

Diplomarbeit

Einfluss von TRIM58 auf die E nukleation roter Blutzellen

eingereicht von

Jan Basri Adiprasito, MSc.

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin

unter der Anleitung von

Univ. FÄ Priv.-Doz. Dr. med. Isabel Dorn

Prof. Dr. Peter Schlenke

Graz, am 25.05.2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 25.05.2021

Jan Basri Adiprasito eh.

Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Peter Schlenke für die Möglichkeit an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin meine Diplomarbeit durchzuführen. Ich bedanke mich bei FÄ Priv.-Doz. Dr. med. Isabel Dorn für ihre durchgehende Betreuung und Unterstützung der Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Marie-Therese Frisch, Annika Lampl, Anja Stoisser, Lisa Rohrhofer und Afrim Avdili, danke ich für die großartige Zusammenarbeit, die Anleitung, die Hilfe und das schöne und fröhliche Miteinander.

Meiner Mutter danke ich für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch und dafür, dass sie mir während meines gesamten Studiums zur Seite stand.

„Danke“ an Jan Fleckhaus und Nils Kückelhaus für ihre trockenen Analysen und ihren Rat zum Ende der Arbeit.

Abschließend möchte ich Gigi danken, für ihre Geduld, ihren Zuspruch und ihre Liebe während der gesamten Zeit meiner Diplomarbeit.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	7
Abstract.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1. Erythropoese.....	9
1.2. <i>Ex vivo</i> Generierung von Erythrozyten.....	10
1.2.1. Pluripotente Stammzellen.....	11
1.2.2. Adulte hämatopoetische Stammzellen.....	12
1.3. E nukleation	13
1.4. TRIM58	14
1.5. CRISPR/Cas9	16
1.6. Autophagie in der Erythropoese.....	17
2. Material und Methoden	21
2.1. Western Blot.....	21
2.1.1. Proteinisolation	21
2.1.2. Konzentrationsbestimmung mittels Lowry-Assay.....	21
2.1.3. SDS-Page.....	22
2.1.4. Proteintransfer	22
2.1.5. Immunoblotting	23
2.1.6. Auswertung.....	24
2.2. TRIM58-KO mittels CRISPR/Cas9.....	24
2.2.1. sgRNA-Design.....	24
2.2.2. Annealing.....	25
2.2.3. Ligation mit px458-Plasmid.....	25

2.2.4.	Transformation.....	25
2.2.5.	Mini-Präparation	25
2.2.6.	DNA-Isolation.....	26
2.2.7.	Nukleofektion	26
2.2.8.	Zellsortierung mittels Fluoreszenz-Aktivierter-Durchflusszytometrie.	27
2.2.9.	DNA-Isolation aus sortierten Zellpellets.....	27
2.2.10.	Bestimmung der Annealing-Temperatur mittels PCR und Gelelektrophorese	28
2.3.	Material	30
2.3.1.	Western Blot	30
2.3.2.	TRIM58-Knockout.....	31
2.3.3.	Zellmaterial	33
3.	Ergebnisse.....	35
3.1.	Western Blot Experimente.....	35
3.1.1.	Isolation und Transfermethodik.....	35
3.1.2.	Ladekontrolle	35
3.1.3.	TRIM58 Expression	38
3.1.4.	Dynein Expression.....	41
3.1.5.	LC3 Expression	45
3.2.	TRIM58 Knock-Out.....	49
3.2.1.	Klonierung, Ligation der Primer mit dem px458-Plasmid.....	49
3.2.2.	Nukleofektion	50
3.2.3.	Bestimmung der Annealing-Temperatur	51
3.2.4.	Sequenzierung der Gradienten-PCR.....	52
4.	Diskussion	55
4.1.	Western Blot.....	55
4.1.1.	Ladekontrolle	55

4.1.2. TRIM58.....	56
4.1.3. Dynein	60
4.1.4. LC3.....	61
4.2. TRIM58 Knock-Out.....	63
4.3. Ausblick.....	65
Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

