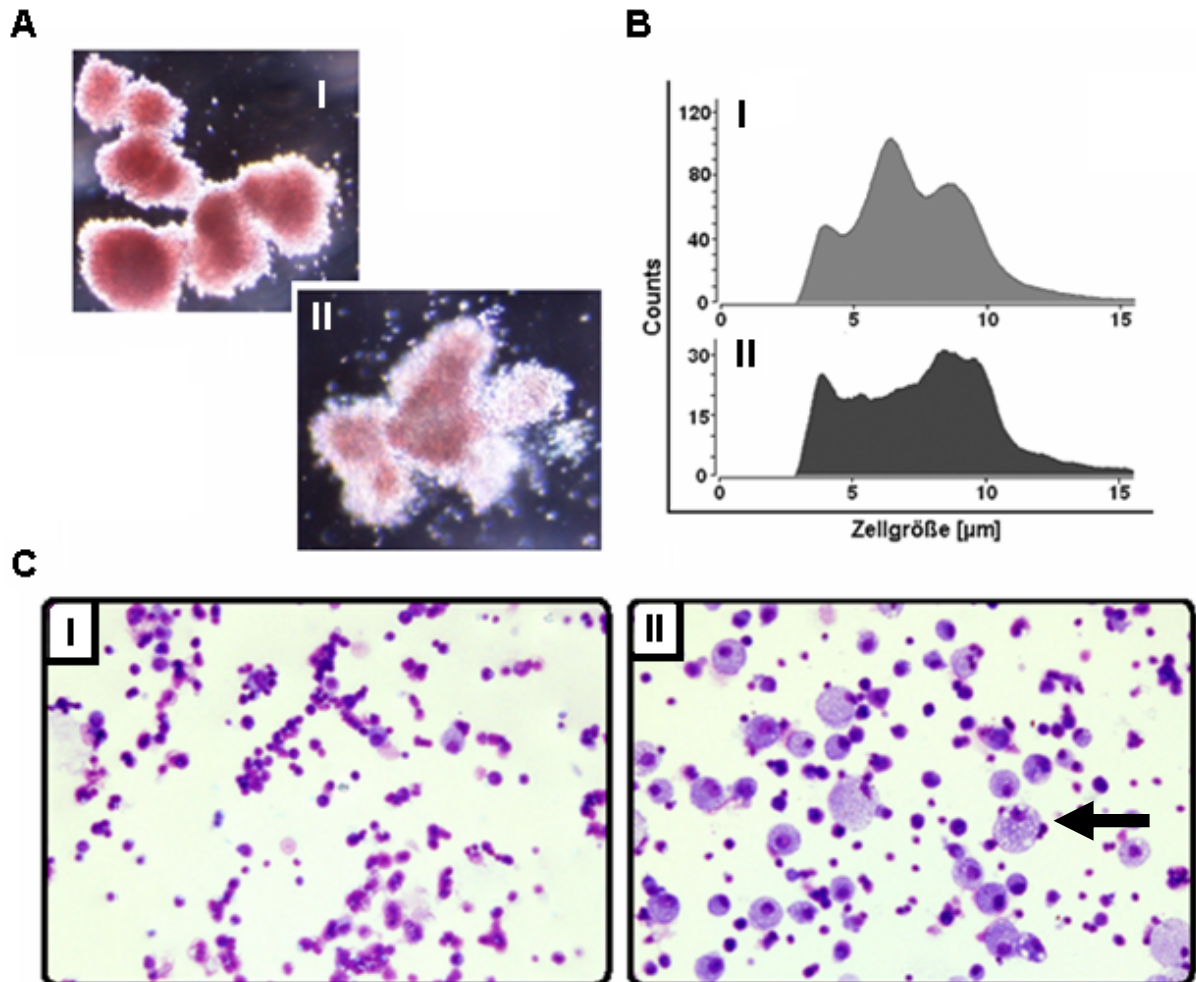


Abb.14: Naphazolin-Behandlung führt zu Alterationen in der Morphologie erythroider Kolonien, sowie zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellpopulation im CFU-Dish. **A:** BFU-E- Kolonien. Obwohl diese Kolonien aus einer einzelnen Progenitorzelle hervorgehen, bilden BFU-E-Progenitorzellen Kolonien aus mehreren Clustern die aus hämoglobinierten erythroiden Vorläuferzellen bestehen. Aufgrund ihrer Größe und ihrer intensiven, Hämoglobin bedingten, Rotfärbung sind diese Kolonien bereits makroskopisch sichtbar. **I:** BFU-E aus einem unbehandelten Kontroll-Dish nach 14 Tagen Kultur. **II:** Typische BFU-E- Kolonie aus einer mit 100 μM Naphazolin behandelten 14 Tage Kultur. Durch die Behandlung mit Naphazolin sind die erythroiden Kolonien kleiner und weisen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen weniger Kontrast und eine bräunliche Färbung auf. Originale Vergrößerung: 40x. **B:** CASY-Cellcounter - Größenprofil von Zellen aus einzelnen CFU-Dishes. **I:** Zellsuspension gewonnen aus einem 14-Tage Kontrollansatz. **II:** Zellsuspension gewonnen aus einem 14-Tage Ansatz behandelt mit 100 μM Naphazolin. **C:** Nach Pappenheim gefärbte Zellen aus einem 14-Tage CFU-Assay ohne Zusätze (**I**) und Zellen aus einem Kulturansatz mit 100 μM Naphazolin (**II**). Der Zusatz von Naphazolin führt zu einer Anreicherung von Makrophagen in der Kultur (siehe Pfeil). Originale Vergrößerung: 200x.

Von einigen Ansätzen wurden Zellen auf Objektträger aufzentrifugiert und mit May-Grünwald-Giemsa-Lösung gefärbt (Abb.14C). Die Analyse der Zellen ergab, dass es durch 100 μM Naphazolin zu einer Anreicherung von Makrophagen in der Kultur kommt. Diese kommen in den Kontrollkulturen zwar auch vor, jedoch in einer sehr viel niedrigeren

Frequenz. Der Großteil der Zellen aus den unbehandelten, sowie Agonisten-behandelten Kulturen wird von erythroiden Vorstufen gebildet.

Um die Abhängigkeit des Naphazolin-Effektes von der Anwesenheit von Erythropoietin (EPO) im Medium zu überprüfen, wurde ein semiliquides Stammzellmedium verwendet, in dem kein EPO zugesetzt war. In 14-Tage-Kulturen wurde die Wirkung von Naphazolin mit und ohne Zugabe von Erythropoietin getestet.

Ohne Zugabe von EPO treten nach 14 Tagen Kultur keine hämoglobinierten erythroiden Kolonien auf. Durch Zugabe von 3IU bzw. 6IU EPO/ml Medium wird das erythroide Wachstum ermöglicht. Die Verdoppelung der EPO-Konzentration hat keine Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien und der Gesamtzellzahl/Dish im Vergleich zu 3IU EPO (Abb.15). Die Gesamtzellzahl/Dish wird durch die Zugabe von EPO von durchschnittlich $6,46 \times 10^5$ +/- $2,66 \times 10^5$ Zellen auf $4,84 \times 10^6$ +/- $2,41 \times 10^6$ Zellen/Dish gesteigert (n = 3).

Überraschenderweise war der Effekt von Naphazolin in diesem Medium nach Zugabe von EPO nicht so stark ausgeprägt wie im Methocult-Standardmedium. Die gewachsenen erythroiden Kolonien in den EPO-supplementierten Ansätzen waren bei der mikroskopischen Analyse weniger stark in der Entwicklung beeinträchtigt wie im Methocult-Medium und auch zahlenmäßig nicht signifikant gehemmt (Abb.15). Dennoch sah man bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl in den CFU-Dishes, dass 100 μ M Naphazolin auch in diesem Medium die Gesamtzellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen signifikant erniedrigt. Auch in den Dishes in denen kein EPO zugesetzt wurde, konnte eine signifikante ($p < 0,05$) Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle gesehen werden. Stärker ausgeprägt war die Hemmung jedoch erst bei der Zugabe von EPO, wo die Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch Naphazolin bei Zugabe von 3IU EPO und auch bei 6IU EPO hochsignifikant ($p < 0,01$) gehemmt wurde. Die Erhöhung der EPO-Konzentration im Medium von 3IU auf 6IU führt zu keiner Beeinflussung der hemmenden Wirkung von Naphazolin.

Das Ergebnis des Experimentes weist darauf hin, dass auch das EPO-unabhängige Wachstum im CFU-Dish ebenfalls durch Naphazolin negativ beeinflusst wird, die Auswirkung auf das erythroide Wachstum aufgrund der Masse der erythroiden Zellen im Dish bei Anwesenheit von EPO jedoch offensichtlicher erscheint als die Wirkung auf das myeloische Kolonienwachstum.

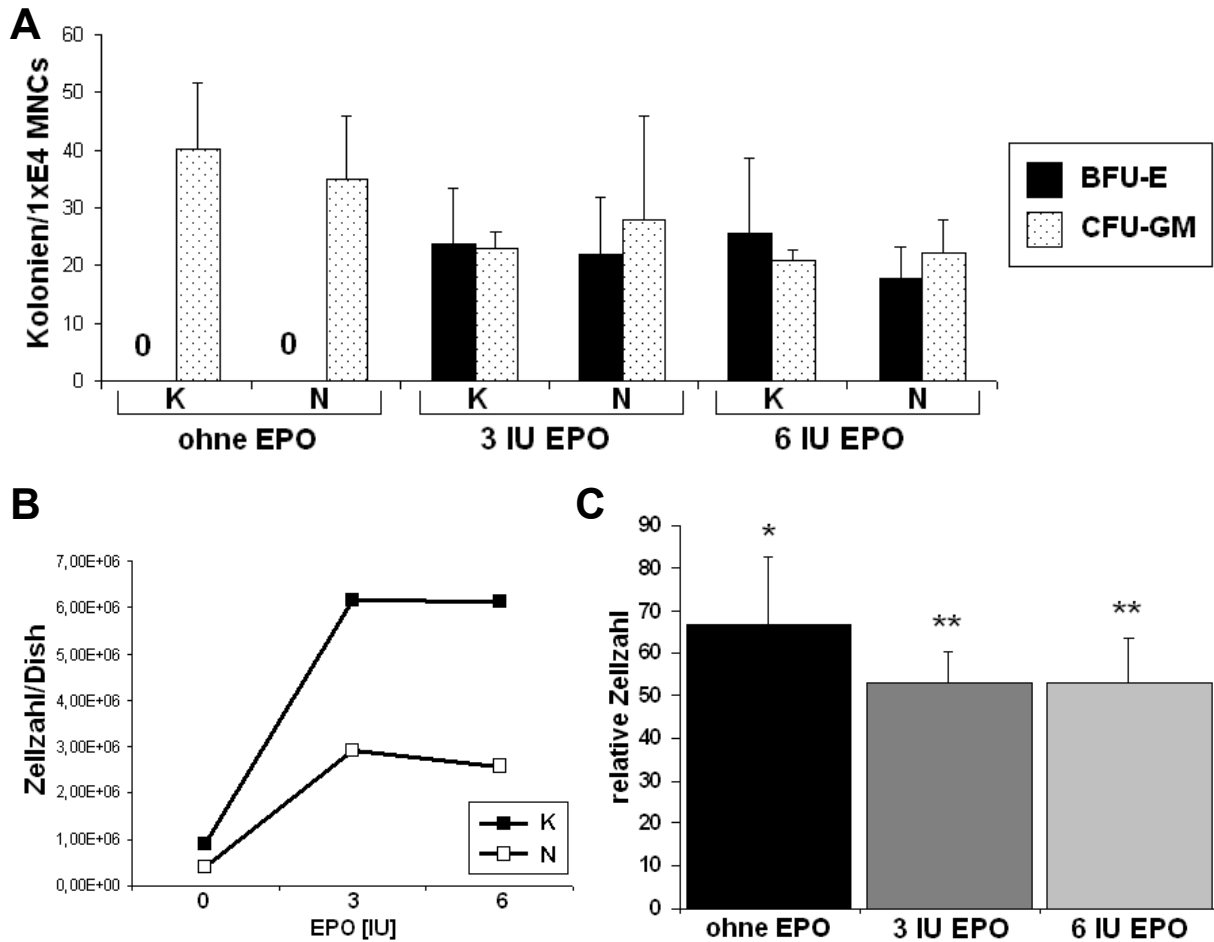


Abb.15: Naphazolin hemmt das EPO-abhängige und EPO-unabhängige Kolonienwachstum im CFU-Dish. **A:** Kolonienauswertung von Naphazolin [100 µM] behandelten UCB-Kulturen ohne und mit EPO- Zugabe im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle. **B:** Die Zugabe von EPO zum Medium führt zu einer massiven Zunahme der Gesamtzellzahl im CFU-Dish. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten. **C:** Die prozentuelle Beeinflussung der Gesamtzellzahl/Dish durch Naphazolin [100 µM] im Vergleich zur Kontrolle. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 100%), bestimmt mittels ANOVA nach der Methode von Holm-Sidak. Zwischen den einzelnen Behandlungen (unterschiedliche EPO-Konzentration im Medium) bestand kein signifikanter Unterschied im Grad der Hemmung des Zellwachstums durch Naphazolin.

Um die Inhibition des erythroiden Wachstums zu bestätigen, wurden nach 14 Tagen Kultivierung die Zellen aus den CFU-Dishes isoliert und mittels Durchflusscytometrie analysiert. In einer Dreifachbestimmung wurde parallel die Expression des Panleukozytenmarkers CD45, des Stammzellmarkers CD34 und des spezifischen erythroiden Antigens CD235a (Glycophorin-a) auf den propagierten UCB-Zellen analysiert. CD45 wurde bestimmt, da erythroide Zellen dieses für Leukozyten spezifische Antigen nicht exprimieren und sich dieser Marker daher gut zur Unterscheidung der Zellen der myeloischen Reihe von der erythroiden Reihe eignet.

Die Geräte-Einstellungen des Durchflusscytometers gestalteten sich schwierig, da die zu analysierenden Zellsuspensionen in ihrer Zusammensetzung und vor allem in der Zellgröße eine sehr große Heterogenität aufweisen. Diese Heterogenität wird bei der Betrachtung der

nach Pappenheim gefärbten Zellpopulation nach Naphazolin-Behandlung in Abb.14C offensichtlich. Durch die FACS-Analyse konnten in den 2-Wochen-UCB-Ansätzen drei Hauptpopulationen unterschieden werden. Die Hauptfraktion in der unbehandelten Probe bildet die erythroide $GPA^+/CD45^-$ Fraktion mit einem durchschnittlichem Vorkommen von $89,47\pm 4,98\%$ aller Zellen ($n = 6$). In Abb.16 wurden die GPA^+ Zellen rot eingefärbt und im Forwardscatter/Sidescatter (FSC/SSC) – Dot Plot dargestellt. Man kann erkennen, dass die GPA^+ Fraktion den Hauptanteil aller Events ausmacht. Für die Bestimmung des Prozentanteils der einzelnen Populationen wurden die Zellen im FSC-SSC-Dot Plot in der Region R1 gegatet, um Debris und tote Zellen aus der Berechnung auszuschließen.

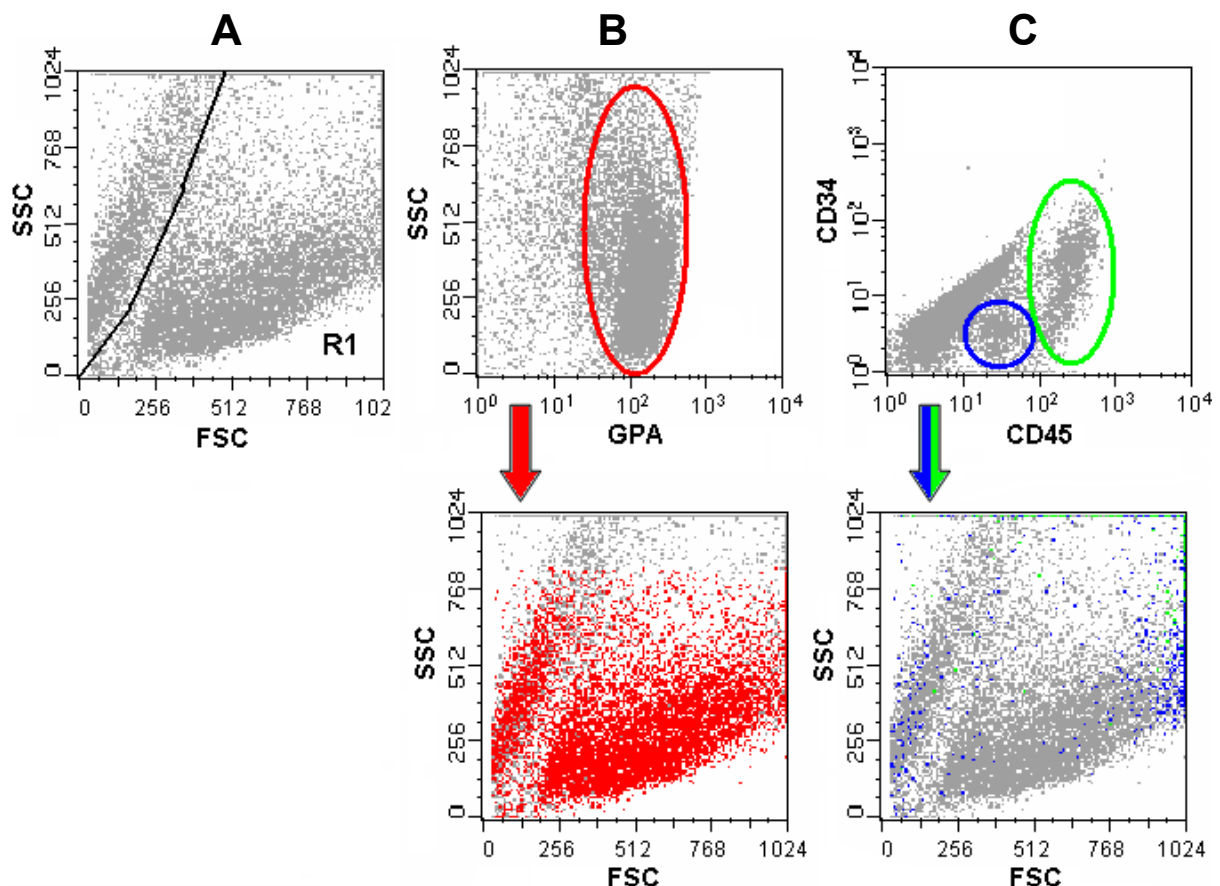


Abb.16: Durchflusscytometrische Analyse von Kulturen hämatopoietischer Progenitoren aus dem humanem Nabelschnurblut. **A:** Dot Plot Forwardscatter gegen Sidescatter. Debris und tote Zellen wurden mittels Setzen des Gates R1 diskriminiert. **B, C:** Es treten in der durchgeführten 5 Parameter Analyse (SSC, FSC, CD34, CD45, CD235a) in dem CFU-Dishes drei große Zellpopulationen auf. In der zweiten Reihe sind die Zellen der umrahmten Populationen jeweils farblich dargestellt, um die unterschiedliche FSC/SSC-Charakteristik und den Anteil der einzelnen Populationen an der Gesamtpopulation anschaulich zu machen. **B:** Den Hauptanteil der Zellpopulation bildet die erythroide, $GPA^+/CD45^-$ -Fraktion (rot umrahmt), hier dargestellt im Dot Plot GPA versus Sidescatter. **C:** Im Dot Plot CD45 gegen CD34 kann man das Vorkommen von zwei weiteren Populationen, die beide $CD45^+$ sind, sich jedoch in der Expression des Stammzellmarkers CD34 unterscheiden (blau bzw. grün umrahmt) sehen.

Des Weiteren konnten noch zwei weitere Populationen unterschieden werden, die beide $CD45^+/CD235a^-$ sind, sich jedoch in der Expression des Stammzellmarkers CD34 unterscheiden. Eine Fraktion ($4,13\pm 1,28\%$ aller Events, in der Abb.16 blau) weist den

Phänotyp $CD45^+/CD34^-$ auf und die zweite Population (2,18+/-1,54% aller Events, in der Abb.16 grün), die mehr CD45 exprimiert als die blaue Population, setzt sich aus $CD45^+/CD34^-$ und $CD45^+/CD34^-$ Zellen zusammen. Die Anfärbung der Populationen zeigt, dass die beiden Fraktionen im FSC/SSC-Bild nicht innerhalb der $CD235a^+$ liegen, sondern jeweils im letzten FSC,- und SSC-Kanal auftauchen (Abb.16). Da beide Fraktionen CD45 exprimieren, kann es sich bei den beiden Fraktionen nur um Vorstufen von Granulozyten und/oder Monozyten handeln. Theoretisch noch vorhandene Zellen aus der ursprünglich zum Start der Kultur eingesetzten MNC-Fraktion spielen bei der FACS-Analyse sicher keine Rolle mehr, da insgesamt nur 1×10^4 mononukleäre Zellen eingesetzt wurden, nach der Kultivierung jedoch Zellzahlen im Bereich von 1×10^6 gemessen wurden.

Durch die Behandlung mit den $\alpha 1$ -adrenergen Agonisten zeigt sich bereits im FSC/SSC-Dot Plot ein deutlicher Unterschied zwischen den Naphazolin- oder Oxymetazolin-behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen (Abb.17, 18). Die Behandlung mit Clonidin zeigt keinen ersichtlichen Effekt (nicht gezeigt). Die Agonisten-behandelten Zellen weisen sowohl ein höheres SSC, als auch FSC-Signal auf (Abb.18). In der Histogrammdarstellung kann man den Effekt noch deutlicher erkennen (Abb.17). Die statistische Auswertung der FSC,- und SSC-Mediane ergab eine dosisabhängige Zunahme beider Scattersignale durch Naphazolin. 100 μ M Oxymetazolin steigert signifikant ($p < 0001$) das FSC-Signal und SSC-Signal ($p < 0,05$). Clonidin steigert das FSC-Signal nur marginal, jedoch signifikant ($p < 0,01$).

Die beobachteten Veränderungen in den Lightscatter-Eigenschaften der behandelten Kulturen lassen sich mit einer unterschiedliche Zusammensetzung der Zellpopulationen nach Agonisten-Behandlung in den CFU-Dishes erklären. Erythroide Vorstufen, bzw. Erythrozyten sind im Vergleich zu Granulozyten und Monozyten sehr kleine Zellen und weisen außerdem keine spezifischen Granula auf. Auch innerhalb der erythroiden Fraktion gibt es eine sehr hohe Variabilität im Zelldurchmesser, da erythroide Precursor-Zellen einen Reifungsprozess mit sehr großen morphologischen Veränderungen (inklusive Verlust des Zellkernes) durchlaufen.

Die Analyse der prozentuellen Zusammensetzung der Zellpopulation lieferte die Bestätigung für diese Annahme. Durch Naphazolin wird die GPA^+ Fraktion im prozentuellen Anteil leicht, jedoch dosisabhängig gehemmt ($p < 0,05$ bei 100 μ M). Rechnet man jedoch den Prozentsatz der Zellen auf die Gesamtzellzahl/Dish um, ergibt das eine dramatisch erniedrigte Zahl von erythroiden Zellen/Dish (Abb.19B). Oxymetazolin wirkt in 100 μ M-Konzentrationen wie schon bei der Inhibition der Kolonien gesehen, signifikant stärker ($p < 0,05$) supprimierend auf die erythroide Population als Naphazolin. Umgerechnet auf die Gesamtzahl der erythroiden Zellen/Dish sieht man wie bei Naphazolin eine stark verminderte Zahl erythroider Zellen in den Oxymetazolin behandelten Ansätzen. Bei den beiden Leukozytenpopulationen

(CD45⁺/GPA⁻) sieht man einen umgekehrten Trend. Durch die Behandlung mit 100 µM-Konzentrationen von Naphazolin und Oxymetazolin kommt es zu einer signifikanten Zunahme der beiden auftretenden CD45⁺ Populationen ($p < 0,05$ bei der CD45⁺/CD34⁻ Population, bzw. $p < 0,001$ bei der CD45⁺/CD34⁺ Population). Umgerechnet in Absolutzahlen sieht man keinen so deutlich ausgeprägten Effekt wie bei den erythroiden Zellen im zahlenmäßigen Anteil der Populationen/Dish mit und ohne Agonisten-Behandlung. Clonidin verändert den Prozentsatz der Leukozyten-Populationen weder prozentuell noch zahlenmäßig signifikant.

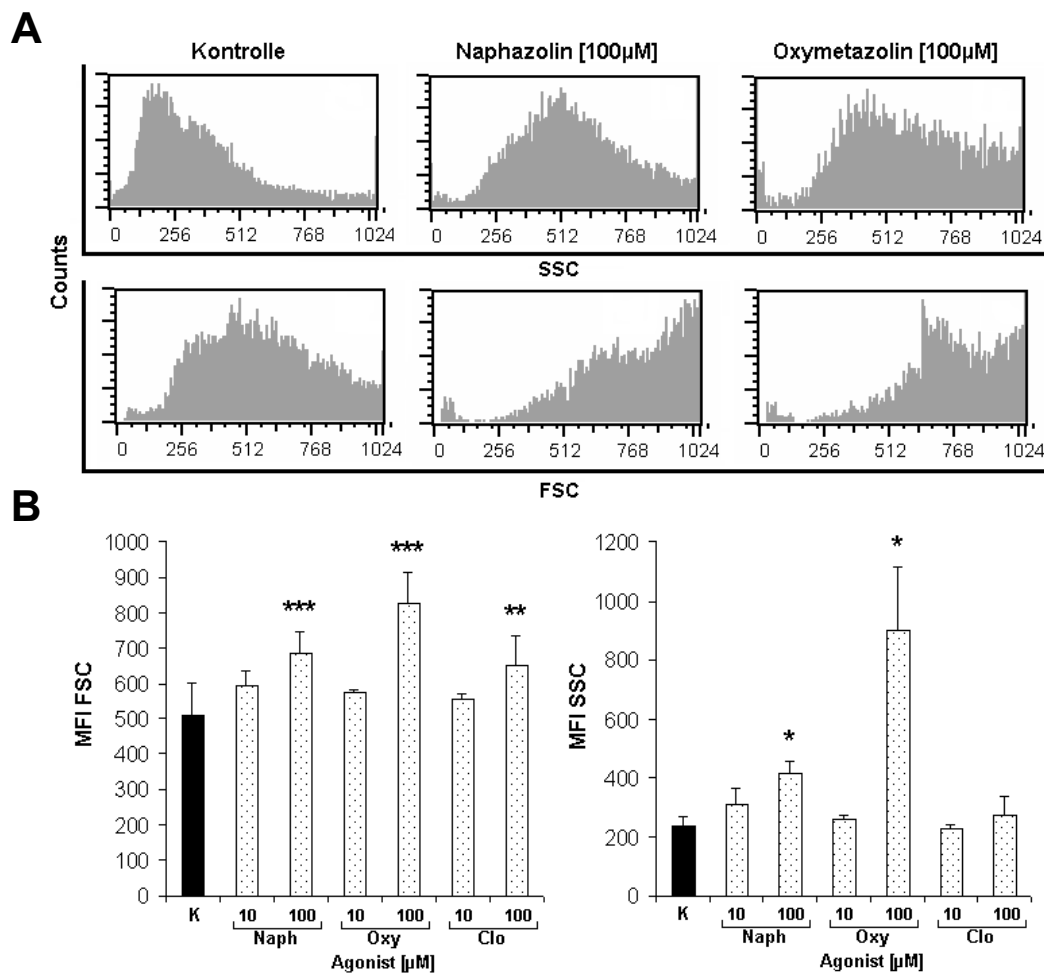


Abb.17: Lightscatter-Charakteristik der Population R1 (siehe Abb.18) aus den 14-Tage UCB-Kulturen mit α -adrenergen Agonisten. **A:** Die Histogramme zeigen im Vergleich die FSC, - und SSC-Signale einer unbehandelten Kontrolle (=UCB-Ansatz in Abb.16) im Vergleich zu den Naphazolin- und Oxymetazolin-behandelten Ansätzen. **B:** Die statistische Auswertung der Lightscattercharakteristik der UCB-Kulturen. Für die statistische Auswertung des Scattersignals wurden die Mediane des Scattersignals der Zellpopulationen (MFI = Median Fluorescence Intensity) herangezogen. K, Naphazolin (Naph): $n = 6$, Oxymetazolin (Oxy), Clonidin (Clo): $n = 4$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ versus Kontrolle bestimmt mittels ANOVA nach Holm Sidak (FSC), bzw. nach Dunn (SSC).

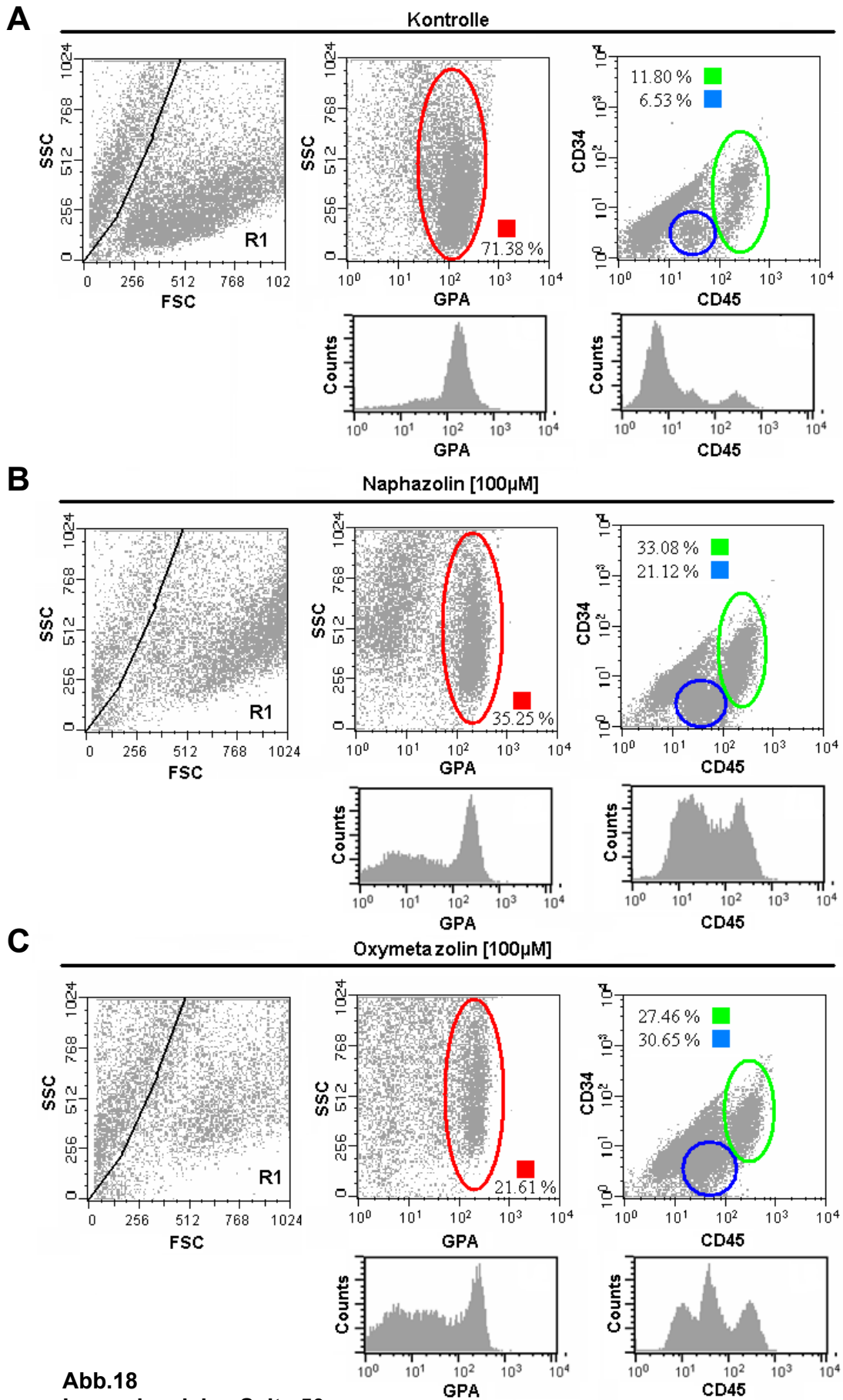


Abb.18
 Legende: siehe Seite 50

Abb.18: Durchflusscytometrische Analyse von Kulturen hämatopoietischer Progenitoren aus dem humanem Nabelschnurblut, behandelt mit 100 μM Naphazolin (**B**) oder 100 μM Oxymetazolin (**C**) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**A**). Es werden jeweils von (links nach rechts) die Dot Plots FSC versus SSC, GPA versus SSC und CD45 versus CD34 gezeigt. Die Expression von GPA und CD45 wird zudem in Histogrammdarstellung gezeigt. Die drei Hauptpopulationen sind wiederum farblich gekennzeichnet (rot: $\text{GPA}^+/\text{CD45}^-$, blau: $\text{CD45}^+/\text{CD34}^-$, grün: $\text{CD45}^+/\text{CD34}^+$) und der prozentuelle Anteil der Population an der Gesamtpopulation R1 im jeweiligem Dotplot angegeben. Durch die Behandlung mit den beiden adrenergen Agonisten sieht man eine Veränderung der Scattercharakteristik der Zellpopulationen. Die drei Hauptpopulationen treten in den Agonisten-behandelten Kulturen zwar auf, jedoch verändert sich der prozentuelle Anteil der Populationen an der Gesamtzellzahl. Es kommt zu einer Abnahme der GPA^+ Population und zu einer parallelen Anreicherung der beiden CD45^+ Populationen.

Die vorliegenden Daten weisen auf einen $\alpha 1$ -adrenergen Effekt auf die *In vitro* Hämatopoiese und im besonderen auf die *in vitro* Erythropoiese im CFU-Dish hin, da nur die beiden $\alpha 1$ -Agonisten Naphazolin und Oxymetazolin, jedoch nicht der $\alpha 2$ -adrenerge Agonist Clonidin einen signifikanten Einfluss auf das das Kolonienwachstum und die Zusammensetzung der Zellpopulationen im CFU-Dish zeigen.

In der Absicht, die Rezeptorabhängigkeit des mutmaßlichen $\alpha 1$ -adrenergen Effektes zu bestätigen, wurden die rezeptorspezifischen adrenergen Antagonisten Prazosin ($\alpha 1$ -spezifisch), Benoxathian ($\alpha 1$ -spezifisch) und Yohimbin ($\alpha 2$ -spezifisch) eingesetzt, um den inhibierenden Effekt von Naphazolin bzw. Oxymetazolin auf das erythroide Wachstum zu unterbinden. Entgegen den Erwartungen konnte die Kombination der Antagonisten mit Naphazolin die Zellen im CFU-Dish nicht vor der Wirkung von Naphazolin schützen.

Als erstes wurde Prazosin, ein $\alpha 1$ -adrenerger Antagonist, der schon von Maestroni et al. [8, 23, 36, 37] erfolgreich verwendet wurde, um potentielle $\alpha 1$ -adrenerge Effekte auf hämatopoietischen Stammzellen bzw. Progenitoren zu unterbinden, getestet.

Der Einsatz von Prazosin in den CFU-Assays war jedoch mit Schwierigkeiten verbunden. Schon das Herstellen des Prazosin-Stocks bereitete Probleme. Aufgrund der niedrigen Löslichkeit in Aqua wurde die Substanz mit einer Mikrowaage eingewogen und als 0,002 M wässrige Lösung in den Experimenten eingesetzt. Trotz der geringen Löslichkeit wurde Aqua als Solvent einem organischem Lösungsmittel (DMSO) vorgezogen, um unspezifische Effekte auf das Zellwachstum durch einen nicht-wässrigen Vektor zu vermeiden.

Es zeigte sich in einem Vorversuch, dass Prazosin schon bei einer Konzentration von 5 nM das *in vitro* Kolonienwachstum hemmen kann, nachdem in den ersten Versuchen gesehen wurde, dass Konzentrationen im μM -Bereich das Wachstum im CFU-Dish total unterdrücken (nicht gezeigt). Es wurde schließlich die Prazosin-Konzentration soweit heruntertitriert (bis in pM-Konzentrationen), bis keine Wachstumsbeeinflussung durch den Antagonisten gesehen mehr werden konnte. Allerdings waren die nicht toxischen Prazosin-Konzentrationen (pM-nM-Konzentrationen) so niedrig, dass eine blockende Wirkung gegen μM - Konzentrationen Naphazolin nicht zu erwarten waren (nicht gezeigt).

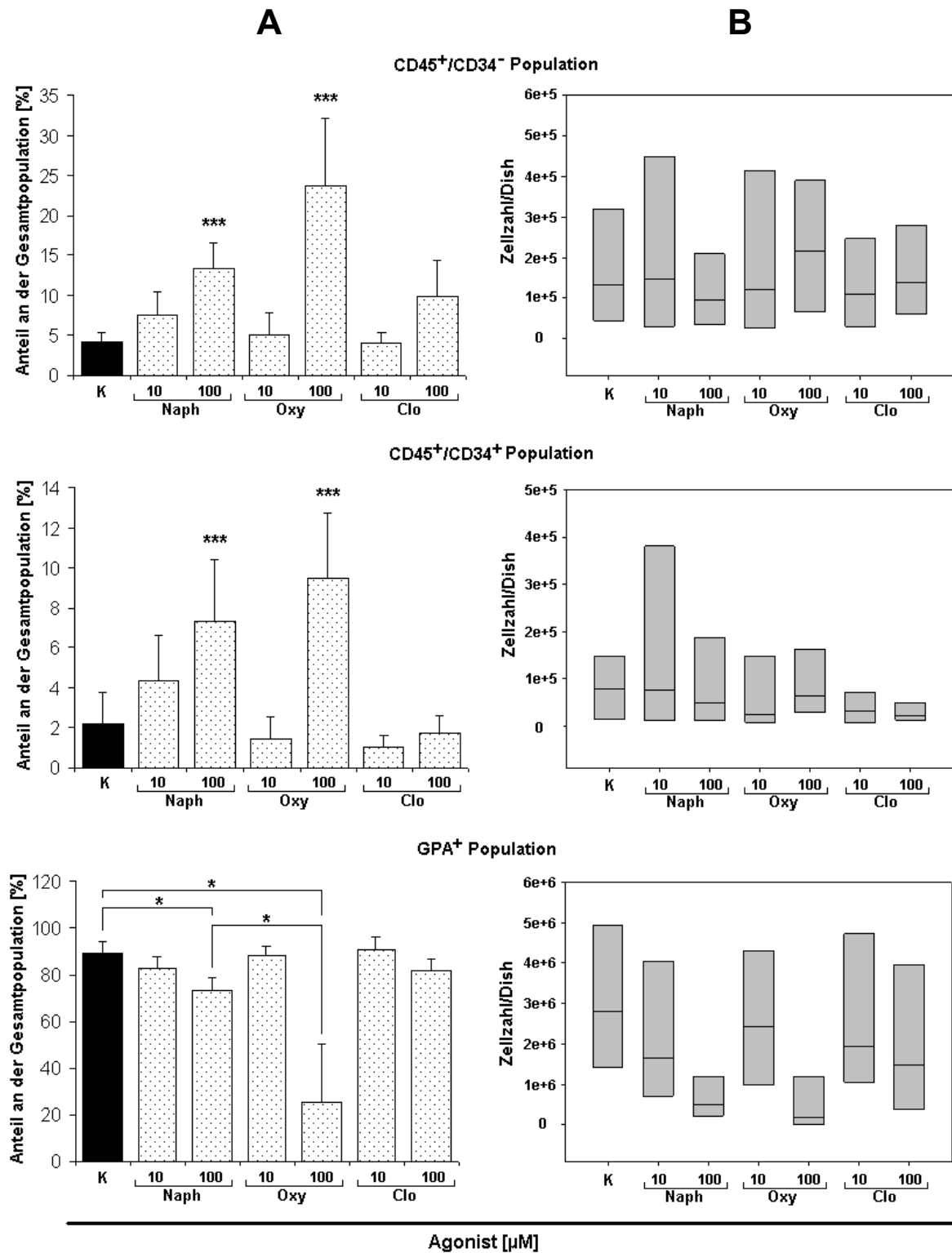
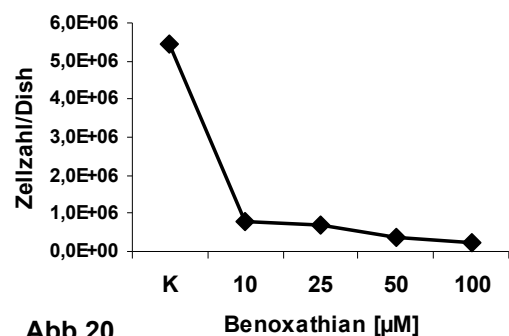


Abb.19: Statistische Auswertung der drei Hauptpopulationen in den UCB-Kulturen nach 14-Tagen Kultivierung mit den α -adrenergen Agonisten Naphazolin (Naph), Oxymetazolin (Oxy) und Clonidin (Clo) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). **A:** Es wird der prozentuelle Anteil der drei Populationen an der Gesamtzellpopulation gezeigt. **B:** Ausgehend von der Gesamtzellzahlbestimmung/Dish und der FACS-Analyse wurde die Anzahl der Zellen der einzelnen Populationen pro CFU-Dish in Absolutwerten berechnet und in Box-Whisker-Diagrammen dargestellt. K, Naph: n = 6, Oxy, Clo: n = 4, *: p < 0,05, ***: p < 0,001, versus Kontrolle bzw. zwischen unterschiedlichen Behandlungen, bestimmt mittels ANOVA.

Aufgrund dieser Problematik wurden die Experimente mit Prazosin eingestellt und mit Benoxathian ein alternativer α 1-spezifischer Antagonist verwendet. Benoxathian weist chemisch eine andere Struktur auf als Prazosin (Abb.6) und ist auch gut in Aqua bidest löslich.

In einem Titrationsexperiment, in dem unterschiedliche Konzentrationen (10 – 100 μ M) von Benoxathian in UCB-Ansätzen ausgetestet wurden, konnte man ein überraschendes Ergebnis sehen. In Ansätzen in denen 50 μ M oder 100 μ M Benoxathian zugesetzt wurden, zeigten sich wie nach Naphazolin-Behandlung keine makroskopisch sichtbaren roten Spots. Erst bei niedrigeren (10 μ M und 25 μ M) - Konzentrationen sah man wieder, in Form und Morphologie eingeschränkte, hämoglobinisierte erythroide Kolonien. Die mikroskopische Kolonienauswertung ergab eine fast vollständige Eliminierung der erythroiden Kolonien durch 50 μ M und 100 μ M Benoxathian, während das myeloische Kolonienwachstum, wie schon bei Naphazolin-Behandlung beobachtet, zumindest in der Zahl der Kolonien, weniger beeinflusst wird (Tab.5). Die Bestimmung der Zellzahl im Dish ergab eine starke Inhibition des Wachstums durch Benoxathian, die schon bei 10 μ M einsetzt (Abb.20).

	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM
Kontrolle (n = 2)	31,5	28	4
Benox [10 μ M] (n = 1)	13	19	3
Benox [25 μ M] (n = 1)	16	24	3
Benox [50 μ M] (n = 1)	1	32	1
Benox [100 μ M] (n = 1)	0	19	0



Tab.5

Abb.20

Tab.5 und **Abb.20** zeigen die Ergebnisse eines Titrationsexperimentes mit dem α 1-adrenergen Antagonisten Benoxathian. Die Tabelle gibt die Zahl der einzelnen Kolonien im jeweiligen Dish an. Von der Kontrolle werden die Durchschnittswerte von zwei Dishes gezeigt. Pro Benoxathian-Konzentration wurde jeweils nur ein Dish angesetzt.

Auch die Kombination von Benoxathian mit Naphazolin konnte die hemmende Wirkung auf das *in vitro* Wachstum der hämatopoietischen Progenitoren nicht wieder herstellen, sondern die beiden Substanzen verstärkten sich gegenseitig in ihrer Wirkung die bis hin zu einer beinahe vollständigen Elimination des erythroiden *in vitro* Wachstums reichte (nicht gezeigt). Durch die parallele Zugabe von Yohimbin (10 μ M - 100 μ M) zu den Naphazolin-behandelten UCB-Ansätzen konnte der Effekt von Naphazolin ebenfalls nicht aufgehoben werden, jedoch zeigte der α 2-Antagonist alleine nicht denselben Trend der spezifischen Inhibition des erythroiden Wachstums wie Naphazolin und Benoxathian (nicht gezeigt).

Da die Kultivierung der hämatopoietischen Progenitoren aus dem UCB eine recht langwierige und teure Methodik darstellt, wurde parallel zu den UCB-Kulturen ein Leukämiezell-Modell etabliert. Aufgrund der Tatsache, dass in den CFU-Ansätzen eine preferentielle Inhibition des erythroiden Wachstums durch die adrenergen Agonisten und Antagonisten gesehen werden konnte, wurden mit den beiden Erythroleukämie Zelllinien K-562 und HEL (Human Erythroleukemia) zwei Zelllinien mit erythroiden Eigenschaften gewählt. Die beiden Zelllinien wurden mit denselben adrenergen Agonisten und Antagonisten wie die UCB-Ansätze behandelt.

3.2 Die Behandlung von K-562-Zellen mit dem α 1-adrenergen Agonisten Naphazolin führt zu Wachstumshemmung, ROS-Induziertem Zelltod, sowie zum Verlust des erythroiden Markers GPA

3.2.1 Die adrenergen Agonisten Naphazolin und Oxymetazolin hemmen das Wachstum von humanen Erythroleukämiezellen

Um die Auswirkung der adrenergen Agonisten auf das Wachstum der Erythroleukämiezellen zu überprüfen, wurden die Zellen mit Naphazolin, Oxymetazolin und Clonidin in ansteigender Konzentration (10 – 300 μ M) kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde bei den K-562-Zellen nach drei Tagen und bei den unter den gewählten Bedingungen langsamer wachsenden HEL-Zellen nach fünf Tagen mittels CASY-Cellcounter analysiert (Abb.21).

Es zeigte sich dabei, dass die K-562-Zellen dosisabhängig durch Naphazolin und Oxymetazolin gehemmt werden. Die Wachstumshemmung war mit einer Abnahme der Viabilität der Zellen assoziiert (Abb.21C). Clonidin hatte keinen Einfluss auf das Wachstum und die Viabilität der K-562-Zellen. In den HEL-Zellen zeigte sich nach fünf Tagen Kultur ein ähnliches Bild, jedoch war die Hemmung durch Naphazolin wesentlich schwächer ausgeprägt als bei den K-562-Zellen. Auch die Viabilität war durch Naphazolin in den HEL-Zellen nur minimal beeinflusst (Abb.21C) Die Wirkung von Oxymetazolin auf die HEL-Zellen ist mit der Wirkung auf die K-562-Zellen vergleichbar. Das Wachstum der HEL-Zellen unter Naphazolin-Einfluss wurde auch nach drei Tagen überprüft. Es konnte hier kein Unterschied im Wachstum der Zellen und ihrer Viabilität festgestellt werden (nicht gezeigt). Naphazolin und Oxymetazolin induzieren neben der Wachstumshemmung in höheren Konzentrationen die Bildung von makroskopisch sichtbaren Aggregaten (Abb.21B). Die Aggregatbildung kann besser beobachtet werden, wenn die K-562-Zellen in Flasks kultiviert werden. Die Aggregatbildung wird bereits nach 48h Kultivierung mit Naphazolin [200 μ M] sichtbar. Bei den HEL-Zellen tritt dieser Aggregationseffekt nicht auf.

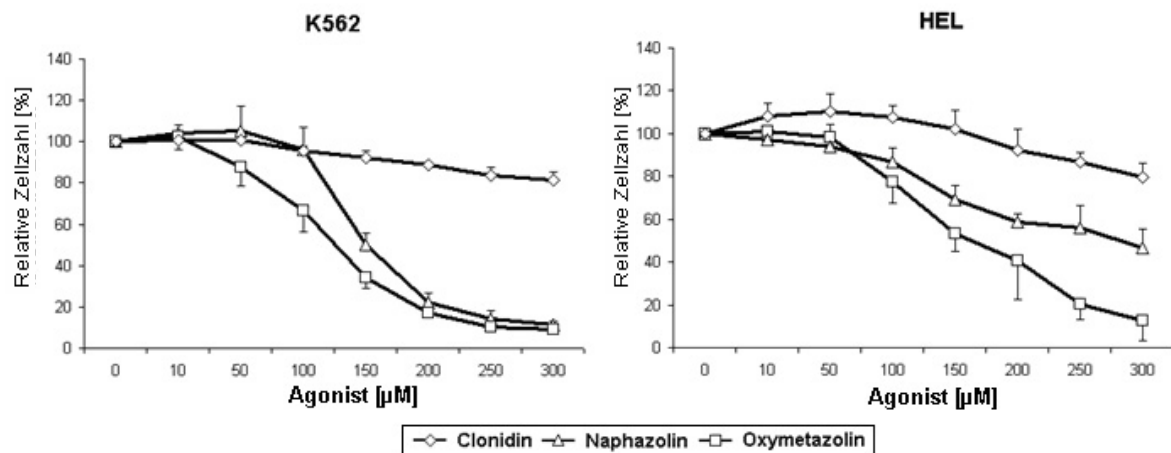
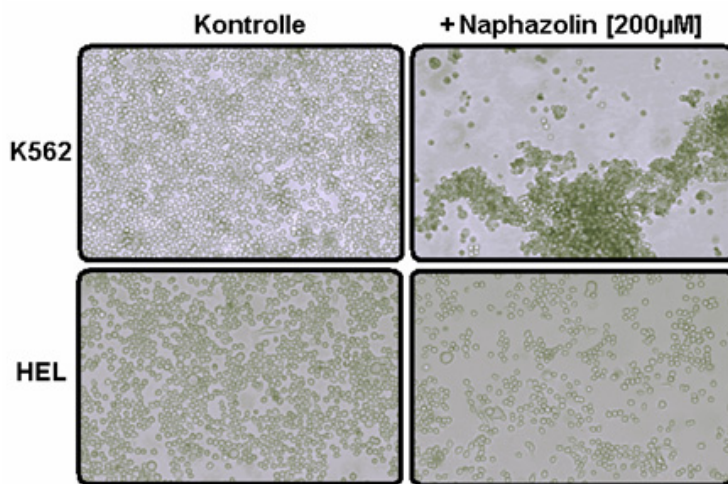
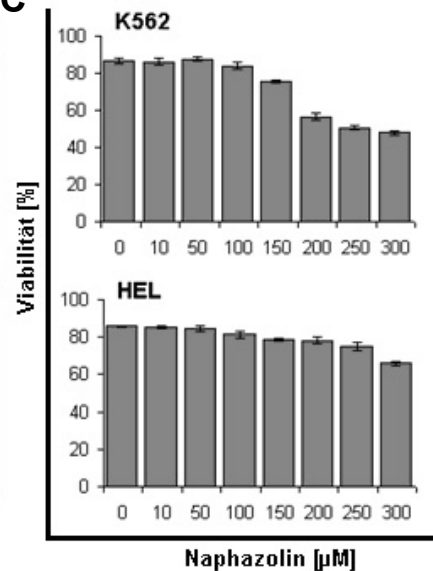
A**B****C**

Abb.21: Die Wirkung von α -adrenergen Agonisten auf das Wachstum der humanen Erythroleukämie Zelllinien K-562 und HEL. **A:** Die beiden Grafiken zeigen die Zahl der lebenden Zellen in % im Vergleich zur Kontrolle (= 100%) nach Behandlung mit ansteigender Konzentration der adrenergen Agonisten Naphazolin (N), Oxymetazolin (O) und Clonidin (C). Die K-562-Zellen (N: n = 5, O: n = 3, C: n = 2) wurden drei Tage mit den Agonisten kultiviert, die HEL-Zellen (N: n = 6, O: n = 3, C: n = 3) fünf Tage. **B:** K-562 und HEL Zellen unter dem Lichtmikroskop nach 70h Kultur mit 200 μ M Naphazolin im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. In den K-562-Zellen wird durch Naphazolin die Bildung von Aggregaten induziert. Bei den HEL-Zellen ist dieses Phänomen nicht zu beobachten (untere Reihe). **C:** Naphazolin in hoher Dosis führt zur Induktion von Zelltod in humanen Erythroleukämiezellen. Die Grafik zeigt die Viabilitätswerte von Erythroleukämiezellen nach drei (K-562) bzw. fünf Tagen (HEL) Kultivierung mit ansteigender Naphazolin Konzentration. Die Graphen zeigen je ein repräsentatives Ergebnis von fünf (K-562), bzw. sechs (HEL) Experimenten.

In der weiteren Arbeit wurde Hauptaugenmerk auf die Wirkung von Naphazolin auf die Erythroleukämiezellen gelegt, da die beiden Zelllinien in den Screeningversuchen eine unterschiedliche Sensitivität gegen die Substanz aufwiesen.

3.2.2 Naphazolin verursacht einen Autophagie-induzierten Zelltod

Um die Induktion von Apoptose als mögliche Ursache des Naphazolin-induzierten Zelltodes zu untersuchen, wurde in Naphazolin behandelten K-562- und HEL-Zellen die Aktivierung der Caspase 3 nach 24h, 48h und 70h Kultivierung gemessen, sowie auf Slides aufzentrifugierte Zellen mit DAPI gefärbt (Abb.22).

In den K-562-Zellen zeigte sich dabei, dass durch hohe Konzentrationen an Naphazolin (200 μM) der Prozentsatz der Zellen, die aktivierte Caspase 3 aufwiesen zwar zeitabhängig anstieg, jedoch nur minimal. Es waren auch zu keinem Zeitpunkt Zeichen von Kernfragmentation zu sehen. Im Gegensatz dazu wurde durch den adrenergen Antagonisten Benoxathian die Aktivierung der Caspase 3 induziert (Ergebnisse gesondert gezeigt, siehe Kapitel 3.3.1). In den HEL-Zellen konnte ein ähnliches Ergebnis gesehen werden. Nach 24h Kultivierung wiesen rund 6% der Zellen (mit und ohne Naphazolinzugabe gleichermaßen) aktivierte Caspase 3 auf. Bei der Kontrolle und den mit 100 μM Naphazolin behandelten Zellen ging dieser Prozentsatz mit Fortdauer der Kultivierung zurück, während bei 200 μM Naphazolin der Prozentsatz der Zellen mit aktivierter Caspase 3 auf niedrigem Niveau gleich blieb. Kernfragmentation war auch bei den HEL-Zellen nicht zu beobachten (nicht gezeigt).

Bei höherer mikroskopischer Vergrößerung (400x) der Naphazolin-behandelten (200 μM) K-562-Zellen sah man einzelne Zellen, die den Anschein einer leeren Zellhülle hatten und teils mehrere, vakuolenförmige, kugelartige Strukturen in ihrem Inneren aufwiesen (Abb.22D). Um zu evaluieren, ob es sich dabei um Vakuolen handelt, die aus möglichen Autophagieprozessen herrühren, wurden Naphazolin-behandelte Zellen elektronenmikroskopisch analysiert. In der Analyse der Ultrastruktur der Naphazolin-behandelten Zellen bestätigte sich die nach lichtmikroskopischer Beobachtung der Zellen aufgestellte Hypothese, dass die Naphazolin-Behandlung der Zellen zur Induktion von Autophagieprozessen führt (Abb.23). Die Naphazolin-behandelten Zellen weisen nach 48h-Kulturdauer Autophagosomen in verschiedenen Stadien auf (Abb.23B-D).

Die Funktion von Autophagieprozessen wird zur Suppression von nekrotischem Zelltod im Zuge von metabolischem Stress diskutiert, was ein paralleles Vorliegen von Autophagocytose und Nekrose nach Naphazolin-Behandlung der K-562-Zellen nicht ausschließt. Exzessive/Chronische Autophagie wird neben der Apoptose (Typ-I-Zelltod) und Nekrose (Typ-III-Zelltod) als Typ-II-Zelltod bezeichnet [110, 111].

Neben dem Vorliegen von Autophagosomen konnten in den Mitochondrien der Naphazolin-behandelten K-562-Zellen kleine, elektronendichte Punkte entdeckt werden, die entweder als Protein-Komplexe oder Akkumulation von Ca^{2+} gewertet werden können (Abb.23E).

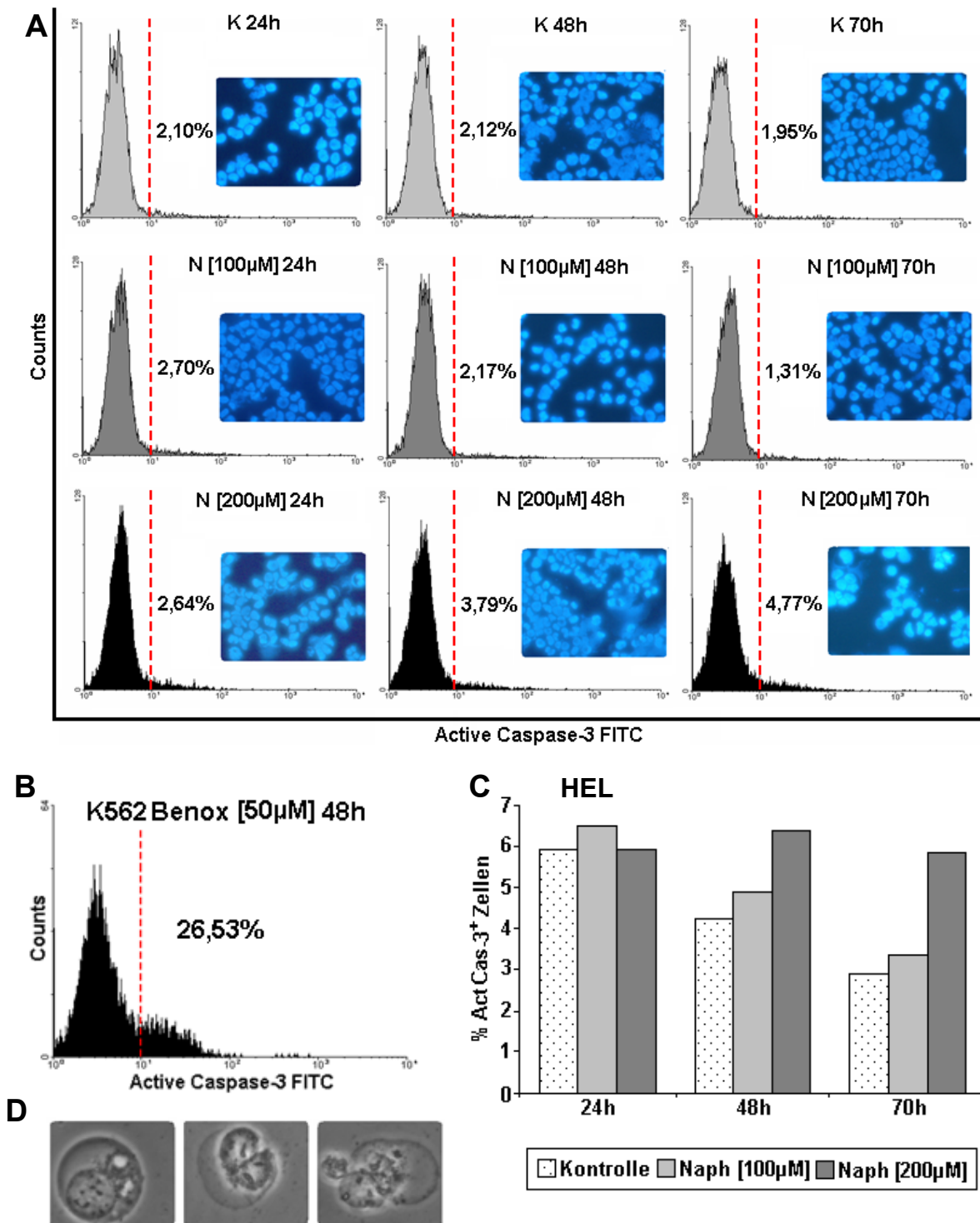


Abb.22: Apoptose-Assay von Erythroleukämiezellen nach Behandlung mit Naphazolin. **A:** Aktive Caspase 3 Messungen in der K-562-Zelllinie nach Kultivierung mit Naphazolin (N) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). Der rote Balken in den Histogrammen diskriminiert zwischen akt.-Cas-3⁺ (li.) und akt.-Cas-3⁻ (re.) Zellen. Parallel zu den Caspase 3 Histogrammen werden DAPI-gefärbte Zellen die jeweils unter denselben Bedingungen kultiviert wurden, gezeigt. Originale Vergrößerung der Zellen: 200x. **B:** Im Gegensatz zu Naphazolin induziert der α 1-adrenerge Antagonist Benoxathian Caspase 3 -Aktivierung in den K-562-Zellen. **C:** Ergebnis der Caspase-Messung der HEL-Zellen nach Behandlung mit Naphazolin unter denselben Bedingungen wie bei den K-562-Zellen. Angegeben wird der Prozentsatz der Zellen, die aktivierte Caspase 3 aufweisen. **D:** Nach 24h Behandlung der K-562-Zellen mit 200 μ M Naphazolin sieht man bei lichtmikroskopischer Betrachtung einige Zellen mit scheinbar intakter Membran, jedoch mit teilweise mehreren kugelartigen intrazellulären vakuolenartigen Strukturen. Originale Vergrößerung: 400x.

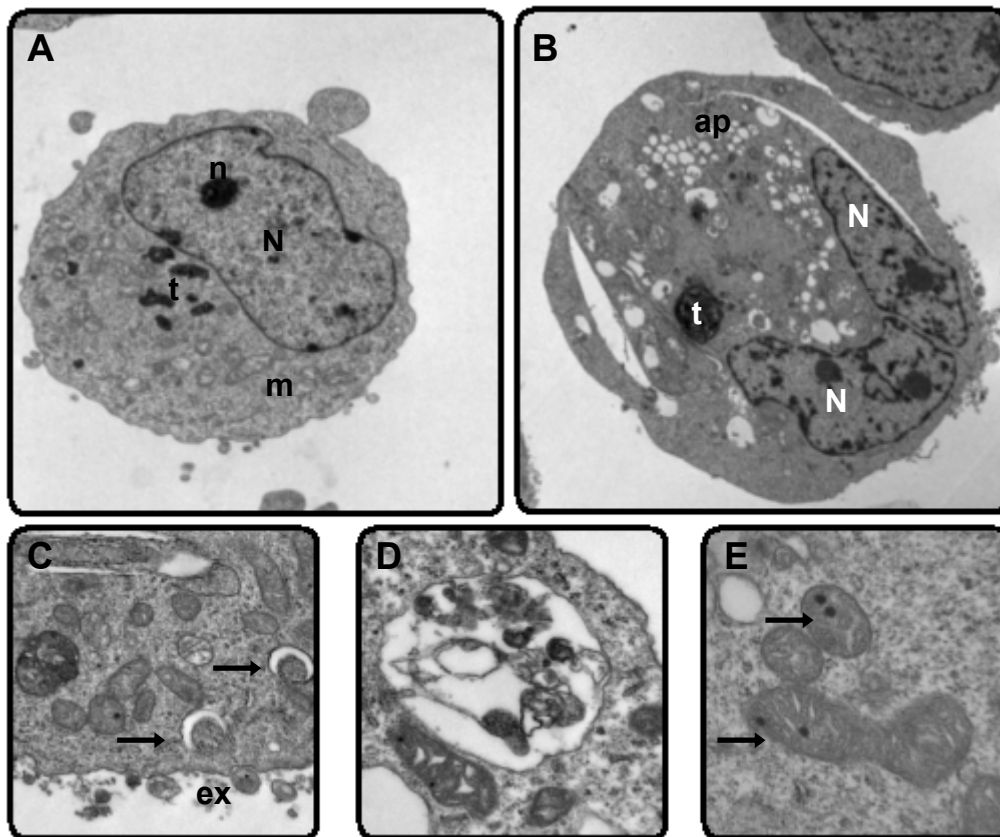


Abb.23: Ultrastrukturanalyse von K-562-Zellen nach 48h-Kultivierung mit Naphazolin. **A:** Exemplarische K-562-Zelle aus einer unbehandelten Kultur. (3000x). **B:** Zelle aus einer K-562-Kultur, die 48h mit 200 μ M Naphazolin behandelt wurde (3000x). Typisch für Naphazolin behandelte Zellen ist das massive Auftreten von Vakuolen, die sich als Autophagosomen (ap) herausstellten, sowie das Vorkommen von im Vergleich zur Kontrolle riesigen Telolysosomen (t). **C-E:** Typische Merkmale von K-562-Zellen nach 48h-Inkubation mit 200 μ M Naphazolin. **C:** Autophagosomenbildung. Die Abb. zeigt zwei frühe Autophagosomen (Pfeile) bei der Einschnürung von Cytoplasma. Weiters sieht man auf der Abb. die Cytoplasmamembran mit der als Exosomen (ex) beschriebenen körnigen Strukturen, die sich abschnittsweise an der Cytoplasmamembran anlagern. **D:** Autophagosomen mit noch nicht aufgelöstem, nicht näher definierbarem Inhalt (20000x). **E:** Die Mitochondrien in Naphazolin-behandelten Zellen weisen häufig punktförmige elektronendichte Strukturen auf (Pfeile). (30000x)., **m:** Mitochondrien, **n:** Nucleoli, **N:** Nucleus, **v:** Vakuolen.

Weiters sah man in den Naphazolin-behandelten Zellen am Plasmalemm vermehrt körnige Strukturen, die von der Morphologie her Exosomen glichen, die in einer rezenten Studie in den K-562-Zellen beschrieben wurden [112]. Kernfragmentation konnte auch in der ELMI-Analyse nicht detektiert werden.

Um zu prüfen, ob Naphazolin genotoxisch wirkt, wurden Comet-Assays mit Naphazolin behandelten Erythroleukämiezellen durchgeführt. Dazu wurden die Erythroleukämiezellen 48h lang mit 100 μ M bzw. 200 μ M Naphazolin kultiviert. Als Vergleich dazu wurde der ROS-Generator Menadion eingesetzt [96, 105], da in einer Studie gezeigt wurde, dass Menadion in den K-562-Zellen wie Naphazolin einen Caspase-unabhängigen, ROS getriggerten Nekrose-ähnlichen Zelltod verursacht [105]. In der Analyse des Zellwachstums bestätigte

sich dabei das Ergebnis des Screenings, dass sich die HEL-Zelllinie weniger sensitiv gegenüber Naphazolin zeigt, als die K-562-Zelllinie. Die Zahl der lebenden Zellen im Verhältnis zur jeweils unbehandelten Kontrolle war in den K-562-Zellen nach 48h und 72h Naphazolin-Behandlung (200 μ M) hochsignifikant ($p < 0,001$) niedriger im Vergleich zu den HEL-Zellen. Bei Behandlung mit dem ROS-Generator Menadion zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach Naphazolin-Behandlung. Die Zahl der lebenden HEL-Zellen war nach 48h und 72h im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle signifikant ($p < 0,05$) höher als bei den K-562-Zellen. Das Ergebnis der Zellanalyse spiegelte sich im Comet-Assay wider.

Nach den einzelnen Arbeitsschritten des Comet-Assays und mikroskopischer Fotografie (bei 100x Vergrößerung) wurden die DAPI-gefärbten Zellkerne (bzw. Kometen) mit der Tritex-Cometscore-Software analysiert. Unter den insgesamt siebzehn möglichen Datensätzen über die einzelnen Zellen wurde der prozentuelle DNA-Gehalt des Schweifes (Zellkern-DNA+Schweif-DNA = 100%) als Auswerteparameter gewählt. Pro Ansatz ($n = 3$) wurden pro Bedingung rund 250 Zellen analysiert. Über die statistische Auswertung des Comet-Assays gibt es keine einheitliche Meinung. Das Problem der Auswertung und in der Wahl des statistischen Testverfahren liegt darin, dass die erzielten Daten in den meisten Fällen nicht normalverteilt sind [113, 114], was die Auswahl von statistischen Testverfahren einschränkt. Duez et al. analysierten die verwendeten statistischen Testverfahren von mehreren Comet-Assay Studien und kommen zum Schluss, dass auch Parameter-freie statistische Testverfahren für die Auswertung von Comet-Assay-Daten nur bedingt geeignet sind und raten zu einfacher deskriptiven Auswertung der gemessenen Daten [113].

Auch nach der Behandlung der beiden Erythroleukämiezellen mit Naphazolin und Menadion ergab die Messung des prozentuellen Anteils der Schweif-DNA keine normalverteilten Datensätze (Abb.24C). Bei mikroskopischer Evaluierung der Zellen auf den Comet-Slides sah man bei den Menadion- und Naphazolin-behandelten K-562-Zellen einen deutlichen Unterschied. Bei den Ansätzen mit den behandelten Zellen sah man mehr Kometen, während dazwischen jedoch auch Zellkerne ohne Schweif lagen (Abb.24B). Bei 100 μ M Naphazolin sah man bei den K-562-Zellen keinen Unterschied zur Kontrolle (nicht gezeigt). Auf den HEL Naphazolin- und Menadion-Slides sah man deutlich weniger Zellen mit Kometenschweif als bei den K-562-Zellen (nicht gezeigt). In der Box-Whisker-Diagramm Darstellung der Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes (Abb.24C) sieht man, dass die Mediane (bestätigt durch den Man-Whitney Test), sowie die beiden Quartile weder durch Naphazolin noch durch Menadion-Behandlung signifikant beeinflusst werden, jedoch bei Naphazolin das Maximum der DNA-Schädigung nach oben verschoben wird. Der geringe Teil der Zellen der durch Menadion intensive DNA-Schäden aufwies, wurde im Box-Whisker-Diagramm als Ausreißer gewertet. Bei 200 μ M Naphazolin kommen auch mehr Ausreißer mit hochgradiger DNA-Schädigung vor, jedoch wird im Gegensatz zu Menadion das Maximum

nach oben verschoben, was bedeutet, dass durch hohe Naphazolin-Konzentrationen (200 μM) DNA-Schäden in ansteigender Intensität auftreten, während nach Menadion-Behandlung hauptsächlich Kometen mit hohem (1×10^{-2} bis 1×10^{-2} % DNA-Anteil im Schweif) auftreten.

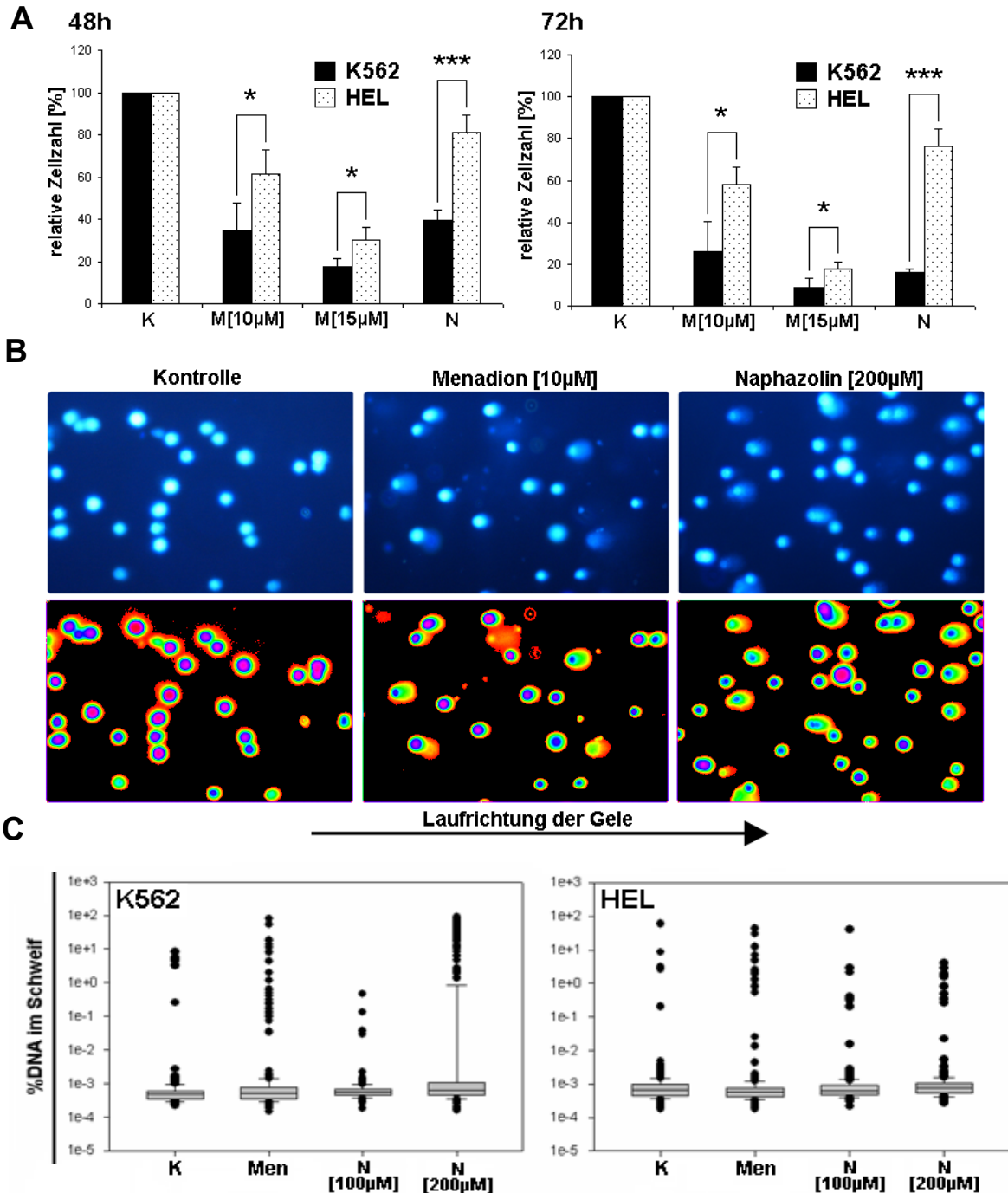


Abb.24: Comet-Assay der Erythroleukämiezellen nach Behandlung mit Menadion oder Naphazolin. **A:** Direkter Vergleich der wachstumsinhibierenden Wirkung von Naphazolin (N, 200 μM) und Menadion (M) auf die beiden Zelllinien HEL und K-562 nach 48h (links) und 72h (rechts) Inkubation mit den beiden Substanzen ($n = 4$). *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$. **B:** Mittels Comet - Assay analysierte K-562-Zellen nach 48h Inkubation mit Menadion oder Naphazolin. Obere Reihe: Originalbild der DAPI-gefärbten Kometen. Untere Reihe: Dieselben Bilder, bearbeitet mit der Comet-Analyse-Software in der „Full spectrum“-Ansicht. Originale Vergrößerung: 100x. **C:** Box-Whisker-Diagramme des prozentuellen DNA-Anteiles im Schweif der Kometen nach Behandlung von Erythroleukämiezellen für 48h mit 10 μM Menadion (Men) oder Naphazolin (N).

Auch in den HEL-Zellen wurde der Median und auch die Quartilen des Analyseparameters DNA im Schweif der Kometen nicht verschoben (Abb.24C) Im Vergleich zwischen den K-562- und den HEL-Zellen sieht man, dass Menadion auch in den HEL-Zellen DNA-Schäden induziert, was man an der Zahl der Ausreißer nach oben erkennt, Naphazolin das Maximum der DNA-Schäden jedoch nicht nach oben verschiebt.

3.2.3 Naphazolin bewirkt eine reversible Abnahme der Expression des erythroiden Markers Glycophorin-a in den K-562-Zellen

Um zu testen, ob Naphazolin auch in den Erythroleukämiezellen eine Abnahme der GPA-Expression bewirkt, wurde nach drei Tagen Kultivierung mit ansteigender Naphazolin Konzentration die Expression von GPA auf Proteinebene mittels FACS bestimmt.

Bei den K-562-Zellen konnte, wie schon in den UCB-Ansätzen beobachtet, eine dosisabhängige prozentuelle Abnahme der GPA-exprimierenden Zellen gesehen werden (Abb.25A). Umgerechnet auf absolute Zahlen pro Well sah man, dass die Population der GPA⁺ K-562-Zellen durch Naphazolin-Behandlung dosisabhängig abnimmt, während die GPA⁻ Population parallel dazu bis zu einer Konzentration von 100 µM zunimmt. Bei 200 µM Naphazolin waren die GPA⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrolle fast depletiert. Die Zahl der GPA⁻ Zellen/Well war bei einer Naphazolin-Konzentration von 100 µM maximal, fiel dann bei höheren Konzentrationen jedoch wieder ab. Nach der Behandlung mit Oxymetazolin zeigt sich ein ähnlicher Effekt wie nach Naphazolin-Behandlung, während Clonidin die GPA-Expression nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

In den HEL-Zellen zeigte sich im FACS-Profil nicht dasselbe Ergebnis wie bei den K-562-Zellen. Naphazolin-Behandlung der HEL-Zellen führt zu keiner Veränderung in der Expression von GPA auf Proteinebene (nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die Veränderung des prozentuellen Verhältnisses GPA⁺ versus GPA⁻ Zellen durch Naphazolin in den K-562-Zellen reversibel ist, wurden K-562-Zellen in einem Tissue Culture Flask drei Tage mit 200µM Naphazolin kultiviert. Es stellte sich heraus, dass die Expression von GPA auch nach Kultivierung in den Flasks durch Naphazolin abnimmt, jedoch fällt die Inhibition der GPA-Expression der Naphazolin-behandelten K-562-Zellen in den Flasks schwächer aus als bei Zellen die in 24 Well Platten mit Naphazolin kultiviert werden (Abb.25). Die Wirkung von Naphazolin auf die GPA-Expression scheint folglich auch von unterschiedlichen Wachstumsbedingungen bedingt durch das Kulturgefäß abzuhängen. Die Naphazolin behandelten Zellen wurden nach drei Tagen geerntet, gewaschen und auf Wells mit Medium mit oder ohne Zusatz von 200 µM Naphazolin aufgeteilt und weitere 48h inkubiert. Nach 48h nahm der Prozentsatz der GPA-exprimierenden Zellen in den ohne Naphazolin weiterinkubierten Zellen wieder zu und es stellte sich wieder dasselbe Verhältnis zwischen GPA⁺ und GPA⁻ Zellen ein wie bei den unbehandelten Zellen (Abb.25C), während

die GPA Expression der Zellen die mit Naphazolin weiterinkubiert wurden im Vergleich zum Zeitpunkt 48h unverändert blieb.

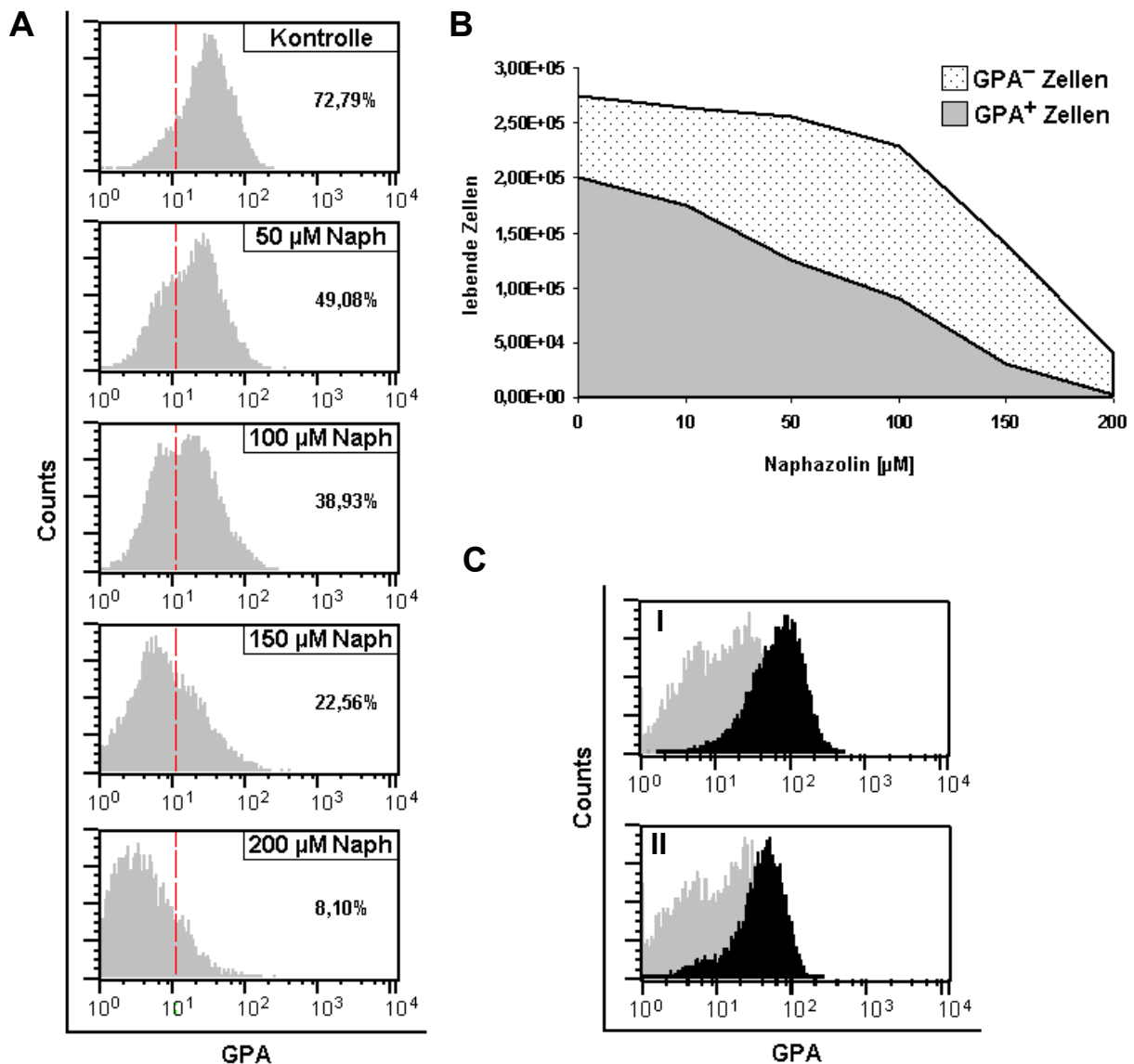


Abb.25: Naphazolin bewirkt eine dosisabhängige Abnahme der Glycophorin-a exprimierenden Zellen in den K-562-Zelllinie **A:** FACS-Histogramme der GPA-Expression von K-562-Zellen, 72h kultiviert mit ansteigender Konzentration an Naphazolin. Die Zahl in den Histogrammen gibt den jeweiligen Prozentsatz der GPA⁺ Zellen (rechts der roten Linie) der Messung an. Für die Unterscheidung zwischen GPA⁺ und GPA⁻ Zellen wurden ungefärbte Zellen aquiriert und der Balken gesetzt. **B:** Ausgehend von der bestimmten Zellzahl und dem mittels FACS ermittelten Prozentsatz der GPA⁺ Zellen wurde der zahlenmäßige Anteil der jeweiligen Population in den Kulturansätzen ermittelt. **C: I:** K-562-Zellen wurden 3 Tage mit und ohne Naphazolin (200 µM) in Kulturflaschen inkubiert und die Expression von CD235a mittels FACS bestimmt. Die Histogramme der unbehandelten Zellen und der Naphazolin-behandelten Zellen wurden übereinandergelegt. Schwarzes Histogramm: unbehandelte Kontrolle, graues Histogramm: Naphazolin-behandelte Zellen. **II:** 3-Tage-Naphazolin-behandelte Zellen wurden gewaschen und mit/ohne Naphazolin - Zusatz (wieder 200 µM) in Zellkulturplatten für 48h wieder in Kultur gebracht. Schwarzes Histogramm: Zellen ohne Naphazolin weiterinkubiert, graues Histogramm: Zellen mit Naphazolin weiterinkubiert.

3.2.4 Die Behandlung von K-562-Zellen mit Naphazolin führt zur Generierung von ROS

Mittels Nachweis der Oxidation von intrazellulär aufgenommenen DCFH-DA wurde die Generierung von ROS in den K-562-Zellen nach 24h und 48h Naphazolin-Behandlung gemessen.

Nach 24h war nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal (Kontrolle: durchschnittliche Fluoreszenz: $8,05 \pm 0,73$, $n = 4$) zu detektieren. Es konnte nach 24h Inkubation kein signifikanter Unterschied zwischen den Naphazolin-behandelten Ansätzen und der Kontrolle gesehen werden (Abb.26). Nach 48h sah man eine deutliche Steigerung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur 48h-Messung (Kontrolle: durchschnittliche Fluoreszenz: $45,11 \pm 7,09$, $n = 3$). Durch $100 \mu\text{M}$ Naphazolin wird die ROS-Generierung in den K-562-Zellen signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Bei $200 \mu\text{M}$ Naphazolin sieht man im Gegensatz dazu ein signifikant ($p < 0,05$) niedrigeres Fluoreszenzsignal als bei der Kontrolle.

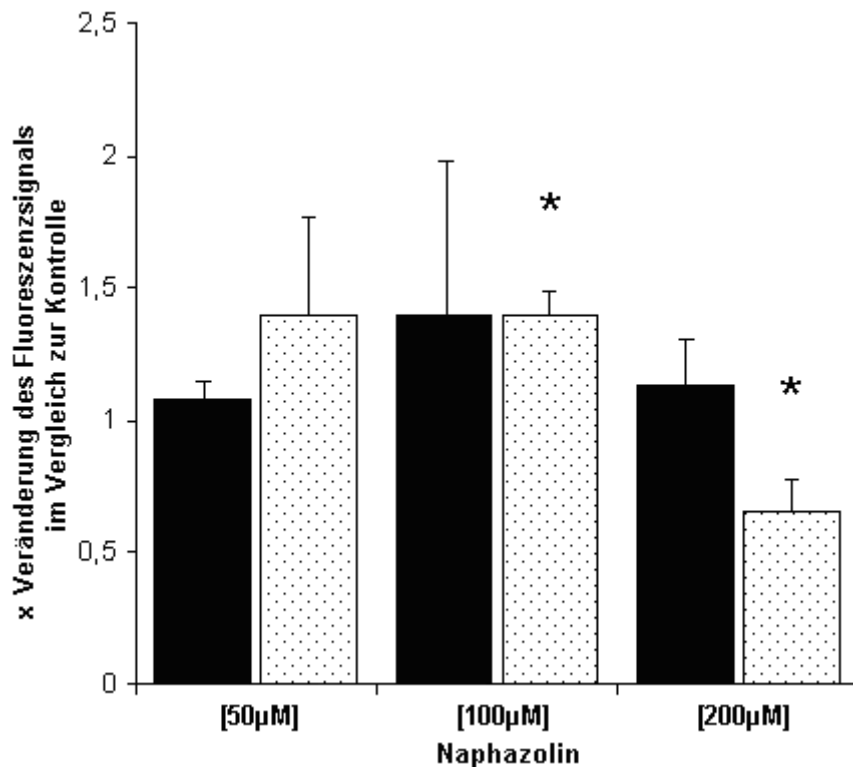


Abb.26: Ergebnisse der ROS-Messung nach Behandlung von K-562-Zellen mit ansteigender Konzentration von Naphazolin nach 24h ($n = 4$) und 48h ($n = 3$) Inkubation. Die Werte sind dargestellt als Faktoren der Veränderung des durchschnittlichen ROS-induzierten Fluoreszenzsignals zwischen den Kontroll-Zellen und den mit Naphazolin behandelten Zellen. *: $p < 0,05$ versus Kontrolle.

In den HEL-Zellen wurde die ROS-Generierung nach fünf Tagen Kultivierung gemessen. Es zeigte sich in diesen Messungen der Trend, dass in den HEL-Zellen die ROS-Generierung im Gegensatz zur K-562-Zelllinie dosisabhängig von Naphazolin gehemmt wird ($R^2 = 0,9539$, $p < 0,001$) (Abb.27). Eine signifikante Hemmung ($p < 0,001$) der ROS Produktion im

Vergleich zur Kontrolle tritt jedoch erst ab einer Konzentration von 250 μM Naphazolin auf (Abb.27).