BFU-E	-	<i>engl.</i> : Burst Forming Unit – Erythrocytes
BSA	-	Bovines Serumalbumin
Bzgl.	-	bezüglich
Bzw.	-	beziehungsweise
CFU-E	-	<i>engl.</i> Colony Forming Unit – Erythrocytes
CAR	-	Kontraktiler Aktin Ring (<i>engl.</i> Contractile actine ring)
CFU-GEMM	-	<i>engl.</i> : Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes, Megakaryocytes
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dPCR	-	digitale Polymerasekettenreaktion
EB	-	<i>engl.</i> Embryonic Bodies
E. Coli	-	Escheria Coli
EPO	-	Erythropoetin
ESZ	-	Embryonale Stammzelle
<i>et al.</i>	-	<i>et alii</i> (lateinisch: und andere)
<i>engl.</i>	-	englisch
EU	-	Europäische Union
FBS	-	Fetales Kälberserum
GFP	-	<i>engl.</i> Green fluorescent protein
Ggf.	-	gegebenenfalls
HSZ	-	hämatopoetische Stammzelle
iPSZ	-	induziert pluripotente Stammzelle
I.U.	-	<i>engl.</i> International Units
KO	-	Knock-Out
LB	-	<i>engl.</i> lysogeny broth
LC3	-	<i>engl.</i> Microtubule-associated <i>proteins</i> 1A/1B light chain 3B
M	-	mol/l
PB	-	Peripheres Blut
PBS	-	<i>engl.</i> Phosphate Buffered Saline
RNA	-	Ribonukleinsäure
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
sgRNA	-	<i>engl.</i> Single guide Ribonukleinsäure

- TRIM58 - *engl.* Tripartite Motif Containing 58
- UCB - Nabelschnurblut (*engl.* Umbilical cord blood)
- Upm - Umdrehungen pro Minute
- SZ - Stammzelle
- z.B. - zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Erythropoese im humanen Knochenmark	9
Abbildung 2: Zellen der ex vivo Erythropoese aus iPSZ nach Tagen. Abbildung aus: Bernecker et al., 2019 in Stem Cells and Development.....	12
Abbildung 3: Zellen der ex vivo Erythropoese aus HSZ nach Tagen. Abbildung aus: Bernecker et al., 2019 in Frontiers in Physiology.....	13
Abbildung 4: Expression von TRIM58 RNA in Erythroblasten kurz vor der E nukleation (Tag 15) der ex vivo Erythropoese aus verschiedenen Stammzellquellen (K. Kessel, 2016)	15
Abbildung 5: Expression von TRIM58 im zeitlichen Verlauf. Vergleich zwischen erythrozytären Zellen aus der ex vivo Erythropoese aus HSZ und iPSZ auf RNA-Ebene (V. Schaberl, 2019).....	16
Abbildung 6: Expression von GABARAPL1, GABARAPL2 und MAP1LC3A in ex vivo kultivierten Erythroblasten kurz vor der E nukleation (Tag 15) aus verschiedenen Stammzellquellen (K. Kessel, 2019).....	19
Abbildung 7: Expression von LC3 im Verlauf im Vergleich zwischen erythrozytären Zellen aus der ex vivo Erythropoese aus HSZ und iPSZ auf RNA-Ebene (Verena Schaberl, 2019)	20
Abbildung 8: Gating-Strategie für die Selektion der GFP-positiven Zellen am Beispiel der Negativkontrolle (CD34 ⁺ -Zellen).....	27
Abbildung 9: Gradienten PCR zur Bestimmung der Annealing-Temperatur der Primer.	29
Abbildung 10 GAPDH Expression nach Trockentransfer. Auftrag von 20 µg Protein von Epo49, Tag 8.	35
Abbildung 11: GAPDH Expression nach Feuchttransfer. Auftrag von 20 µg Protein von Epo49, Tag 8.	35
Abbildung 12: α-Tubulin Expression in den jeweiligen Zellreihen nach Tagen (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils 30 µg. Epo45 und Epo47 jeweils 20 µg pro Probe.	36
Abbildung 13: GAPDH Expression in den jeweiligen Zellreihen nach Tagen (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils 30 µg Protein. Epo45 und Epo47 jeweils 20 µg pro Probe.	37

Abbildung 14: β -Aktin Expression nach Tagen 8-18. Auftrag von 20 μ g Protein aus Epo49.	37
Abbildung 15: α -Tubulin und GAPDH Expression zu verschiedenen Zeitpunkten (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten) Auftrag nach Zellzahl. Pro Probe wurde die Proteinmenge aus 900.000 Zellen aufgetragen.	38
Abbildung 16: Expression von TRIM58 in den Adulten-Zellreihen Epo79, Epo45 und Epo47 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag 30 μ g bei Epo79, jeweils 20 μ g bei Epo45 und Epo 47. A: Western Blot Banden von TRIM58. B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte der Expression in Epo79. B: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Epo 45, Epo47 und Epo 79 nach Zeitpunkt.	39
Abbildung 17: Expression von TRIM58 in den IPS-Zellreihen Cml-1 und PEB-7 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 15, R – Retikulozyten – Tag 18 nach Filtrierung). Auftrag jeweils 30 μ g. A: Western-Blot-Banden von TRIM58. B: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte nach Zeitpunkt.	40
Abbildung 18: Vergleich der TRIM58 Kinetik zwischen ex vivo Erythropoese aus adulten HDZ und iPSZ zwischen den Tagen 8 und 18 (Retikulozytenpellets). Werte mit GAPDH Expression korrigiert, normalisiert und gemittelt. Auftrag jeweils 30 μ g.	41
<i>Abbildung 19: Expression von Dynein in der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ. Epo79, Epo45 und Epo47 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag 30 μg bei Epo79, jeweils 20 μg bei Epo45 und Epo 47. A: Western Blot Banden von Dynein. B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte der Expression in Epo79. C: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Epo 45, Epo47 und Epo 79 nach Zeitpunkt.</i>	<i>42</i>
Abbildung 20: Expression von Dynein in der ex vivo Erythropoese aus IPSZ. Cml-1 und PEB-7 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 15, R – Retikulozyten – Tag 18 nach Filtrierung). Auftrag jeweils 30 μ g. A: Western Blot Banden, B: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte (Cml-1, PEB-7) nach Zeitpunkt.....	43
Abbildung 21: Expression von Dynein in der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ (Epo79) und aus IPSZ (Cml-1) zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils Proteinmenge aus 900.000 Zellen. A: Western Blot Banden, B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte nach Zeitpunkt.....	44

Abbildung 22: Expression von LC3 im Verlauf der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ: Epo79, Epo45 und Epo47 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag 30 µg bei Epo79, jeweils 20 µg bei Epo45 und Epo47. A: Western Blot Banden von LC3, B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte der Expression in Epo79. B: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Epo45, Epo47 und Epo79 nach Zeitpunkt. . 45

Abbildung 23: Expression von LC3 im Verlauf der ex vivo Erythropoese aus IPSZ (Cml-1 und PEB-7) zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils 30 µg. A: Western Blot Banden von LC3. B Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Cml-1 und PEB-7 nach Zeitpunkt..... 46

Abbildung 24: Vergleich der Expression von LC3 in multipotenten adulten HSZ zu induzierten pluripotenten Stammzellen. SZ18 und SZ19 als adulte und PEB-7 bzw. Cml-1 als IPSZ. Auftrag von jeweils 30 µg. A: Western Blot Bilder der LC3 Expression. B: Auswertung nach Korrektur durch GAPDH. 47

Abbildung 25: Expression von LC3 in den Zellen der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ (Epo79) und in Zellen aus der ex vivo Erythropoese aus IPSZ (Cml-1) zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag einer Proteinmenge aus jeweils 900.000 Zellen. A: Western Blot Banden von LC3 in Epo79, C: Western Blot Banden von LC3 in Cml-1. B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte in Epo79 nach Zeitpunkt. D: mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte in Cml-1 nach Zeitpunkt. 48

Abbildung 26: Expression von LC3 im Vergleich zwischen adulter Erythropoese (Epo79) und IPSZ (Cml-1) nach Korrektur der Expressionswerte mit GAPDH ohne Normalisierung auf den höchsten Wert. Messpunkte Tag 0, 8, 11, 15 und Tag 18 nach Retikulozyten-Filtrierung. Auftrag jeweils 30 µg..... 49