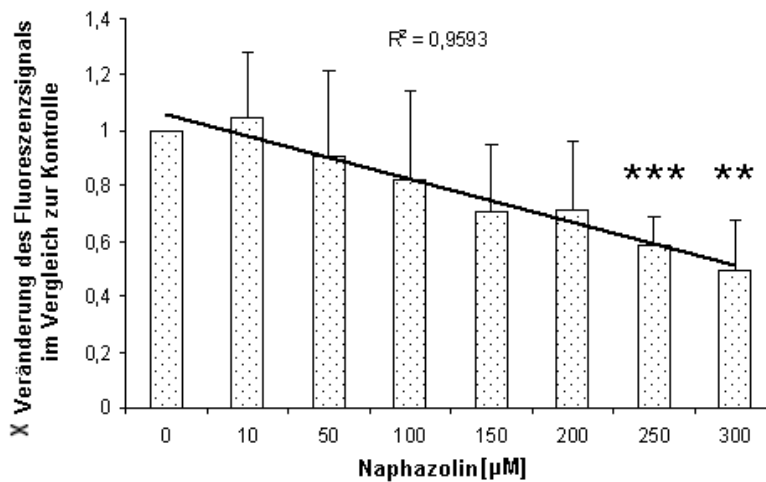


Abb.27: ROS Messung in der HEL-Zelllinie nach Kultivierung mit ansteigender Naphazolin Konzentration. HEL-Zellen wurden 5 Tage mit Naphazolin kultiviert und die ROS-Generierung in den Zellen mittels DCFH-DA bestimmt (n = 4). **: p < 0,01, ***: p < 0,01 versus Kontrolle.

3.2.5 Das Antioxidants NAC schützt die K-562-Zellen effizient vor der toxischen Wirkung von Naphazolin und auch von Menadion

Durch die Zugabe des Antioxidants N-Acetyl-Cystein (NAC) zur Kultur kann der wachstumshemmende, toxische Effekt von 200 μM Naphazolin auf die K-562-Zellen fast vollständig rückgängig gemacht werden (Abb.28). 5 mM NAC stellte sich als die ideale Dosis heraus um die Zellen vor Naphazolin zu schützen. Höhere Dosen (10 mM – 15 mM) wirken selbst inhibierend auf das Wachstum der K-562-Zellen. Auch die durch Naphazolin induzierte Aggregation der Zellen wird durch NAC aufgehoben (nicht gezeigt). Die ROS-Generierung scheint jedoch nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Induktion der Aggregation zu stehen, da der ROS-Generator Menadion keine Aggregation der K-562-Zellen bewirkt (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu NAC kann durch den Zusatz von Pyrollidindithiocarbamat (PDTC) zur Kultur, ein Antioxidants das wie NAC eine Thiolgruppe trägt, der toxische Effekt von Naphazolin auf die K-562-Zellen nicht abgeschwächt werden. Auch bei Behandlung der K-562- Zellen mit 10 μM Menadion für 72h kann durch NAC ein protektiver Effekt erzielt werden, während PDTC auch gegen den mitochondrialen ROS Generator keine Schutzwirkung zeigt (Abb.28).

Durch die Zugabe von NAC zum Medium wird die Zahl der GPA⁺ K-562-Zellen, bestimmt durch FACS Analyse, dosisabhängig erniedrigt, die Zahl der GPA⁻ Zellen bleibt durch die NAC-Behandlung jedoch nahezu konstant (Abb.28DI). Bei 200 μM Naphazolin kann die Zugabe von NAC zum Medium, die Zahl der GPA⁺ Zellen signifikant steigern (nicht gezeigt). Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass Naphazolin auch in den nicht toxischen

Konzentrationen die Expression von GPA in den K-562-Zellen inhibiert. Um zu überprüfen, ob

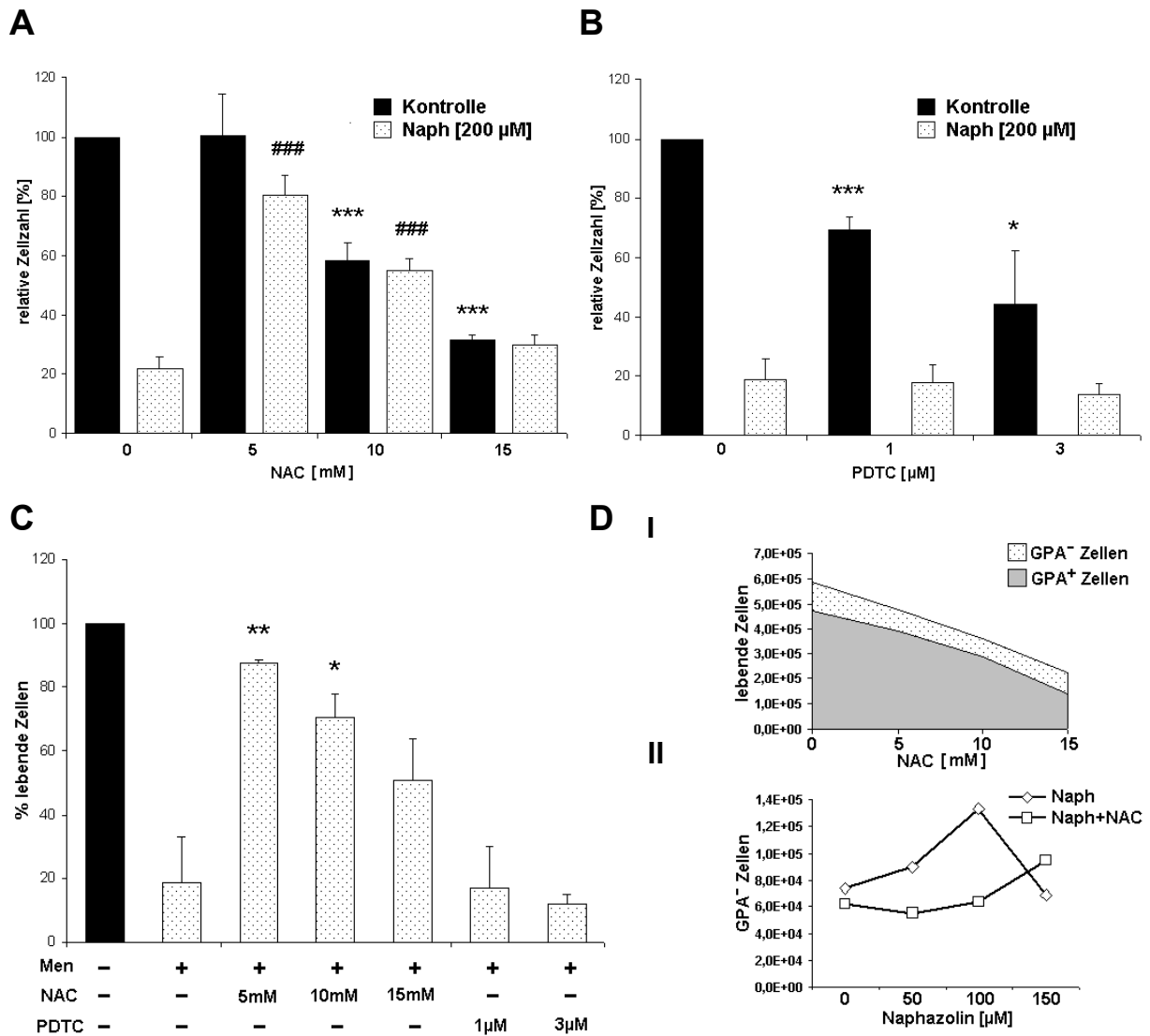


Abb.28: Der Effekt von Naphazolin kann durch das Antioxidants N-Acetyl-Cystein (NAC) attenuiert werden. **A/B:** K-562-Zellen wurden 72h mit den Antioxidantien NAC oder PDTC +/- Naphazolin (200 µM) kultiviert (n = 3). Nach der Kultivierung wurde die Zellzahl mittels CASY-Cellcounter bestimmt. Die Zellzahlen sind angegeben als der Prozentsatz der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (= 100%); *:p < 0,05 ***, p < 0,001 versus Kontrolle, ####: p < 0,001 versus Naph [200 µM]; **C:** K-562 Zellen wurden 72h mit Menadion (Men, 10 µM) +/- NAC oder PDTC kultiviert (n = 3). Die Proliferation der Zellen wurde durch einen CASY-Cellcounter bestimmt. Die Zellzahlen sind angegeben als der Prozentsatz der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (= 100%);*: p < 0,05, **:p < 0,01 versus Menadion. **D: I:** K-562-Zellen wurden 72h mit ansteigender Konzentration mit NAC kultiviert und mittels CASY und FACS die Zahl der GPA⁺/GPA⁻ Zellen pro Well bestimmt. **II:** Um den Effekt von NAC auf auf den Differenzierungseffekt (Inhibition der GPA-Expression) von Naphazolin zu testen, wurden K-562-Zellen 72h mit 50 µM, 100 µM und 150 µM mit und ohne Zugabe von 5mM NAC inkubiert und mittels FACS der prozentuelle Anteil der GPA⁺/GPA⁻ Zellen bestimmt und auf die absolute Zahl der GPA⁻ Zellen/Well umgerechnet. Man kann in der Grafik erkennen, dass durch NAC-Behandlung, die Steigerung der GPA⁻ Zellen durch Naphazolin attenuiert wird. Die Grafik zeigt ein präsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

NAC nur die GPA⁺ Zellen vor dem Naphazolin-medierten Zelltod schützt, oder auch die Expression von GPA selbst rekonstituieren kann, wurden K-562-Zellen mit 50 µM, 100 µM

und 150 μM Naphazolin in Kombination mit 5 mM NAC inkubiert und die Zahl der $\text{GPA}^+/\text{GPA}^-$ Zellen pro Well bestimmt.

Das Ergebnis dieser Experimente war, dass NAC in den nicht toxischen Naphazolin-Konzentrationen den durch Naphazolin bewirkten Anstieg der Zahl der GPA^- Zellen unterbindet (Abb.28DII).

Keine Schutzwirkung auf das Wachstum der Zellen und keine Alterationen in der Expression von GPA konnte nach der Behandlung der K-562-Zellen mit den NO-Synthase-Inhibitoren und Hämoglobin gesehen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.6 ROS-Generierung durch Menadion und NO-Freisetzung durch SNP können den Effekt von Naphazolin auf die Expression von GPA nicht imitieren

Es konnte demonstriert werden, dass durch Naphazolin-Behandlung in den Zellen die Produktion von toxischen Sauerstoffradikalen induziert wird und gleichzeitig die Expression von GPA zurückgeht. Um die Rolle der Sauerstoffradikalproduktion an der Regulation von GPA zu überprüfen, wurden K-562-Zellen mit dem ROS-Generator Menadion oder mit dem NO-freisetzenden Agens SNP kultiviert und die Expression von GPA mittels FACS bestimmt.

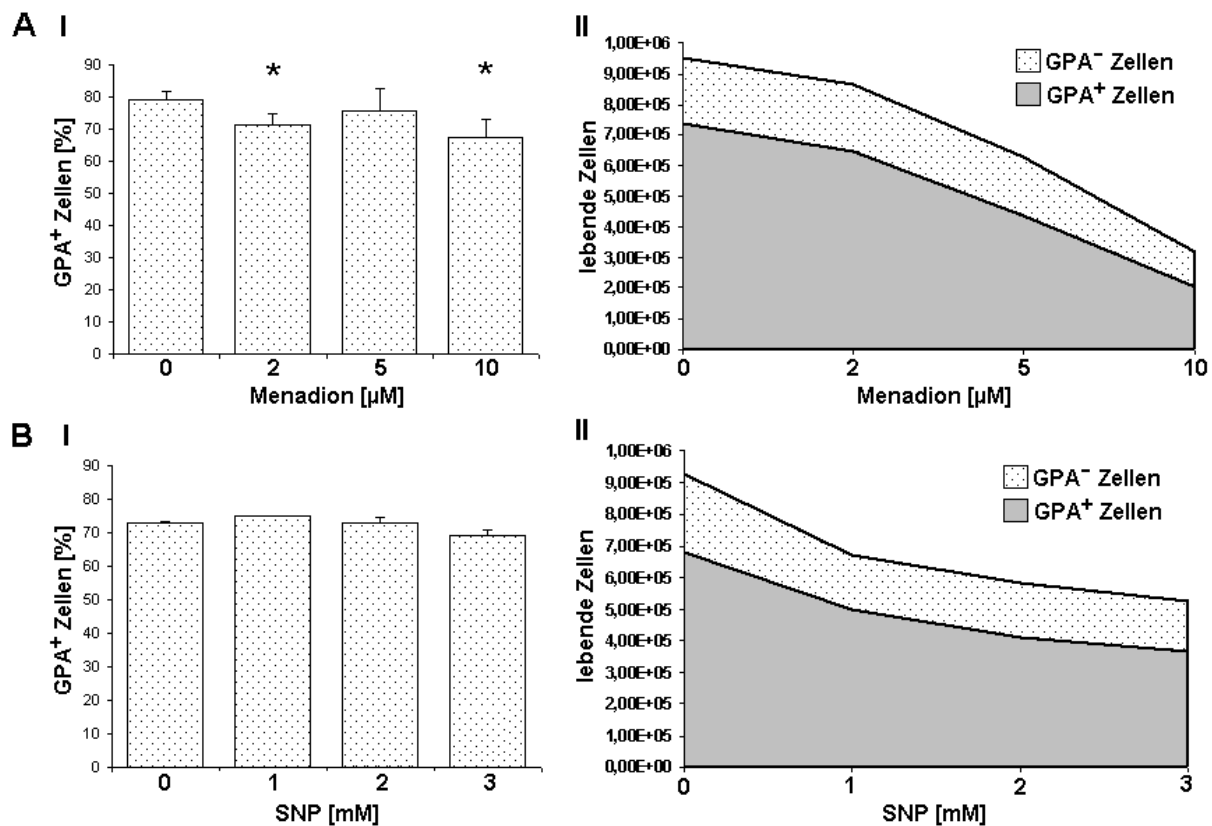


Abb.29: A: (I): Gezeigt wird der prozentuelle Anteil der GPA-exprimierenden K-562-Zellen nach 72h Inkubation mit dem ROS-Generator Menadion, bestimmt durch Durchflusscytometrie (n = 3); *: p < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0). **(II):** Nach der Bestimmung mittels FACS wurde die absolute Zahl der GPA-exprimierenden Zellen pro Well berechnet. Die Gesamtzellzahl setzt sich aus den GPA^+ und GPA^- Zellen zusammen. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnissen aus insgesamt drei Experimenten. **B: I:** Gezeigt wird der prozentuelle Anteil der GPA-exprimierenden K-562-Zellen

nach 48h Inkubation mit dem NO-freisetzenden Agens SNP, bestimmt durch Durchflusszytometrie (n = 3), II: Nach der Bestimmung mittels FACS wurde die absolute Zahl der GPA-exprimierenden Zellen pro Well berechnet. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnissen aus insgesamt drei Experimenten.

Menadion senkte den Prozentsatz der GPA-exprimierenden Zellen in den Konzentrationen 2 μM ($p < 0,05$) und 10 μM ($p < 0,05$) zwar signifikant, jedoch nur marginal (Abb.29A). Vergleicht man die Gesamtzellzahlen der GPA⁺ und GPA⁻ Zellen pro Well, (Abb.28AII) sieht man einen deutlichen Unterschied zum Ergebnis von Naphazolin (siehe Abb.25).

Es kommt durch Menadion-Behandlung zwar ebenfalls zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation der K-562-Zellen, jedoch nicht zu einer Akkumulation von GPA⁻ Zellen wie bei Naphazolin. Man kann erkennen, dass die Zahl der GPA⁺ Zellen zwar dosisabhängig zurückgeht, die Zahl der GPA⁻ Zellen jedoch ziemlich konstant bleibt (Abb.29AII).

SNP bewirkt keine signifikante Veränderung in der prozentuellen Verteilung der GPA-exprimierenden Zellen (Abb.29B). In mM-Konzentrationen hemmt SNP die Proliferation der Zellen, jedoch wie schon bei Menadion beobachtet kommt es zu keiner prozentuellen und zahlenmäßigen Veränderung der GPA⁻ Zellen, jedoch zu einer zahlenmäßigen Abnahme der GPA⁺ Fraktion.

3.2.7 Der NO-Generator Nitroprussid hebt die durch Naphazolin induzierte Aggregation der K-562-Zellen auf

In einem Experiment, das durchgeführt wurde um mögliche Synergismen zwischen Naphazolin und SNP zu entdecken, konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden.

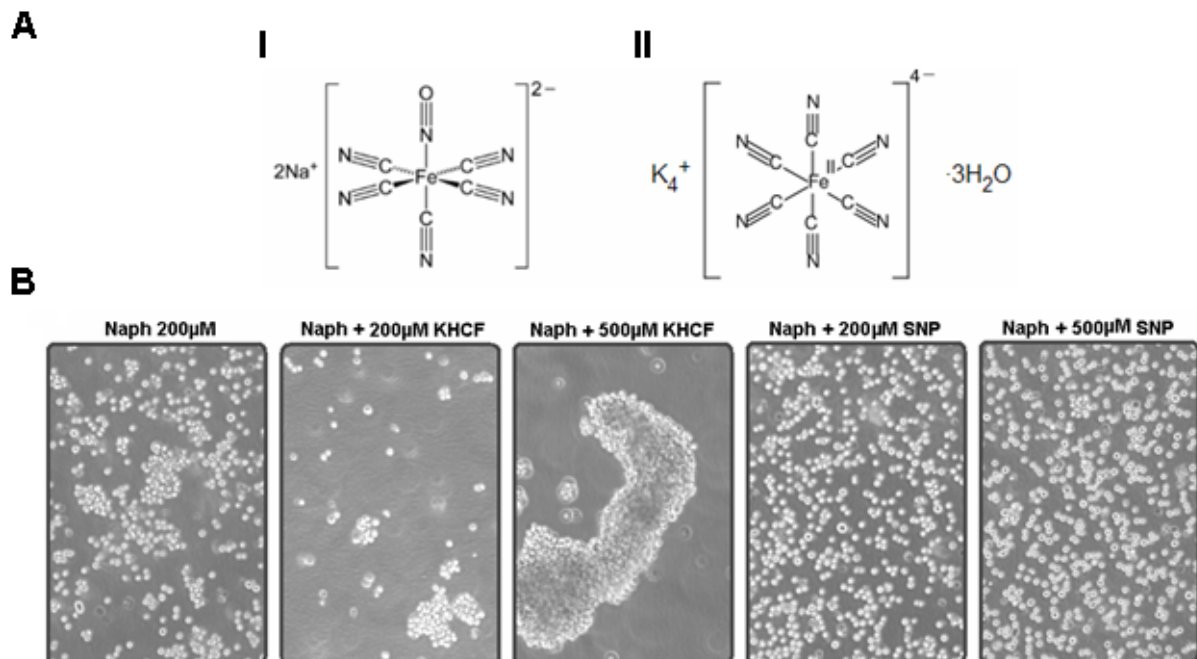


Abb.30: Das NO-freisetzende Agens SNP hebt die von Naphazolin (200 μM) induzierte Aggregation von K-562-Zellen auf. **A:** Strukturformeln der Substanzen **I:** Na-Nitroprussid und **II:** K-Hexacyanidoferrat (Quelle: Wikipedia). **B:** K-562-Zellen wurden in 10 ml-Flasks mit Naphazolin +/- SNP oder als Kontrolle mit KHCF 72h inkubiert. Originale Vergrößerung der Fotos 100x.

In einem optimalen Konzentrationsbereich von 200 - 500 μM kann der NO-Generator SNP die Aggregation der K-562-Zellen die nach Behandlung mit 200 μM Naphazolin auftritt, abgeschwächt bzw. aufgehoben werden (Abb.30). Der Effekt scheint auf die NO-freisetzende Eigenschaft des Moleküls zurückzuführen zu sein, da das nicht-NO-freisetzende, strukturähnliche Molekül Kaliumhexacyanidoferrat(II) (= gelbes Blutlaugensalz, K₂Fe(CN)₆) in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie SNP, die Aggregation nicht aufhebt, sondern sogar noch verstärkt (Abb.30).

3.2.8 Der PLC-Inhibitor U-73122 schützt die K-562-Zellen vor der toxischen Wirkung von Naphazolin

Um den (die) Signalweg(e) zu identifizieren, die im Zuge der zellulären Reaktion auf Naphazolin in den K-562-Zellen aktiviert werden, wurden spezifische Signaltransduktions-Inhibitoren parallel zu Naphazolin der Kultur zugesetzt und das Wachstum der Zellen bestimmt bzw. die Expression von GPA gemessen.

Es stellte sich dabei heraus, dass der PLC-Inhibitor U-73122 bei einer Konzentration von 5 μM die K-562-Zellen schwach, jedoch signifikant ($p < 0,05$) vor der toxischen Wirkung von Naphazolin schützt, während der PI3K-Inhibitor LY-294,002 (LY) keine Schutzwirkung zeigt (Abb.32). Die Schutzwirkung von U-73122 ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie beim Antioxidans NAC.

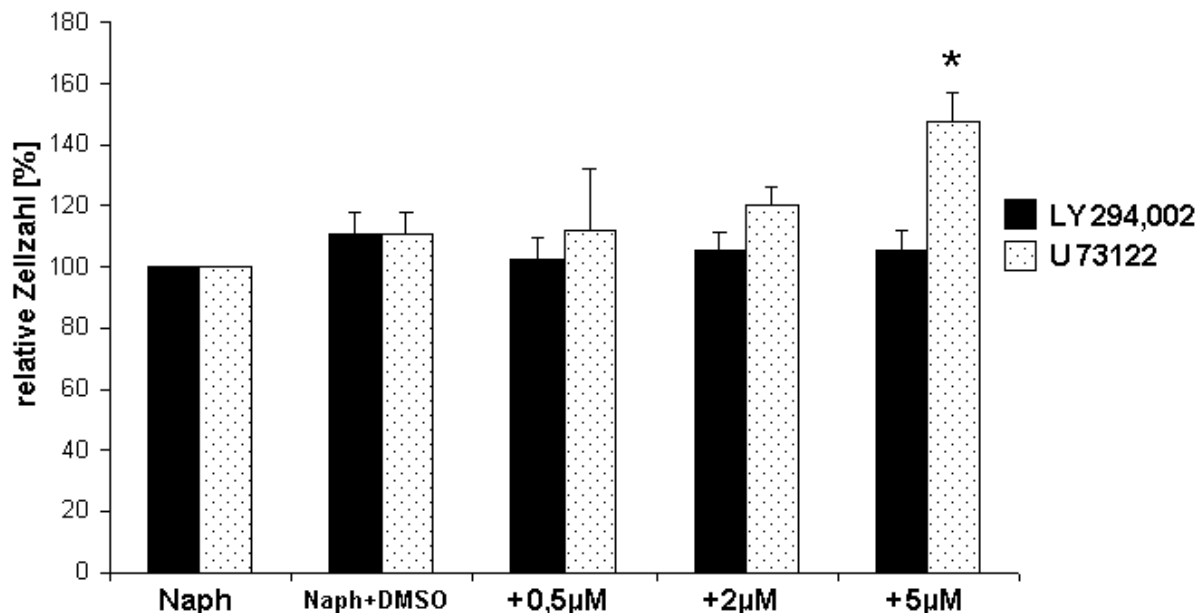


Abb.31: K-562-Zellen wurden mit Naphazolin (200 μM) in Kombination mit den synthetischen Enzym-Inhibitoren LY-294,002 (Inhibitor der PI3-Kinase) oder mit U-73122 (Inhibitor der PLC) 48h inkubiert und danach die Zellzahl bestimmt ($n = 4$). *: $p < 0,05$ versus Kontrolle (= mit 200 μM behandelte K-562-Zellen).

Höhere Konzentrationen von U-73122 wurden aufgrund des für Zellen toxischen Vektors DMSO, der selbst keine Schutzwirkung gegen Naphazolin zeigte, nicht eingesetzt. Der p38-

Inhibitor SB203580 und die beiden MEK1/2-Inhibitoren U-0126 und PD-98059 weisen ebenfalls keine protektive Wirkung gegen die Naphazolin-Behandlung auf (nicht gezeigt).

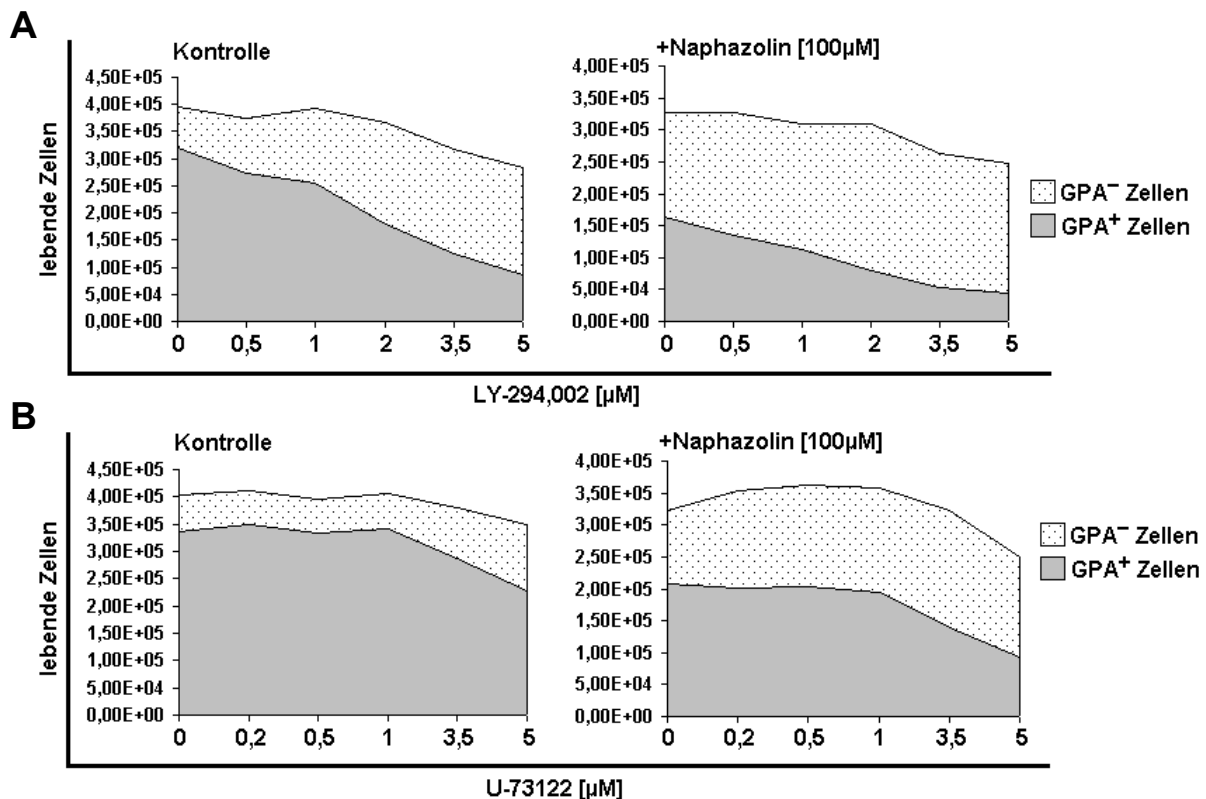


Abb.32: K-562-Zellen wurden drei Tage mit/ohne 100 µM Naphazolin in Kombination mit ansteigender Konzentration an LY-294,002 (A) oder U-73122 (B) kultiviert, der Anteil der GPA⁺ Zellen mittels FACS ermittelt und der Anteil der GPA⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet. n = 3.

Die Bestimmung der GPA-Expression der Zellen, die mit einer Kombination von 100 µM Naphazolin und dem PLC-Inhibitor, oder dem PI3K-Inhibitor behandelt wurden, zeigte, dass LY einen ähnlichen Effekt auf die K-562-Zellen aufweist wie Naphazolin.

LY steigert ebenfalls die GPA⁻ Zellen bei einer parallelen Abnahme der GPA⁺ Zellen (Abb.32A) in der K-562-Zelllinie. Bei der Kombination von Naphazolin mit dem PI3K-Inhibitor sieht man eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen (Abb.32A). Während die Zahl der GPA⁺ Zellen mit Zunahme der LY-Konzentration dosisabhängig weniger wird, steigert sich die Zahl der GPA⁻ Zellen noch bis zu einer Konzentration von 2 µM und bleibt dann konstant. Derselbe Effekt konnte auch bei dem p38-Inhibitor SB203580 beobachtet werden (nicht gezeigt). Die beiden getesteten MEK1/2-Inhibitoren veränderten mit und ohne Naphazolin die GPA-Expression nicht (nicht gezeigt).

Der PLC-Inhibitor U-73122 verändert, obwohl die Substanz den Zellen eine Schutzwirkung gegen hohe Dosen Naphazolin verleiht, die von 100 µM Naphazolin induzierte Veränderung in der GPA-Expression der Zellen ebenfalls nicht (Abb.32B).

3.2.9 Calcium schützt die K-562-Zellen vor der toxischen Wirkung von Naphazolin

Da Calciumionen allgemein eine sehr wichtige Rolle als Cofaktor von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie z.B. den Cadherinen [115] oder Fibronectinrezeptoren [116] spielen, wurde versucht, ob durch Modulation des extrazellulären Calciumspiegels im Zellkulturmedium die Naphazolin-induzierte Aggregation der K-562-Zellen beeinflusst werden kann. Die Konzentration von freiem Calcium im Zellkulturmedium wurde durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen des Calcium-spezifischen Ionenchelators BAPTA (1,2-Bis(O-Aminophenoxy)ethan- N,N,N',N'-Tetraacetat (Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, OR/USA) herabgesetzt, oder durch Zugabe des Calcium-Salzes CaCl_2 erhöht.

Das Ergebnis dieser Experimente war, dass durch den Calciumchelator der Effekt von Naphazolin, die Aggregation und die Proliferation betreffend, nicht nur verstärkt wurde, sondern der Calciumchelator alleine den Effekt von Naphazolin sogar teilweise imitierte. Die Zugabe des Chelators hemmt das Wachstum der K-562-Zellen (Abb.33) und induziert ebenfalls Aggregation (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu kann die Naphazolin-induzierte Aggregation durch Erhöhung des extrazellulären Calcium-Spiegels durch CaCl_2 dosisabhängig aufgehoben werden und auch die Cytotoxizität von Naphazolin verringert werden (Abb.33). In Kontrolleexperimenten zeigte die Zugabe derselben CaCl_2 Konzentrationen zu unbehandelten K-562-Zellen keinen Einfluss auf das Wachstum und die Viabilität der Zellen (nicht gezeigt).

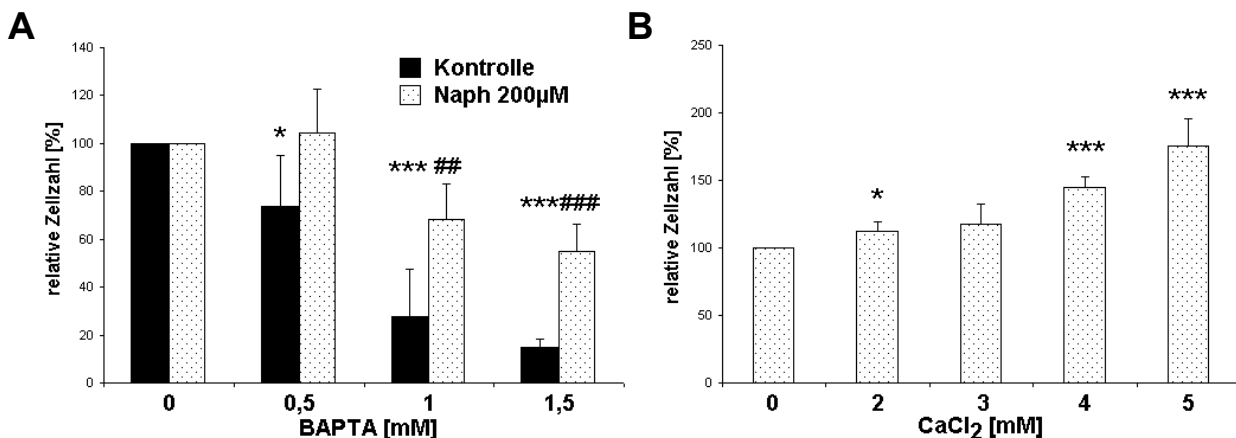


Abb.33: Durch Modulation des extrazellulären Calciumspiegels verändert sich die Reaktion der K-562-Zellen auf die Behandlung mit Naphazolin. **A:** Der Prozentsatz der lebenden K-562-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (=100%) nach 3-Tage-Behandlung mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA mit und ohne Naphazolin (200 μM). *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ versus Kontrolle, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ versus Naph 200 μM ; **B:** Durch Zugabe von CaCl_2 ins Zellkulturmedium werden die K-562-Zellen partiell vor der toxischen Wirkung von Naphazolin geschützt. K-562-Zellen wurden mit und ohne Zusatz von CaCl_2 72h mit 200 μM Naphazolin kultiviert. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ versus Kontrolle (= Naphazolin [200 μM]).

Auch der Einfluss der Modulation des Calciumspiegels auf das Verhältnis zwischen den GPA^+ und den GPA^- Zellen wurde überprüft. Es stellte sich heraus, dass weder durch Chelation des extrazellulären Calciums, noch durch weitere Zugabe von CaCl_2 ins Medium

das Verhältnis zwischen den GPA^+ und den GPA^- Zellen in den unbehandelten Zellen signifikant beeinflusst wird (nicht gezeigt). Auch die Wirkung von Naphazolin (100 μ M) auf die GPA-Expression konnte durch Erniedrigung oder Erhöhung des Calciumspiegels nur minimal beeinflusst werden (nicht gezeigt).

In chromaffinen Zellen der Nebenniere konnte eine α 1-adrenerge Aktivierung der Na-K-ATPase beobachtet werden [117]. Da die membranständige Natrium-Kalium-ATPase wichtigen Einfluss in der Calcium-Homöostase von eukaryontischen Zellen hat [118] und eine Beteiligung der Ionenpumpe an der erythroiden Differenzierung in den K-562-Zellen beobachtet werden konnte [119], wurde versucht, die Kinetik des Naphazolin-Effektes durch Ouabain, einem natürlich vorkommendem Hormon und Inhibitor der Na,K-ATPase, zu beeinflussen.

Es zeigte sich, dass sich Ouabain schon in nM-Konzentrationen toxisch auf das Wachstum auswirkt und weder die K-562-Zellen vor der inhibierenden Wirkung von Naphazolin schützen kann, noch das Verhältnis der GPA^+ zu den GPA^- Zellen beeinflusst (nicht gezeigt).

3.3 Die Behandlung von humanen Erythroleukämiezellen mit α 1-adrenergen Antagonisten führt zu Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose, sowie zu einem Switch in Richtung megakaryozytärer Differenzierung

In den UCB-Experimenten konnte gesehen werden, dass nicht nur adrenerge Agonisten das erythroide Wachstum hemmen, sondern auch die α 1-adrenerge Antagonisten Prazosin und Benoxathian. Analog zu Naphazolin und Oxymetazolin wurde deshalb auch der Einfluss von adrenergen Antagonisten auf das Wachstum der Erythroleukämiezellen überprüft, um die Wirkung der Antagonisten mit jener der Agonisten vergleichen zu können.

3.3.1 Die α 1-adrenergen Antagonisten Prazosin und Benoxathian inhibieren die Proliferation und induzieren Apoptose in humanen Erythroleukämiezellen

Die Zugabe von adrenergen Antagonisten zu den Kulturen der K-562- und HEL-Zellen führt zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation beider getesteten Zelllinien (Abb.34). Die Wirkung der einzelnen Antagonisten ist dabei unterschiedlich stark ausgeprägt. Die stärkste Wirkung zeigt der α 1-adrenerge Antagonist Prazosin. Schon bei 10 μ M beträgt die Zahl der K-562-Zellen, bestimmt durch einen CASY-Zellcounter nur rund 20% im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise sah man in den Vorversuchen, dass es bei 5 μ M-Konzentrationen des Wirkstoffes noch zu keiner Beeinflussung des Wachstums der Zellen kommt (nicht gezeigt). Gegenüber Benoxathian zeigen sich die HEL-Zellen resistenter als die K-562-Zellen. Die schwächste Wirkung der getesteten Antagonisten zeigt der α 2-adrenerge Antagonist Yohimbin. Weitaus höhere Yohimbin Konzentrationen (150 μ M) sind nötig um das Wachstum der beiden Erythroleukämie Zelllinien signifikant zu inhibieren.

Durch die Behandlung mit den α 1-adrenergen Antagonisten wird nicht nur das Wachstumsverhalten der Zellen verändert, sondern auch die Morphologie der Zellen. Prazosin-Behandlung (10 μ M) führt zu einer Größenzunahme der Zellen beider Zelllinien sowie in der HEL-Zelllinie zu leicht gesteigerter Adhärenz (Abb.34B). Charakteristisch für die HEL-Zellen nach Prazosin-Behandlung ist auch das Auftreten von scheinbar apikal den Zellen entspringenden nadelförmigen Strukturen (Abb.34BIII).

Um nachzuweisen, ob die Wachstumshemmung der Zellen mit der Induktion von Apoptose einhergeht, wurde bestimmt, ob nach 48h-Inkubation mit adrenergen Antagonisten aktivierte Caspase 3 in den Zellen vorliegt. Weiters wurden behandelte und unbehandelte Zellen auf Objektträger aufzentrifugiert mit DAPI gefärbt und auf Kernfragmentation gescreent.

Die Caspase Messungen ergaben, dass die beiden α 1-adrenergen Antagonisten Benoxathian und Prazosin in beiden Zelllinien ein hochsignifikantes, dosisabhängiges Ansteigen von Zellen mit aktivierter Caspase 3 bewirken (Abb.35), Yohimbin hingegen die Caspase 3 der Erythroleukämiezellen nur marginal aktiviert. Zwischen den Antagonisten

Benoxathian und Prazosin war ein starker Unterschied in Bezug auf die Potenz der beiden Substanzen Caspase 3 Aktivierung in den K-562- und HEL-Zellen zu induzieren, zu beobachten. Während Benoxathian eine stärkere Aktivierung der Caspase 3 in den K-562-Zellen bewirkt, so induziert Prazosin die Aktivierung der Caspase 3 stärker in den HEL-Zellen.

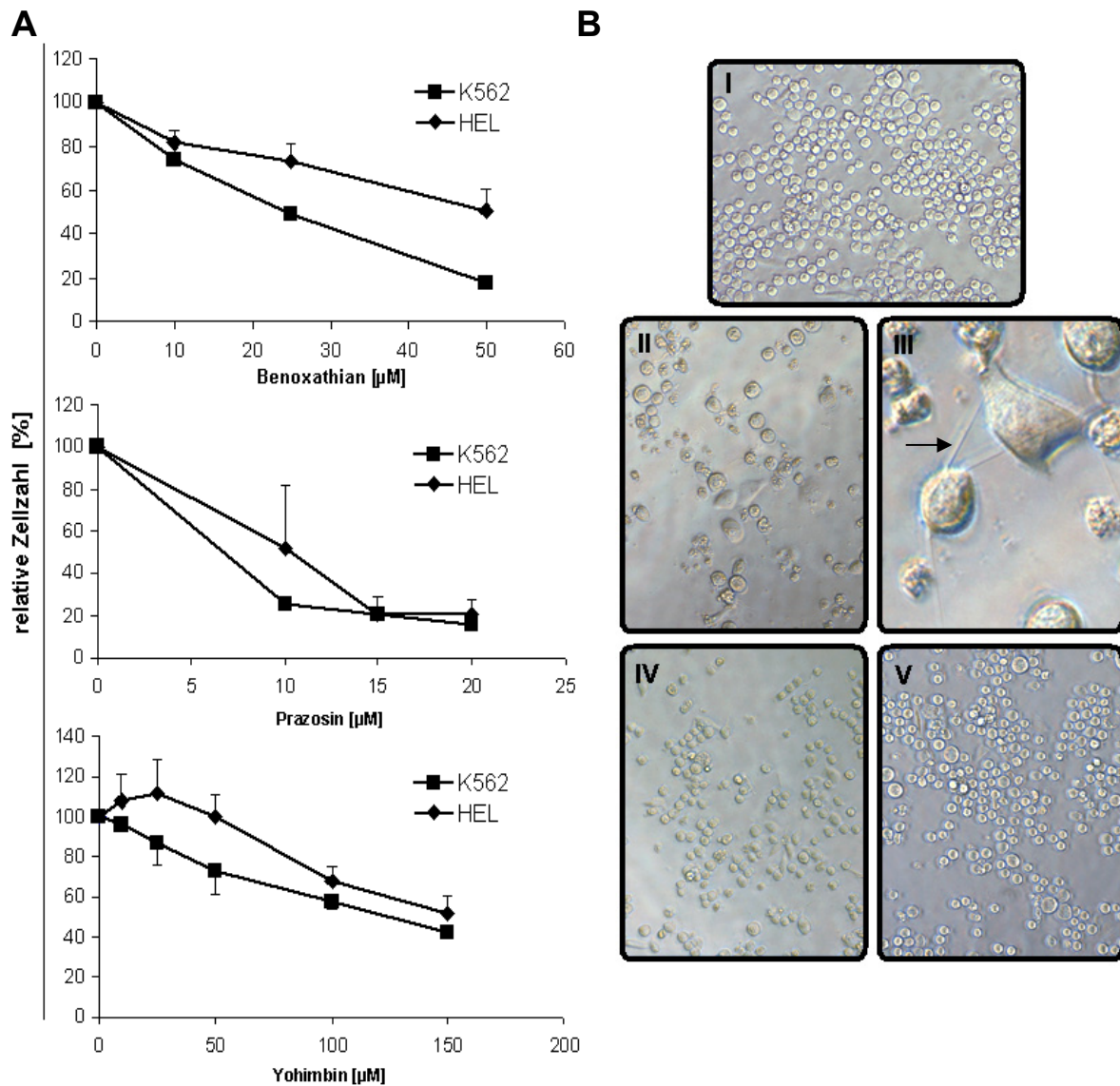


Abb.34: Adrenerge Antagonisten hemmen das Wachstum von humanen Erythroleukämiezellen. **A:** Die durchschnittliche Zahl der lebenden K-562- und HEL-Zellen nach 72h Behandlung mit den adrenergen Antagonisten Benoxathian (n = 4), Prazosin (n = 5) und Yohimbine (n = 4) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. **B:** Mikroskopische Ansicht von HEL-Zellen nach 72h-Behandlung mit 15 µM Prazosin. (II, III), 50 µM Benoxathian (IV) oder 150µM Yohimbine (V) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (I). Durch Behandlung mit Prazosin konnte bei den HEL-Zellen eine Größenzunahme der Zellen (II) sowie die Ausprägung von apikalen, nadelförmigen Strukturen beobachtet werden (III, gekennzeichnet durch den Pfeil). Originale Vergrößerung: I, II,IV,V: 200x, III: 400x.

Benoxathian verursacht in den getesteten Konzentrationen 25 µM und 50 µM eine dosisabhängige und hochsignifikante ($p < 0,001$) Aktivierung der Caspase 3 in den K-562-

Zellen. In den HEL-Zellen war ebenfalls Aktivierung der Caspase 3 nach Benoxathian Behandlung feststellbar, jedoch nicht so stark wie bei den K-562-Zellen. Auch nach Prazosin-Behandlung konnte in den K-562-Zellen eine dosisabhängige, signifikante ($p < 0,001$) Aktivierung der Caspase 3 gesehen werden. In den HEL-Zellen war die Wirkung von Prazosin auf die Aktivierung der Caspase 3 äußerst effektiv. Nach 48h-Inkubation weisen über 40% der Zellen in dem mit 20 μM Prazosin behandelten Wells aktive Caspase 3 auf. Yohimbin bewirkt in den K-562-Zellen nur in der hohen Konzentration von 150 μM eine schwache Caspase 3 Aktivierung ($p < 0,01$). Die Caspase 3 aktivierende Wirkung von Yohimbin auf die HEL-Zelllinie war zwar stärker als bei den K-562-Zellen, zeigte aber nicht dieselbe Potenz wie Benoxathian oder Prazosin.