Abbildung 27: Sequenzierung der px458-Plasmide nach Klonierung und Ligation mit den sgRNA1-4. Die Sequenzen der sgRNA sind eingerahmt..... 49

Abbildung 28: GFP Expression in K562-Zellen nach Nukleofektion mit dem sgRNA1 (A), sgRNA3 (B), sgRNA4-tragenden Plasmid (C). 50

Abbildung 29: Gradienten-PCR der Klonierten und nukleofektierten sgRNA1, 3 und 4 aus K562-Zellen 52

Abbildung 30: Sequenzierung der Gradienten-PCR des nukleofektierten Plasmids mit sgRNA1 in K562-Zellen. 52

Abbildung 31: Sequenzierung der Gradienten-PCR des nukleofektierten Plasmids mit sgRNA3 in K562-Zellen.	53
Abbildung 32: Veränderte DNA-Sequenzen nach Nukleofektion mit sgRNA3-tragendem Plasmid in K562-Zellen.....	53
Abbildung 33: Sequenzierung der Gradienten-PCR des nukleofektierten Plasmids mit sgRNA4 in K562-Zellen.	54
Abbildung 34: Veränderte DNA-Sequenzen nach Nukleofektion mit sgRNA4-tragendem Plasmid in K562-Zellen.....	54
Abbildung 35: Vorherrschendes Zellmaterial nach Tagen in aus der Erythropoese von iPSZ gewonnenem Material. Abbildung aus Bernecker et al., 2019, Stem Cells and Development.	58
Abbildung 36: Vorherrschendes Zellmaterial nach Tagen in aus der Erythropoese von HSZ gewonnenem Material. Abbildung aus Bernecker et al., 2019, Frontiers in Physiology.	59
Abbildung 37: Vorliegendes Zellmaterial nach Tagen in der adulten Erythropoese (A) und in der iPSZ-Erythropoese (B). Mittelwerte aus den jeweiligen verwendeten Zellen (Epo45, Epo47, Epo79 – adulte Erythropoese; Cml-1 und PEB-7 – iPSZ-Erythropoese). Auswertung von Zytospins und Zurverfügungstellung durch die Labor-AG der Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin.	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erstellte und verwendete sgRNAs	25
Tabelle 2: Verwendete Primer für Gradienten-PCR und Sequenzierung.....	28
Tabelle 3: Verwendete Zellpellets und vorherrschendes Zellmaterial.....	34

Zusammenfassung

Die *ex vivo* Kultivierung von Erythrozyten rückt immer mehr in den Fokus der Forschung, da hierdurch unter anderem erhofft wird, speziell Patient*innen mit seltenen Blutgruppen oder komplexen Alloimmunisierungen notwendige Erythrozytenkonzentrate bereitstellen zu können. Dabei wird vermehrt mit Ansätzen aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) gearbeitet, da diese den Vorteil einer unlimitierten Quelle im Vergleich zu *ex vivo* Ansätzen aus adulten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) bieten. Der wissenschaftliche Fortschritt der letzten Jahre in Bezug auf die *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ ist vielversprechend, allerdings besteht weiterhin im Vergleich zu Modellen aus adulten HSZ eine verminderte E nukleation. TRIM58 ist ein Protein, dessen Expression in ersten Microarray Untersuchungen in Erythroblasten aus iPSZ im Vergleich mit Erythroblasten aus HSZ vermindert ist. 2014 wurde im Rahmen einer einzelnen Forschungsarbeit die Hypothese aufgestellt, dass TRIM58 die E nukleation muriner Erythroblasten hin zu Retikulozyten über die Degradation von Dynein maßgeblich beeinflusst. In einem humanen Modell wurde dieser Zusammenhang bisher nicht untersucht. Ziel dieser Diplomarbeit ist es die Bedeutung von TRIM58 für die E nukleation humaner Erythrozyten zu erforschen. Es kann auf Basis von aktuellen *ex vivo* Erythropoese Modellen aus iPSZ und adulten HSZ gezeigt werden, dass die Expressionskinetik von TRIM58 und dessen möglichem Effektorprotein Dynein, auf Proteinebene keine abweichende Dynamik zwischen beiden Systemen aufweist. Zudem wird im Rahmen der Diplomarbeit ein TRIM58-Knock-Out (KO) mittels CRISPR/Cas9 in humanen Erythroblasten vorbereitet. Mit Hilfe dieser Vorarbeiten soll, in Folgeprojekten die Auswirkungen eines TRIM58-KO auf die Entwicklung und im Speziellen auf die E nukleation von Erythrozyten zu untersucht werden.

Weiter wird die Funktion der Autophagie in der Erythropoese betrachtet. Dazu wird die Expression des Proteins LC3, ein zentrales Protein der Autophagie, auf Protein-Ebene untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine verstärkte Expression von LC3 in iPSZ verglichen zu der Expression in HSZ, was auf eine mögliche Rolle der Autophagie bei der Generierung von iPSZ hindeutet. Allerdings ist dieser Unterschied im Verlauf der Erythropoese nicht mehr nachweisbar, was einen direkten Einfluss auf die E nukleation unwahrscheinlich macht.

Abstract

The *ex vivo* cultivation of erythrocytes is increasingly becoming the focus of research, as it is hoped that this will provide the necessary erythrocyte concentrates for patients with rare blood groups or complex alloimmunizations. Increasingly, approaches from induced pluripotent stem cells (iPSCs) are being used, as they offer the advantage of an unlimited source compared to *ex vivo* approaches from adult hematopoietic stem cells (HSCs). Scientific progress in recent years with respect to *ex vivo* erythropoiesis from iPSCs is promising, however, there continues to be reduced enucleation compared to models derived from adult HSCs. TRIM58 is a protein whose expression is decreased in initial microarray studies of erythroblasts from iPSCs compared with erythroblasts from HSCs. In 2014, a single research paper hypothesized that TRIM58 significantly affects the enucleation of murine erythroblasts to reticulocytes via degradation of dynein. This relationship has not yet been investigated in a human model. The aim of this diploma thesis is to investigate the role of TRIM58 in the enucleation of human erythrocytes. Based on current *ex vivo* erythropoiesis models from iPSCs and adult HSCs, it can be shown that the expression kinetics of TRIM58 and its possible effector protein dynein, do not show divergent dynamics between both systems at the protein level. Furthermore, a CRISPR/Cas9 project is started within the scope of this diploma thesis with the aim to generate a TRIM58-KO in erythroblasts of adult erythropoiesis. With the help of this preliminary work, it is possible in follow-up projects to investigate the effects of such a TRIM58-KO on the development and in particular on the enucleation of erythrocytes.

Furthermore, the function of autophagy in erythropoiesis is investigated. For this purpose, the expression of the protein LC3, a central protein of autophagy, is investigated at the protein level. The results show enhanced expression of LC3 in iPSCs compared to expression in HSCs, suggesting a possible role of autophagy in the generation of iPSCs. However, this difference is no longer detectable during erythropoiesis, making a direct effect on enucleation unlikely.

1. Einleitung

1.1. Erythropoese

Die Erythropoese ist ein komplexer Prozess, welcher in Säugetieren pränatal in der fetalen Leber abläuft, ehe er sich nach der Geburt in das Knochenmark verlagert. Dabei geht die Erythropoese im Knochenmark von einer recht kleinen Population an multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) aus, welche über verschiedene Progenitoren die differenzierten hämatopoetischen Zelllinien bilden. Erythrozyten entstehen dabei vermutlich aus CFU-GEMM (*engl.*: Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes, Megakaryocytes), einem gemeinsamen Progenitor von Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Megakaryozyten. Aus diesem gehen BFU-E (*engl.*: Burst Forming Unit – Erythrocytes) hervor, welche sich sehr langsam teilen und CFU-E bilden (*engl.*: Colony Forming Unit – Erythrocytes), welche über einem Zeitraum von drei Tagen stark proliferieren und dabei zahlreichen Veränderungen unterliegen, ehe sie als Erythroblasten den Kern verlieren und Retikulozyten bilden (Abbildung 1), aus denen im Verlauf Erythrozyten reifen (Pham, Macdougall, 2008). Allein im Stadium des Erythroblasten durchläuft die Erythropoese einige komplex regulierte Veränderungen, wie die Kondensierung des Chromatins und die Reduktion der Zellgröße aber auch z.B. die Produktion von Hämoglobin (Hattangadi, Wong *et al.*, 2011).