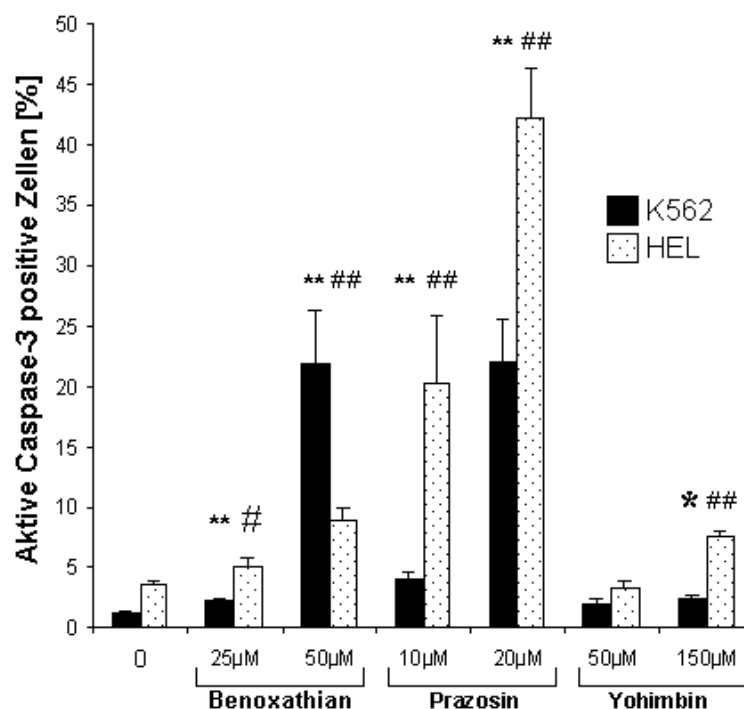


Abb.35: Caspase 3 Aktivierung nach Behandlung von humanen Erythroleukämiezellen mit adrenergen Antagonisten. K-562- und HEL-Zellen wurden 48h mit den adrenergen Antagonisten Benoxathian ($n = 4$), Prazosin ($n = 4$) und Yohimbin ($n = 3$) in verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Nach 48h wurde die Aktivierung der Caspase 3 mittels Durchflusszytometrie gemessen. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ versus Kontrolle von K-562; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus Kontrolle von HEL.

Die DAPI - Färbung von Benoxathian - und Prazosin behandelten Zellen brachte folgendes Ergebnis: Bei den K-562-Zellen (Abb.36A) sah man nach 48h-Behandlung mit 10 μM Prazosin, dass die Zellen nukleäre Komplexität aufwiesen. Prazosin löst folglich in den K-562-Zellen endomitotische Zellteilung aus. Bei 20 μM sah man keine so komplexen Kerne wie bei 10 μM mehr, jedoch nukleäre Kondensation als Zeichen von Apoptose. Bei mit 50 μM Benoxathian behandelten K-562-Zellen sah man nach 48h-Inkubation keine Induktion von Endomitose und auch kein gehäuftes Vorkommen von Zellen mit Kernfragmentation, jedoch deutlich kleinere Zellkerne im Vergleich zur Kontrolle.

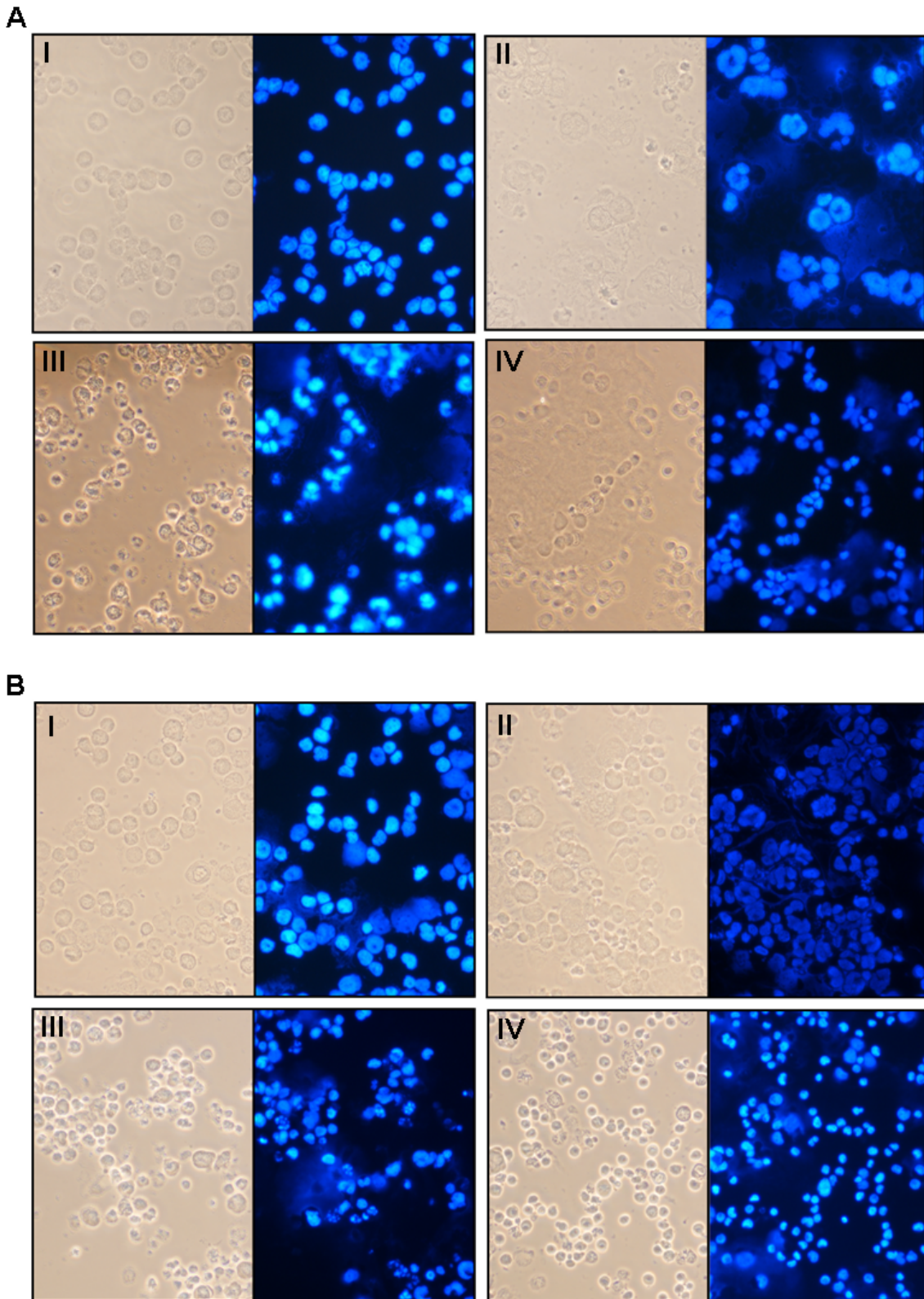


Abb.36: Induktion von nukleärer Komplexität und Kernfragmentation nach Behandlung von humanen Erythroleukämiezellen mit adrenergen Antagonisten. K-562- und HEL-Zellen wurden 48h mit den adrenergen Antagonisten Benoxathian, Prazosin in verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, auf Objektträger aufzentrifugiert, mit DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop auf Kernfragmentation gescreent. **A:** K-562-Zellen: I: Unbehandelte Kontrolle, II: Prazosin [10 μM], III: Prazosin [20 μM], IV: Benoxathian [50 μM]. **B:** HEL-Zellen: I: Unbehandelte Kontrolle, II: Prazosin [10 μM], III: Prazosin [20 μM], IV: Benoxathian [50 μM]. Auf der jeweils linken Hälfte der Abbildungen sind die Zellen im Durchlicht zu sehen; auf der rechten Seite im UV-Licht. Originale Vergrößerung aller Fotos: 600x.

Bei den HEL-Zellen (Abb.36B) war ein ähnliches Bild wie bei den K-562-Zellen zu sehen. 10 μM Prazosin induzierten in den HEL-Zellen nukleäre Komplexizität, während bei 20 μM dieses Phänomen nicht mehr so stark ausgeprägt war. Bei den HEL-Zellen waren bei Zugabe von 20 μM Prazosin Zellen mit Kernfragmentation zu sehen.

Bei Behandlung der HEL-Zellen mit 50 μM Benoxathian konnte man nukleäre Kondensation beobachten.

Yohimbin-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Morphologie der Zellkerne beider Zelllinien (nicht gezeigt).

3.3.2 Prazosin bewirkt eine Zunahme der Zellgröße, Endomitose, sowie Alterationen in der Expression von Linien-spezifischen Expressionsmarkern

Schon bei Beobachtung der Zellen in den Kulturplatten mittels inversen Mikroskops sah man, dass die Zellen unter Einfluss von Prazosin neben einer starken Wachstumshemmung auch eine Zunahme in der Zellgröße im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Der DAPI-Test zeigte nukleäre Komplexizität und Anzeichen der Induktion von Apoptose in den Zellen. Um die Zeitabhängigkeit der Induktion von Endomitose zu testen, wurden mit 10 μM Prazosin behandelte K-562-Zellen nach 24h, 48h und 72h Inkubation geerntet, auf einen Objektträger aufzentrifugiert und nach der Pappenheim-Methode gefärbt.

Man sah, dass die Induktion von Endomitose bereits nach 24h Inkubation mit Prazosin auftritt (Abb.37A). Bis 48h konnte man auch eine Größenzunahme der Zellen messen. Interessanterweise veränderten sich die Zellen zwischen 48h und 72h noch einmal dramatisch. Es kam zu keiner Veränderung der Durchschnittsgröße mehr, jedoch änderten sich die Färbeintensität, sowie die Form der Zellen. Nach 72h Inkubation der K-562-Zellen mit Prazosin weisen die Zellen nach der Pappenheim-Färbung eine intensive blaue Färbung auf und erschienen wieder annähernd rund. Eine ähnliche Tendenz wie bei den K-562-Zellen konnte in der HEL-Zelllinie beobachtet werden (nicht gezeigt). Eine statistische Auswertung der Zellen mit polylobuliertem Zellkern nach 48h ergab eine starke Dosisabhängigkeit des „Prazosin-Effektes“ (Abb.37B). Nach 48h sah man in den K-562-Zellen bei Inkubation mit 10 μM Prazosin bei rund 30% der Zellen eine Größenzunahme sowie einen polylobulierten Kern, während es bei den HEL-Zellen bei 10 μM zu keiner signifikanten Zunahme des Prozentsatzes der Zellen mit polylobuliertem Kern kam. Bei den HEL-Zellen trat der Effekt erst bei einer Konzentration von 15 μM Prazosin hochsignifikant ($p < 0,001$) auf. Bei 15 μM Prazosin zeigten nach 48h rund 54% der HEL-Zellen einen polylobulierten Kern. Benoxathian und Yohimbin veränderten den Prozentsatz der Zellen mit polylobuliertem Zellkern bei beiden Zelllinien nicht signifikant.

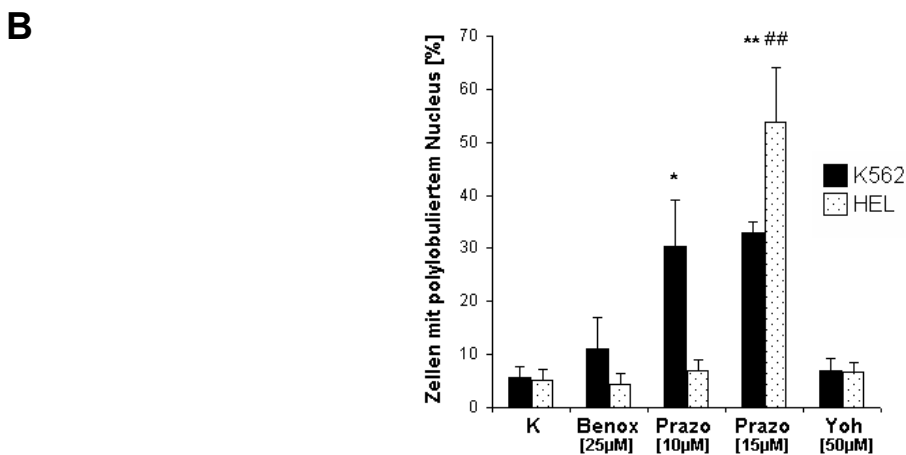
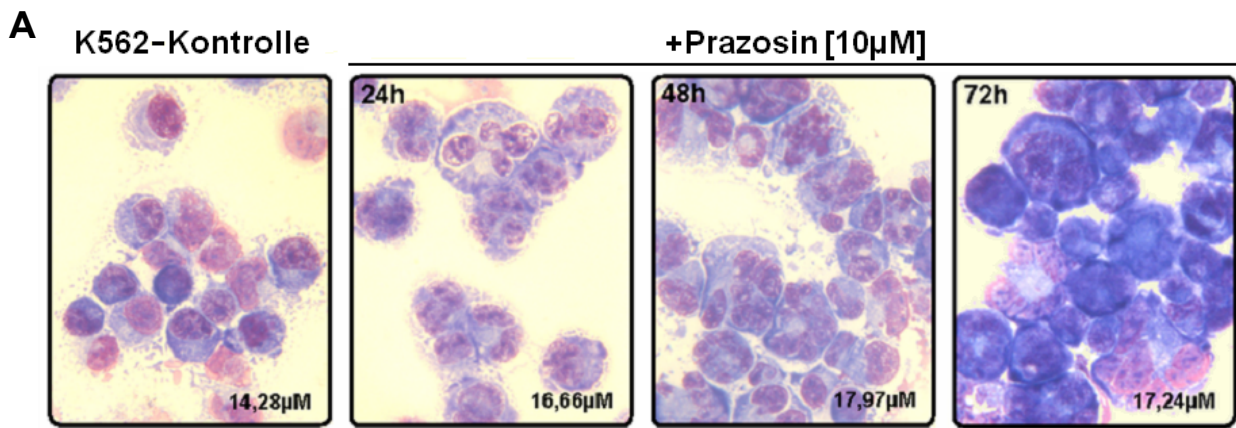


Abb.37: Die Behandlung von humanen Erythroleukämiezellen mit dem adrenergen Antagonisten Prazosin führt zur Induktion von Endomitose. **A:** Nach Pappenheim gefärbte K-562-Zellen, behandelt mit 10 μ M Prazosin zu verschiedenen Zeitpunkten. Rechts unten in der Abb. ist jeweils der durchschnittliche Durchmesser der Zellpopulation angegeben. Originale Vergrößerung: 630x. **B:** Die Grafik zeigt den Prozentsatz der Erythroleukämiezellen nach 48h-Inkubation mit den adrenergen Antagonisten Benoxathian (Benox, 25 μ M, n = 4), Prazosin (Prazo, 10 μ M: n = 4 und 15 μ M: K-562: n = 3, HEL: n = 4) und Yohimbin (Yoh, 50 μ M, n = 4). * p < 0.01, ** p < 0.001 versus Kontrolle von K-562; ## p < 0.001 versus Kontrolle von HEL, analysiert mit dem Student t Test.

K-562- und HEL-Zellen wurden nach 72h-Inkubation mit Prazosin einer Ultrastrukturanalyse unterzogen (Abb.38). Generell zeigten die analysierten Prazosin-behandelten Zellpopulationen eine sehr große Heterogenität. Einige Zellen wiesen keine großen Unterschiede zu den unbehandelten Zellen auf, während andere Zellen eine deutliche Größenzunahme und einen polylobulierten Kern aufwiesen (Abb.38). Die ELMI-Analyse konnte die Induktion von Apoptose durch Behandlung der Erythroleukämiezellen mit Prazosin bestätigen, da einige Zellen typische apoptotische Merkmale wie Kernkondensation und nukleäre Fragmentation zeigten (Abb.38B). Weiters konnte in einer Minderheit der Prazosin-behandelten Zellen ein diffuses, vakuolenförmiges Membransystem detektiert werden, das an das Demarkationslinien-System von reifen Megakaryozyten erinnert (Abb.38B, C, E). Das Demarkationsliniensystem von Megakaryozyten besteht aus membranumhüllten Kanälen die den reifen Megakaryozyten und auch schon dessen Vorstufen durchziehen. Die einzelnen Kanäle entstehen durch Invagination der

Cytoplasmamembran und determinieren den Bereich, wo sich später die Blutplättchen entwickeln [120].

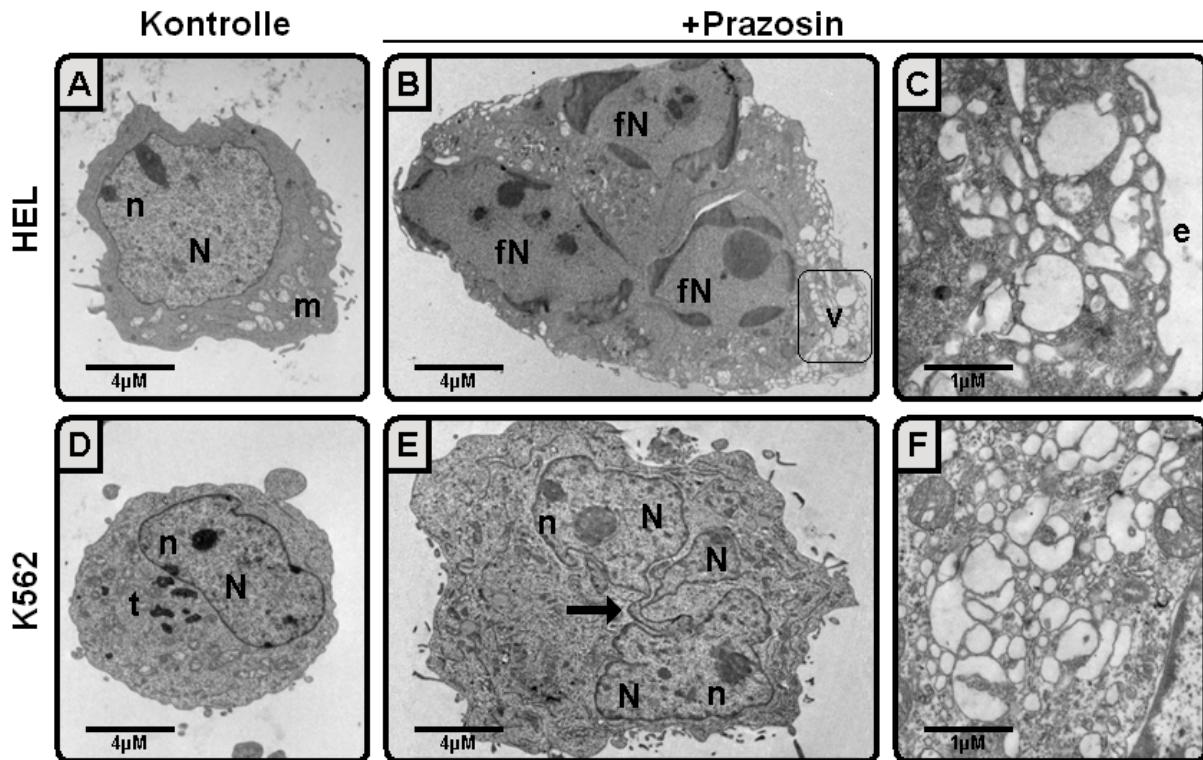


Abb.38: Ultrastrukturanalyse von Prazosin behandelten K-562- und HEL-Zellen. K-562- und HEL-Zellen wurden 72h mit Prazosin [K-562: 10 μ M, HEL: 15 μ M] inkubiert und die Zellen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert. Prazosin-Behandlung von Erythroleukämiezellen führt zu Größenzunahme der Zellen, einer sehr komplexen Zusammensetzung des Cytoplasma und dem Auftreten von polylobulierten Nuclei (**B, E**). Darüber hinaus können in den Prazosin behandelten Zellen Zeichen von apoptotischen Vorgängen wie Chromatin Kondensation und nukleärer Fragmentation beobachtet werden (**B**). In einer Minderheit der Zellen mit polylobuliertem Kern traten Vakuolen auf die an das für Megakaryozyten spezifische Demarkationsliniensystem erinnern (**B, C, F**). In Abb. C wird ein vergrößerter Ausschnitt dieses Systems der Zelle die in B gezeigt wird in stärkerer Vergrößerung dargestellt (markiert durch das Rechteck). Auch in der K-562-Zelllinie konnte ein solches Membransystem nachgewiesen werden (**F**). Das in F dargestellte Membransystem wurde in einer Zelle aufgenommen, die in dieser Abb. nicht als ganzes gezeigt wird. Der Pfeil in E verweist auf eine Kernregion, die einzelne Loben des Zellkerns einer Prazosin behandelten Zelle miteinander verbindet. **e**: extrazellulärer Raum, **fN**: fragmentierter Nucleus, **n**: Nucleoli, **N**: Nucleus, **t**: Teliosomen, **v**: Vakuolen.

α -Granula, ein weiteres typisches Kennzeichen von Megakaryozyten, konnten in der elektronenmikroskopische Analyse der Prazosin behandelten Zellen nicht entdeckt werden.

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen der Erythroleukämiezellen nach Prazosin-Behandlung (Zunahme der Zellgröße, Induktion von Endomitose, Demarkationsmembranen) sind in humanen Erythroleukämiezellen sehr gut beschrieben nach Behandlung mit verschiedenen Modulatoren der Proteinkinase-C (z.B. Phorbol ester PMA oder Staurosporin) [85-89] oder der src-Kinase [121]. PMA und Staurosporin induzieren nachgewiesenerweise die Differenzierung der Erythroleukämiezellen in Richtung megakaryozytäre Linie unter gleichzeitigem Verlust des erythroiden Markers GPA.

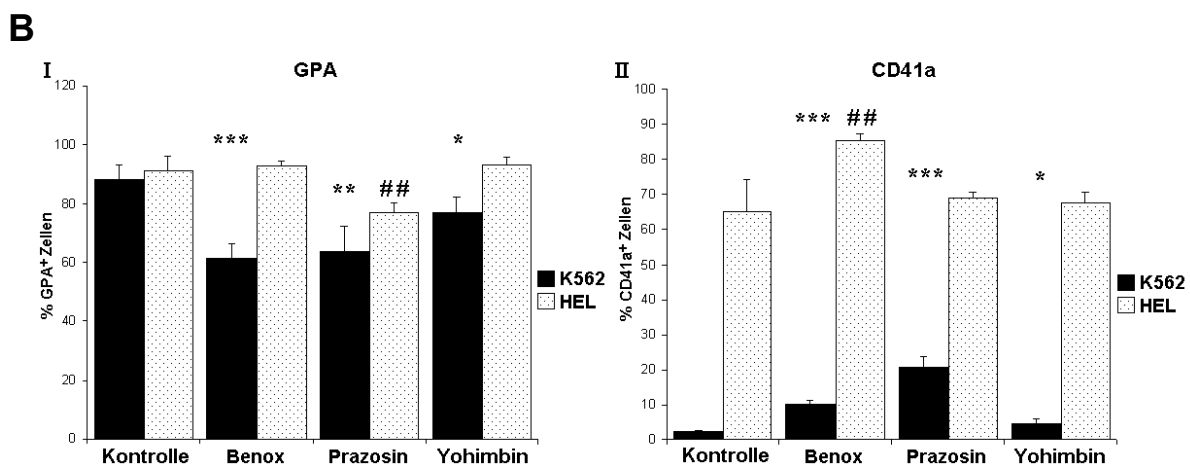
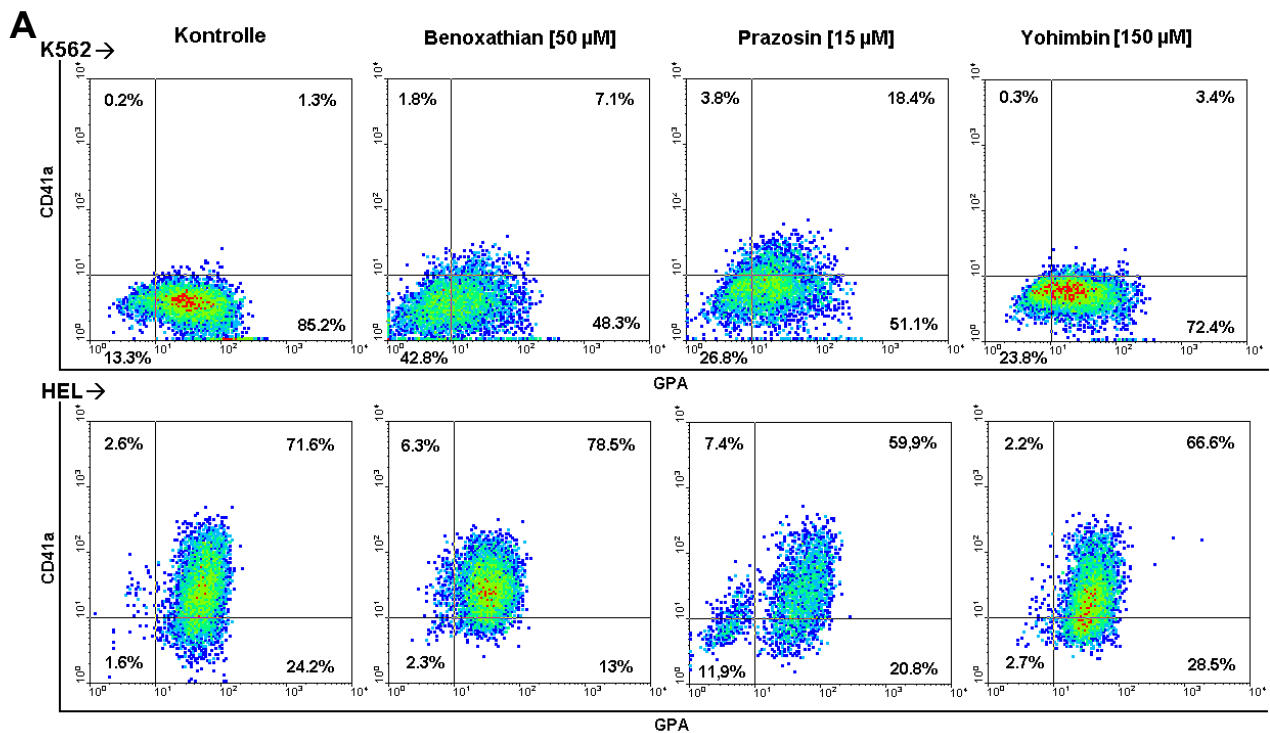


Abb.39: Die Behandlung mit α -adrenergen Antagonisten führt zu Alterationen in der Expression von Linien-spezifischen Expressionsmarkern. **A:** FACS Density-Plots von aquirierten K-562- und HEL Zellen nach Behandlung mit Benoxathian [50 μ M], Prazosin [10 μ M] und Yohimbin [150 μ M] im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis von einer Serie von insgesamt vier Experimenten. **B:** Statistische Auswertung der Expression der Marker GPA und CD41a nach Inkubation mit adrenergen Antagonisten. **I:** Es wird der Prozentsatz der GPA⁺ Zellen gezeigt. **II:** Es wird der Prozentsatz der CD41a⁺ Zellen gezeigt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus Kontrolle von K-562; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus Kontrolle von HEL, analysiert mit dem Student t Test.

Um die Megakaryozyten-Natur der Prazosin-behandelten Erythroleukämiezellen zu überprüfen, wurde CD41a, ein spezifischer Marker der megakaryozytären Reihe, mittels Durchflusscytometrie bestimmt. Die Expression dieses Proteins wurde in Kombination mit dem erythroiden Marker GPA nach Behandlung mit den adrenergen Antagonisten überprüft. Die beiden Zelllinien wurden dazu 48h mit den Antagonisten in unterschiedlichen

Konzentrationen (Benoxathian [50 μ M], Prazosin [15 μ M], Yohimbin [150 μ M]) kultiviert und mittels Durchflusszytometrie die Expression der beiden Marker parallel bestimmt.

Es erwies sich, dass in den an sich CD41a-negativen K-562-Zellen, die Expression von CD41a durch die adrenergen Antagonisten Benoxathian und Prazosin in einem geringen Prozentsatz der Zellen induziert wird (Abb.39A, B). Prazosin hatte von den getesteten Antagonisten die stärkste CD41a Expressions-induzierende Wirkung auf die K-562-Zellen, Yohimbin die schwächste. Parallel zur Induktion von CD41a wurde die Expression des erythroiden Markers GPA durch die Antagonisten inhibiert. In diesem Fall war Benoxathian potenter als Prazosin. Yohimbin zeigte nur eine schwache Wirkung im Vergleich zu den beiden α 1-adrenergen Antagonisten.

In den HEL-Zellen zeigte sich ein etwas anderes Bild als in den K-562-Zellen. In den HEL-Zellen, die sowohl CD41a, als auch GPA exprimieren, führte Prazosin, jedoch nicht Benoxathian und Yohimbin zu einer signifikanten ($p < 0,001$) prozentuellen Verringerung der GPA-exprimierenden Zellen. Im Gegensatz dazu wird der Prozentsatz der CD41a⁺ Zellen durch Benoxathian-Behandlung gesteigert, während Yohimbin und Prazosin keinen signifikanten Einfluss auf die Expression dieses Markers haben. Auffallend bei der Analyse der FACS-Auswertung war auch, dass durch Prazosin-Behandlung in den HEL-Zellen eine neue Population auftaucht die teils aus GPA⁻/CD41a⁺ und teils aus GPA⁻/CD41a⁻ Zellen zusammengesetzt ist.

Im Vergleich zu den Antagonisten sah man in den Naphazolin behandelten K-562-Zellen keine Induktion von CD41a-Expression (nicht gezeigt).

Die Bestimmung von GPA nach drei Tagen Kultur mit ansteigender Konzentration mit Benoxathian enthüllte einen interessanten Unterschied der Wirkung zwischen Naphazolin und den Antagonisten auf die GPA-Expression. Nach der Bestimmung des Prozentsatzes der GPA-exprimierenden Zellen wurde die Anzahl der GPA⁺ Zellen/Well nach Benoxathian-Behandlung analog zu den Naphazolin-Versuchen ermittelt. Man sah, dass durch Benoxathian die absolute Zahl der GPA⁺ Zellen dosisabhängig abnahm, jedoch die Zahl der GPA⁻ Zellen kaum beeinflusst wurde (Abb.40). Dies steht im Kontrast zu den Naphazolin-Versuchen wo gezeigt werden konnte, dass Naphazolin einen parallelen Anstieg von GPA⁻ Zellen und einen Abfall von GPA⁺ Zellen bewirkt (siehe Kapitel 3.2.3).

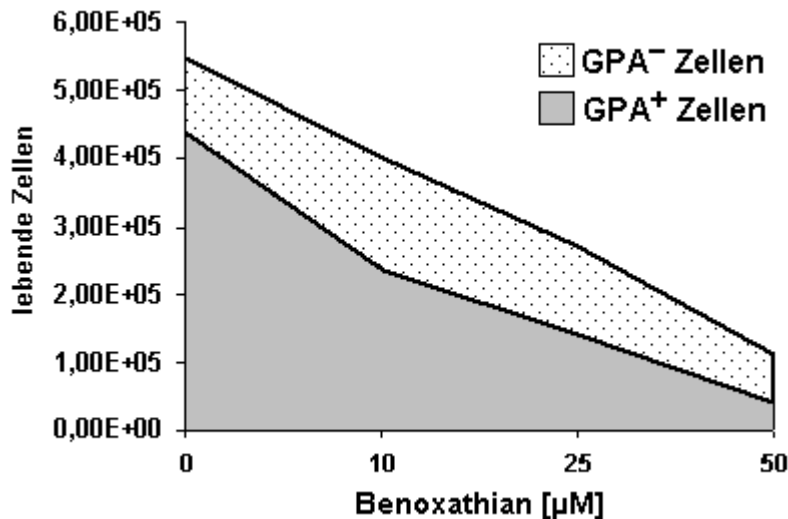


Abb.40: K-562-Zellen wurden drei Tage mit ansteigender Konzentration an Benoxathian kultiviert, der prozentuelle Anteil der GPA⁺ Zellen mittels FACS ermittelt und der Anteil der GPA⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus einer Serie von drei Experimenten.

3.4 Die Wirkungen der adrenergen Modulatoren auf die Erythroleukämie Zelllinien erfolgen in Abhängigkeit von der Aktivierung, bzw. der Blockade von α 1-adrenergen Rezeptoren.

3.4.1 Naphazolin attenuiert die von Prazosin induzierte Größenzunahme, Endomitose und Apoptose in den K-562-Zellen

Es konnte im Zuge dieser Studie geklärt werden, dass sowohl α 1-adrenerge Agonisten als auch α 1-adrenerge Antagonisten in Zellen der Erythroleukämie Zelllinien K-562 und HEL Differenzierungseffekte sowie Zelltod über prinzipiell unterschiedliche Mechanismen induzieren.

In den Nabelschnurblut-Ansätzen war es nicht gelungen, den Effekt von Naphazolin mit den spezifischen α 1-adrenergen Antagonisten Prazosin und Benoxathian zu blocken.

Mit dem Wissen um einzelne Wirkungen der Agonisten bzw. Antagonisten auf die Erythroleukämie Zellen wurden, um den Kreis zu schließen, in K-562-Kulturen Naphazolin parallel mit adrenergen Antagonisten zugesetzt.

In einem Screeningexperiment zeigte sich, dass weder Prazosin, noch Benoxathian noch Yohimbin den wachstumshemmenden Effekt von 200µM Naphazolin attenuieren können (nicht gezeigt).

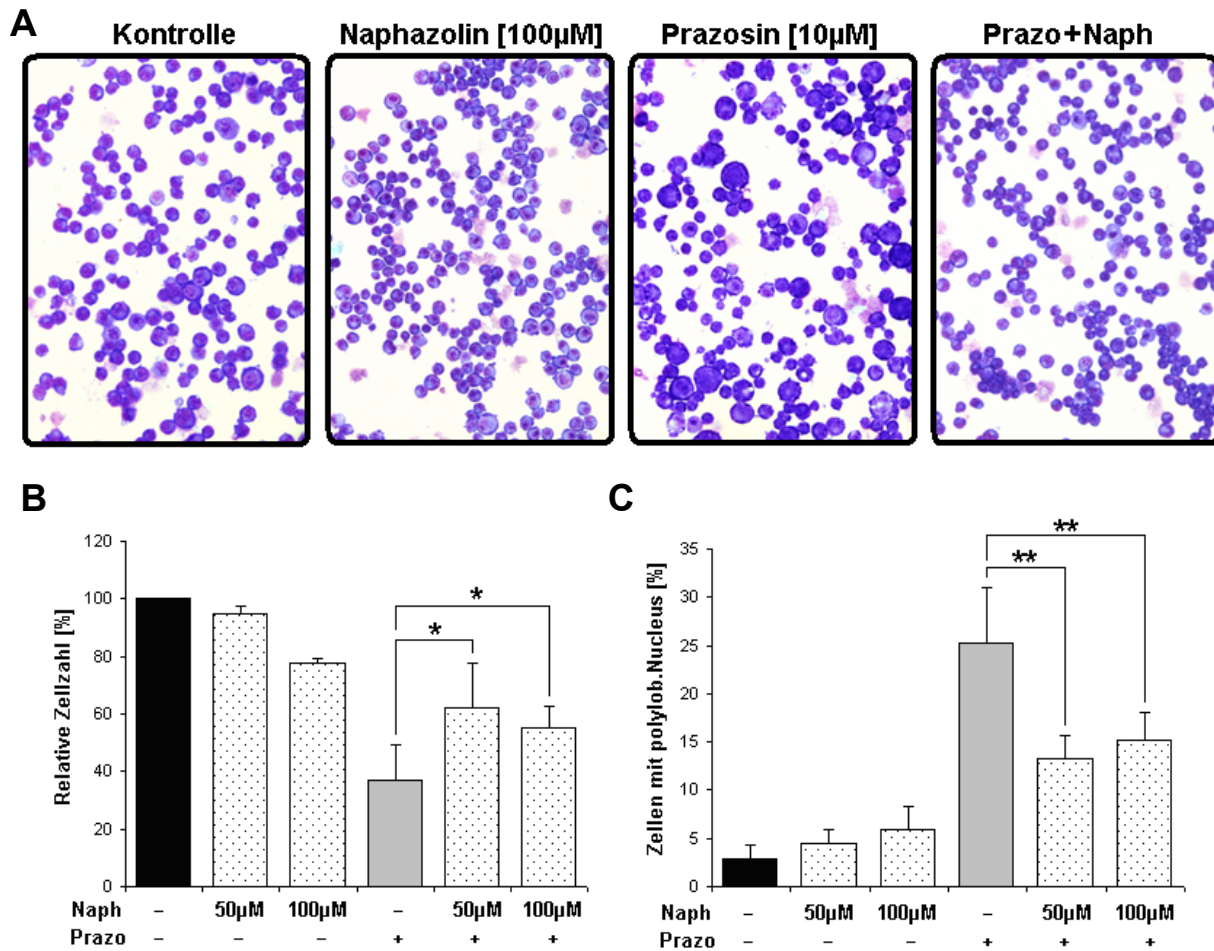


Abb.41: Naphazolin attenuiert die Prazosin bedingte Wachstumsinhibition in der K-562-Zelllinie. **A:** Nach Pappenheim gefärbte K-562-Zellen nach 72h-Kultivierung mit Naphazolin [100 µM], Prazosin [10 µM] oder mit einer Kombination aus Prazosin und Naphazolin. Originale Vergrößerung: 400x **B:** Das Wachstum der Zellen wurde nach 72h Kultur mit Naphazolin, Prazosin oder Kombinationen beider Wirkstoffe mit dem CASY Cellcounter bestimmt. Die Zellzahlen sind angegeben als der Prozentsatz der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (= 100%). Die parallele Zugabe von Naphazolin in nicht toxischen Konzentrationen führt zu einer partiellen Aufhebung der Prazosin bedingten Hemmung des Zellwachstums der K-562-Zelllinie. n = 5 **C:** In einer verblindeten Studie wurde der Prozentsatz der Zellen mit polylobuliertem Nucleus bestimmt. Die parallele Zugabe von Prazosin und Naphazolin führt zu einer Abschwächung der Prazosin bedingten Wachstumsinhibition sowie zu einem signifikantem prozentuellem Abfall der Zellen mit polylobuliertem Nucleus. n = 5. *p < 0,05, **p < 0,01 berechnet mit dem ungepaarten t Test.

Man konnte jedoch beobachten, dass in den Wells in denen K-562-Zellen parallel mit Prazosin und Naphazolin inkubiert wurden, die Prazosin bedingte Größenzunahme der Zellen nicht auftrat (nicht gezeigt). Ausgehend von diesem Ergebnis wurde ein neues Protokoll etabliert, in dem K-562-Zellen 72h in 12 Well Platten (Einsatz 1×10^4 Zellen/ml) zugleich mit 10 µM Prazosin und 50 µM oder 100 µM Naphazolin inkubiert wurden.

Es stellte sich dabei heraus, dass durch die Zugabe von 50 µM oder 100 µM Naphazolin die wachstumsinhibierende Wirkung von Prazosin auf die K-562-Zellen signifikant ($p < 0,05$) attenuiert, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden kann. Nach 72h wurde auch der Prozentsatz der Zellen bestimmt, die einen polylobulierten Kern aufwiesen. Dafür wurden die

Zellen geerntet, auf Objektträger aufzentrifugiert und nach Pappenheim gefärbt. Um die Aussagekraft dieser Evaluierung zu verstärken, wurde die Studie verblindet und die Bestimmung des prozentuellen Anteiles der Zellen mit polylobulierten Kern von einer medizinisch technischen Analytikerin durchgeführt.

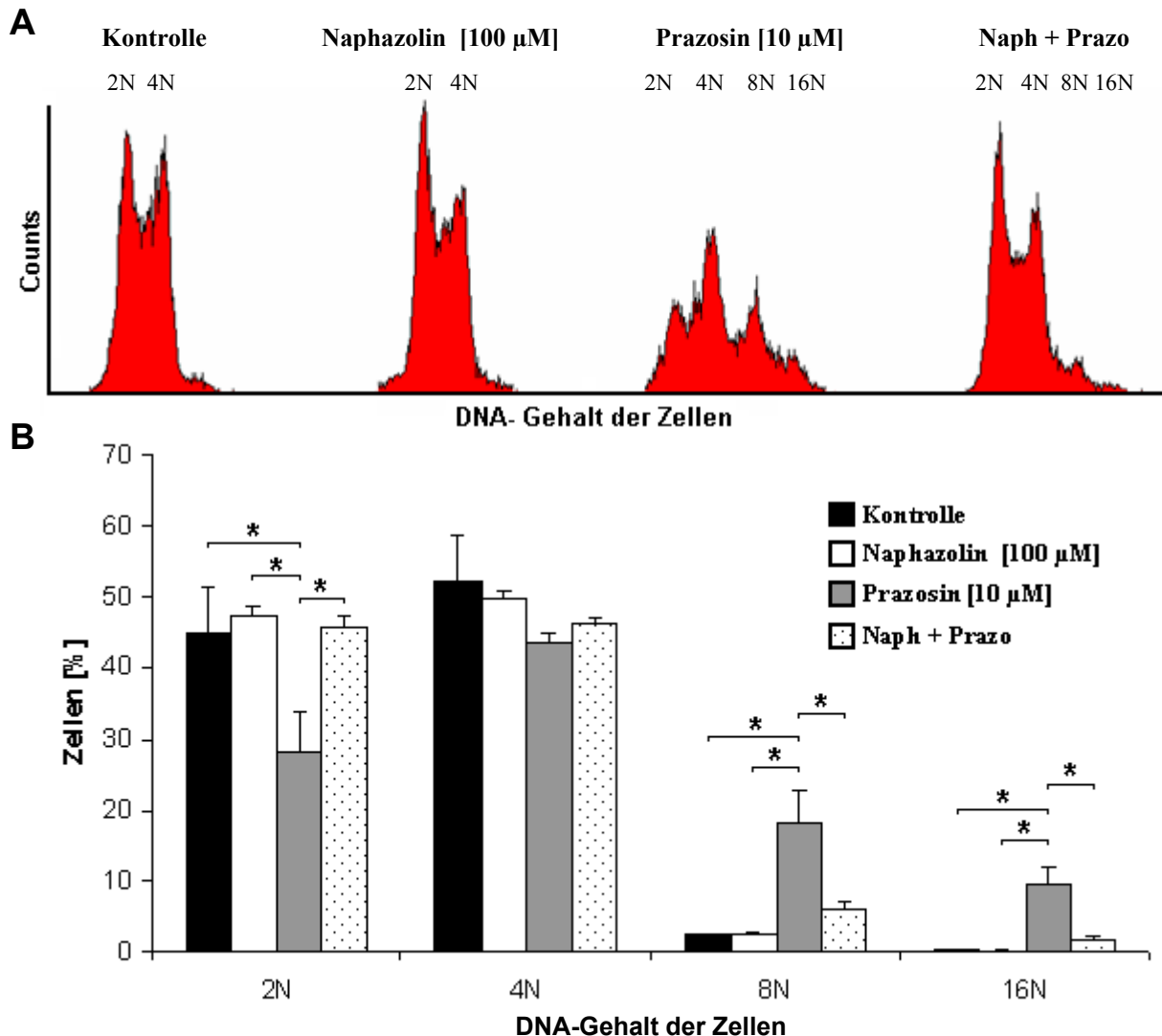


Abb.42: Polyploidiemessungen in der K-562-Zelllinie nach Behandlung mit Naphazolin [100 µM], Prazosin [10 µM] oder mit Kombinationen aus Naphazolin (Naph) und Prazosin (Prazo). **A:** Histogramme der DNA Messungen mittels Propidiumiodid. Durch die Behandlung der K-562-Zellen mit Prazosin kommt es zum Auftreten von Zellen mit einem DNA Gehalt von 8N und auch 16N. Dieser Effekt kann durch Naphazolin rückgängig gemacht werden. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von insgesamt vier Experimenten. **B:** Statistische Auswertung der Polyploidiemessungen der K-562-Zellen mit Propidiumiodid. Durch Prazosin-Behandlung kommt es in der K-562-Zelllinie nach 72h Kultur zu einem signifikanten Rückgang der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2N und parallel dazu zu einem signifikanten Anstieg von Zellen mit 8N und 16N. Die Induktion von Endomitose konnte somit bestätigt werden. Naphazolin kann den Prazosin Effekt auf den DNA-Gehalt der K-562-Zellen statistisch signifikant unterdrücken. Kontrolle, Naphazolin: n = 3 , Prazosin, Prazosin + Naphazolin: n = 4. *: p < 0,001 berechnet mittels ANOVA nach der Methode nach Holm Sidak.

Es zeigte sich, dass auch die Prazosin induzierte prozentuelle Zunahme der Zellen mit polylobuliertem Kern durch Naphazolin signifikant ($p < 0,01$) attenuiert werden kann (Abb.41). Um das Ergebnis noch abzusichern, wurde der DNA-Gehalt der K-562-Zellen nach

Behandlung mit Prazosin oder mit der Kombination Naphazolin+Prazosin bestimmt. Dabei konnte ermittelt werden, dass durch die Prazosin-Behandlung in den K-562-Zellen der DNA Gehalt der Zellen bis zu einem Grad von 16N ansteigt (Abb.42).

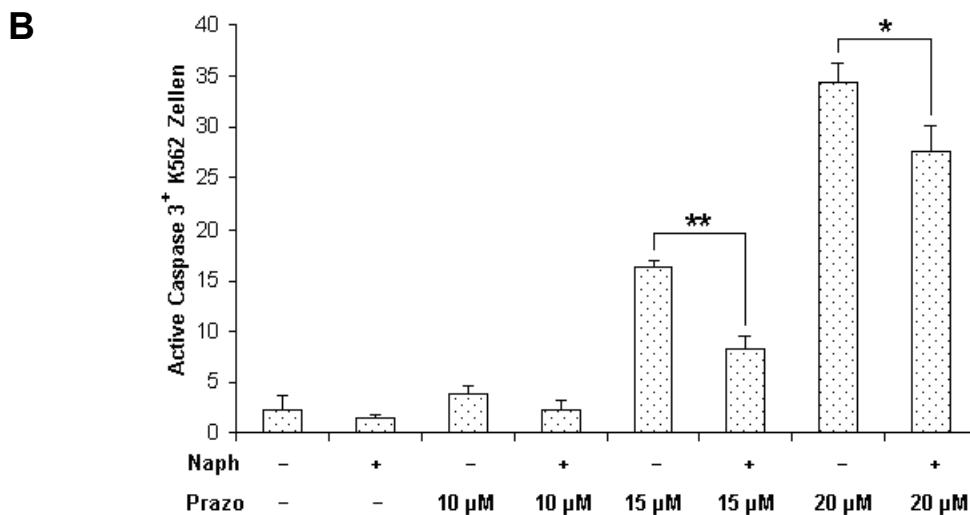
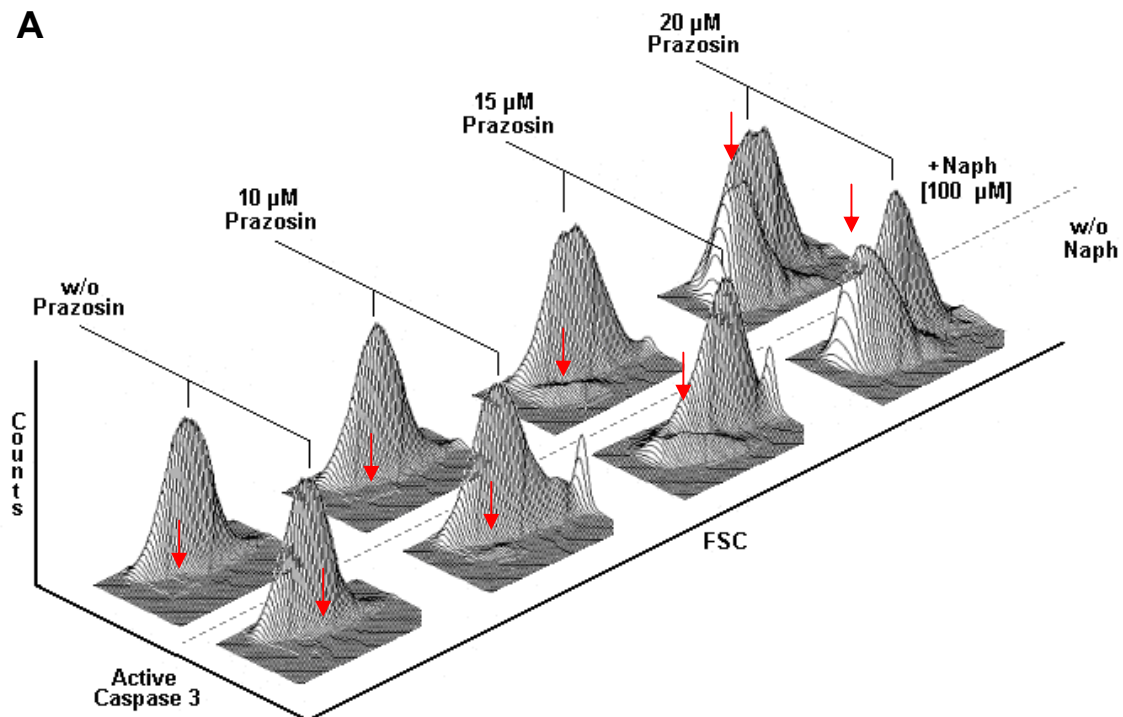


Abb.43: Naphazolin attenuiert die von Prazosin induzierte Caspase 3 Aktivierung in den K-562-Zellen. K-562-Zellen wurden 48h mit 10 µM, 15 µM oder 20 µM Prazosin alleine oder in Kombination mit 100µM Naphazolin kultiviert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und mittels Caspase 3 Kit der Prozentsatz der Zellen mit aktiver Caspase 3 bestimmt. In **A** werden 3D Histogramme, in denen die Größe (FSC) der unbehandelten bzw. Agonist/Antagonist behandelten Zellen gegen die Caspase 3-Aktivierung aufgetragen ist, gezeigt. Der Peak der von der Zellpopulation gebildet wird, in der die Caspase 3 aktiviert vorliegt, wird in der Abb. jeweils mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. In **B** wird die statistische Auswertung der Caspase 3 Daten gezeigt. n = 3, *: p < 0,05, **: p < 0,001.

Durch die parallele Zugabe von Naphazolin kann der Effekt von Prazosin auf den DNA-Gehalt der Zellen rückgängig gemacht werden. Dies beweist, dass nicht nur der prozentuelle

Anteil der Zellen mit polylobulierten Zellkern durch die Naphazolin-Behandlung zurückgeht, sondern auch der Prozess der Endomitose selbst durch Naphazolin unterdrückt wird.

Um nachzuweisen, ob Naphazolin auch die von Prazosin induzierte Apoptose supprimieren kann, wurde nach 48h wiederum die Aktivierung der Caspase 3 in den K-562-Zellen gemessen nachdem die Zellen entweder nur mit ansteigenden Konzentrationen von Prazosin oder mit Kombinationen aus Prazosin und 100 μ M Naphazolin behandelt wurden. Es stellte sich heraus, dass Naphazolin die von Prazosin induzierte Caspase Aktivierung signifikant unterdrücken kann (Abb.43). Der protektive Effekt von Naphazolin war dabei am deutlichsten ausgeprägt bei einer Prazosin- Konzentration von 15 μ M. In den Caspase Assays mit Prazosin und Naphazolin konnte man auch erkennen, dass Naphazolin auch die Prazosin bedingte Größenzunahme der K-562-Zellen aufhebt (Abb.43A).

3.4.2 Die HEL-Zelllinie exprimiert das Schlüsselenzym der Synthese von Noradrenalin, β -Dopamin Hydroxylase

Durch RT-PCR Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die HEL-Zelllinie die Dopamin- β -Hydroxylase (DbH) exprimiert, die K-562-Zelllinie jedoch nicht (Abb.45). Auch die Positivkontrollen, mRNA isoliert aus einer humanen Nebenniere und mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut [3], zeigten ein positives Signal (Abb.45). Ob die HEL-Zellen wirklich Noradrenalin *in vitro* produzieren lässt sich jedoch daraus noch nicht ableiten.

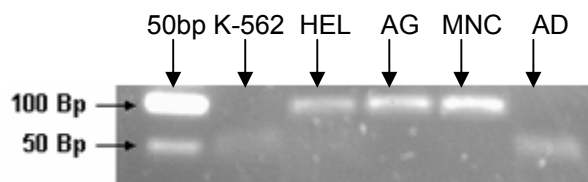


Abb.45: Ergebnis der DbH-RT-PCR. Es konnte nachgewiesen werden, dass die HEL-Zelllinie, jedoch nicht die K-562-Zelllinie das Schlüsselenzym für die Synthese von Noradrenalin, Dopamin- β -Hydroxylase, exprimieren. 50bp: 50-Basenpaar-DNA-Leiter, AG: Adrenal gland (humane Nebenniere), MNC (humane mononukleäre Zellen aus dem peripherem Blut, AD: Aqua bidest.

3.4.3 Ergebnisse des Nachweises von Katecholaminen mittels HPLC in hämatopoietischen Zelllinien

Die Katecholamin-HPLC-Messungen in den hämatopoietischen Zelllinien K-562, HEL und RAW 264.7 brachten keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die Messungen konnten weder für die RAW 264.7-Zellen, noch für die HEL- und K-562-Zellen einen reproduzierbaren positiven Nachweis von Katecholaminen erbringen.

Da in der RAW- Zelllinie bereits bekannt war, dass in diesen Zellen Katecholaminsynthese erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass die Sensitivität der verwendeten Methode nicht ausreichend war, um die Katecholamine zumindest in den RAW-Zellen, nachzuweisen.

Der Beweis für eine mögliche autokrine Beeinflussung der Erythroleukämiezellen über die Produktion von Katecholaminen konnte somit nicht erbracht werden.

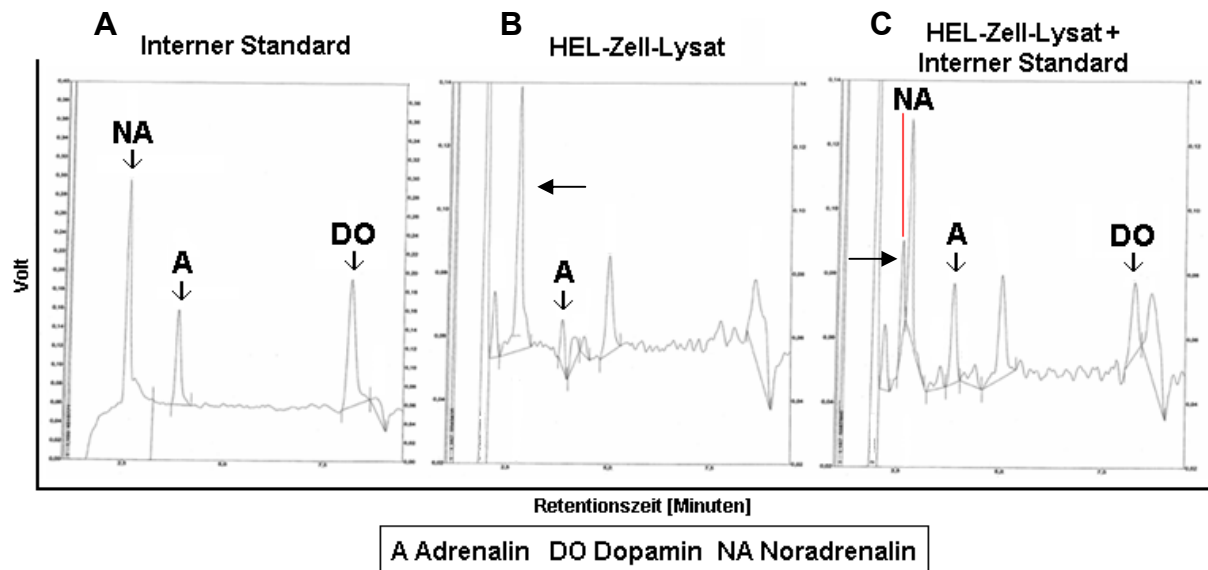


Abb.46: Nachweis von Katecholaminen in hämatopoietischen Zelllinien mittels HPLC. **A:** Chromatogramm nach chromatografischer Auftrennung der Eichlösung aus Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin. **B/C:** Chromatogramme nach chromatografischer Auftrennung eines HEL-Zelllysats ohne (**B**) und mit (**C**) internen Standard. Auftretende Peaks wurden falls möglich aufgrund der spezifischen Retentionszeit den Katecholaminen Noradrenalin (NA), Adrenalin (A) und Dopamin (DO) zugeordnet. Im Chromatogramm in B und C sieht man in dem Bereich der Retentionszeit zu der Noradrenalin erscheinen sollte jeweils einen Peak (Pfeil). Bei Zugabe des internen Standards sieht man in C jedoch eine Zweiteilung des Peaks, was darauf schließen lässt, dass es sich bei dem mit dem Pfeil markierten Peak in B nicht um einen Noradrenalin Peak handelt. Im Chromatogramm der HEL-Zellen in B sieht man zwar einen Peak, der als Adrenalin Peak identifiziert werden konnte, jedoch waren die Experimente kaum reproduzierbar, was die Aussagekraft der Experimente stark limitiert.

3.4.4 Unter serumfreien Bedingungen verstärkt sich die wachstumshemmende Wirkung der adrenergen Agonisten und Antagonisten auf die K-562-Zellen

In Kulturansätzen, in denen zum Medium statt fetalem Rinderserum ein Serumersatz aus humanem Insulin, humanem Transferrin, Selen und bovinen Albumin zugesetzt wurde, konnte zwar eine niedrigere Proliferationsrate gegenüber dem serumhaltigem Medium gesehen werden, doch war die Viabilität der Zellen kultiviert mit Serumersatz gegenüber dem serumhaltigen Medium nicht herabgesetzt (nicht gezeigt).

Bei mikroskopischer Betrachtung der serumfreien K-562- Kulturansätze fiel auf, dass einige Zellen in den serumfreien Ansätzen eine ähnliche Größenzunahme zeigten, wie bei den Prazosin behandelten Kulturen (Abb.47). Deshalb wurde der DNA-Gehalt der unter serumfreien Bedingungen kultivierten K-562-Zellen mit jenen der mit Serum kultivierten Zellen verglichen. Es zeigte sich, dass die Zellen die im Medium mit Serumersatz kultiviert wurden, im Vergleich zu den Zellen die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden.

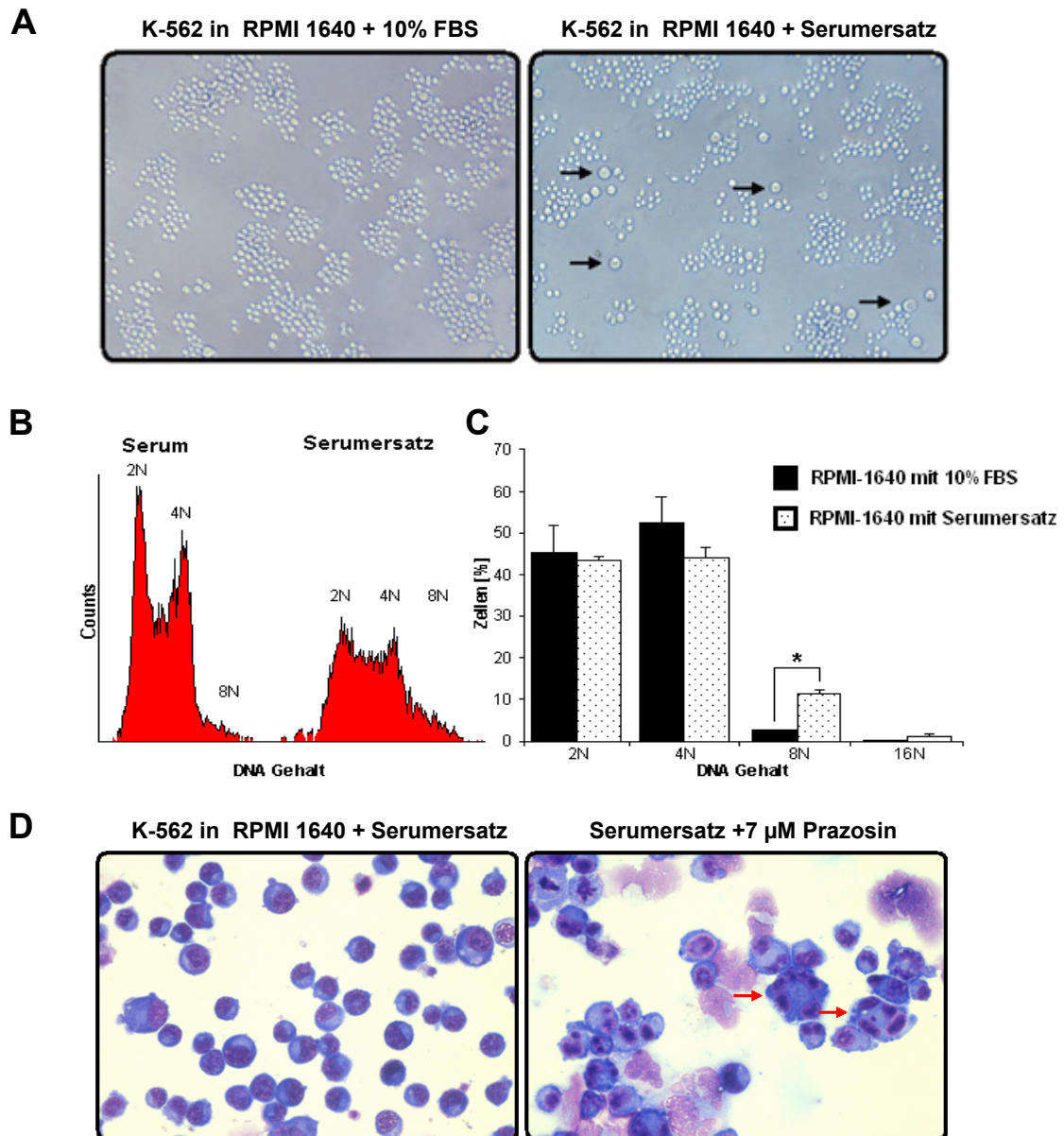


Abb.47: Polyploidiemessungen in der K-562-Zelllinie unter serumfreien Bedingungen. Um zu evaluieren, ob Inhaltsstoffe aus dem fetalem Rinderserum in den K-562-Zellen die Induktion von Endomitose inhibieren, wurden K-562-Zellen anstatt mit Serum mit einem Serumersatz kultiviert und der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid bestimmt. Es zeigte sich dabei, dass im Vergleich zur Kultivierung im serumhaltigen Medium, im Medium mit Serumersatz der Prozentsatz der K-562-Zellen mit Polyploidie (8N) signifikant zunimmt. **A:** Schon bei mikroskopischer Betrachtung der K-562-Zellen in den serumfreien Kulturen konnte man eine vermehrte Auftreten von großen Zellen beobachten (Pfeile). **B:** Zum Vergleich werden DNA-Histogramme von K-562-Zellen gezeigt, die entweder in Medium mit FBS oder in Medium mit Serumersatz kultiviert wurden. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten. **C:** Statistische Auswertung der Polyploidiemessungen unter serumfreien Bedingungen. $n = 3$. *: $p < 0,001$ berechnet nach dem ungepaarten t Test. **D:** Auch unter serumfreien Bedingungen treten bei Prazosin-Behandlung von K-562-Zellen polylobulierte Zellkerne (Pfeile) auf.

einen signifikanten Anstieg des Prozentsatzes von Zellen mit einem DNA Gehalt von 8N aufweisen (Abb.47). Ein DNA-Gehalt von 16N konnte im Vergleich zu den Prazosin behandelten Kulturen jedoch nicht beobachtet werden. Nach Färbung der Zellen nach der Pappenheimmethode war die Induktion von Polyploidie jedoch nicht so augenscheinlich wie nach Prazosin-Behandlung (Abb.47D, zum Vergleich siehe Abb.37, 41). Dass unter

serumfreien Bedingungen die Induktion von Polyploidie beobachtet werden kann, spricht dafür, dass im Serum Inhaltsstoffe enthalten sind, die die Induktion von Endomitose der K-562-Zellen supprimieren.

Die α 1-adrenergen Mediatoren Benoxathian, Prazosin und Naphazolin zeigen auch unter serumfreien Bedingungen jeweils eine starke Wachstumshemmung. Die Hemmung des Wachstums war dabei bei allen drei Substanzen stärker als in den serumhaltigen Kulturansätzen (nicht gezeigt). Bei einer dreitägigen Kultur der K-562-Zellen mit 10 μ M Prazosin konnte man die beschriebene Größenzunahme der K-562-Zellen nach Inkubation mit Prazosin nicht beobachten, stattdessen war die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle stark herabgesetzt (nicht gezeigt). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der serumhaltigen Kulturansätze in denen hohe ($\geq 20 \mu$ M) Prazosin Konzentrationen eingesetzt wurden. Durch Herabsetzen der Prazosin Konzentration auf 7 μ M im serumfreien Medium konnte man partiell die Induktion von Polyploidie beobachten (Abb.47D). Jedoch war der Effekt von Prazosin weniger deutlich ausgeprägt als im serumhaltigen Medium bei Zugabe von 10 μ M Prazosin.

4 Diskussion

4.1 α 1-adrenerge Agonisten hemmen das *in vitro* Wachstum von erythroiden Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut

In den CFU-Assays zeigte sich, dass die beiden α 1-adrenergen Agonisten Naphazolin und Oxymetazolin das *in vitro* Wachstum von hämatopoietischen Progenitoren aus dem humanem Nabelschnurblut gemessen an der Bildung von Kolonien und der Gesamtzellzahl pro CFU-Dish inhibieren. Der α 2-adrenerge Agonist Clonidin hemmt das Wachstum der Progenitoren hingegen nur schwach. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass der Effekt primär über α 1-adrenerge Rezeptoren und nicht über α 2-adrenerge Rezeptoren vermittelt wird. Über welche(n) α 1-Rezeptor-Subtyp(en) lässt sich aus den bisher durchgeführten Experimenten nicht ableiten. Eine molekularbiologische Untersuchung der Expression der Rezeptorsubtypen auf den erythroiden Progenitoren wäre dazu nötig. Der Effekt von Naphazolin und Oxymetazolin ist bei 10 μ M-Konzentrationen nur schwach, bei 100 μ M jedoch hoch signifikant ausgeprägt. Die hohen benötigten Konzentrationen der Agonisten sprechen gegen einen rezeptorspezifischen Effekt der Substanzen, die Selektivität der beobachteten Effekte auf das erythroide Wachstum jedoch für eine Rezeptorabhängigkeit. Zu den hohen eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen ist anzumerken, dass bei Verwendung von nicht-physiologischen Rezeptor-Agonisten nicht nur die Konzentration des Effektors, sondern auch die Affinität der synthetischen Agonisten zum Rezeptor im Vergleich zum physiologischen Agonisten eine Rolle spielt. Es wurde nachgewiesen, dass die synthetischen adrenergen Agonisten Naphazolin und Oxymetazolin zwar eine recht hohe Spezifität für die Bindung von α 1-adrenergen Rezeptoren aufweisen, im Vergleich zum physiologischen Agonisten Noradrenalin jedoch nur eine sehr niedrige Affinität zu α 1-adrenergen Rezeptoren zeigen [122, 123]. Höhere Konzentrationen der synthetischen Agonisten sind daher vonnöten, um denselben Effekt wie der physiologische Agonist zu erzielen.

Die Auszählung und die Bestimmung der einzelnen Kolonien in den CFU-Assays ergab eine starke Präferenz der inhibierenden Wirkung von Oxymetazolin und Naphazolin auf das erythroide Kolonienwachstum. Schon bei makroskopischer Evaluierung der Naphazolin- und Oxymetazolin behandelten CFU-Dishes konnte man erkennen, dass durch den Zusatz der beiden Substanzen weniger rote Spots, die durch erythroide Kolonien gebildet werden, zu sehen waren. Da Oxymetazolin eine signifikant höhere Potenz aufweist, das erythroide Kolonienwachstum total zu supprimieren, kann man davon ausgehen, dass Oxymetazolin auf erythroide Progenitorzellen eine stärkere wachstumssupprimierende und/oder Zelltod induzierende Wirkung aufweist als Naphazolin. Die FACS-Analyse in der eine Dreifachfärbung gegen CD34, CD45 und GPA durchgeführt wurde, zeigte, dass es sowohl

zu einer leichten prozentuellen und gemessen an der Gesamtzellzahl/Dish zu einer starken Inhibition der GPA-exprimierenden Zellen durch die Behandlung mit Naphazolin und Oxymetazolin kommt. Dies bestätigt, dass das erythroide Wachstum durch adrenerge Agonisten gehemmt wird. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Behandlung mit den adrenergen Agonisten zu einer Anreicherung von Zellen die den Panleukozytenmarker CD45 exprimieren. CD45 wird auf Leukozyten exprimiert, während Zellen der erythroiden Reihe CD45⁻ sind. Der Marker ist daher gut geeignet, um die erythroiden Zellen von den myeloischen Zellen im CFU-Dish zu diskriminieren. Umgerechnet auf die Gesamtzellzahl/Dish der beiden CD45⁺ Populationen sah man keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und den Agonisten-behandelten Ansätzen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Anreicherung der Leukozytenpopulationen aus der Hemmung der erythroiden Population resultiert und es zu keiner parallelen Stimulation des myeloischen Wachstums durch Agonisten-Behandlung kommt. Der Phänotyp der beiden CD45⁺ Populationen wurde nicht weiter bestimmt, jedoch dürfte es sich um Granulozyten- und Monozyten-Vorstufen handeln, die von CFU-GEMM, CFU-GM oder noch weiter ausdifferenzierten Progenitoren generiert wurden. Die Begutachtung von aufzentrifugierten Zellen aus Naphazolin-behandelten Ansätzen zeigte eine Anreicherung von Makrophagen, was diesen Schluss bestätigt.

Ein geringer Prozentsatz der CD45⁺ Zellen exprimierte auch den Stammzellmarker CD34, ein Indikator dafür, dass auch nach 14-tägiger Kultur Zellen mit Progenitoreigenschaften in den CFU-Dishes vorkommen.

In CFU-Assays, in denen ein Stammzell-Medium verwendet wurde, in dem kein EPO zugesetzt war, konnte man sehen, dass die Gesamtzellzahl pro Dish durch die Naphazolin-Behandlung auch dann signifikant niedriger als bei der Kontrolle war, wenn kein EPO ins Medium zugesetzt wurde. Dies weist darauf hin, dass auch das EPO-unabhängige Kolonienwachstum (primär CFU-GM) durch Naphazolin inhibiert wird, jedoch der (Naphazolin-)Effekt auf das erythroide Wachstum, aufgrund der höheren proliferativen Kapazität der erythroiden Progenitoren im Vergleich zu den myeloischen Progenitoren viel offensichtlicher wird als beim myeloischen Kolonienwachstum. Durch die signifikante Anreicherung der beiden CD45⁺-Fraktionen in den Ansätzen im Standardmedium (mit EPO) lässt sich jedoch sagen, dass präferentiell das erythroide Wachstum gehemmt wird. Bei einer gleichmäßigen Inhibition beider, der erythroiden- und der myeloischen Fraktion, wäre es nämlich zu keiner Anreicherung der beiden CD45⁺ Populationen gekommen.

Dass auch das myeloische Kolonienwachstum durch adrenerge Agonisten gehemmt wird, steht im Einklang zu einer parallelen Studie im murinen System der Gruppe Schauenstein. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Oxymetazolin das *in vitro* Wachstum (gemessen an der Bildung von CFU-GM-Kolonien) von hämatopoietischen Progenitoren,

isoliert aus dem Knochenmark, hemmt [52]. Da in dieser Studie jedoch kein EPO zum Stammzellmedium zugesetzt wurde, kann kein Vergleich zwischen der murinen und der aktuellen humanen Studie auf das erythroide Wachstum gezogen werden. Auch Maestroni et al. beschreiben eine Inhibition des myeloischen Kolonienwachstum durch adrenerge Agonisten [24]. Ebenfalls in einer *in vitro* Studie im murinen Modellsystem konnten Maestroni et al. eine Hemmung des CFU-GM-Wachstums sowohl durch den natürlichen Agonisten Noradrenalin als auch mit dem synthetischen, spezifischen α 1-adrenergen Agonisten Methoxamin feststellen. Das erythroide Wachstum wurde auch in dieser Studie nicht berücksichtigt. Über eine Modulation des erythroiden Kolonienwachstums über einen α 1-adrenergen Mechanismus existieren bis dato noch keinerlei Daten. Aus der Frühzeit der Stammzellforschung (70er-Jahre des 20. Jahrhunderts) stammen zwar Daten über eine potentielle β 2-adrenerge Stimulation des erythroiden Wachstums [25-29], doch Erkenntnisse über einen α 1-adrenergen Mechanismus fehlen bis dato. Die neuesten Studien rund um eine adrenerge Modulation der Erythropoiese durch Fonseca et al. [30, 31] focusieren sich auf einen stimulatorischen β -adrenergen Effekt auf das *in vitro* Wachstum von erythroiden Progenitoren, wobei die beschriebenen wachstumsmodulierenden Eigenschaften von Noradrenalin indirekt über Stromazellen vermittelt werden und nicht über adrenerge Rezeptoren auf den Zellen selbst.

Der Versuch in den CFU-Assays den Effekt der α 1-adrenergen Agonisten durch spezifische Antagonisten zu blocken, blieb erfolglos. Prazosin inhibierte das Kolonienwachstum in den CFU-Assays über einen sehr breiten Konzentrationsbereich vollständig. Interessanterweise hatte der α 1-adrenerge Antagonist Benoxathian eine ähnliche Wirkung wie Naphazolin auf das Kolonienwachstum der Progenitoren aus dem Nabelschnurblut. Auch bei Zugabe des Antagonisten wurde präferentiell das erythroide Wachstum in den CFU-Dishes inhibiert. Die Kombination von Naphazolin mit Benoxathian verstärkte den Effekt sogar synergistisch. Dass die adrenergen Antagonisten die inhibierende Wirkung von Naphazolin nicht attenuieren konnten, spricht gegen eine Rezeptorabhängigkeit des Naphazolin-Effektes. Allerdings spielen in den Experimenten in denen die Agonisten mit den Antagonisten kombiniert wurden, mehrere, nicht determinierbare Faktoren eine Rolle, die den Ausgang der Experimente möglicherweise beeinflusst haben. Einerseits spielt sicher die Rezeptoraffinität der Agonisten und Antagonisten und die benötigten Konzentrationen der einzelnen Substanzen um einen messbaren Effekt zu erzielen eine Rolle und andererseits auch die Heterogenität des biologischen Materials in Bezug auf den Gehalt der Progenitorzellen in der eingesetzten MNC-Population und der unterschiedlichen proliferativen Kapazität der Progenitoren. Auch das generell sehr langsame Wachstum der Progenitoren und die dadurch sehr lange Kulturdauer sind sehr ungünstig für Agonisten/Antagonisten-Experimente. Mögliche unspezifische Effekte auf das Zellwachstum durch die adrenergen

Agonisten als auch der Antagonisten können ebenso nicht ganz ausgeschlossen werden. So weiß man zum Beispiel, dass Prazosin über einen nicht Rezeptor-abhängigen Prozess Apoptose in humanen Prostatakrebszellen induzieren kann [124]. Die Hypothese, dass es sich beim Naphazolin-Effekt auf das erythroide Wachstum um einen rezeptormedierten Effekt handelt, wurde jedoch durch die Tatsache untermauert, dass Benoxathian, ein ausgewiesener spezifischer α 1-adrenerger Antagonist, das erythroide Wachstum wie Naphazolin hemmt.

Dieser Befund würde dafür sprechen, dass die erythroide Progenitorzelle von einem α 1-adrenergen Stimulus abhängig ist, um *in vitro* Kolonien zu bilden, eine Überstimulation der Zelle durch den Zusatz des Agonisten zur Kultur, das Wachstum der Kolonien jedoch inhibiert.

Als Quelle für Katecholamine in den CFU-Assays würde das enthaltene fetale Rinderserum im Medium und/oder die Produktion von Katecholaminen durch die Zellen im CFU-Assay selbst (z.B. durch Makrophagen) [42-44] in Frage kommen. Eine generelle Abhängigkeit der *in vitro* Generierung von erythroiden Zellen von Katecholaminen im Medium kann jedoch ausgeschlossen werden, da mehrere etablierte Modelle zur *in vitro* Kultur von erythroiden Zellen ohne den Zusatz von Serum oder Katecholaminen auskommen [125-127].

4.2 α 1-adrenerge Agonisten hemmen das *in vitro* Wachstum, induzieren Autophagocytose und supprimieren die Expression des erythroiden Markers Glycophorin-a in humanen Erythroleukämiezellen

In den CFU-Assays mit den Progenitoren aus dem Nabelschnurblut hat sich gezeigt, dass Naphazolin und Oxymetazolin primär das erythroide Wachstum hemmen. Um herauszufinden über welche Mechanismen und welche Signaltransduktionswege die α 1-adrenergen Agonisten das Wachstum erythroider Progenitoren modulieren, musste ein Modellsystem etabliert werden, da bis dato kein geeignetes Protokoll zur selektiven Isolation von erythroiden Progenitoren existiert. Durch eine Kombination von speziellen Wachstumsfaktoren, wobei meist EPO und SCF in den Kombinationen enthalten sind, ist eine Anreicherung von erythroiden Progenitoren zwar prinzipiell möglich, doch ist diese Kultivierung wie die CFU-Assays sehr zeit- und kostenintensiv. Als Alternative wurde deshalb ein Leukämiezell-Modell etabliert, in dem erste Erkenntnisse über mögliche Wirkungsmechanismen der adrenergen Modulatoren auf erythroide Zellen gesammelt werden sollten. Die beiden Erythroleukämie Zelllinien K-562 und HEL weisen beide erythroide Eigenschaften auf und sind daher als Modellsystem als Ersatz für erythroide Progenitoren geeignet. Von Vorteil für diese Studie war und ist, dass K-562 und HEL sehr häufig verwendete Zelllinien sind und daher bereits recht gut charakterisiert sind.

Längerfristig gesehen soll in weiterführenden Studien versucht werden, die Erkenntnisse die im Erythroleukämiezell-Modell gesammelt wurden, an physiologischen Progenitorzellen zu verifizieren.

Als erster Schritt wurde überprüft, ob der Zusatz der adrenergen Agonisten ins Zellkulturmedium auch das Wachstum der Erythroleukämiezellen beeinflussen kann. Es stellte sich heraus, dass sowohl Naphazolin als auch Oxymetazolin, nicht jedoch Clonidin, das Wachstum der K-562-Zelllinie dosisabhängig in einer dreitägigen Kultur hemmen. Jedoch sind höhere Konzentrationen der Wirkstoffe nötig als in den Nabelschnurblut-CFU-Assays um das Wachstum der K-562-Zellen zu beeinflussen. Allerdings wurden die K-562-Zellen im Gegensatz zu den UCB-Progenitoren auch nur drei Tage kultiviert. In höheren Konzentrationen sank durch Naphazolin und Oxymetazolin dosisabhängig die Viabilität der Zellen, was nicht nur auf eine reine Wachstumshemmung, sondern auch auf die Induktion von Zelltod durch die adrenergen Agonisten hinweist.

Im Gegensatz zu den K-562-Zellen zeigte sich die HEL-Zelllinie insensitiv gegen die Behandlung mit Naphazolin. Während jedoch in der K-562-Zelllinie kein großer Unterschied in der Wirkung von Naphazolin und Oxymetazolin zu beobachten war, zeigten sich die HEL-Zellen zwar insensitiv gegen Naphazolin, doch reagierten sie auf die Behandlung mit Oxymetazolin mit starker Wachstumshemmung. Auch in den CFU-Assays wurde eine stärkere inhibierende Wirkung von Oxymetazolin im Vergleich zu Naphazolin beobachtet. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die Rezeptorspezifität der beiden Substanzen bieten. Aus dem Lehrbuch *Pharmakologie und Toxikologie* von Forth et al. [128] geht hervor, dass sowohl Naphazolin als auch Oxymetazolin auch an α_2 -adrenerge Rezeptoren binden können, wobei Oxymetazolin jedoch eine höhere Affinität zu α_2 -adrenergen Rezeptoren aufweist als Naphazolin. Clonidin als selektiver α_2 -Agonist hingegen beeinflusste das Wachstum der HEL-Zellen nicht, was eine alleinige α_2 -vermittelte Beeinflussung des Wachstums der HEL-Zellen ausschließt. Unspezifische Wechselwirkungen der Agonisten mit den Zellen können jedoch ebenso nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Dass die HEL-Zellen kaum auf die Behandlung mit Naphazolin ansprechen, die K-562-Zellen jedoch stark im Wachstum inhibiert werden und zugleich Zelltod induziert wird, spricht für eine Rezeptorabhängigkeit des Naphazolin-Effektes und gegen einen unspezifischen toxischen Effekt der Substanz.

Naphazolin inhibiert nicht nur das Wachstum der K-562-Zellen, sondern änderte auch das Wachstumsverhalten der Zellen. In höheren Konzentrationen induzieren Naphazolin und Oxymetazolin, nicht jedoch Clonidin, die Bildung von traubenförmigen Zellaggregaten, was für eine mögliche Regulation von Adhäsionsfaktoren spricht. In den HEL-Zellen konnte nach Behandlung mit den adrenergen Agonisten keine Bildung von Aggregaten beobachtet werden.

Eine ähnliche Induktion von Aggregatbildung wie durch Naphazolin-Behandlung wurde nach Inkubation von K-562-Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA beobachtet [129]. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Behandlung mit PMA in den K-562-Zellen die Expression von CD44, einem Rezeptor für Hyaluronsäure, hinaufreguliert wird [129, 130]. Ebenso wird die Expression von Perlecan, einem Proteoglykan und Bestandteil der extrazellulären Matrix, durch PMA-Behandlung in den K-562-Zellen hinaufreguliert [131]. Ahrens konnte nachweisen, dass spezifische Antikörper gegen CD44 die durch PMA vermittelte Aggregation der K-562-Zellen aufheben können [129]. Van der Velde-Zimmermann et al. konnten auf den K-562-Zellen auch die Expression der Adhäsionsfaktoren VLA-5 (Rezeptor für Fibronectin), ICAM-1 und VCAM-1 nachweisen [132], die ebenfalls als potentielle Faktoren für die Induktion der Aggregation durch die α 1-adrenergen Agonisten in Frage kommen würden. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Naphazolin behandelten K-562-Zellen konnte man um die Zellen stellenweise ein Saum von körnigen Strukturen sehen, die als Exosomen identifiziert werden konnten [112]. Exosomen sind kleine Mikrovesikel die von verschiedenen Zelltypen, unter anderen auch den K-562-Zellen über dem Weg der Exocytose freigesetzt werden [112, 133]. Über die genaue Funktion von Exosomen weiß man bis dato noch wenig [133]. Die als Exosomen identifizierten körnigen Strukturen zeigten eine enge Assoziation mit der Cytoplasmamembran der Zellen, sodass diese Strukturen neben Adhäsionsfaktoren oder gar alleine als Ursache für die Aggregation der Zellen in Frage kommen. Stoeck et al. stellen eine Verbindung zwischen CD44 und dem zellulärem Release von Exosomen her [134]. Stoeck et al. wiesen nach, dass sich aktiviertes CD44 in Ovar-Carcinomzellen auf freigesetzten Exosomen befindet [134].

Ein mögliches Szenario in den K-562-Zellen wäre, dass es nach Aktivierung der Zellen mit PMA oder Naphazolin über aktiviertes CD44 auf freigesetzten Exosomen zu einer Kreuzvernetzung zwischen Zellen und den Exosomen kommt, die zur Formation von Zellaggregaten führt. Untermauert wird diese Hypothese durch die Beobachtungen, dass der NO-Generator SNP die Aggregation der Zellen inhibiert. Es wurde nämlich nachgewiesen, dass Stickstoff-Monoxid Moleküle die Exocytose, der Mechanismus über den Exosomen freigesetzt werden, supprimieren können [135]. Weiters wurde demonstriert, dass die Freisetzung von Exosomen in K-562-Zellen durch Modulation des zellulären Calciumspiegels beeinflusst werden kann [136]. Dies wiederum geht koform mit den eigenen Beobachtungen dass durch Chelation des extrazellulären Calciums im Medium Aggregation der K-562-Zellen induziert werden kann und durch Erhöhung des extrazellulären Calciumspiegels die Naphazolin induzierte Aggregation aufgehoben wird.

Um zu überprüfen, über welchen grundlegenden Mechanismus Naphazolin in den K-562-Zellen Zelltod induziert (Nekrose, Apoptose oder Autophagie), wurden die Zellen mittels

CASY-Cellcounter, Comet Assay, Aktive Caspase 3-Assay, DAPI-Färbung und mittels Elektronenmikroskopie analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Naphazolin-Behandlung in den K-562-Zellen weder Kernfragmentation auftritt, noch Aktivierung der Caspase 3 erfolgt. Im Comet-Assay sah man auch keine signifikante Steigerung des prozentuellen Anteiles der DNA im Schweif des Kometen im Vergleich von unbehandelten Zellen mit Naphazolin behandelten Zellen. Diese drei Befunde sprechen dafür, dass der Zelltod in den K-562-Zellen nicht durch Apoptose erfolgt. Das Ergebnis stimmt mit den Resultaten der parallel durchgeführten murinen Stammzellstudie überein, in der nach Behandlung von Progenitorzell-Kulturen mit Oxymetazolin ebenfalls keine Caspase-Aktivierung und keine signifikante Zunahme von DNA-Schädigung gesehen werden konnte [52].

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der K-562-Zelllinie sah man in Naphazolin-behandelten Zellen Anzeichen eines autophagolytischen Prozesses. Es kamen vermehrt Zellen vor, die eine große Zahl von Autophagosomen sowie riesige Telolysosomen aufwiesen.

Autophagie (aus dem Griechischen: Autophagie = Selbst-Aufessen) ist an und für sich ein physiologischer Prozess der in allen eukaryontischen Zellen vorkommt um cytoplasmatische Proteine oder degradierte Organellen intrazellulär zu recyceln [110, 111, 137-139]. Der Prozess der Autophagie dient daher der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Ausgehend von einem bis dato unbestimmten Endomembransystem der Zelle werden cytoplasmatische Komponenten oder Organellen der Zelle von einer Membran umhüllt und es entstehen Vesikel mit einer Doppelmembran. Die Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen, die Enzyme in das Autophagolysosom freisetzen, welche das autophagocytierte Material degradieren. Exzessive Autophagie, führt zu einer Art Selbst-Kannibalismus, in der sich die Zelle quasi selbst auffrisst [110]. Autophagie induzierter Zelltod wird auch als Typ 2-Zelltod (Typ 1 = Apoptose, Typ 3 = Nekrose) bezeichnet und läuft unabhängig von der Aktivierung von Caspasen ab. Die ursprüngliche Funktion von autophagolytischen Prozessen liegt jedoch nicht in der Induktion von Zelltod, sondern zur Vermeidung von Zelltod [111, 140] bei metabolischem Stress oder Nährstoffmangel sowie in der Tumorsuppression. Die parallele Inhibition von Apoptose und Autophagie induziert nekrotischen Zelltod [140].

Da Autophagieprozesse induziert werden um nekrotischen (und auch apoptotischen) Zelltod zu verhindern, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in einigen K-562-Zellen nach Naphazolin Behandlung über nekrotischen Mechanismus Zelltod induziert wird. Es kann jedoch konstatiert werden, dass der durch Naphazolin induzierte Zelltod von einem Autophagieprozess begleitet wird.

Fader et al. konnten nachweisen, dass in der K-562-Zelllinie generell eine hohe autophagolytische Aktivität beobachtet werden kann [112]. Durch Naphazolin scheint dieser autophagolytische Prozess so stimuliert zu werden, dass er schließlich im Zelltod endet. In der K-562-Zelllinie wurde kürzlich auch verstärkte autophagolytische Aktivität nach Inkubation mit dem Phorbolster PMA beobachtet [141]. Mishima et al. postulieren aus ihren Beobachtungen, dass durch die Inhibition von autophagolytischen Prozessen die Sensitivität gegenüber Zelltod induzierenden Substanzen in malignen Zellen gesteigert werden kann, dass die Inhibition von Autophagie eine neue Strategie in der Bekämpfung der Chronischen Myeloischen Leukämie darstellen könnte [141].

In den Mitochondrien der Naphazolin-behandelten Zellen konnte man punktförmige elektronendichte Strukturen ausmachen, deren Natur nicht näher bestimmt wurde. Bei diesen Strukturen könnte es sich entweder um Proteinakkumulationen [142] oder um Calcium-Präzipitate handeln [143]. Das Auftreten der elektronendichten Strukturen weist darauf hin, dass auch die Mitochondrien durch die Naphazolin-Behandlung beeinflusst werden. Für die Hypothese, dass es sich dabei um Calcium-Präzipitate handelt, spricht die Tatsache, dass in Reaktion auf α -adrenerge Stimulierung von Zellen der intrazelluläre Calciumspiegel ansteigt und die Mitochondrien Calcium als Calcium-Puffersystem aufnehmen wenn in der Zelle aufgrund eines Stimulus ein gewisser Calciumspiegel erreicht wird [107, 144, 145].