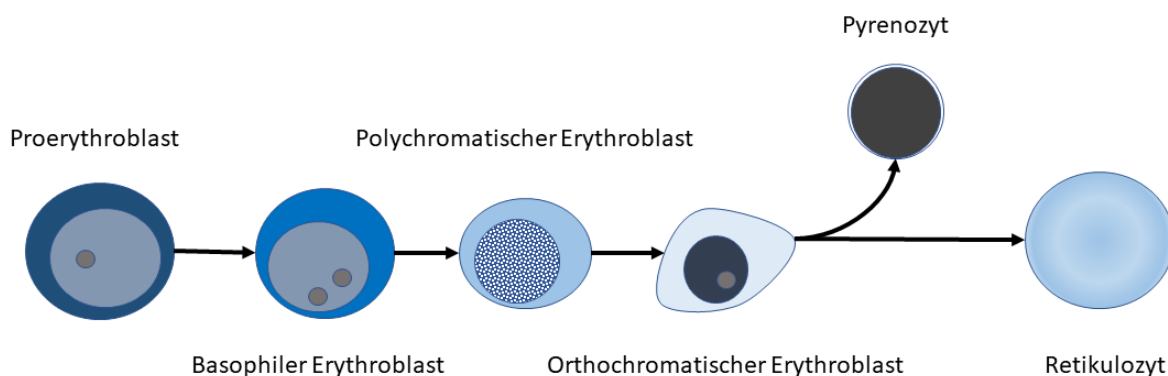


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Erythropoese im humanen Knochenmark

Der Ablauf der Erythropoese ist dabei streng reguliert. Zu Beginn ist insbesondere der Stammzellularfaktor (SCF) von Bedeutung. SCF und der zugehörige Rezeptor c-Kit (Tyrosinkinase KIT) aktivieren zahlreiche verschiedenen Signalwege, welche im Rahmen der Hämatopoese die Proliferation und das Überleben der Zelle fördern (C.E. Edling, B. Hallberg, 2006). Diese Funktion erfüllt SCF im Verlauf der Erythropoese in

Zusammenspiel mit Erythropoetin (EPO), welches als Transkriptionsfaktor für verschiedene Prozesse innerhalb der Erythropoese fungiert, dessen Bedeutung aber in späteren Stadien der Erythropoese abnimmt (C.S. Lin *et al.*, 1996; H. Wu *et al.*, 1995). So induziert SCF die Expression des EPO-Rezeptors und verstärkt so den genannten Effekt auf die Zellproliferation und das Überleben der Zellen (R. Kapur, L. Zhang, 2001).

Obwohl die Entwicklung von Erythrozyten insgesamt sehr intensiv untersucht wurde, sind insbesondere die Mechanismen der E nukleation sowie die weitere Ausreifung der kernlosen Retikulozyten zu reifen bikonkaven Erythrozyten bis heute weitestgehend ungeklärt. Dies trifft mit Einschränkungen auch auf die Rolle der Autophagie in der Erythropoese zu, welche aber in den letzten Jahren vermehrt in das Blickfeld der erythropoetischen Forschung rückt.

1.2. Ex vivo Generierung von Erythrozyten

Rote Blutzellen werden im klinischen Bereich massiv eingesetzt. Die Bereitstellung von Erythrozytenkonzentraten basiert dabei auf freiwilligen Blutspenden gesunder Menschen. Dabei sinkt gerade in westlichen Ländern mit einer alternden Gesellschaft die Population der jungen, gesunden Spender*innen, während die Population der Menschen, welche mit höherer Wahrscheinlichkeit eine solche Blutspende benötigen, wächst (Ali, Auvinen & Rautonen, 2010). Zudem bestehen bereits heute ungelöste Engpässe bei der Versorgung von Patient*innen mit multiplen Alloantikörpern oder seltenen Blutgruppen (Hendrickson *et al.*, 2016). Für diese Patient*innen stellt die *ex vivo* Herstellung von Erythrozyten eine mögliche Alternative dar, weshalb ihr ein zunehmendes Interesse in der hämatologischen Forschung zukommt.

Prinzipiell stehen verschiedene Quellen zur *ex vivo* Generierung von Erythrozyten zur Verfügung. Neben pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESZ) sind dies adulte CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) aus dem peripheren adulten Blut (PB) oder aus Nabelschnurblut (UCB). Darüber hinaus besteht seit wenigen Jahren die Möglichkeit induzierte pluripotente Stammzellen aus bereits differenzierten Zellen (iPSZ) zu reprogrammieren (Y. Seo *et al.*, 2019). Alle Optionen haben verschiedene Vor- und Nachteile, welche in deren Verwendung abzuwägen sind.

1.2.1. Pluripotente Stammzellen

ESZ und iPSZ besitzen das gemeinsame Charakteristikum der unlimitierten Expansionsmöglichkeit, welches sie von allen anderen Möglichkeiten der *ex vivo* Generierung von Erythrozyten unterscheidet. Die Verwendung von ESZ ist ethisch umstritten, weshalb die Verwendung innerhalb der EU weitestgehend untersagt oder sehr streng reguliert ist. Bei der Verwendung von iPSZ bestehen diese ethischen Bedenken nicht, da diese aus differenzierten Zellen generiert werden können, wohingegen ESZ einem Embryo entnommen werden müssen. Die Gewinnung von pluripotenten Stammzellen aus bereits differenzierten humanen Zellen erfolgt unter Zugabe von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc). 2006 wurde diese Methodik zunächst an Mäusezellen und 2007 an humanen Zellen beschrieben (Takashi *et al.*, 2006; Takashi *et al.*, 2007). Die Möglichkeit der *ex vivo* Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen ist Grundlage für vielfältige, neue Forschungsansätze innerhalb der Stammzellforschung.

Bereits heute lassen sich experimentell aus iPSZ Hepatozyten, Kardiomyozyten und verschiedene andere Zelltypen generieren (Lalit *et al.*, 2016; G. Song *et al.*, 2016). Die Gewinnung von Erythrozyten aus pluripotenten Stammzellen erfolgt über die Erzeugung von sog. *Embryonic Bodies* (EB), aus welchen sich über die Zugabe spezifischer Transkriptionsfaktoren und Zytokine sowie der Verwendung spezifischer Kulturmedien eine Differenzierung in Richtung der Hämatopoese induzieren lässt (R. Grant Rowe *et al.*, 2016). Ein weiterer Vorteil der Gewinnung von Erythrozyten aus iPSZ ist, dass patient*innen- bzw. empfänger*innenspezifische Erythrozyten mit genetischen Modifikationen hergestellt werden können. So wurden bereits 2007 Mäusen mit Sichelzellanämie aus autolog gewonnenen iPSZ hämatopoetische Stammzellen transplantiert, in welchen das Sichelzellhämoglobin durch genspezifisches Targeting korrigiert wurde (Hanna *et al.*, 2007). Auch bei Patient*innen mit Fanconi-Anämie konnte gezeigt werden, dass sich aus autolog gewonnenen iPSZ nach genetischer Modifikation hämatopoetische Stammzellen generieren ließen, welche alle Zellreihen der Hämatopoese bildeten (A. Raya *et al.*, 2009). Allerdings ist die Tumorigenität von Zellen, die aus iPSZ hervorgehen nicht endgültig geklärt. Diese Sicherheitsfragen gilt es genauer zu eruieren (Y. Seo *et al.*, 2019). Erste Studien zeigen Hinweise auf eine niedrige Tumorigenität (H. Zhang *et al.*, 2021; H. Ishigaki *et al.*, 2021). Ein spezielles Problem bei der Gewinnung von Erythrozyten aus iPSZ zeigt

sich in einer deutlich verminderten Eukleation der Erythroblasten zu Retikulozyten im Vergleich zur Verwendung von adulten HSZ (M. Hansen *et al.*, 2019; Y. Seo *et al.*, 2019; Dorn *et al.*, 2014).