Um zu überprüfen, ob auch in den Erythroleukämiezellen, wie schon in den CFU-Assays beobachtet, durch die adrenergen Agonisten die Expression von Glycophorin-a beeinflusst wird, wurde die GPA-Expression der Zellen nach Inkubation mit den Agonisten gemessen. Es zeigte sich, dass die Zahl der GPA-exprimierenden Zellen der K-562 Zelllinie nicht jedoch bei den HEL-Zellen dosisabhängig zurückgeht. Naphazolin und Oxymetazolin zeigten eine ähnlich starke Wirkung auf die GPA-Expression der Zellen, während Clonidin keinen Einfluss hatte.

Die beobachtete Wachstumshemmung und die Inhibition der GPA-Expression durch Naphazolin in den K-562-Zellen legen nahe, dass die Erythroleukämiezellen ein ideales Modell darstellen, um den Effekt der α 1-adrenergen Agonisten auf erythroide Progenitoren zu untersuchen, da sich die Effekte der Agonisten auf die Erythroleukämiezellen mit jenen ähneln, die auch mit den UCB-Progenitoren beobachtet wurden. Die HEL-Zelllinie kann im Vergleich zu den K-562-Zellen, da sie sich als insensitiv gegen die Naphazolin-Behandlung erwiesen hat, als Kontrolle eingesetzt werden. Der Grund dass die HEL-Zellen weniger sensitiv gegen die Naphazolin-Behandlung sind als die K-562-Zellen, könnte in der unterschiedlichen Expression der Rezeptoren liegen und/oder auch an zellspezifischen Eigenheiten wie das Vorhandensein von BCR-ABL in den K-562-Zellen. Nach Radioactive-Ligand-Binding Assays in HEL-Zellen wurde postuliert, dass die adrenergen Rezeptoren auf HEL-Zellen primär zum α 2-Subtyp gehören [33]. Obwohl auch der offizielle Nachweis für die

Expression von α 1-adrenergen Rezeptoren auf K-562-Zellen noch nicht erbracht wurde, zeigten Gauwerky und Golde, dass die K-562-Zelllinie unter Hormon-depletierten Bedingungen auf die Behandlung mit dem α 1-adrenergen Agonisten Phenylephrin mit einer leichten Wachstumssteigerung reagieren, während unter Standard-Zellkulturbedingungen (Kultivierung mit fetalem bovines Serum) keine Wachstumsbeeinflussung gesehen werden konnte [95].

Neben den Experimenten von Gauwerky und Golde stellt diese Arbeit die erste Studie (soweit nach umfangreicher Reserche bekannt) dar, welche die Wirkung von α 1-adrenergen Agonisten auf Erythroleukämiezellen zum Inhalt hat.

4.3 Die Wirkung von Naphazolin auf Wachstum und Differenzierung der K-562-Zellen erfolgt in Abhängigkeit von der Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen

In zwei Studien der Gruppe Schauenstein konnte nachgewiesen werden, dass adrenerge Agonisten in hämatopoietischen Zellen die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen induzieren. Einerseits konnte in einem *in vivo* Versuch gezeigt werden, dass Noradrenalin ROS in peripheren Lymphozyten der Ratte induzieren kann [51] und andererseits konnte demonstriert werden, dass Oxymetazolin *in vitro* das Wachstum von murinen hämatopoietischen Progenitoren durch Generierung von ROS hemmt [52]. Dass Noradrenalin die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen induzieren kann wurde von einer amerikanischen Gruppe auch in der PC12 Phäochromozytom-Zelllinie und in Cardiomyozyten nachgewiesen [146-148].

Die Generierung von intrazellulären reaktive Sauerstoffradikalen wird mit zahlreichen negativen Einflüssen auf den menschlichen Organismus wie DNA-Schädigung, Zelltod, dem natürlichen Alterungsprozess [149-151] oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson [152] verbunden. Neben diesen zahlreichen belegten negativen Effekten spielen ROS jedoch auch eine wichtige Rolle im zellulären Signalsystem als second messenger-Moleküle. So konnte demonstriert werden, dass ROS essentielle Komponenten im zellulären Signalsystem von hämatopoietischen Cytokinen und Wachstumsfaktoren wie SCF oder EPO darstellen [153, 154]. Dass auch die EPO-Signaltransduktion von ROS-Generierung abhängig ist, weist darauf hin, dass auch in der erythroiden Differenzierung Sauerstoffradikale notwendig sind. Nagata et al. [155] demonstrierten, dass N-Acetyl-Cystein in der Funktion als Antioxidants die Generierung von TER119⁺ Zellen aus murinen erythroiden Progenitoren gewonnen aus der fetalen Leber inhibiert. Das murine Antigen TER119 entspricht dem humanem Glycophorin-a. Auch das (EPO-unabhängige) Wachstum der HEL-Zellen ist abhängig von Sauerstoffradikalen. Die Kultivierung der HEL-Zellen in Anwesenheit von Antioxidantien (NAC und PDTC inklusive) hemmt das Wachstum von HEL

Zellen, da für das Funktionieren des JAK-STAT-Signalweges ein bestimmter ROS-Spiegel in der Zelle notwendig ist [156].

Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in den K-562-Zellen gesehen werden. mM-Konzentrationen von NAC hemmen das Wachstum der Zellen und senken folglich auch die Zahl der GPA⁺ Zellen in den Wells. Allerdings hat NAC einen umgekehrten Effekt, wenn die K-562-Zellen zugleich mit Naphazolin behandelt werden. In diesem Fall führt die Zugabe von NAC zu einem Ansteigen der GPA⁺ Zellen. Auch die Inhibition der Expression von GPA in den nicht toxischen Naphazolin-Konzentrationen konnte in den K-562-Zellen durch das Antioxidants rückgängig gemacht werden. Jedoch hat die Generierung von ROS durch den ROS-Generator Menadion oder das Antioxidants selbst keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die GPA-Expression. Es lässt sich daraus ableiten, dass der durch Naphazolin induzierte zelluläre Prozess der Inhibition der GPA-Expression von der Generierung von ROS abhängig ist, erhöhte ROS-Produktion in den Mitochondrien alleine die erythroide Differenzierung der Zellen jedoch nicht beeinflusst.

Aus diesem Vorwissen heraus wurde die Generierung von ROS in K-562-Zellen nach Behandlung mit Naphazolin bestimmt. Die Messung ergab, dass Naphazolin dosisabhängig die Generierung von ROS induziert. Bei einer hohen Konzentration des Wirkstoffes konnte jedoch überraschenderweise keine Erhöhung der ROS detektiert werden, sondern im Gegenteil, eine signifikante Erniedrigung des ROS-Levels in den Zellen. Auch in der HEL Zelllinie führte die Behandlung mit Naphazolin zu einem erniedrigtem zellulärem ROS Level. In weiteren Experimenten wird es noch nötig sein, den möglichen Einfluss von Hämproteinen auf die ROS – Messung in den Erythroleukämie Zelllinien zu überprüfen. Ohashi et al. haben nämlich nachgewiesen, dass Hämproteine und Hemin in den K-562-Zellen DCFH-DA ebenfalls oxidieren können und somit möglicherweise mit der ROS-Bestimmung interferieren [157]. Dass der toxische Effekt von Naphazolin durch Induktion von Sauerstoffradikalbildung erfolgt, wird jedoch durch den protektiven Effekt der antioxidativen Behandlung der Zellen bewiesen.

Die Quelle für die ROS-Produktion nach Stimulation mit Naphazolin in den K-562-Zellen wurde zwar nicht bestimmt, doch kann die NADPH-Oxidase, die neben den Mitochondrien auch in vielen nicht phagozytierenden Zelltypen, wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen oder Endothelialzellen die Hauptquelle von ROS in eukaryontischen Zellen darstellt [145, 158, 159], als ROS-Generator ausgeschlossen werden, da die K-562-Zellen per se keine funktionelle NADPH-Oxidase besitzen [159]. Als weitere mögliche Quellen für die Naphazolin induzierte ROS-Produktion kommen Enzyme wie die Xanthin-Oxidase, Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen oder auch ROS Generierung im Zuge von ER-Stress in Frage [145, 160].

Die wahrscheinlichsten Verursacher der ROS-Generierung durch Naphazolin in den Erythroleukämiezellen sind jedoch die Mitochondrien und/oder ER-Stress.

Wichtige Indizien für eine Beteiligung der Mitochondrien an der ROS-Generierung sind, dass die Mitochondrien die primären Verursacher von zellulären Sauerstoffradikalen in den K-562 Zellen sind und ROS aus den Mitochondrien eine wichtige Funktion in der Regulation von Autophagieprozessen innehaben [161, 162]. Darüber hinaus sind Mitochondrien auch direkt in der Biogenese von Autophagosomen involviert [161, 162].

In den Mitochondrien sind die Komplexe I und III der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran die Bildungsorte von ROS, wobei Superoxidradikale bei niedrigen Elektronentransportraten primär in Komplex I und bei hohen Elektronentransportraten in Komplex III entstehen [145]. Die ROS-Generierung in den Mitochondrien steht dabei in einem sehr engen Zusammenhang mit Calcium-Ionen [107, 145, 163] und dem ER. In den Mitochondrien fungiert Calcium einerseits als ein Schlüssel-Regulator der Mitochondrien-Funktion, andererseits kann eine Dysregulation der mitochondrialen Calcium-Homöostase - primär das Überladen von Mitochondrien mit Calcium- zur Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen führen [107]. Andere Studien kamen hingegen zum Schluss, dass ein Überladen der Mitochondrien mit Calcium das Mitochondrienpotential negativ beeinflusst und dadurch die Funktion der Atmungskette und die ROS-Produktion hemmt [163, 164]. Ein weiterer Mechanismus wie Calcium-Einstrom in die Mitochondrien mitochondriale Dysfunktion hervorrufen kann zeigten Arrington et al. auf [165]. Arrington et al. wiesen nach, dass der Einstrom von Calcium in die Mitochondrien die Mitochondrien-ständige Calcium-abhängige Protease Calpain 10 aktiviert, die zwei funktionelle Komponenten des Komplexes I der Atmungskette zerschneidet und so zu einer Dysfunktion der Atmungskette führt.

In den K-562-Zellen nach Naphazolin-Behandlung könnten in den Mitochondrien beide Szenarien auftreten - Ankurbelung der ROS-Produktion in niedrigen Dosen- und Suppression der ROS-Produktion in hohen Konzentrationen. Gegen die mögliche Annahme, dass die Mitochondrien durch die bei hoch dosiertem Naphazolin bedingte Radikalbildung so stark beschädigt werden, dass sie generell keine ROS mehr produzieren können, spricht das Ergebnis der Ultrastrukturanalyse der mit hohen Naphazolin Dosen behandelten K-562-Zellen. Es konnten zwar in den Mitochondrien der behandelten Zellen elektronendichte Strukturen (Calcium-Präzipitate?) entdeckt werden, jedoch keine Anzeichen für sonstige morphologische Abnormalitäten wie eine angeschwollene Form oder eine deformierte Struktur der Cristae. Ganz im Gegenteil wiesen die Cristae in den Mitochondrien in den Naphazolin behandelten Zellen sogar eine deutlichere Strukturierung auf als die unbehandelten Zellen.

Auch im ER stehen Calciumionen und die Generierung von Sauerstoffradikalen in enger Verbindung. Das ER fungiert als wichtiger zellulärer Calciumspeicher, aus dem nach Aktivierung der Zelle durch bestimmte Agonisten (z.B. Noradrenalin, Naphazolin) Calciumionen ins Cytosol freigesetzt werden die dort ihre Rolle als second messenger

ausführen. Übermäßiges Calcium aus dem Cytosol wird durch die Mitochondrien gepuffert. Vollständige Calcium-Depletion im ER führt zu ER-Stress der mit Fehler in der Faltung von Proteinen, der Induktion von reaktiven Sauerstoffradikalen, Autophagieprozessen und letztlich mit dem Zelluntergang einhergeht [160, 166-168]. Malhodra et al. konnten nachweisen, dass oxidativer Stress und Zelltod bedingt durch ER-Stress in CHO-Zellen durch Antioxidantien (inklusive NAC) attenuiert werden kann [160]. Im Zuge der Freisetzung von Calcium aus dem ER ins Cytosol strömt durch spezielle Ionenkanäle Calcium auch durch die Zellmembran in die Zelle ein (= *store operated calcium influx*, SOC). Dieser SOC-Prozess spielt eine wichtige Rolle zur Verstärkung des Calcium-Signals im Cytosol und vor allem beim Wiederauffüllen des Calciumspeichers des ERs [169]. Der SOC wurde als essentieller Vorgang identifiziert um die Viabilität der Zellen zu erhalten [167, 169, 170].

In den HEL-Zellen wird die Generierung von Sauerstoffradikalen von Naphazolin dosisabhängig inhibiert. Naphazolin beeinträchtigt die Viabilität der HEL-Zellen im Vergleich zu den K-562-Zellen jedoch kaum. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen könnten sein, dass in den HEL-Zellen als Reaktion auf die ROS-Generation durch Naphazolin in den HEL-Zellen mitochondriale Dysfunktion auftritt und/oder Schutzmechanismen in Form von Antioxidantien und ROS-degradierenden Enzymen aktiviert werden. Es zeigte sich auch, dass die HEL-Zellen nicht nur weniger sensitiv gegen Naphazolin sind, sondern auch gegen den ROS-Generator Menadion im Vergleich zu den K-562-Zellen eine geringere Sensitivität aufweisen. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied könnte das etwas langsamere Wachstum der HEL-Zellen im Vergleich zu den K-562-Zellen sein. Die ROS-Generierung durch Menadion erfolgt in den Mitochondrien und ist daher vom Energiestoffwechsel der Zelle abhängig. Ein hoher Energiestoffwechsel ist zugleich mit einem hohen Maß an ROS-Produktion in den Mitochondrien verbunden, die durch das Vorhandensein von Menadion noch verstärkt wird. Ein weiterer Grund für die niedrigere Sensitivität der HEL-Zellen gegen ROS könnte in der Produktion von niedermolekularen antioxidativen Metaboliten und/oder ROS-degradierenden Enzymen sein, die den HEL-Zellen eine höhere antioxidative Kapazität im Vergleich zu den K-562-Zellen verleihen. Eine Schlüsselrolle könnte hier dem Transkriptionsfaktor FOXO3 zukommen. Der Transkriptionsfaktor FOXO3 fungiert als wichtiger Regulator der erythroiden Differenzierung und spielt außerdem eine essentielle Rolle in der Regulation von Mechanismen zur Abwehr von oxidativen Stress in erythroiden Zellen [171]. Ghaffari et al. demonstrierten, dass das Onkogen BCR-ABL die Aktivierung von FOXO3 verhindert, indem es die Akt-Kinase aktiviert [172]. Dies führt dazu, dass die proapoptische Wirkung von FOXO3 supprimiert wird, hat aber auch die Folge, dass nur ungenügend antioxidative Enzyme wie Catalase oder Superoxid-Dismutase von den Zellen exprimiert werden [172]. Die Zugabe von N-Acetyl-Cystein zu Kulturen FOXO3-defizienter

erythroiden Zellen konnte diese Zellen effektiv vor oxidativem Stress schützen [171], was auch in der eigenen Arbeit bestätigt werden konnte.

Da der Effekt von Naphazolin auf die K-562-Zellen durch Modulation der extrazellulären Calciumkonzentration beeinflusst wird, kann eine funktionelle Beteiligung von Calciumionen am toxischen Effekt von Naphazolin auf die K-562-Zellen angenommen werden. Wie genau Calcium am Naphazolin-Effekt beteiligt ist, muss noch geklärt werden, doch ein mögliches Szenario wäre es, dass durch Naphazolin in den K-562-Zellen die zelluläre Calcium-Homöostase, an deren Regulation sowohl das ER als auch die Mitochondrien beteiligt sind, gestört wird (Abb.48). Beim Prozess der Mobilisierung von Calcium aus dem ER der K-562-Zellen kommt zusätzlich noch eine weitere Eigenart von BCR-ABL⁺ Zellen zum Tragen. Von BCR-ABL⁺ Zellen (K-562 = BCR-ABL⁺) ist seit kurzem bekannt, dass sie einerseits in Vergleich zu BCR-ABL⁻ Zellen ein reduziertes Level an mobilisierbarem Calcium im ER vorliegen haben und andererseits auch eine eingeschränkte Kapazität aufweisen, Calcium aus dem extrazellulären Raum aufzunehmen [173]. Diese Eigenschaft könnte sie anfälliger gegen ER Stress induzierende Mechanismen machen.

Eine mögliche Hypothese wäre, dass im Zuge der α 1-adrenergen Aktivierung der Zelle durch Naphazolin aus dem ER Calciumionen ins Cytosol freigesetzt werden, die von den Mitochondrien aufgenommen werden und dort die Produktion von ROS ankurbeln, bzw. bei zu hoher Konzentration die Funktion der Mitochondrien lahm legen. Der durch BCR-ABL bedingte verzögerte SOC-Prozess in Reaktion auf die Aktivierung mit Naphazolin könnte ER Stress und einen intrazellulären Calciummangel bewirken, der durch Steigerung der extrazellulären Calciumkonzentration abgeschwächt werden kann. Die Störung der Calcium-Homöostase führt schließlich zu einem autophagolytischen Prozess der die Zelle in den Zelltod treibt. Die Hypothese würde auch zu den Ergebnissen der Studien von Mao et al. passen, die in zwei Studien schildern, dass Noradrenalin in PC12-Zellen ER-Stress durch Generierung von oxidativem Stress auslöst [146, 147]. Im Gegensatz zu den Erythroleukämiezellen wo Naphazolin einen autophagolytischen nekrotischen Zelltod induziert, führt Noradrenalin in den PC12-Zellen jedoch zu einem apoptotischen Zelltod [146, 147]. Mao et al. konnten auch nachweisen, dass im Zuge des Noradrenalin induzierten ER-Stress auch die Aktivierung der Akt-Kinase attenuiert wird [147].

Calciumionen spielen jedoch nicht nur eine wichtige Rolle in der Induktion bzw. Prevention von Zelltod, sondern sind auch maßgeblich am Differenzierungsprozess von erythroiden Zellen beteiligt, da Calciumionen als second messenger Moleküle in der EPO-Signaltransduktion fungieren [174-177]. Es konnte demonstriert werden, dass bei eingeschränkter Verfügbarkeit von Calcium die erythroide Differenzierung von murinen Erythroleukämiezellen gehemmt wird [178]. Weiters konnte festgestellt werden, dass durch

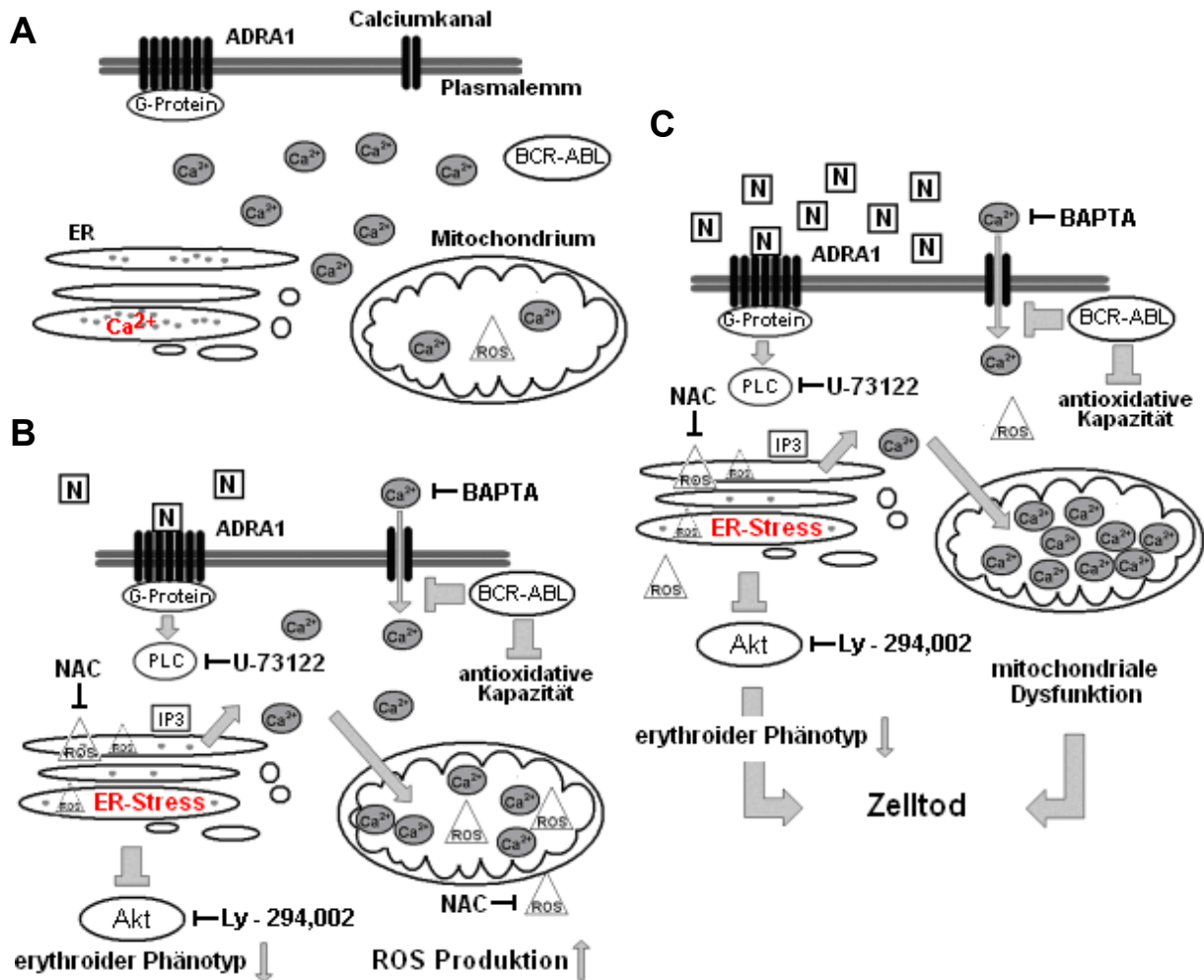


Abb.48: Hypothese zur Toxizität von Naphazolin auf die K-562-Zellen. **A:** Der Zustand der K-562-Zellen in der Kulturflasche ohne den Zusatz von Naphazolin. BCR-ABL sorgt für eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit der Zellen, die Ca²⁺-Speicher im ER der Zellen sind gefüllt und in den Mitochondrien werden in einem geringen Ausmaß reaktive Sauerstoffradikale (ROS) gebildet. **B:** Der Zustand der K-562-Zellen inkubiert mit niedrigen, nicht toxischen Naphazolinkonzentrationen. Durch Naphazolin wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die Inositol-1,4,5 triphosphat (IP3) produziert. Über IP3 abhängige Ca²⁺ Kanäle werden Calciumionen aus dem ER freigesetzt, die in die Mitochondrien aufgenommen werden und dort die Produktion von ROS angekurbelt. Zusätzlich wird Ca²⁺ aus dem extrazellulären Raum über Ionenkanäle aufgenommen. Der erythroide Phänotyp der Zellen wird durch ER-Stress bedingte Inhibition der Akt-Kinase unterdrückt. **C:** Der Zustand der K-562-Zellen inkubiert mit hohen, toxischen Naphazolin Konzentrationen. Durch Naphazolin wird die PLC aktiviert und es werden Calciumionen aus dem ER freigesetzt, die in die Mitochondrien aufgenommen werden und dort die Produktion von ROS stimulieren. Schließlich kommt es durch die hohe Naphazolindosis zur vollständigen Depletion von Ca²⁺ im ER, was zu ER-Stress führt. Die Funktion der Mitochondrien wird schließlich durch eine Überladung mit Ca²⁺ lahmgelegt. BCR-ABL verstärkt den Effekt von Naphazolin indem es den *store operated calcium influx* hemmt und auch die antioxidative Kapazität der Zellen erniedrigt. Die Suppression des erythroiden Phänotyps sowie die Induktion von Zelltod (Autophagie/Nekrose) ist die Folge dieses Prozesses. Durch den PLC-Inhibitor U-73122, dem Antioxidants N-Acetyl-Cystein (NAC) und durch Erhöhung der extrazellulären Ca²⁺ Konzentration kann der toxische Effekt von Naphazolin auf die K-562-Zellen partiell attenuiert werden. Durch Chelation von extrazellulären Ca²⁺ durch den Ca²⁺ Chelator 1,2-Bis(O-Aminophenoxy)ethan- N,N,N',N'-Tetraacetat (BAPTA) wird der Effekt von Naphazolin imitiert oder der Effekt von Naphazolin in Kombination mit BAPTA verstärkt. ADRA1: α1-adrenerger Rezeptor, N: Naphazolin, LY-294,002: Akt-Kinase-Inhibitor, U-73122: PLC-Inhibitor.

Ionomycin, eine Substanz die das Durchdringen der Cytoplasmamembran von Calciumionen ermöglicht, das Wachstum von erythroiden *in vitro* Kolonien der Maus gesteigert werden

kann [179]. Durch die Störung der Calcium-Homöostase durch Naphazolin könnte auch die erythroide Differenzierungsfähigkeit der K-562-Zellen beeinträchtigt worden sein, was sich an der fehlenden GPA – Expression äußert. Calcium-Ionen könnten folglich eine Schlüsselrolle im Effekt von Naphazolin auf den Zelltod und die erythroide Differenzierung der K-562-Zellen einnehmen.

Durch Modulation des extrazellulären Calciumspiegels wurde die Expression von GPA mit und ohne Naphazolin Behandlung jedoch nur marginal beeinflusst. Da jedoch auch der schützende Effekt gegen hohe Naphazolin Konzentrationen in den K-562-Zellen durch eine erhöhte Calciumkonzentration im Medium nur schwach war, kann davon ausgegangen werden, dass die alleinige Steigerung des extrazellulären Calciumspiegels möglicherweise nicht ausreichend ist, um einen Effekt von Calcium auf die GPA-Expression dingfest zu machen.

Um hier eine sichere Aussage treffen zu können, sollen in weiterführenden Versuchen intrazelluläre Calciumchelatoren wie die membrandurchgängige Form von BAPTA, BAPTA-AM oder Substanzen, die den Calciumspiegel in Zellen steigern (z.B. Ionomycin) verwendet werden. Ganz generell wird es auch nötig sein, den Einfluss von Calcium auf den Naphazolin Effekt durch intrazelluläre Calciummessungen zu untermauern.

Bei den UCB-Progenitorzellen in den CFU-Assays kann man davon ausgehen, dass sie den natürlichen oxidativen Schutz den FOXO3 den erythroiden Zellen verleiht noch aufweisen und auch die Calcium Homöostase der Progenitoren nicht beeinträchtigt ist. Dadurch lässt sich möglicherweise auch erklären, warum die Progenitorzellen auch in Anwesenheit von Naphazolin immerhin noch Kolonien gebildet haben und nicht gleich beim Start der Kultur zugrunde gingen.

Die Erkenntnis, dass durch die Zugabe eines Antioxidants der Effekt von Naphazolin auf das Wachstum der K-562-Zellen reversibel war, schürte die Hoffnung, durch den Zusatz von spezifischen pharmakologischen Inhibitoren, gerichtet gegen Komponenten aus der α -adrenergen Signaltransduktionskette, bzw. der erythroiden Differenzierung, den Effekt von Naphazolin auf das Wachstum und die Differenzierung der K-562-Zellen ebenso beeinflusst werden kann wie mit dem Antioxidants. Der Einsatz von klassischen PKC-Inhibitoren wie Staurosporin erschien kontraproduktiv wegen bereits beschriebener Differenzierungseffekte solcher Substanzen auf Erythroleukämiezellen [85-89].

Als einziger der angewandten pharmakologischen Inhibitoren hatte der PLC-Inhibitor U-73122 einen leicht protektiven Effekt auf die K-562-Zellen gegen die toxische Wirkung von Naphazolin, was dafür spricht, dass durch Inhibition einer Komponente der adrenergen Signaltransduktion der Effekt von Naphazolin zumindest attenuiert werden kann. Allerdings sind die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren, da nachgewiesen wurde, dass U-73122

neben der Inhibition der PLC auch unspezifische Wechselwirkungen mit der zellulären Calcium-Homöostase zeigt [180, 181].

Der p38-Inhibitor SB203580 wurde getestet, da in einer rezenten Studie gezeigt worden war, dass reaktive Sauerstoffradikale über die Aktivierung von p38 das Überleben von murinen Stamm- und Progenitorzellen limitieren [182]. In der parallel im Labor laufenden murinen Studie wurde nachgewiesen, dass durch Inhibition von p38 der wachstumsinhibierende Effekt von Oxymetazolin auf murine GM-CFU-Progenitorzellen aus dem Knochenmark rückgängig gemacht werden kann [52]. Die Zugabe des p38-Inhibitors zu Naphazolin behandelten K-562-Zellen schützt diese jedoch nicht vor der toxischen Wirkung von Naphazolin. Es konnte weder durch die Zugabe des p38-Inhibitors der wachstumsinhibierende Effekt, noch der Einfluss von Naphazolin auf die Expression von GPA rückgängig gemacht werden. Im Gegenteil, der Effekt von Naphazolin wurde durch Inhibition von p38 noch verstärkt, bzw. der Inhibitor imitierte den Effekt von Naphazolin sogar. In den Naphazolin behandelten Kulturen bewirkte der p38-Inhibitor, dass die Zahl der GPA exprimierenden Zellen noch weiter zurückging, die Zahl der GPA negativen Zellen jedoch nahezu konstant blieb. Naphazolin und der p38-Inhibitor hatten folglich eine synergistische Wirkung, was auf eine Wechselwirkung zwischen dem p38 Signalweg und dem Signalwege/n der/die durch Naphazolin aktiviert werden hindeutet. Dass der p38-Inhibitor einen Einfluss auf die erythroide Differenzierung aufweist, geht konform mit den Ergebnissen früherer Studien, in denen demonstriert werden konnte, dass p38 eine Komponente der EPO-Signaltransduktionskette darstellt und essentiell für den Prozess der erythroiden Differenzierung ist [183, 184]. In den Naphazolin behandelten K-562-Zellen scheint die Aktivierung von p38 nicht die Ursache für die Toxizität und den Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von Naphazolin zu sein. In diesem Punkt gab es folglich keine Übereinstimmung mit der murinen Studie, in der der inhibierende Effekt von Oxymetazolin, der ebenfalls mit ROS-Generierung verbunden war, durch pharmakologische Inhibition von p38 aufhebbar war. Die möglichen Gründe für diese Unterschiede sind recht mannigfaltig. Einerseits spielen sicher Spezies-Unterschiede (Maus vs. Mensch) eine Rolle, der Zelltyp der untersucht wurde (CFU-GM versus erythroide Zellen) und vor allem auch der Umstand, dass in der vorliegenden Studie Leukämiezellen und keine physiologischen Progenitoren untersucht wurden. In einer rezenten Studie konnte nachgewiesen werden, dass p38 nicht nur in der Signaltransduktion von erythroiden Zellen eine essentielle Rolle spielt, sondern auch an der megakaryozytären Differenzierung der K-562-Zellen beteiligt ist [130]. In K-562-Zellen, in denen durch PMA-Behandlung megakaryozytäre Differenzierung induziert wird, wird der megakaryozytäre Phänotyp der Zellen durch die Zugabe von p38-Inhibitoren noch zusätzlich verstärkt [130]. Die Effizienz von p38-Inhibitoren megakaryozytäre Differenzierung zu induzieren konnte in dieser Studie ansatzweise bestätigt werden. Die Zugabe des p38-

Inhibitors führte nämlich parallel zur Abnahme der GPA-Expression zu einer leichten Zunahme der Expression des megakaryozytären Markers CD41a, ohne jedoch Endomitose zu induzieren (nicht gezeigte Daten).

Ähnlich wie der p38-Inhibitor SB203580 zeigte auch der PI3-Kinase-Inhibitor LY-294,002 einen suppressiven Effekt auf die Expression von GPA. Der PI3-Kinase-Inhibitor wurde getestet, da Zhu et al. gezeigt hatten, dass der Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) in Granulozyten über Aktivierung der PI3-Kinase die Akt-Kinase aktiviert und im Zuge dieses Prozesses Sauerstoffradikale produziert werden [185]. Die in dieser Studie demonstrierte Sauerstoffradikalbildung konnte erfolgreich durch Behandlung mit NAC supprimiert werden [185]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Akt-Kinase in vaskulären glatten Muskelzellen in Reaktion auf Agonistenbindung an α 1-adrenerge Rezeptoren aktiviert wird [52] und Akt auch als essentieller Faktor in der EPO-Signaltransduktion und im erythroiden Differenzierungsprozess fungiert [186-189]. Jedoch zeigte sich bei der Behandlung der K-562-Zellen mit LY-294,002 ein ähnliches Ergebnis wie es schon beim p38-Inhibitor SB203580 beobachtet werden konnte. Der toxische Effekt von Naphazolin konnte nicht attenuiert werden und der Effekt von Naphazolin auf die GPA-Expression wurde imitiert oder in Kombination mit Naphazolin verstärkt. Auch LY-294,002 weist eine synergistische Wirkung mit Naphazolin auf die GPA-Expression auf.

Dass der PI3-Inhibitor den Effekt von Naphazolin auf die GPA-Expression imitieren kann ist dahingehend interessant, da Mao et al. nachgewiesen haben, dass durch Noradrenalin induzierten ER-Stress in PC-12-Zellen die Akt-Kinase supprimiert wird [147]. Diese Erkenntnis könnte einen Ansatz für eine Erklärung bieten, warum die Inhibition der PI3-Kinase dieselbe Differenzierungsblockade auslöst wie Naphazolin. Diese Hypothese wird auch von den Beobachtungen gestützt, dass die Zugabe von NAC, das nachweislich ER Stress attenuieren kann, auch die Naphazolin bedingte GPA Expressionshemmung aufhebt. Auch eine Verknüpfung der Signalwege der Akt-Kinase mit jenem der p38-Kinase ist denkbar, da sich die beobachteten Effekte von LY-294,002 und SB203580 auf die GPA Expression ähneln. In der Literatur wird diskutiert, ob die Akt-Kinase ein mögliches Target der p38-Kinase darstellt in der Funktion als *Phosphoinositide-Dependent Kinase-2* (PDK2). Die Akt-Kinase weist nämlich zwei Phosphorylierungsstellen (Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³) auf, nach deren Phosphorylierung durch zwei PDK (PDK1 und PDK2) die Aktivierung der Akt-Kinase erfolgen kann [190]. Während jedoch die PDK1 erfolgreich identifiziert werden konnte, liegt die Identität der PDK2 noch im Dunkeln [190]. In humanen Neutrophilen Granulozyten konnte p38 als solche PDK2 identifiziert werden [190]. Ob dies jedoch auch in der K-562-Zelllinie zutrifft, muss erst geklärt werden. Ein weiterer Grund warum sich die Effekte von SB203580 und LY-294,002 gleichen, könnte in einer ebenfalls inhibierend

wirkenden Wechselwirkung von SB203580 mit der PDK1 sein, die von Lali et al. entdeckt wurde [191].

Weitere Vertreter der MAP-Kinase Familie, die MAP-Kinasen ERK1/2, wurden ebenfalls pharmakologisch inhibiert und die Auswirkungen auf Proliferation, Viabilität und Differenzierung der Naphazolin behandelten K-562-Zellen bestimmt. Auch durch Manipulation des ERK1/2-Signalweges konnte weder der Differenzierungseffekt, noch der Zelltod induzierende Effekt von Naphazolin in den K-562-Zellen attenuiert werden.

Aus den vorliegenden Daten der Experimente kann man die Erkenntnis ziehen, dass der Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren gerichtet gegen Komponenten der MAP-Kinase Familie den toxischen Effekt von Naphazolin auf die K-562-Zellen nicht abschwächen kann. Es kann jedoch postuliert werden, dass sich die Wirkung von Naphazolin durch Inhibition von p38 oder der Akt-Kinase imitieren lässt. Diese Ergebnisse liefern die Grundlage für weitere (Western-Blot) Experimente, ob durch Naphazolin wirklich die Aktivierung der beiden Kinasen inhibiert wird und so die Inhibition der GPA Expression bewirkt wird.

Zur Anwendung von pharmakologischen Inhibitoren in *in vitro* Experimenten sind generell einige Fakten zu bedenken, die das Versuchsergebnis und die Interpretation der Daten betreffen. Viele der kommerziell angebotenen Kinase-Inhibitoren sind (wie für U-73122 und SB203580 erklärt) nicht spezifisch für ein bestimmtes zelluläres Target und können somit zu Fehlinterpretationen führen. Auch die Stoffeigenschaften von einigen Substanzen können für einen *in vitro* Versuch problematisch sein. Viele Kinase-Inhibitoren sind nicht wasserlöslich und erfordern den Einsatz von organischen Lösungsmitteln (z.B. DMSO), die das Versuchsergebnis unspezifisch beeinflussen können. Auch über die Stabilität von diversen Kinase-Inhibitoren unter Kulturbedingungen gibt es meist nur wenig verfügbare Informationen.

Unabdingbar ist es, die Aktivierung oder die Inhibition von Signaltransduktionskomponenten z.B. durch Westernblotting nachzuweisen. Eine neue Technologie und gute Alternative oder Additiv zu Kinase-Inhibitor-Experimenten zur gezielten Ausschaltung von Kinasen oder anderen Proteinen stellt neuerdings der Einsatz von spezifischen siRNAs dar.

4.4 α 1-adrenerge Antagonisten hemmen das *in vitro* Wachstum, induzieren Apoptose und verändern das Differenzierungsverhalten von humanen Erythroleukämiezellen in Richtung megakaryozytärer Linie

Im UCB-Progenitorzell-Modell konnte man sehen, dass der adrenerge Antagonist Benoxathian anstatt die Wirkung von Naphazolin aufzuheben, den Effekt von Naphazolin in Bezug auf die Inhibition der Generierung von erythroiden Zellen noch verstärkte. Der Antagonist alleine konnte den Effekt teilweise sogar imitieren. Analog zu den UCB-Experimenten führte der Zusatz von Benoxathian zu den Kulturen der beiden Erythroleukämie Zelllinien ebenfalls zu einer Inhibition des Wachstums und zu einem Abfall der GPA-Expression. Die Wachstumshemmung war mit dem Auftreten von Apoptosemerkmalen verbunden. Da im Erythroleukämiezell-Modell nach Behandlung mit Benoxathian ähnliche Effekte auftreten wie bei den UCB-Progenitorzellen, sind die Erythroleukämiezellen als Modellsystem auch geeignet, die Wirkung von Benoxathian auf das erythroide Wachstum zu untersuchen. Parallel zu Benoxathian wurde auch die Wirkung von Prazosin auf das Wachstum der Erythroleukämiezellen untersucht, da sich in den UCB-Ansätzen gezeigt hatte, dass der Antagonist das *in vitro* Wachstum der UCB-Progenitoren total unterbinden kann.

Schon bei der routinemäßigen lichtmikroskopischen Untersuchung der Prazosin behandelten Kulturen nach Ablauf der Inkubationszeit zeigte sich ein sehr interessantes Ergebnis. Eine starke Inhibition des Wachstums und eine Größenzunahme der Zellen waren ersichtlich. Eine hämatologische Färbung der behandelten Zellen zeigte, dass ein Gros der Erythroleukämiezellen nach Behandlung mit Prazosin einen polylobulierten Kern aufweist. Die Größenzunahme der Zellen, das Auftreten von polylobulierten Zellkernen und die ebenfalls nachgewiesene Expression des Oberflächenmarkers CD41a deuten darauf hin, dass Prazosin die Differenzierung der Erythroleukämiezellen in Richtung megakaryozytärer Linie verschiebt [192]. Benoxathian reguliert die Expression von GPA in den Erythroleukämiezellen ebenfalls herunter, doch die Induktion von CD41a ist schwächer als bei Prazosin und auch das Auftreten von polylobulierten Kernen ist nicht zu beobachten. Die beiden α 1-adrenergen Antagonisten Benoxathian und Prazosin zeigen folglich Unterschiede in ihrer Potenz einen megakaryozytären Phänotyp in den beiden Erythroleukämiezelllinien zu induzieren. Auch in der Fähigkeit Apoptose in den beiden Zelllinien auszulösen, zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Substanzen. Im Gegensatz zur K-562-Zelllinie induziert Benoxathian in der HEL-Zelllinie nach 48h-Kultivierung nur schwache Caspase 3 Aktivierung. Prazosin hingegen induziert in den HEL-Zellen stärkere Caspase Aktivierung als in den K-562-Zellen, was allerdings zu keinem prozentuellen Unterschied in der Wachstumshemmung nach 72h-Kultivierung mit Prazosin zwischen den beiden Zelllinien

führt. Die Induktion von Apoptose durch Prazosin geht einher mit den Ergebnissen einer chinesischen Gruppe, die demonstrieren konnte, dass Prazosin Apoptose in der K-562 Zelllinie auslöst [94]. Die Autoren dieser Studie beschreiben jedoch nicht den Differenzierungseffekt (vor allem Größenzunahme, komplexe Kernstruktur) den Prazosin auf die K-562-Zellen ausübt. Der Grund dafür, dass die chinesische Studie den Effekt nicht beschreibt, könnte darin liegen, dass Prazosin den Differenzierungseffekt nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich (10-15 μM) auslöst. Bei Konzentrationen unter oder auch über diesem Konzentrationsbereich ist der Effekt auf die Kernkomplexität nicht, oder nur schwach ausgeprägt. Vermutlich spielen neben der Wirkstoffkonzentration auch Unterschiede in der Zelleinsaat oder der Inkubationsdauer eine Rolle, warum He und He den offensichtlichen Effekt von Prazosin auf die Zellmorphologie der K-562-Zellen nach Prazosin Behandlung in ihrer Studie nicht beschreiben.

Die K-562-Zellen unterschieden sich beim Prazosin-Effekt nicht nur dahingehend von der HEL-Zelllinie dass Prazosin in den K-562-Zellen erst in höheren Konzentrationen Apoptose induziert, sondern auch in der Induktion von Endomitose sieht man einen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. In der K-562-Zelllinie sieht man nach 48h Kultivierung mit Prazosin schon bei 10 μM Prazosin eine signifikante Steigerung der Zellen mit polylobulierten Nucleus, während bei der HEL-Zelllinie 15 μM Prazosin notwendig sind, um eine signifikante Anreicherung von Zellen mit komplexem Kern zu erreichen. Bei 15 μM war dann der Effekt von Prazosin dafür deutlich stärker ausgeprägt als bei den K-562-Zellen, was vermutlich auch mit der parallelen stärkeren Induktion von Apoptose zusammenhängt.

Die Gründe für die Wirkungsunterschiede der beiden getesteten α_1 -adrenergen Antagonisten Prazosin und Benoxathian im Bezug auf Wachstumshemmung, Induktion von Endomitose und Apoptose auf die beiden Erythroleukämie-Zelllinien könnten neben zelllinienspezifischen Parametern wie Wachstumsverhalten oder Toleranz gegen Xenobiotika, an einer - noch zu überprüfenden - zahlenmäßigen und Rezeptorsubklasseabhängigen unterschiedlichen Rezeptorexpression der beiden Zelllinien liegen. Es unterscheiden sich nämlich nicht nur die großen adrenergen Rezeptorsubklassen (α_1 , α_2 , β) in ihrem Signalsystem untereinander, sondern auch innerhalb der α_1 -Rezeptorsubklasse existieren Unterschiede im nachgeschalteten Signalsystem. So wurde nachgewiesen, dass der α_1 -adrenerge Agonist Phenylephrin abhängig davon ob er $\alpha_1\text{B}$ oder $\alpha_1\text{D}$ -adrenerge Rezeptoren auf Ratten-Fibroblasten bindet, verschiedene Vertreter der MAP-Kinase-Familie wie p38, JNK oder ERK mit unterschiedlicher Stärke aktiviert [193].

Die p38 MAP-Kinase und ERK1/2 sind maßgeblich an der Induktion von megakaryozytärer Differenzierung in Erythroleukämie-Zelllinien beteiligt [130, 194].

Prazosin weist zwar eine höhere Affinität zu α_1 -Rezeptoren auf als Benoxathian [195], eine starke selektive Präferenz für einen der drei α_1 -Rezeptorsubtypen ($\alpha_1\text{a}$, $\alpha_1\text{b}$, $\alpha_1\text{d}$) zeigt

jedoch keine der beiden Substanzen [196]. Auffallend bei Vergleich der Rezeptoraffinität von Prazosin und Benoxathian ist jedoch, dass die relative Affinität von Prazosin im Vergleich der drei α 1-Rezeptorsubtypen am α 1b-Rezeptor am höchsten ist, bei Benoxathian jedoch am niedrigsten, was die Hypothese unterstützt, dass die unterschiedliche Wirkung von Prazosin und Benoxathian doch aufgrund unterschiedlicher Rezeptoraffinität erfolgen könnte. Neben Faktoren wie Rezeptorexpression oder Rezeptoraffinität der beiden Agonisten spielen auch chemische Eigenschaften der verwendeten Substanzen wie die Hydrophilität/Lipophilität, die strukturelle Stabilität unter Zellkulturbedingungen oder unspezifische Wechselwirkungen mit zellulären Prozessen oder Komponenten eine Rolle, warum Benoxathian und Prazosin eine unterschiedliche Wirkung auf die beiden Erythroleukämie-Zelllinien aufweisen.

Der α 2-adrenerge Antagonist Yohimbin hat auf beide Zelllinien, der Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Differenzierung betreffend, nur einen schwachen Effekt im Vergleich zu den getesteten α 1-adrenerge Antagonisten, was wiederum auf einen primär α 1-vermittelten Effekt schließen lässt. Dies geht analog mit dem Ergebnis, dass der α 1-adrenerge Agonist Clonidin ebenfalls nur eine marginale oder keine Wirkung auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der beiden Erythroleukämiezelllinien zeigt.

Ausgehend von der Beobachtung, dass der α 1-adrenerge Agonist Naphazolin die Wirkung von Prazosin in Bezug auf die megakaryozytäre Differenzierung und Wachstumshemmung in den K-562-Zellen attenuiert, können drei verschiedene Hypothesen aufgestellt werden, warum die megakaryozytäre Differenzierung der Zellen unter Standard-Zellkulturbedingungen nicht auftritt, bzw. bei Zugabe von Prazosin auftritt.

Die erste Hypothese ist, dass die Wirkung der Antagonisten darin besteht, die Bindung von im Zellkulturmedium enthaltenen Katecholaminen (aus dem zugesetzten FBS) an adrenerge Rezeptoren auf der Zellmembran zu blocken. Aufgrund des geringen Anteils des Serums am Kulturmedium (10%), der geringen Stabilität von Katecholaminen, unter *in vitro* Kulturbedingungen (primär bedingt durch Autooxidation [197, 198]) kann davon ausgegangen werden, dass Serum-Katecholamine kaum eine Rolle am Ausgang der Experimente spielen. Unterstützt wird die Hypothese jedoch durch Experimente, in denen statt Serum ein Serumersatz zum Zellkulturmedium zugesetzt wurde. Es stellte sich heraus, dass unter serumfreien Bedingungen in der K-562-Zelllinie vermehrt Polyploidie der Zellen auftritt.

Die zweite Hypothese ist, dass die Erythroleukämiezellen selbst Katecholamine produzieren und über einen autokrinen/parakrinen Mechanismus ihre Differenzierungsverhalten über adrenerge Rezeptoren selbst steuern können. Ein solcher autokriner/parakriner Mechanismus über Produktion von Katecholaminen und autokriner Modulation von adrenergen Rezeptoren wurde bereits in Makrophagen beschrieben [199]. In den HEL-Zellen, jedoch nicht in den K-562-Zellen konnte der Nachweis der Expression der Dopamin-

β -Hydroxylase erbracht werden. Die HEL-Zellen zeigen dadurch Ähnlichkeit mit den makrophagenartigen RAW 264.7-Zellen, die ebenfalls Dopamin- β -Hydroxylase exprimieren [44]. Einige HEL-Zellen tendieren in der Kultur dazu, an das Kulturgefäß zu adhären und eine spindelförmige polare Zellform auszubilden. Dieser neben anderen Zelltypen wie Fibroblasten für Makrophagen typische Phänotyp in den HEL-Zellen wird durch die Zugabe von PMA zur Zellkultur, die einen Makrophagen-megakaryozytären Phänotyp der Zellen induziert, noch verstärkt [86, 88]. Bei der Expression der Dopamin- β -Hydroxylase könnte es sich um eine Ausprägung des Potentials der HEL-Zellen handeln, in Richtung der Monozyten/Makrophagen Linie zu differenzieren. Dafür spricht, dass die K-562-Zelllinie, die keine spindelförmigen Zellen in den Kulturen aufweist, auch negativ für die Expression der Dopamin- β -Hydroxylase ist.

Da die DBH das Schlüsselenzym der Synthese von Noradrenalin darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass der Mechanismus der adrenergen Antagonisten nicht darin besteht, ausschließlich eine autokrine Modulation über Katecholamine zu inhibieren, zumal beide Zelllinien nach Prazosin-Behandlung einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Der Nachweis von Katecholaminen in den K-562- und HEL-Zellen selbst oder im Zellkulturüberstand konnte aufgrund einer zu geringen Sensitivität der HPLC-Messung nicht erbracht werden. Es empfiehlt sich daher, für die Messung von Katecholaminen eine sensitivere Methode wie die verwendete HPLC- Methode heranzuziehen.

Die dritte Möglichkeit wie die Antagonisten die beobachteten Effekt ausgelöst haben könnten, besteht in einer besonderen pharmakologischen Eigenschaft von Prazosin und Benoxathian.

Beide Antagonisten (wie viele andere adrenerge Antagonisten auch, inklusive Yohimbin [200]) wirken nämlich nicht als so genannte neutrale Antagonisten, sondern agieren nach Bindung an adrenerge Rezeptoren als so genannte inverse Agonisten [200-205]. Die Theorie des inversen Agonismus geht von der Grundlage aus, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu denen auch alle adrenergen Rezeptoren zählen, in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen vorliegen [203]. Einerseits können sie einem inaktivem Zustand vorliegen, oder andererseits in einem Aktivitätszustand, in den sie auch spontan ohne nötige Bindung eines spezifischen Agonisten gelangen können. Die spezifischen Agonisten verschieben den Zustand des Rezeptors in Richtung aktiven Zustand, während inverse Agonisten den Aktivitätszustand des Rezeptors in Richtung inaktiven Zustand verschieben [203]. Dadurch wird die spontane Aktivierung des Rezeptors unterbunden. Neutrale Antagonisten binden zwar den Rezeptor, beeinflussen den Aktivitätszustand des Rezeptors nicht, sondern blockieren einfach die Bindung des Agonisten.

Die Konsequenzen des inversen Agonismus für die Zelle bestehen darin, dass es zu einer Hinaufregulation des entsprechenden Rezeptors kommt und in der Zelle der umgekehrte

(=inverse) Effekt der Agonistenbindung erfolgt, wie im Falle der α 1-adrenergen Antagonisten ein Abfall des Calciumspiegels im Cytoplasma und ein vermindertes Level an IP3 [203, 204]. Da bei einer Prazosin-Konzentration von 7 μ M im serumfreien Medium Zellen mit polylobuliertem Zellkern auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich beim Prazosineffekt entweder um inversen Agonismus oder schlichtweg um einen unspezifischen Effekt des Wirkstoffes (= Hypothese 4) handelt.

Gegen diese Hypothese des unspezifischen Effektes spricht jedoch, dass der α 1-adrenerge Agonist Naphazolin die Wirkung des α 1-adrenergen Antagonisten Prazosin teilweise aufheben kann. Die parallele Zugabe von für die K-562-Zellen nicht toxischen Konzentrationen an Naphazolin attenuiert die durch Prazosin induzierte Wachstumshemmung und setzt den Prozentsatz der Zellen mit polylobuliertem Zellkern signifikant herunter. Auch die Zunahme des DNA-Gehaltes der K-562-Zellen kann durch Naphazolin reversibel gemacht werden. Die Abschwächung der Prazosin bedingten Wachstumshemmung lässt sich durch die Suppression der durch Prazosin induzierten Apoptose durch Naphazolin erklären, da die Prazosin bedingte Aktivierung der Caspase 3 durch Naphazolin unterdrückt werden kann.

Es kann aus den erzielten Ergebnissen der *Agonist versus Antagonist - Versuche* abgeleitet werden, dass durch die Aktivierung von α 1-adrenergen Rezeptoren auf Erythroleukämiezellen sowohl die Induktion von Apoptose als auch der Shift in Richtung megakaryozytären Phänotyps supprimiert wird. Ob sich die Apoptose supprimierende Wirkung von Naphazolin nur auf Prazosin beschränkt, oder ob die Naphazolin-Behandlung auch die Apoptose Induktion von typischen Chemotherapeutika hemmt, muss noch überprüft werden.

Überraschenderweise konnte Naphazolin den Effekt von Prazosin attenuieren, aber nicht umgekehrt Prazosin den wachstumshemmenden Effekt von hohen Naphazolin Konzentrationen. Das Problem bei der Kombination der Antagonisten und Agonisten war, dass Antagonisten und Agonisten alleine bereits Zelltod induzieren. Ist die Dosis von Prazosin zu hoch führt das zu einem apoptotischen Zelltod, wird Naphazolin zu hoch dosiert führt dies zu einem autophagolytischen/nekrotischen Zelltod. Auch Yohimbin und Benoxathian konnten die wachstumshemmende Wirkung von hohen Naphazolin-Dosen auf die K-562-Zelllinie nicht aufheben. Dass Yohimbin keine Wirkung gegen Naphazolin zeigt, steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass die beobachteten Effekte von Naphazolin primär über α 1-Rezeptoren mediiert werden und nicht über α 2-Rezeptoren. Das Ergebnis von Benoxathian ist jedoch widersprüchlich zum Ergebnis von Prazosin. Es kann gemutmaßt werden, dass Benoxathian einen oder mehrere α 1-Rezeptor Subtypen bindet, den Naphazolin nicht aktiviert, oder Benoxathian hat neben der Eigenschaft als adrenerger Antagonist noch andere, bislang nicht beschriebene Wirkungen auf erythroide Zellen.

Auch für die Rezeptorabhängigkeit der Effekte der adrenergen Antagonisten spricht, dass Benoxathian und Prazosin chemisch gesehen nicht derselben Strukturklasse (Benoxathian = 1,4-Benzodioxan-Derivat [206], Prazosin: Quinazolin-Derivat [124]) angehören und dennoch ein Spektrum derselben Effekte verursachen, während der α 2-adrenerge Antagonist Yohimbin die Wirkungen der beiden α 1-adrenergen Antagonisten nur sehr schwach oder gar nicht imitieren kann.

Dass Prazosin Apoptose in humanen Zellen induzieren kann, wurde nicht nur in den K-562-Zellen demonstriert [94], sondern zuvor schon in Prostatakarzinomzellen [124]. Die Apoptose induzierende Wirkung auf Prostatakrebs wird jedoch als rezeptorunabhängige Wirkung von Prazosin beschreiben, sodass man eine unspezifische Wirkung von Prazosin in Bezug auf die Induktion von Apoptose nicht ganz ausschließen konnte. Apoptosemessungen ergaben jedoch, dass Naphazolin den proapoptischen Effekt von Prazosin attenuieren kann, was auf eine rezeptorspezifische Induktion von Apoptose durch Prazosin hinweist.

Prazosin wurde bereits in zwei *in vivo* Studien Mäusen injiziert und danach Zellen des peripheren Blutes der Tiere analysiert [23, 38]. Izaguirre et al. wiesen nach, dass die Administration von Prazosin in normoxische oder hypoxische Mäuse die Erythropoiese gemessen am Hämatokrit und an der Aufnahme von radioaktivem Eisen in erythroide Zellen inhibiert [38]. Die Studienautoren erklären den Effekt von Prazosin auf die Erythropoiese über eine verstärkte renale Durchblutung, die die renale Sauerstoffversorgung verbessert und folglich die Erythropoietinbildung herunterreguliert. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Erythropoiese nicht nur indirekt über die Produktion von Erythropoietin in den Nieren beeinflusst werden kann, sondern auch durch α 1-adrenerge Rezeptoren auf erythroiden Zellen selbst. Maestroni et al. konnten zeigen dass durch Injektion von Prazosin in Mäusen die Zahl der Granulozyten, CFU-GM-Progenitoren und Thrombozyten im peripherem Blut der Tiere zunahm [23]. Ob auch die Erythropoiese in den Mäusen beeinflusst wurde, wird in der Studie von Maestroni nicht berichtet. Eine Zunahme der Thrombozyten im peripheren Blut deutet auf jeden Fall darauf hin, dass Prazosin auch *in vivo* die Megakaryozytose bzw. die Bildung von Thrombozyten beeinflussen kann.

Die Erkenntnis, dass adrenerge Antagonisten die Differenzierung von Erythroleukämiezellen in Richtung megakaryozytäre Linie verschieben ist absolut neu, doch wurden sowohl in der HEL, als auch in der K-562-Zelllinie mit diversen Kinase-Inhibitoren oder Aktivatoren wie den PKC-Modulatoren Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und Staurosporin bereits ähnliche oder die selben Effekte beschrieben [85-89]. Benoxathian und vor allem Prazosin sind jedoch (soweit eruiert) die ersten Substanzen die einen Membranrezeptor als primäres biologisches Target haben und den megakaryozytären Differenzierungseffekt auslösen.

Die Zugabe von PMA oder Staurosporin zu HEL- oder K-562-Zellen führt zu einem Verlust des erythroiden Phänotyps der Zellen und zu einem Shift in Richtung Makrophagen bzw. megakaryozytärer Differenzierung [85-89]. Interessant an der Induktion der megakaryozytären Differenzierung durch Modulatoren der PKC in der K-562-Zelllinie ist, dass sowohl der klassische PKC-Aktivator PMA, als auch der PKC-Inhibitor Staurosporin megakaryozytäre Differenzierung induzieren und parallel dazu erythroide Eigenschaften der Zellen unterdrücken. Erklärt wird die Ähnlichkeit der Effekte von PMA und Staurosporin dadurch, dass PMA die PKC bei kurzzeitiger Bindung (in der Rolle von Diacylglycerol) aktiviert, die längere Inkubation mit PMA die Expression der PKC jedoch hinunterreguliert und so die megakaryozytäre Differenzierung auslöst [207, 208]. Ein ähnliches Phänomen wie bei der Wirkung von PMA und Staurosporin in den K-562-Zellen tritt bei Naphazolin und Prazosin auf. Sowohl die Zugabe von Naphazolin als auch Prazosin führen zur Unterdrückung des erythroiden Phänotyps gemessen an der Expression von GPA, jedoch nur Prazosin (und teilweise auch Benoxathian) können megakaryozytäre Eigenschaften induzieren.

Wenn man in der Literatur beschriebene Effekte des PKC-Inhibitors Staurosporin und des PKC-Aktivators PMA mit den Wirkungen von Prazosin (α 1-adrenerger Antagonist) und Naphazolin (α 1-adrenerger Agonist) vergleicht, kann man mehrere Überschneidungen der Wirkungen der beschriebenen Substanzen in der K-562-Zelllinie feststellen.

So führt im Gegensatz zu Prazosin und Staurosporin die Behandlung der K-562-Zellen mit PMA und Naphazolin zu keiner Größenzunahme, Endomitose und Induktion von Apoptose [90, 130, 194, 209]. PMA als auch Naphazolin induzieren jedoch in der K-562-Zelllinie Aggregation, Prazosin und Staurosporin jedoch nicht [90, 129]. Auch die Induktion von Autophagie konnte in der K-562-Zelllinie sowohl nach PMA-Behandlung als auch nach Naphazolin-Behandlung beobachtet werden [141].

Es scheint folglich so zu sein als ob Naphazolin in den K-562-Zellen teilweise Eigenschaften des PKC-Aktivators imitieren könnte und Prazosin teilweise die des PKC-Inhibitors.

Auch bei den HEL-Zellen konnte man Unterschiede zwischen der Wirkung von PMA und Prazosin auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der Zellen beobachten. In einem in dieser Arbeit nicht gezeigten Versuch und auch in in anderen publizierten Studien, bewirkte die Zugabe von PMA eine massive Zunahme von adhärennten Zellen innerhalb weniger Stunden [86, 88]. Bei Prazosin-Behandlung der HEL-Zellen jedoch sieht man dieses Phänomen nicht. Man kann zwar tendentiell eine leichte Zunahme von adhärennten Zellen nach Prazosin(-als auch Benoxathian)-Behandlung beobachten, jedoch weist die Mehrheit der Zellen eine runde Zellform und keine adhärennte, ausgestreckte Zellform wie sie für Makrophagen typisch ist, auf.

Der Unterschied in der Inhibition der GPA-exprimierenden (K-562-)Zellen zwischen Agonist- und Antagonist-Behandlung besteht darin, dass Naphazolin in niedrigen Konzentrationen die

Zellzahl nicht beeinflusst, die GPA-Expression der (K-562-)Zellen jedoch supprimiert. Die Antagonisten senken jedoch lediglich die Zahl der GPA-exprimierenden Zellen ohne die Zahl der GPA⁺ Zellen zu erhöhen. Es kann daraus postuliert werden, dass der Effekt der Agonisten darin beruht, primär den erythroiden (und auch den megakaryozytären) Phänotyp der Zellen zu unterdrücken. Der Mechanismus der Agonisten ist zugleich mit der Generierung von reaktiven Sauerstoffsradikalen verbunden, die die Zellen schädigen und im Extremfall zum Zelltod führen. Die Behandlung mit den Antagonisten jedoch führt in niedrigeren Konzentrationen zu einem Shift in Richtung megakaryozytären Phänotyp der Zellen, in höheren Konzentrationen jedoch zu einem apoptotischen Zelltod. Der Effekt der Antagonisten kann dadurch erklärt werden, dass sie nicht wie die Agonisten die erythroide und megakaryozytäre Differenzierung unterdrücken, sondern Zellen, die bereits einen bestimmten Grad an Differenzierung (erythroid/megakaryozytär) aufweisen, einerseits in den erythroiden Zellen einen apoptotischen Zelltod und andererseits in den Zellen mit megakaryozytären Differenzierungstyp Endomitose induzieren.

Die möglichen intrazellulären Signalwege die die megakaryozytäre Differenzierung auslösen, dürften die gleichen sein, die durch Naphazolin aktiviert oder inhibiert werden, da Naphazolin die Wirkung von Prazosin teilweise aufheben kann. Als mögliche intrazelluläre Signalgeber sind wiederum primär die Proteinkinase C zu nennen, die MAP-Kinasen Erk1/2 und p38, sowie die Akt-Kinase, da die genannten Signalkomponenten alle am megakaryozytären Differenzierungsprozess in Erythroleukämiezellen, sowie in der adrenergen Signaltransduktionskette involviert sind [121, 130, 194].

Von Lindern et al. und Myklebust et al. konnten zeigen, dass der PKC Subtyp PKC- α an der durch EPO-induzierten erythroiden Differenzierung von humanen Progenitoren aus dem Knochenmark beteiligt ist [207, 211]. Die beiden Studien konnten zwar einen intrazellulären Schalter für die erythroide Differenzierung finden, jedoch nicht den Auslöser, der den Schalter umlegt. Von Lindern et al. postulierten, dass als solcher Schalter ein G-Protein gekoppelter Rezeptor in Frage kommen würde, der die PKC- α über eine $G\alpha_q$ - Untereinheit aktiviert [207]. Bislang konnte ein solcher Rezeptor jedoch noch nicht identifiziert werden.

Die Daten aus dieser Arbeit würden rechtfertigen, die Rolle von α_1 -adrenergen Rezeptoren als typische Vertreter der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die auch die besagte $G\alpha_q$ - Untereinheit aufweisen [213] auf die Aktivierung verschiedener PKC Subtypen und der PKC- α im besonderen in erythroiden Zellen zu untersuchen.

Auch eine Beteiligung der PKC an der Regulation von autophagolytischen und apoptotischen Zelltod konnte bereits nachgewiesen werden [212]. Zhang et al. konnten demonstrieren, dass das Pharmakon Oridonin unter Standardbedingungen Autophagie in der HeLa-Zelllinie induziert, bei gleichzeitiger Inkubation der HeLa-Zellen mit Oridonin und einem PKC-Inhibitor

der Autophagieprozess jedoch unterdrückt wird und in den Zellen ein apoptotischer Zelltod induziert wird [212]. Ein ähnlicher Effekt könnte bei Naphazolin/Prazosin zutreffend sein.

4.5 Medizinisch relevante Aspekte der Dissertation und Ausblick

Die Tatsache, dass durch adrenerge Antagonisten in den Erythroleukämiezellen Apoptose und Differenzierung induziert wird, kann ein möglicher Ausgangspunkt für weitere Studien sein über den Einsatz von adrenergen Antagonisten als mögliche Alternative oder Zusatz zu gängigen Chemotherapeutika die zur Behandlung von Leukämie eingesetzt werden. Prazosin, das bereits in den 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt wurde, wird noch heute in Tablettenform (Minipress®) routinemäßig zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt. Genügend Daten über die Eigenschaften der Substanz im Menschen müssten also vorhanden sein. Auch in der Therapie von Prostatakrebs zeigte die Behandlung mit Prazosin oder anderen α 1-Antagonisten aus der Klasse der Quinazoline bereits gute Erfolge [124, 213, 214], was für weitere Forschungen über den Einsatz von Prazosin auch bei anderen Krebs-Arten (Leukämie) sprechen würde.

Auch die Eigenschaft von Naphazolin in Krebszellen Autophagie zu induzieren könnte in medizinischen Fragestellungen von Bedeutung sein.

Mishima et al. sehen in der Bekämpfung von autophagolytischen Prozessen in CML-Zellen einen möglichen Ansatz um die Resistenz von leukämischen Zellen gegen Tyrosinkinase-Inhibitoren herabzusetzen [141]. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob Katecholamine auch *in vivo* in hämatopoietischen Progenitoren oder CML-Zellen Autophagie induzieren um so die Zellen vor dem Zelltod schützen.

Die Induktion von Autophagie wird auch als Therapiekonzept von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Huntington Disease diskutiert. Durch die Induktion von Autophagieprozessen wird verhindert, dass im Cytoplasma Proteine akkumulieren, die sich schädigend auf die Zellen auswirken [216]. Clonidin, das in seiner Eigenschaft Autophagie in Erythroleukämiezellen zu induzieren in dieser Studie zwar nicht untersucht wurde, konnte als eine Substanz identifiziert werden die Autophagieprozesse in Neuronen induziert und somit als mögliche Medikation zur Bekämpfung von neurodegenerativen Erkrankungen in Frage kommen würde [216]. Eine Untersuchung, ob Naphazolin auch in Neuronen Autophagie induzieren kann, ist jedoch auf klinische Sicht hin gesehen eher kontraproduktiv, da bekannt ist, dass Naphazolin ab einer Dosis von 0,05 mg/kg Körpergewicht im Menschen (vor allem bei Kindern) toxisch wirkt [219]. Die Toxizität von Naphazolin manifestiert sich in Form von kardiovaskulären und Zentralnervensystem bedingten Symptomen [217].

Die Beobachtung der Hemmung des Wachstums der erythroiden Zellen aus dem Nabelschnurblut und der K-562-Zelllinie durch α 1-Agonisten könnte eine mögliche Erklärung dafür bieten, warum Trauma-Patienten oft Anämien ausprägen [218]. Livingston et al. stellten bereits fest, dass in Trauma-Patienten die Zahl der hämatopoietischen Progenitorzellen im Knochenmark erniedrigt sind, im peripheren Blut jedoch erhöht sind [218]. Dies ist analog zu den Ergebnissen die im Schauenstein-Labor nach Administration von implantierbaren Noradrenalin-Tabletten in Ratten erzielt wurden (Quan et al. unpublizierte Daten, 2008). In zwei Folgestudien der Arbeitsgruppe von Livingston konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Ausprägung von Anämie in Traumapatienten und einem erhöhtem Katecholaminspiegel im Urin der Patienten gefunden werden [30, 31]. Jedoch kam diese Gruppe zu recht widersprüchlichen Ergebnissen in ihren weiteren Untersuchungen. Entgegen der Annahme, dass Noradrenalin das Wachstum von BFU-E Kolonien *in vitro* inhibiert, kam die Studie zur Erkenntnis, dass Noradrenalin das Wachstum von BFU-E über einen β -Rezeptor abhängigen Mechanismus in Anwesenheit von Stromazellen stimuliert [30, 31]. Zum experimentellen Design dieser Studie ist jedoch anzumerken, dass für die erythroiden Kulturen eine extrem hohe Zellzahl eingesetzt wurde und auch die EPO-Konzentration sehr niedrig dosiert war [30]. Die Ergebnisse von Fonseca et al. spiegeln somit gut die Ergebnisse von Byron und Brown/Adamson wider, die bereits in den 70ern des 20. Jhd. zum Schluss kamen, dass unter suboptimalen EPO Konzentrationen das erythroide *in vitro* Wachstum stimuliert werden kann [25, 29]. Da in der Studie von Fonseca et al. keine α 1-spezifischen Agonisten verwendet wurden, steht die Studie prinzipiell auch nicht im Widerspruch mit den eigenen Ergebnissen.

Jedoch geht die Erkenntnis, dass α 1-adrenerge Agonisten mit hoher Selektivität *in vitro* die Genese von erythroiden Zellen inhibieren, analog zur Erkenntnis von Livingston et al. dass in Traumapatienten zwar die Zahl der Erythrozyten im peripherem Blut herabgesetzt wird, die Leukozyten jedoch nur funktionell retardiert, aber nicht zahlenmäßig reduziert sind [218]. Die Ergebnisse der eigenen Studie würden auf eine ROS bedingte Inhibition der Genese von Erythrozyten im Knochenmark von Traumapatienten über α 1-adrenerge Rezeptoren auf erythroiden Progenitoren hindeuten. Man kann der Studie von Fonseca et al. auch entnehmen, dass der Katecholaminspiegel im Urin (= repräsentativ für Katecholaminspiegel im Organismus) von Traumapatienten über mehrere Tage nach dem traumatischen Ereignis (z.B. Unfall) hinweg erhöht ist [30]. Es ist davon auszugehen, dass durch die erhöhten Katecholaminspiegel im Serum der Traumapatienten der natürliche Rhythmus der Abgabe von Noradrenalin in das Knochenmark, wie von Maestroni et al. beschrieben wurde, gestört wird und dies die sympathische Regulation der Hämatopoiese „aus dem Takt bringt“ [8]. Auch in den *in vitro* Nabelschnurblut-Assays waren die Progenitoren einem chronischem

adrenergem Stress ausgesetzt, was eine weitere Ähnlichkeit zu der Situation in den Traumapatienten wäre.

Adrenerger Stress bzw. erhöhte sympathische Aktivität wird nicht nur in Zusammenhang gebracht mit der Ausprägung von Anämie nach Traumata, sondern auch mit physiologischen Veränderungen im menschlichen (und tierischen) Organismus während des natürlichen Alterungsprozesses [219]. Es konnte gezeigt werden, dass die sympathoadrenale Aktivität im Menschen pro Lebensdekade um 10 - 15% zunimmt [219]. Aus den rezenten Studien (inklusive dieser Dissertation) der Gruppe Schauenstein kann man entnehmen, dass adrenerger Stress sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu einem eingeschränktem Proliferationspotential von hämatopoietischen Progenitorzellen im Menschen sowie in Maus und Ratte führt. [51, 52, Quan et al. unpublizierte Daten, 2008]. Die Wachstumshemmung der Progenitorzellen war dabei stets mit der intrazellulären Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen verbunden, was eine Verbindung zwischen der Generierung von adrenergen Stress und oxidativem Stress herstellt. In einer Studie in der Ratte wurde die Replating Capacity von GM-CFU Kolonien aus dem Knochenmark zwischen juvenilen und alten Tieren verglichen [220]. Der Vergleich zeigte eine hochsignifikante altersabhängige Abnahme der Proliferationskapazität der Progenitorzellen [220]. Dieses Ergebnis war analog zu den Ergebnissen der Noradrenalin behandelten Ratten, in denen ebenso eine Abnahme des Proliferationspotentials im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren gesehen werden konnte (Quan et al. unpublizierte Ergebnisse, 2008). Kurzzeitiger adrenerger Stress führt folglich zu ähnlichen Effekten in Bezug auf die Proliferationskapazität der Progenitorzellen wie der natürliche Alterungsprozess.

Reaktive Sauerstoffradikale sind laut der *free radical theory of ageing*, die bereits 1956 von Harman entwickelt wurde, die treibende Kraft des Alterungsprozesses [149, 150]. Ito et al. demonstrierten, dass reaktive Sauerstoffspezies über p38 das Self renewal und das Überleben von murinen hämatopoietischen Stammzellen hemmen und so zu einer Erschöpfung des Stammzellenpools führen [182]. In der murinen Studie von Schraml et al. konnte ein Zusammenhang zwischen adrenergem Stress, der Generierung von oxidativem Stress und der Aktivierung von p38 belegt werden [52], was auf eine Beteiligung von adrenergem Stress am Alterungsprozess von HSC hindeutet.

Im verwendeten Erythroleukämiezell-Modell konnte zwar der toxische Effekt der adrenergen Agonisten auf die Zellen durch Inhibition von p38 nicht rückgängig gemacht werden, doch führte die Agonisten bedingte Sauerstoffradikalproduktion ebenso zu Wachstumshemmung und Zelltod.

Die Daten aus dieser und anderen Studien bezüglich der Wirkung von adrenergem Stress auf Stamm- und Progenitorzellen lassen den Schluss zu, dass chronischer Stress und die

erhöhte sympathische Aktivität während des natürlichen Alterungsprozesses auch den Stammzellpool im Knochenmark schädigen und somit auch die Generierung von allen Zelltypen des peripheren Blutes beeinflusst.

Die gesammelten Daten aus dieser Arbeit weisen darauf hin, dass durch Modulation von intrazellulären Signalsystemen über α 1-adrenerge Rezeptoren sowohl auf physiologischen Progenitoren wie auch leukämischen Progenitorzellen das Wachstum, die Differenzierung und die Induktion von Zelltod von Progenitorzellen beeinflusst werden kann. Die Studie zeigt damit eine mögliche bis dato noch unbekannte Wechselwirkung des sympathischen Nervensystems auf die Regulation der Erythropoiese und der Megakaryopoiese auf.

Es ist jedoch anzumerken, dass durch diese Studie nur der Grundstein für weiterführende Arbeiten gelegt werden konnte. Es wurden zwar prinzipielle zelluläre Mechanismen betreffend der Wirkung von adrenergen Modulatoren in hämatopoietischen Zellen und Zelllinien, wie die Induktion von Zelltod oder Differenzierung aufgeklärt, jedoch blieben die intrazellulären Signalsysteme, die durch die adrenergen Modulatoren aktiviert bzw. inaktiviert werden noch im Dunklen. Weitere intensive Forschungen sind noch vonnöten, vor allem auf dem Gebiet der Molekularbiologie, um das Signalsystem der α 1-adrenergen Rezeptoren in erythroiden Progenitoren zu entschlüsseln. Auch wird es nötig sein, die in den Erythroleukämiezellen etablierten Methoden betreffend der Wirkungen der α 1-adrenergen Antagonisten auf die megakaryozytäre Differenzierung in physiologischen Progenitoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen.

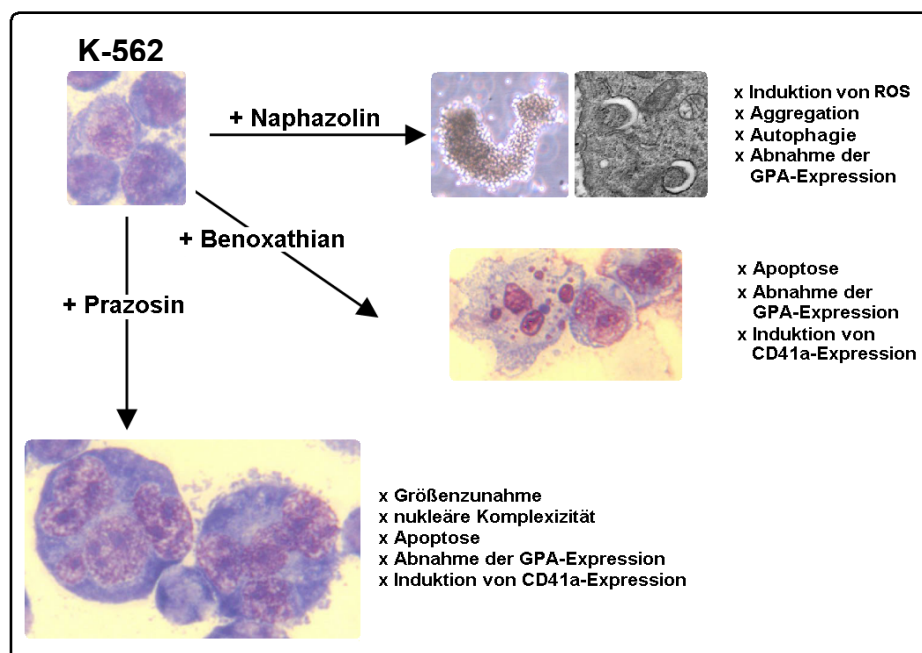


Abb.49: In einer Übersicht werden die Haupteffekte der adrenergen Modulatoren Naphazolin, Benoxathian und Prazosin auf Wachstumsverhalten, Zelltod und Differenzierungseigenschaften der K-562 Zelllinie dargestellt.

5 Anhang

5.1 Abkürzungen

- **BFU-E:** Burst Forming Unit- Erythrocyte
- **CASY:** Cell Counter & Analyser System
- **CD:** Cluster of Differentiation
- **CFU:** Colony Forming Unit
- **CFU-Assay:** Colony Forming Unit-Assay
- **CFU-E:** Colony Forming Unit- Erythrocyte
- **CFU-G:** Colony Forming Unit- Granulocyte
- **CFU-GEMM:** Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte
- **CFU-GM:** Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage
- **CFU-M:** Colony Forming Unit-Macrophage
- **BAPTA:** 1,2-Bis(O-Aminophenoxy)ethan- N,N,N',N'-Tetraacetat
- **CMF-PBS:** Calcium/Magnesium freier Phosphatpuffer
- **COMT:** Catechol-O-Methyltransferase
- **DAPI:** 4',6-Diamidino-2-Phenylindol
- **DBH:** Dopamin β - Hydroxylase
- **DCFH-DA:** 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetate
- **DMSO:** Dimethylsulfoxid
- **EDTA:** Ethylen-Diamin-Tetraacetat
- **EPO:** Erythropoietin
- **EPOR:** Erythropoietin-Rezeptor
- **ELMI:** Elektronenmikroskopie
- **ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinases
- **FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorting/Durchflusscytometrie
- **FBS:** Fetal Bovine Serum/fetales Rinderserum
- **FITC:** Fluorescein Isothiocyanat
- **FSC:** Forewardscatter
- **G-CSF:** Granulocyte- Colony stimulating Factor
- **GPA:** Glycophorin-a
- **HEL:** Human Erythroleukemia
- **HIF:** Hypoxia Inducible Factor
- **HPC:** Hematopoietic Progenitor Cell
- **HPLC:** High Performance Liquid Chromatography
- **HSC:** Hematopoietic Stem Cell/ Hämatopietische Stammzelle

- **IMDM:** Iscove's Modified Dulbeccos's Medium
- **iPS:** induced Pluripotent Stem Cell
- **KHCF:** Kaliumhexacyanoferrat
- **L-NNA:** N^G-nitro-L-Arginine
- **LT-HSC:** Long Time-Repopulating-HSC
- **MAO:** Monoaminoxidase
- **MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase
- **MEM-α:** Minimal Essential Medium-α
- **MEK1/2:** Mitogen Activated Kinase Kinases 1/2
- **NAC:** N-Acetyl-Cystein
- **NO:** Nitric Oxide/ Stickstoff-Monoxid
- **PARP:** Poly ADP-Ribose Polymerase
- **PDTC:** Pyrollidin-Dithiocarbamat
- **PE:** Phycoerythrin
- **PECy5:** Phycoerythrin-Cy5 Tandem-Fluoreszenzfarbstoff
- **PKA:** Proteinkinase-C
- **PKC:** Proteinkinase-A
- **PLC:** Phospholipase-C
- **PMA:** Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
- **ROS:** Reactive Oxygen Species
- **RT-PCR:** Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
- **SCF:** Stem Cell Factor
- **SNP:** Sodium Nitroprussid
- **SSC:** Sidescatter
- **STAT5:** Signal Transducer and Activator 5
- **ST-HSC:** Short Time-Repopulating-HSC
- **TEM:** Transelektronenmikroskopie
- **TRIS:** Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
- **UCB:** Umbilical Cord Blood /Nabelschnurblut

5.2 Publikationen

Artikel in internationalen Fachzeitschriften:

Schraml E, Quan P, Stelzer I, Fuchs R, Skalicky M, Viidik A, Schauenstein K. Norepinephrine treatment and aging lead to systemic and intracellular oxidative stress in rats. *Exp Gerontol.* 2007;42:1072-1078.

Schraml E, Fuchs R, Kotzbeck P, Grillari J. Acute adrenergic stress inhibits proliferation of murine haematopoietic progenitor cells via p38/MAPK signalling. Online verfügbar bei *Stem Cells Dev.*, 2008.

Stelzer I, Fuchs R, Schraml E, Quan P, Quehenberger R, Hansalik M, Pietschmann P, Skalicky M, Viidik A, Schauenstein K. Decline of bone marrow derived hematopoietic stem and progenitor cell quality during aging in the rat. Angenommenes Manuskript bei *Exp Aging Res.* Voraussichtliches Erscheinen: 2009.

Fuchs R, Stelzer I, Haas HS, Leitinger G, Schauenstein K, Sadjak A. The α -adrenergic receptor antagonists benoxathian and prazosin induce apoptosis and a switch towards megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Ann Hematol.* 2009.

Posterpräsentationen:

Fuchs R, Schauenstein K: Differential *in vitro* effects of alpha and beta adrenergic agonists on growth and differentiation of hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Graz, 12/2005.

Stelzer I, Fuchs R, Skalicky M, Viidik A, Schauenstein K: Decline of bone marrow derived hemopoietic stem and progenitor cell quality during ageing in the rat. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Graz, 12/2005.

Schraml E, Stelzer I, Fuchs R, Schwarzenberger E, Heintz E, Schauenstein K: Measurement of free thiol-groups of serum proteins (RSH) provides information about oxidative stress in peripheral immune tissues. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Graz, 12/2005.

Schraml E, Fuchs R, Kotzbeck P, Grillari J. Acute adrenergic stress inhibits proliferation of murine haematopoietic progenitor cells via p38/MAPK signalling. Proceedings of the Ninth International Symposium on the Neurobiology and Neuroendocrinology of Aging. Bregenz, JUL 20-25, 2008. Abstract in: *Experimental Gerontology.* 2009;44:1-2.

Fuchs R, Stelzer I, Leitinger G, Haas HS, Sadjak A: Control of differentiation and cell death of human erythroleukemia cells by alpha1-adrenergic mechanisms. 9. Multinationale Konferenz für Mikroskopie 2009, Graz, 08/2009.

Vorträge bei wissenschaftlichen Veranstaltungen:

Fuchs R, Schauenstein K: Die adrenerge Beeinflussung der Hämatopoese. Jahrestagung der Österreichischen Physiologischen Gesellschaft, Graz, 9/2005.

Schraml E, Stelzer I, Fuchs R, Quan P, Schauenstein K:

Adrenergic/Oxidative Stress and the Ageing of Hemopoietic Stem Cells.
 4TH EUROPEAN CONGRESS OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY GRAZ, AUSTRIA,
 JULY 5-9, 2006. Abstract in: Am J Reprod Immunol.2006;56:1-61.

5.3 Lösungen, Medien und Puffer

Calcium und Magnesium freier Phosphatpuffer (CMF-PBS)

NaCl	8g/l
KCl	0,3g/l
Glucose x 1H ₂ O	2g/l
KH ₂ PO ₄	20mg/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	91,4g/l
pH: 7,4	

Pufferlösungen für den Comet-Assay

Lyse-Puffer

NaCl	146,1g/l
Na ₂ EDTA x2H ₂ O	37,2g/l
TRIS	1,2g/l
NaOH	8g/l
Triton X-100 *	1%
pH: 10	

*erst kurzfristig vor Verwendung zugeben

Elektrophorese-Puffer

Der Elektrophoresepuffer wird für jede Anwendung frisch zubereitet.

NaOH	12g/l
Na ₂ EDTA x2H ₂ O	372,2mg/l
pH: >13	

Neutralisationslösung

TRIS	48,5g/l
Mit rauchender HCl auf pH 7,4 einstellen.	

Agarosen

1% Low melting Agarose (LE) (BMA)	gelöst in CMF-PBS
1% Normal Melting Agarose (ME) (Promega) gelöst in Aqua bidest	

Stammzellmedium zur *In vitro* Kultivierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut

Human Methylcellulose Complete Media without Epo (R&D Systems)

1,3% Methylcellulose (1500 cps)
25% Fetales Bovines Serum
2% Bovines Serum Albumin
2 mM L-Glutamin
5 x 10 ⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol
50 ng/ml rh Stem Cell Factor
10 ng/ml rh GM-CSF
10 ng/ml rh IL-3
Iscove's MDM

**METHOCULT™ GF H4434
“COMPLETE” METHYLCELLULOSE
MEDIUM WITH RECOMBINANT
CYTOKINES (Stem Cell Technologies)**

1% Methylcellulose (4000 cps)
30% Fetales Bovines Serum
1% Bovines Serum Albumin
1x10 ⁻⁴ M 2-Mercaptoethanol
2 mM L-Glutamin
50 ng/mL rh Stem Cell Factor
10 ng/mL rh GM-CSF
10 ng/mL rh IL-3
3 U/mL rh Erythropoietin
Iscove's MDM

Lösungen für die HPLC-Bestimmung von Katecholaminen

Extraktionslösung 1

2M NH ₄ Cl *
0,5% EDTA
0,2% Diphenylboratethanolaminkomplex

*: pH mit 2M NH₄OH auf 8,5 einstellen

Extraktionslösung 2

99 ml n-Heptan
1 ml n-Octanol
0,25% Tetraoctylammoniumbromid

Laufmittel

Zu 500 ml 0,05 M Trichloressigsäure (pH 4 mit Na-Acetat eingestellt) werden

100 mg EDTA
80 mg NaCl
400 mg Heptansulfonsäure

zugemischt und auf 1l mit Aqua bidest aufgefüllt.

Färbelösung für die Propidiumiodid-Färbung der DNA

Auf der Basis von CMF-Puffer :

50µg/ml Propidiumiodid (Sigma)
0,1 mg/ml RNase A (Sigma)
0,1% Natrium Citrat
0,1% Igepal CA-630 Detergens (Sigma)

5.4 Literaturverzeichnis

1. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52:595-638.
2. Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2003;23:1-25.
3. Giubilei F, Calderaro C, Antonini G, et al. Increased lymphocyte dopamine beta-hydroxylase immunoreactivity in Alzheimer's disease: compensatory response to cholinergic deficit? *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004;18:338-341.
4. Schauenstein K, Felsner P, Rinner I, et al. *In vivo* immunomodulation by peripheral adrenergic and cholinergic agonists/antagonists in rat and mouse models. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:618-627.
5. Schauenstein K, Rinner I, Felsner P, Stevenson R, Haas H, Liebmann P. Mens sana in corpore sano--and vice versa. The role of the autonomic nervous system in the immune-neuroendocrine dialogue. *Int J Hyg Environ Health.* 2001;204:75-79.
6. Gruber-Olipitz M, Stevenson R, Olipitz W, et al. Transcriptional pattern analysis of adrenergic immunoregulation in mice. Twelve hours norepinephrine treatment alters the expression of a set of genes involved in monocyte activation and leukocyte trafficking. *J Neuroimmunol.* 2004;155:136-142.
7. Tabarowski Z, Gibson-Berry K, Felten SY. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem.* 1996;98:453-457.
8. Maestroni GJ. Neurohormones and catecholamines as functional components of the bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:29-37.
9. Tang Y, Shankar R, Gamelli R, Jones S. Dynamic norepinephrine alterations in bone marrow: evidence of functional innervation. *J Neuroimmunol.* 1999;96:182-189.
10. Artico M, Bosco S, Cavallotti C, et al. Noradrenergic and cholinergic innervation of the bone marrow. *Int J Mol Med.* 2002;10:77-80.
11. Benestad HB, Strom-Gundersen I, Iversen PO, Haug E, Nja A. No neuronal regulation of murine bone marrow function. *Blood.* 1998;91:1280-1287.
12. Iversen PO, Hjeltnes N, Holm B, et al. Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood.* 2000;96:2081-2083.

13. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>
14. Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451:141-146.
15. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics- recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82:252-264.
16. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, et al. Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells In the Bone Marrow Niches Organize the Hierarchical Structure of Hematopoiesis. *Stem Cells*. 2008.
17. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:1-14.
18. Ho, AD, Haas R, Champlin RE (Editoren): Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Marcel Dekker, INC., New York, Basel, 2000.
19. Wang W, Horner DN, Chen WL, Zandstra PW, Audet J. Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99:1261-1272.
20. Sherley JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem Cells*. 2002;20:561-572.
21. Bullock TE, Wen B, Marley SB, Gordon MY. Potential of CD34 in the regulation of symmetrical and asymmetrical divisions by hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 2007;25:844-851.
22. Marciniak-Czochra, A., Stiehl, T., Ho, A. D., et al. Modeling of Asymmetric Cell Division in Hematopoietic Stem Cells - Regulation of Self-Renewal is Essential for Efficient Repopulation. *Stem Cells Dev* 2008.
23. Maestroni GJ, Conti A. Modulation of hematopoiesis via alpha 1-adrenergic receptors on bone marrow cells. *Exp Hematol*. 1994;22:313-320.
24. Muthu K, Iyer S, He L-K, et al. Murine Hematopoietic Stem cells and Progenitors Express Adrenergic Receptors. *J Neuroimmunol*. 2007;186:27-36.
25. Byron JW. Evidence for a β 2-adrenergic receptor initiating DNA synthesis in haemopoetic stem cells. *Exp Cell Res*. 1971:228-232.
26. Fink GD, Fisher JW. Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists. I. Characterization of activity in polycythemic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977;202:192-198.
27. Fink GD, Fisher JW. Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists. II. Mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977;202:199-208. Fink GD, Fisher JW.
28. Mladenovic J, Adamson JW. Adrenergic modulation of erythropoiesis: *in vitro* studies of colony-forming cells in normal and polycythaemic man. *Br J Haematol*. 1984;56:323-332.

29. Brown JE, Adamson JW. Modulation of *in vitro* erythropoiesis. The influence of beta-adrenergic agonists on erythroid colony formation. *J Clin Invest.* 1977;60:70-77.
30. Fonseca RB, Mohr AM, Wang L, et al. Adrenergic modulation of erythropoiesis following severe injury is mediated through bone marrow stroma. *Surg Infect (Larchmt).* 2004;5:385-393.
31. Fonseca RB, Mohr AM, Wang L, Sifri ZC, Rameshwar P, Livingston DH. The impact of a hypercatecholamine state on erythropoiesis following severe injury and the role of IL-6. *J Trauma.* 2005;59:884-889; discussion 889-890.
32. Cussac D, Schaak S, Denis C, Flordellis C, Calise D, Paris H. High level of alpha2-adrenoceptor in rat foetal liver and placenta is due to alpha2B-subtype expression in haematopoietic cells of the erythrocyte lineage. *Br J Pharmacol.* 2001;133:1387-1395.
33. Jansson CC, Kukkonen JP, Nasman J, et al. Protean agonism at alpha2A-adrenoceptors. *Mol Pharmacol.* 1998;53:963-968.
34. Yokusoglu M, Nevruz O, Baysan O, et al. The altered autonomic nervous system activity in iron deficiency anemia. *Tohoku J Exp Med.* 2007;212:397-402.
35. Obayashi K, Ando Y, Terazaki H, et al. Mechanism of anemia associated with autonomic dysfunction in rats. *Auton Neurosci.* 2000;82:123-129.
36. Maestroni GJ, Conti A, Pedrinis E. Effect of adrenergic agents on hematopoiesis after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood.* 1992;80:1178-1182.
37. Maestroni GJ, Conti A. Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. *Int J Immunopharmacol.* 1994;16:117-122.
38. Izaguirre V, Vargas M, Leon-Velarde F, et al. Inhibitory effect of an alpha 1-adrenergic antagonist on erythropoiesis in normoxic or hypoxic mice. *Int J Clin Lab Res.* 1994;24:213-216.
39. Maestroni GJ, Togni M, Covacci V. Norepinephrine protects mice from acute lethal doses of carboplatin. *Exp Hematol.* 1997;25:491-494.
40. Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 2006;124:407-421.
41. Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, et al. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol.* 2007;8:1123-1131.
42. Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol.* 1999;27:489-495.
43. Qiu YH, Cheng C, Dai L, Peng YP. Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. *J Neuroimmunol.* 2005;167:45-52
44. Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, et al. Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol.* 2003;135:47-55.

45. Wright CD, Chen Q, Baye NL, et al. Nuclear α 1-Adrenergic Receptors Signal Activated ERK Localization to Caveolae in Adult Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2008.
46. Koshimizu TA, Yamauchi J, Hirasawa A, Tanoue A, Tsujimoto G. Recent progress in alpha 1-adrenoceptor pharmacology. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:401-408.
47. Scheiderer CL, Smith CC, McCutchen E, et al. Coactivation of M(1) muscarinic and alpha1 adrenergic receptors stimulates extracellular signal-regulated protein kinase and induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus. *J Neurosci*. 2008;28:5350-5358.
48. Zhong H, Minneman KP. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways in PC12 cells by closely related alpha1-adrenergic receptor subtypes. *J Neurochem*. 1999;72:2388-2396.
49. Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffman BB. Contrasting signaling pathways of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor subtype activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH3T3 cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13:3-14.
50. Berts A, Zhong H, Minneman KP. No role for Ca⁺⁺ or protein kinase C in alpha-1A adrenergic receptor activation of mitogen-activated protein kinase pathways in transfected PC12 cells. *Mol Pharmacol*. 1999;55:296-303.
51. Schraml E, Fuchs R, Kotzbeck P, Grillari J. Acute adrenergic stress inhibits proliferation of murine haematopoietic progenitor cells via p38/MAPK signalling. *Stem Cells Dev*. 2008.
52. Schraml E, Quan P, Stelzer I, et al. Norepinephrine treatment and aging lead to systemic and intracellular oxidative stress in rats. *Exp Gerontol*. 2007;42:1072-1078.
53. Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffman BB. Contrasting signaling pathways of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor subtype activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH3T3 cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13:3-14.
54. Peng M, Li Y, Luo Z, Liu C, Laties AM, Wen R. Alpha2-adrenergic agonists selectively activate extracellular signal-regulated kinases in Muller cells *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1721-1726.
55. Cussac D, Schaak S, Gales C, Flordellis C, Denis C, Paris H. alpha(2B)-Adrenergic receptors activate MAPK and modulate proliferation of primary cultured proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F943-952.
56. Flordellis CS, Berguerand M, Gouache P, et al. Alpha 2 adrenergic receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells activate differentially mitogen-activated protein kinase by a p21ras independent pathway. *J Biol Chem*. 1995;270:3491-3494.
57. Karkoulis G, Mastrogianni O, Lympelopoulos A, Paris H, Flordellis C. alpha(2)-Adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR.

- Cell Signal. 2006;18:729-739.
58. Ma YC, Huang XY. Novel signaling pathway through the beta-adrenergic receptor. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:46-49.
 59. Huang J, Sun Y, Huang XY. Distinct roles for Src tyrosine kinase in beta2-adrenergic receptor signaling to MAPK and in receptor internalization. *J Biol Chem*. 2004;279:21637-21642.
 60. Knudtzon S. *In vitro* growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*. 1974;43:357-361.
 61. Fauser AA, Messner HA. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood*. 1978;52:1243-1248.
 62. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103:1669-1675.
 63. El-Badri NS. Endothelial progenitor cells from cord blood: a new therapeutic promise? *Stem Cells Dev*. 2005;14:237-238.
 64. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3828-3832.
 65. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-1178.
 66. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, et al. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;101:4711-4713.
 67. Bruno S, Gammaitoni L, Gunetti M, et al. Different growth factor requirements for the *ex vivo* amplification of transplantable human cord blood cells in a NOD/SCID mouse model. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001;15:38-48.
 68. Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, et al. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med*. 2007;2:371-382.
 69. Sullivan MJ. Banking on cord blood stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:555-563.
 70. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*. 1996;81:404-409.
 71. Cardoso AA, Li ML, Batard P, et al. Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft Adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8707-8711.
 72. Mayani H, Gutierrez-Rodriguez M, Espinoza L, et al. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells*. 1998;16:127-135.

73. Martin P, Papayannopoulou T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*. 1982;216:1233-1235.
74. Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. *JAK2* V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006;20:471–476.
75. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood*. 2000;96:2269-2276.
76. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
77. Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K-562-a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer*. 1979;23:143-147.
78. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45:321-334.
79. Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res*. 2005;65:2047-2053.
80. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 2003;101:2940-2954.
81. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J*. 1997;16:6151-6161.
82. Marley SB, Gordon MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:13-25.
83. Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work? *Acta Haematol*. 2008;119:212-217.
84. Piwocka K, Vejda S, Cotter TG, O'Sullivan GC, McKenna SL. Bcr-Abl reduces endoplasmic reticulum releasable calcium levels by a Bcl-2-independent mechanism and inhibits calcium-dependent apoptotic signaling. *Blood*. 2006;107:4003-4010.
85. Shelly C, Petruzzelli L, Herrera R. PMA-induced phenotypic changes in K-562 cells: MAPK-dependent and -independent events. *Leukemia*. 1998;12:1951-1961.
86. Zauli G, Gibellini D, Vitale M, et al. The induction of megakaryocyte differentiation is accompanied by selective Ser¹³³ phosphorylation of the transcription factor CREB in both HEL cell line and primary CD34⁺ cells. *Blood*. 1998;92:472-480.
87. Lerga A, Crespo P, Berciano M, et al. Regulation of c-myc and max in megakaryocytic and monocytic-macrophagic differentiation of K-562 cells induced by protein kinase C modifiers: c-myc is down-regulated but does not inhibit differentiation. *Cell Growth Differ*. 1999;10:639–654.
88. Long MW, Heffner CH, Williams JL, Peters C, Prochownik EV. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest*. 1990; 85:1072-1084.

89. Classen CF, Gnekow A, Debatin KM. Terminal differentiation *in vitro* of patient-derived post-TMD megakaryoblastic AML cells. *Ann Hematol.* 2003;82:506-510.
90. Bermejo R, Vilaboa N, Cales C. Regulation of CDC6, geminin, and CDT1 in human cells that undergo polyploidization. *Mol Biol Cell.* 2002;18:6679-6697.
91. Huo XF, Yu J, Peng H, et al. Differential expression changes in K-562 cells during the hemin-induced erythroid differentiation and the phorbol myristate acetate (PMA)-induced megakaryocytic differentiation. *Mol Cell Biochem.* 2006;292:155-167.
92. Kucukkaya B, Arslan DO, Kan B. Role of G proteins and ERK activation in hemin-induced erythroid differentiation of K-562 cells. *Life Sci.* 2006;78:1217-1224.
93. Jacquet A, Herrant M, Legros L, et al. Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K-562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J.* 2003;17:2160-2162.
94. He J, He Q. Effects of prazosin on the proliferation and apoptosis of K-562 leukemia cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005;30:562-565.
95. Gauwerky C, Golde DW. Hormonal effects on cell proliferation in a human erythroleukemia cell line (K-562). *Blood.* 1980;56:886-891.
96. Criddle DN, Gillies S, Baumgartner-Wilson HK, et al. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 2006;281:40485-40492.
97. Birnboim HC, Sandhu JK. Levels of DNA strand breaks and superoxide in phorbol ester-treated human granulocytes. *J Cell Biochem.* 1997;66:219-228.
98. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-191.
99. Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, et al. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 2003;51:873-885.
100. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 1990;122:86-94.
101. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:897-907.
102. Zhan Y, van de Water B, Wang Y, Stevens JL. The roles of Caspase 3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene.* 1999;18:6505-6512.
103. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142:231-255.
104. Hsiao CH, Li W, Lou TF, Baliga BS, Pace BS. Fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves generation of reactive oxygen species. *Exp Hematol.* 2006;34:264-273.

105. Verrax J, Stockis J, Tison A, Taper HS, Calderon PB. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K-562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:671-680.
106. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:6-20.
107. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C817-833.
108. Poole J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Rev.* 2000;14:31-43.
109. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, et al. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J.* 2005;24:2354-2366.
110. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004;23:2891-2906.
111. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:663-669.
112. Fader CM, Colombo MI. Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy.* 2006;2:122-125.
113. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis.* 2003;18:159-166.
114. Wiklund SJ, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis.* 2003;18:167-175.
115. Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:887-897.
116. Mould AP, Garratt AN, Askari JA, Akiyama SK, Humphries MJ. Regulation of integrin alpha 5 beta 1 function by anti-integrin antibodies and divalent cations. *Biochem Soc Trans.* 1995;23:395S.
117. Cohen J, Eckstein L, Gutman Y. The mechanism of alpha-adrenergic inhibition of catecholamine release. *Br J Pharmacol.* 1980;71:135-142.
118. Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* 2003;3:157-168.
119. English LH, Macara IG, Cantley LC. Vanadium stimulates the (Na⁺,K⁺) pump in friend erythroleukemia cells and blocks erythropoiesis. *J Cell Biol.* 1983;97:1299-1302.
120. Mahaut-Smith MP, Thomas D, Higham AB, et al. Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophys J.* 2003;84:2646-2654.
121. Lannutti BJ, Minear J, Blake N, Drachman JG. Increased megakaryocytopoiesis in Lyn-deficient mice. *Oncogene.* 2006;25:3316-3324.

122. Minneman KP, Fox AW, Abel PW. Occupancy of alpha 1-adrenergic receptors and contraction of rat vas deferens. *Mol Pharmacol.* 1983;23:359-368.
123. Diaz-Toledo A, Marti MC. Relationship between alpha-adrenoceptor occupancy and contractile response in rat vas deferens. Experimental and theoretical analysis. *Eur J Pharmacol.* 1988;156:315-324.
124. Lin SC, Chueh SC, Hsiao CJ, et al. Prazosin displays anticancer activity against human prostate cancers: targeting DNA and cell cycle. *Neoplasia.* 2007;9:830-839.
125. Konwalinka G, Geissler D, Peschel C, et al. Human erythropoiesis *in vitro* and the source of burst-promoting activity in a serum-free system. *Exp Hematol.* 1986;14:899-903.
126. Cheung JO, Casals-Pascual C, Roberts DJ, Watt SM. A small-scale serum-free liquid cell culture model of erythropoiesis to assess the effects of exogenous factors. *J Immunol Methods.* 2007;319:104-117.
127. Jung YJ, Cha JE, Kim HJ, et al. Erythropoietin-independent and -dependent stages during *in vitro* erythropoiesis. *Acta Haematol.* 2007;118:222-225.
128. Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Editoren), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer Verlag, 2001.
129. Ahrens PB. Enhancement of phorbol ester induced cell aggregation after alterations in asparagine-linked oligosaccharides. *Biol Cell.* 1993;77:255-260.
130. Jacquet A, Herrant M, Defamie V, et al. A survey of the signaling pathways involved in megakaryocytic differentiation of the human K-562 leukemia cell line by molecular and c-DNA array analysis. *Oncogene.* 2006;25:781-794.
131. Grassel S, Cohen IR, Murdoch AD, Eichstetter I, Iozzo RV. The proteoglycan perlecan is expressed in the erythroleukemia cell line K-562 and is upregulated by sodium butyrate and phorbol ester. *Mol Cell Biochem.* 1995;145:61-68.
132. Van der Velde-Zimmerman D, Smits AJ, Verdaasdonk MA, et al. beta1-Integrins dominate cell traffic of leukemic cells in human bone-marrow stroma. *Int J Cancer.* 1996;66:225-233.
133. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 2006;107:102-108.
134. Stoeck A, Keller S, Riedle S, et al. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J.* 2006;393:609-618.
135. Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, et al. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell.* 2003;115:139-150.
136. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K-562 cells. *J Biol Chem.* 2003;278:20083-20090.
137. Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of

- metabolic stress. *Autophagy*. 2008;4:563-566.
138. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*. 2003;9:65-76.
 139. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2:1509-1518
 140. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10:51-64.
 141. Mishima Y, Terui Y, Taniyama A, et al. Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci*. 2008;99:2200-2208.
 142. Margineantu DH, Emerson CB, Diaz D, Hockenbery DM. Hsp90 inhibition decreases mitochondrial protein turnover. *PLoS ONE*. 2007;2:e1066.
 143. Kristian T, Pivovarova NB, Fiskum G, Andrews SB. Calcium-induced precipitate formation in brain mitochondria: composition, calcium capacity, and retention. *J Neurochem*. 2007;102:1346-1356.
 144. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000;529 Pt 1:57-68.
 145. Hidalgo C, Donoso P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1275-1312.
 146. Mao W, Qin F, Iwai C, Vulapalli R, Keng PC, Liang CS. Extracellular norepinephrine reduces neuronal uptake of norepinephrine by oxidative stress in PC12 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H29-39.
 147. Mao W, Iwai C, Qin F, Liang CS. Norepinephrine induces endoplasmic reticulum stress and downregulation of norepinephrine transporter density in PC12 cells via oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H2381-2389.
 148. Qin F, Rounds NK, Mao W, Kawai K, Liang CS. Antioxidant vitamins prevent cardiomyocyte apoptosis produced by norepinephrine infusion in ferrets. *Cardiovasc Res*. 2001;51:736-748.
 149. Harman D. Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J Gerontol*. 1968;23:476-482.
 150. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998;78:547-581.
 151. Passos JF, Von Zglinicki T. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free Radic Res*. 2006;40:1277-1283
 152. Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf O, Allsop D. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Curr Top Med Chem*. 2001;1:507-517.

153. Sattler M, Winkler T, Verma S, et al. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood*. 1999;93:2928-2935.
154. Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T, Miura O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell Signal*. 2006;18:174-182.
155. Nagata M, Arimitsu N, Ito T, Sekimizu K. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine inhibits erythropoietin-induced differentiation of erythroid progenitors derived from mouse fetal liver. *Cell Biol Int*. 2007;31:252-256.
156. Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem*. 2006;281:18177-18183.
157. Ohashi T, Mizutani A, Murakami A, Kojo S, Ishii T, Taketani S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett*. 2002;511:21-27.
158. Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S221-226.
159. de Mendez I, Leto TL. Functional reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase by transfection of its multiple components in a heterologous system. *Blood*. 1995;85:1104-1110.
160. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:18525-18530.
161. Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*. 2007;17:422-427.
162. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 2007;26:1749-1760.
163. Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:C1082-1088.
164. Starkov AA, Polster BM, Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem*. 2002;83:220-228.
165. Arrington DD, Van Vleet TR, Schnellmann RG. Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:C1159-1171.
166. Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*. 2007;14:1576-1582.
167. Soboloff J, Berger SA. Sustained ER Ca²⁺ depletion suppresses protein synthesis and induces activation-enhanced cell death in mast cells. *J Biol Chem*. 2002;277:13812-13820.

168. Lodish HF, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1992;267:12753-12760.
169. Zhang Y, Berger SA. Increased calcium influx and ribosomal content correlate with resistance to endoplasmic reticulum stress-induced cell death in mutant leukemia cell lines. *J Biol Chem.* 2004;279:6507-6516.
170. Gommerman JL, Berger SA. Protection from apoptosis by steel factor but not interleukin-3 is reversed through blockade of calcium influx. *Blood.* 1998;91:1891-1900.
171. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2007;117:2133-2144.
172. Ghaffari S, Jagani Z, Kitidis C, Lodish HF, Khosravi-Far R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6523-6528.
173. Piwocka K, Vejda S, Cotter TG, O'Sullivan GC, McKenna SL. Bcr-Abl reduces endoplasmic reticulum releasable calcium levels by a Bcl-2-independent mechanism and inhibits calcium-dependent apoptotic signaling. *Blood.* 2006;107:4003-4010.
174. Tong Q, Chu X, Cheung JY, et al. Erythropoietin-modulated calcium influx through TRPC2 is mediated by phospholipase Cgamma and IP3R. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C1667-1678.
175. Schaefer A, Magocsi M, Marquardt H. Signalling mechanisms in erythropoiesis: the enigmatic role of calcium. *Cell Signal.* 1997;9:483-495.
176. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* 2005;15:146-155.
177. Miller BA, Cheung JY. Mechanisms of erythropoietin signal transduction: involvement of calcium channels. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;206:263-267.
178. Bridges K, Levenson R, Housman D, Cantley L. Calcium regulates the commitment of murine erythroleukemia cells to terminal erythroid differentiation. *J Cell Biol.* 1981;90:542-544.
179. Misiti J, Spivak JL. Erythropoiesis *in vitro*. Role of calcium. *J Clin Invest.* 1979;64:1573-1579.
180. Mogami H, Lloyd Mills C, Gallacher DV. Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca²⁺, potentiates Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 2):645-651.
181. Takenouchi T, Ogihara K, Sato M, Kitani H. Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1726:177-186.

182. Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2006;12:446-451.
183. Dalmas DA, Tierney LA, Zhang C, et al. Effects of p38 MAP kinase inhibitors on the differentiation and maturation of erythroid progenitors. *Toxicol Pathol.* 2008;36:958-971.
184. Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST. JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. *Blood.* 2000;96:933-940.
185. Zhu QS, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ. G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood.* 2006;107:1847-1856.
186. Schmidt EK, Fichelson S, Feller SM. PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol.* 2004;2:7.
187. Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, et al. PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol.* 2006;135:117-128.
188. Ghaffari S, Kitidis C, Zhao W, et al. AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation. *Blood.* 2006;107:1888-1891.
189. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood.* 2006;107:907-915.
190. Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, et al. p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem.* 2001;276:3517-3523.
191. Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2000;275:7395-7402.
192. Shen HW, Chen YL, Chern CY, Kan WM. The effect of prostacyclin agonists on the differentiation of phorbol ester treated human erythroleukemia cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;83:231-236.
193. Waldrop BA, Mastalerz D, Piascik MT, Post GR. alpha(1B)- and alpha(1D)-Adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:83-90.
194. Guerriero R, Parolini I, Testa U, et al. Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes *J Cell Sci.* 2006:744-752.
195. Honner V, Docherty JR. Investigation of the subtypes of alpha1-adrenoceptor mediating contractions of rat vas deferens.

- Br J Pharmacol. 1999;128:1323-1331.
196. Erami C, Zhang H, Ho JG, French DM, Faber JE. Alpha(1)-adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall *in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283:H1577-1587.
 197. Rosenberg PA. Catecholamine toxicity in cerebral cortex in dissociated cell culture. J Neurosci. 1988;8:2887-2894.
 198. Mahan LC, Insel PA. Use of superoxide dismutase and catalase to protect catecholamines from oxidation in tissue culture studies. Anal Biochem. 1984;136:208-216.
 199. Engler KL, Rudd ML, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 beta. J Neuroimmunol. 2005;160:87-91.
 200. Wade SM, Lan K, Moore DJ, Neubig RR. Inverse agonist activity at the alpha(2A)-adrenergic receptor. Mol Pharmacol. 2001;59:532-542.
 201. Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P. Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle. Br J Pharmacol. 1996;119:158-164.
 202. Zhu J, Taniguchi T, Takauji R, Suzuki F, Tanaka T, Muramatsu I. Inverse agonism and neutral antagonism at a constitutively active alpha-1a adrenoceptor. Br J Pharmacol. 2000;131:546-552.
 203. Zhang L, Taniguchi T, Tanaka T, et al. Alpha-1 adrenoceptor up-regulation induced by prazosin but not KMD-3213 or reserpine in rats. Br J Pharmacol. 2002;135:1757-1764.
 204. Melchiorre C, Bolognesi ML, Budriesi R, et al. Search for selective antagonists at alpha 1-adrenoreceptors: neutral or negative antagonism? Farmaco. 1998;53:278-286.
 205. Rossier O, Abuin L, Fanelli F, Leonardi A, Cotecchia S. Inverse agonism and neutral antagonism at alpha(1a)- and alpha(1b)-adrenergic receptor subtypes. Mol Pharmacol. 1999;56:858-866.
 206. Pignini M, Brasili L, Giannella M, et al. Structure-activity relationships in 1,4-benzodioxan-related compounds. Investigation on the role of the dehydrodioxane ring on alpha 1-adrenoreceptor blocking activity. J Med Chem. 1988;31:2300-2304.
 207. von Lindern M, Parren-van Amelsvoort M, van Dijk T, et al. Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. J Biol Chem. 2000;275:34719-34727.
 208. Parker PJ, Bosca L, Dekker L, Goode NT, Hajibagheri N, Hansra G. Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: a model for down-regulation. Biochem Soc Trans. 1995;23:153-155.
 209. Leger DY, Liagre B, Beneytout JL. Low dose leflunomide activates PI3K/Akt signalling in erythroleukemia cells and reduces apoptosis induced by anticancer agents. Apoptosis. 2006;11:1747-1760.

210. Wang D, Li H, Yuan H, et al. Humanin delays apoptosis in K-562 cells by downregulation of P38 MAP kinase. *Apoptosis*. 2005;10:963-971.
211. Myklebust JH, Smeland EB, Josefsen D, Sioud M. Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood*. 2000;95:510-518.
212. Zhang Y, Wu Y, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Involvement of PKC signal pathways in oridonin-induced autophagy in HeLa cells: a protective mechanism against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:273-278.
213. Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem*. 1992;267:25798-25802.
214. Kirby RS. Expanding role of alpha adrenoceptor blockade in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Int J Clin Pract*. 1998;52:402-407
215. Garrison JB, Shaw YJ, Chen CS, Kyprianou N. Novel quinazoline-based compounds impair prostate tumorigenesis by targeting tumor vascularity. *Cancer Res*. 2007;67:11344-11352.
216. Williams A, Sarkar S, Cuddon P, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*. 2008;4:295-305.
217. Alvarez-Pitti J, Rodriguez-Varela A, Morales-Carpi C, Lurbe E, Estan L. Naphazoline intoxication in children. *Eur J Pediatr*. 2006;165:815-816.
218. Livingston DH, Anjaria D, Wu J, et al. Bone marrow failure following severe injury in humans. *Ann Surg*. 2003;238:748-753
219. Seals DR, Esler MD. Human ageing and the sympathoadrenal system. *J Physiol*. 2000;528:407-417.
220. Stelzer I, Fuchs R, Schraml E, et al. Decline of bone marrow derived hematopoietic stem and progenitor cell quality during aging in the rat. *Exp Aging Res*. 2009.

5.5 Kurzzusammenfassung der Dissertation

5.5.1 Deutsche Kurzzusammenfassung

Charakterisierung der adrenergen Beeinflussung von adulten hämatopoetischen Stammzellen

Zahlreiche Studien in den letzten Jahren konnten belegen, dass das sympathische Nervensystem über dessen primäre Transmittersubstanz Noradrenalin Einfluss auf die Zellen des Immunsystems nimmt. Über eine mögliche modulatorische Wirkung des sympathischen Nervensystems auf die Hämatopoese im Knochenmark existieren jedoch bis jetzt nur sehr wenige Daten. Um eine mögliche Einflussnahme des sympathischen Nervensystems auf das Wachstum und die Differenzierungskapazität von Stamm- und Progenitorzellen nachweisen zu können, wurden in einem *in vitro* Versuch Stamm- und Progenitorzellen aus dem humanen Nabelschnurblut isoliert und in klassischen Colony forming unit-Assays unter Zusatz von rezeptorspezifischen adrenergen Agonisten und Antagonisten kultiviert.

Es zeigte sich, dass in Stammzellkulturen durch alpha1-adrenerge Agonisten mit großer Selektivität das erythroide Wachstum supprimiert wird und es zu einer parallelen Anreicherung von myeloischen Zellen kommt. In einem parallel zu den Nabelschnurblut Progenitoren etablierten erythroiden Modellsystem mit humanen Erythroleukämie-Zelllinien konnte demonstriert werden, dass alpha1-adrenerge Agonisten in den Leukämiezellen die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen induzieren, die sowohl an der Suppression des erythroiden Phänotyps der Zellen beteiligt sind, als auch an der Induktion von autophagolytischem/nekrotischem Zelltod. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung von humanen Erythroleukämiezellen mit alpha1-adrenergen Antagonisten zu einem Umschalten des Differenzierungstypes der Zellen in Richtung megakaryozytärer Linie und zu einem apoptotischem Zelltod. Sowohl der Switch in Richtung megakaryozytärer Differenzierung als auch die Induktion von Apoptose durch die adrenergen Antagonisten kann durch adrenerge Agonisten attenuiert werden, was die Rezeptorabhängigkeit der beobachteten Effekte beweist.

Die erzielten Ergebnisse dieser Dissertation lassen darauf schließen, dass die Prozesse der erythroiden und megakaryozytären Differenzierung von unreifen Progenitorzellen im Knochenmark durch das sympathische Nervensystem über alpha1-adrenerge Rezeptoren moduliert wird. Es konnte somit eine neue mögliche Wechselwirkung zwischen dem sympathischen Nervensystem und der Hämatopoese enthüllt werden.

Eine pathophysiologische Relevanz der Studie besteht in der Erkenntnis, dass chronischer adrenerger Stress die Genese von erythroiden Zellen hemmt. Dies geht einher mit der klinischen Beobachtung, dass Traumapatienten, die hohe Katecholaminspiegel im Serum aufweisen, oft Anämien ausprägen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit besteht darin, dass durch adrenerge Antagonisten in Leukämiezellen reversibel Apoptose und Differenzierung induziert werden kann. Dieser Befund könnte zur Grundlage für weitere Studien werden, betreffend den Einsatz von adrenergen Antagonisten als Chemotherapeutika zur Behandlung von Leukämie.

5.5.2 Englische Kurzzusammenfassung (Abstract)

Characterisation of the adrenergic impact on growth and differentiation of adult hematopoietic stem cells

In the recent years the point of view got more and more pronounced that the stem cell compartment in the bone marrow is not only controlled through the cytokine network but also by signals from the nerve system through secreted neurohormons. As norepinephrine, the major transmitter substance of the sympathetic nerve system, was shown to be a potent modulator of peripheral immune functions, the role of norepinephrine on hematopoiesis should be investigated.

In an *in vitro* approach, stem and progenitor cells from human umbilical cord blood were cultivated in classical colony forming unit assays in the presence of receptor specific adrenergic agonists and antagonists.

The main result of these experiments is, that α 1-adrenergic agonists inhibit with high selectivity the generation of erythroid cells, while myeloid cells were enriched in the cell culture.

In a parallel established erythroid model system, using human erythroleukemia cell lines, it could be demonstrated that α 1-adrenergic agonist treatment induces the generation of reactive oxygen species which are participated both in the suppression of the erythroid phenotype and in the induction of an autophagolytic/necrotic cell death in erythroleukemia cells. In contrast to α 1-adrenergic agonists, α 1-adrenergic antagonists induce a switch towards megakaryocytic differentiation and apoptotic cell death in erythroleukemia cells. The effect of megakaryocytic differentiation and apoptosis by adrenergic antagonist treatment can be reversed by adrenergic agonists, revealing a receptor-dependent effect of the adrenergic drugs.

The obtained results of this study points out a new interaction between the sympathetic nerve system and hematopoiesis providing a new potential control mechanism of differentiation capacity and viability of immature progenitor cells through modulation of α 1-adrenergic receptors.

The obtained data also show pathophysiological relevance, as trauma patients often achieve severe anemia which was previously related to elevated plasma catecholamines. The suppression of erythropoiesis through α 1-adrenergic receptors on erythroid progenitors could be an explanation for this phenomenon. Furthermore concerning the proapoptotic and

differentiation inducing effects of adrenergic antagonists on leukemia cells, this study could be the basis for further research for the use of adrenergic antagonists as chemotherapeutic drugs treating leukemia.

5.6 Posterpräsentationen

5.6.1 Poster bei der Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Graz, 12/2005.

DIFFERENTIAL IN VITRO EFFECTS OF ALPHA- AND BETA-ADRENERGIC AGONISTS ON GROWTH AND DIFFERENTIATION OF HEMOPOIETIC STEM CELLS DERIVED FROM HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD



Fuchs R, Schauenstein K

Dept. of Pathophysiology, Center of Molecular Medicine, Med. Univ. Graz, Austria

Introduction

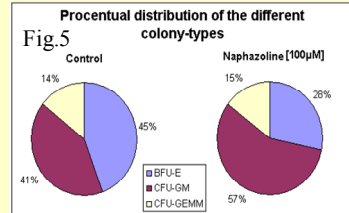
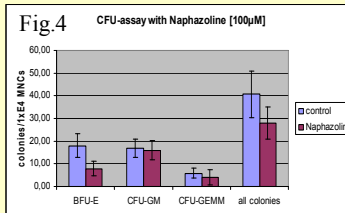
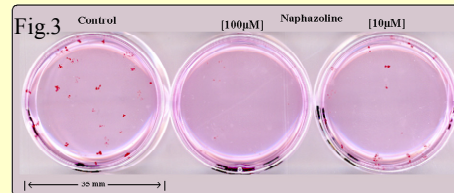
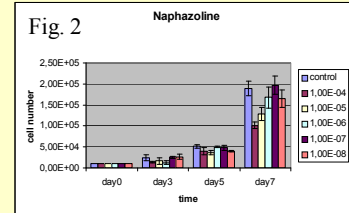
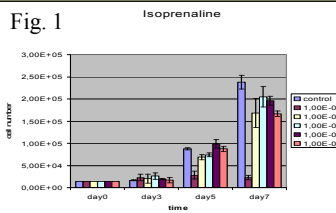
Catecholamines are important regulators of peripheral immune functions. Preliminary evidence exists that they also influence hematopoiesis in the bone marrow, even though the data are partially conflicting. In the present experiments we examined in vitro effects of α - and β -adrenergic agonists on growth and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) derived from human umbilical cord blood (UCB). To assess adrenergic effects on cell growth, CD34⁺ cells were immunomagnetically isolated from UCB and further cultivated in liquid medium with addition of either naphazoline (α 1-adrenergic agonist) or isoprenaline (non selective β -adrenergic agonist). To examine adrenergic effects on differentiation of HSCs, the formation of hematopoietic colonies was determined in the classical colony forming unit (CFU) assay with/without addition of naphazoline or isoprenaline.

Material and Methods

Fresh UCB was obtained from the Department of Obstetrics, Graz. Mononuclear cells were isolated by means of Ficoll separation.

CD34⁺ cells were purified using immunomagnetic sorting (MACS). CD34⁺ cells were cultivated for 8 days in serum free medium with IL-6, flt-3 ligand, SCF and TPO. Cell numbers and growth were determined by means of a CASY analyser (Schaefer). Naphazoline or isoprenaline were added in concentrations of 10⁻⁴ to 10⁻⁸ M.

For the CFU-Assay, the semiliquid Medium MethoCult™ (StemCell technologies Inc.) was used. 1x10⁴ MNCs/ml medium were cultivated 14 days with or without either naphazoline or isoprenaline (10 μ M-100 μ M). After cultivation the dishes were screened microscopically for erythrocyte burst-forming units (BFU-E), granulocyte, monocyte-colonies (CFU-GM) and myeloid colonies (CFU-GEMM).



Results and Discussion

High concentrations (10⁻⁴ – 10⁻⁶M) of both isoprenaline and naphazoline resulted in a significant and dose dependent suppression of cell growth in the liquid culture.(Fig. 1, 2).

In the CFU-assay, 100 μ M isoprenaline fully inhibited the growth of colonies (not shown). In contrast, naphazoline (10 μ M-100 μ M) appeared to selectively affect the growth of erythroid colonies. This effect could be seen macroscopically, with less or no red (erythrocyte) colonies in comparison to controls (Fig.3). Microscopic analysis of the naphazoline-treated CFU's revealed that the number of BFU-E was significantly ($p < 0,01$) reduced (Fig.4, 5) and the shape of remaining erythroid colonies was less distinctive as BFU-E's of controls. This effect could also be seen at the level of CFU-GEMM where the erythroid component was also clearly less developed.

As the viability of the cells was not affected by either of the adrenergic agonists in the liquid culture, a receptor mediated effect is likely, even though the expression of adrenergic receptors on CD34⁺ on umbilical cord blood cells has not yet been formally proven.

Our data suggest that adrenergic immune regulation occurs not only at the level of mature cells, but acts also on the growth and differentiation capacity of hematopoietic precursors. Experiments with receptor specific blockers are on the way to confirm these differential adrenergic effects.

5.6.2 Poster bei der 9. Multinationalen Konferenz für Mikroskopie, Graz, 08/2009

Control of differentiation and cell death of human erythroleukemia cells by α 1-adrenergic mechanisms



MC 2009
Graz

Medical University of Graz

Robert Fuchs¹, Ingeborg Stelzer¹, Gerd Leitinger^{2,3}, Helga Susanne Haas¹, Anton Sadjak¹

(1) Institute of Pathophysiology and Immunology, Center of Molecular Medicine, Medical University of Graz, Austria

(2) Institute of Histology and Cell Biology, Medical University of Graz, Austria

(3) Core Facility Ultrastructure Analysis, Center for Medical Research, Medical University of Graz, Austria

Norepinephrine, the major neurotransmitter substance of the sympathetic nervous system, plays an important role in the regulation of homeostasis in higher organisms. Few studies have addressed the issue that norepinephrine can also influence hematopoiesis in the bone marrow through adrenergic signaling. The interactions of sympathetic signaling pathways and hematopoiesis can be disturbed by adrenergic stress which is reflected by elevated catecholamine levels in the circulation. Recent experiments in our laboratory showed that the *in vitro* treatment of human erythroleukemia cell lines with α 1-adrenergic antagonists results in growth inhibition, the induction of apoptosis and a shift towards megakaryocytic differentiation. To confirm the receptor dependence of these observed effects, erythroleukemia cells were either treated with the α 1-adrenergic antagonist prazosin alone or in combination with the α 1-adrenergic agonist naphazoline.

MATERIAL & METHODS

K562 cells were treated 48 or 72 h with the α 1-adrenergic agonist naphazoline, the α 1-adrenergic antagonist prazosin or combinations of both drugs. After cultivation, cells were analyzed by a CASY cell counter and analyzer (Innovatis) for testing proliferation and by flow cytometry for induction of apoptosis using a BD Active Caspase 3 Kit. Endomitosis of the cells was analyzed by microscopically inspection and staining with propidium iodide (PI). The erythroid phenotype of the cells was determined by flow cytometry using an anti glycophorin- a (GPA) antibody and by determination of hemoglobin synthesis by benzidine staining. Transmission electron microscopy using a Zeiss EM 902 electron microscope was performed to characterize the ultrastructure of drug treated and untreated K562 cells.

RESULTS

Treatment of human erythroleukemia cells with either the α 1-agonist naphazoline or the α 1-antagonist prazosin results in concentration dependent growth inhibition (Fig.3), accompanied by the induction of cell death (Fig.2), whereas low dose α 1-antagonist treatment causes an apoptotic cell death in K562 cells, detected by a dose dependent increase of cells with active caspase 3 (Fig.3). Naphazoline treatment attenuated growth inhibition and caspase activation induced by prazosin (Fig.3).

Aside from growth and viability, also differentiation characteristics of K562 cells are influenced by α 1-agonist and α 1-antagonist treatment. α 1-agonist treatment suppresses the expression of the erythroid marker GPA (Fig.5) and also hemoglobin synthesis (not shown), indicating inhibition of the erythroid phenotype of K562 cells. On the contrary, α 1-antagonist treatment results in an increase in cell size, the appearance of polylobulated nuclei (Fig.2-4), an increase in DNA content up to 16N (Fig.4) and weak expression of the megakaryocytic marker CD41a parallel to a loss of GPA⁺ and hemoglobin producing cells (not shown). The described effects observed after α 1-antagonist treatment are all typical signs of a shift towards megakaryocytic differentiation of K562 cells. Combined prazosin and naphazoline treatment abolishes the induction of endomitosis by prazosin, indicated by a significant percental decrease of cells with polylobulated nucleus (Fig.4b) as well as less DNA content in comparison to cells treated with prazosin alone (Fig.4a, c). These observations suggest that through α 1-adrenergic activation of K562 cells, also the megakaryocytic phenotype of the cells is suppressed.

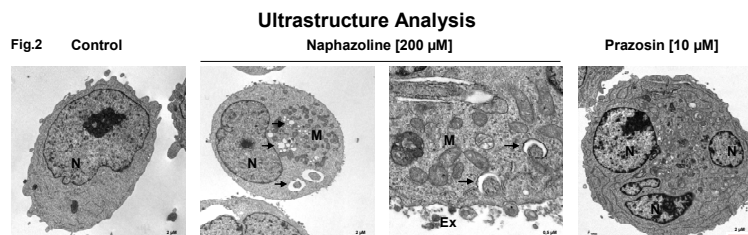
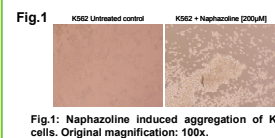


Fig.2: Treatment of K562 cells with the adrenergic agonist naphazoline induces an autophagolytic cell death, indicated by autophagosome formation (arrows), and enhances exosome (Ex) release. On the other hand, treatment of K562 cells with the adrenergic antagonist prazosin yields in endomitosis - a major hallmark of megakaryocytic differentiation - and cytoplasmic complexity. N: nucleus, M: mitochondria.

Proliferation and Apoptosis

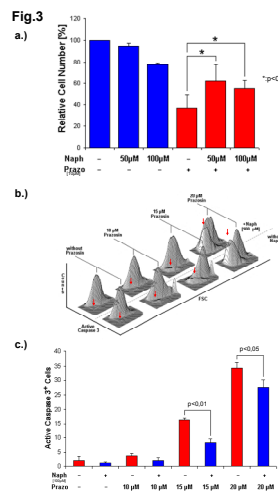


Fig.3: Naphazoline (naph) counteracts the growth inhibitory (a) and pro apoptotic (b, c) effect of prazosin (prazo) on K562 cells, indicating receptor dependence of the observed drug actions. The red arrows in b indicate the caspase3⁺ cell peaks. a: n=5, b, c: n=3.

Differentiation

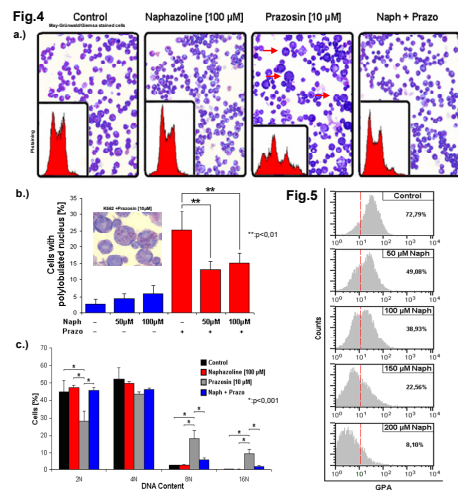


Fig.4: Prazosin (prazo) induces endomitosis in the K562 cell line, resulting in huge, polylobulated cells (arrows) with a DNA-content up to 16N. Combined naphazoline (naph) treatment attenuates endomitotic cell cycles. Original magnification of cells in a: 100x, in c: 630x. b: n=5, c: n=3.

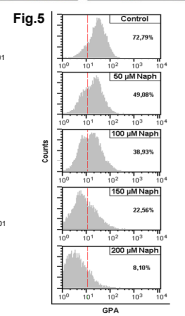


Fig.5: Naphazoline (naph) dose dependently suppresses the expression of the erythroid antigen Glycophorin-a (GPA).

CONCLUSION

We explored a novel potential α 1-adrenergic receptor mediated pathway for the control of differentiation as well as survival of human erythroleukemia cells, even though the relevance of the effect on physiologic erythroid/megakaryocytic progenitor cells must still be examined in more detail. The fact that adrenergic antagonist treatment can reversibly induce differentiation as well as apoptosis in leukemia cells could be the basis for further research about the use of adrenergic antagonists in the treatment of leukemia.