Abbildung 2 zeigt Zellen des im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Modells der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ über 18 Tage. Dabei sind an Tag 0 hämatopoetische Vorläuferzellen aus iPSZ und an Tag 8 überwiegend basophile Erythroblasten zu erkennen. In den Folgetagen (Tag 11) nimmt die Zahl der hämoglobinhaltigen, polychromatischen Erythroblasten zu. An Tag 15 besteht eine Mischpopulation aus Normoblasten und bereits entkernten Retikulozyten. Letztere bilden an Tag 18 die Hauptfraktion der Zellen.

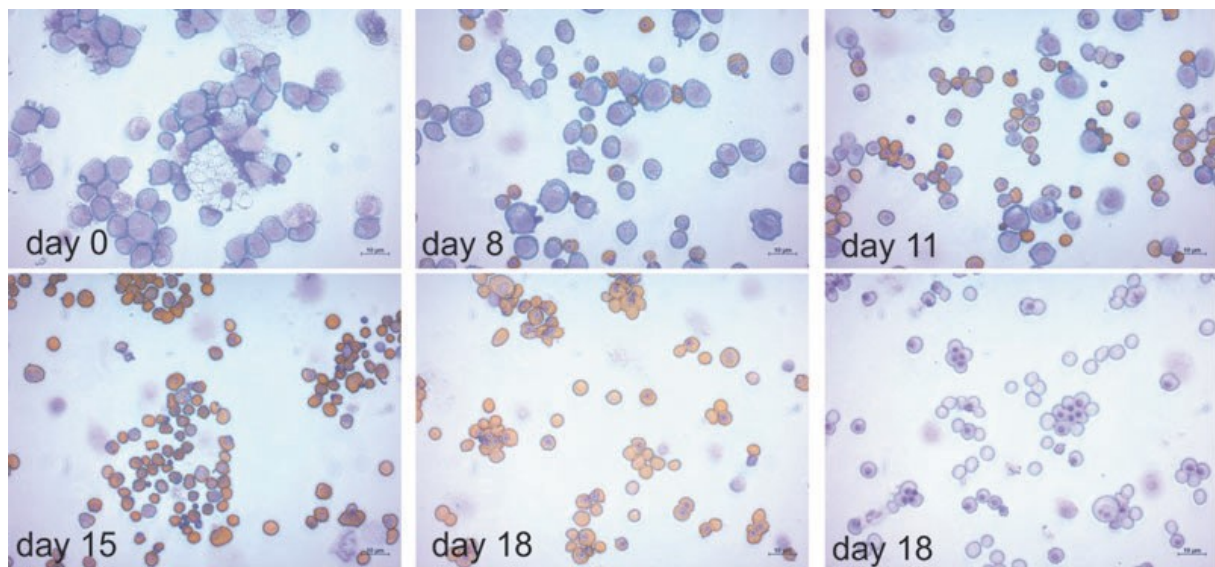


Abbildung 2: Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ nach Tagen. Abbildung aus: Bernecker *et al.*, 2019 in *Stem Cells and Development*.

iPSZ werden mittlerweile in zahlreichen Feldern der medizinischen Forschung eingesetzt. Dabei sind nicht immer direkt therapeutische Ansätze vordergründig. So sind iPSZ auch zum Verständnis der Epigenetik und möglicher Veränderungen dieser im Rahmen einer kanzerogenen Entartung von Zellen von Interesse (J. Bragança *et al.*, 2019). Therapeutische Ansätze werden in der Reprogrammierung von Zellen zur Krebstherapie gesehen. Dabei sind die prinzipielle Entstehung von iPSZ und die dabei involvierten Prozesse bis heute noch nicht gänzlich erforscht (J. Bragança *et al.*, 2019).

1.2.2. Adulte hämatopoetische Stammzellen

Sowohl bei der Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen aus PB als auch aus UCB werden in der Regel CD34⁺ Zellen isoliert. Diese werden *in vitro* kultiviert und

beispielsweise zur Produktion von Erythrozyten verwendet. Zellen aus UCB haben unter anderem den Vorteil, dass sie eine geringere Rate an Mutationen aufweisen als HSZ aus adultem peripherem Blut (Y. Seo *et al.*, 2019). Ein Nachteil von Erythrozyten, welche von HSZ aus UCB stammen, ist die Expression primitiverer Globin-Varianten im Vergleich zu Erythrozyten, die aus adulten HSZ (aus PB isoliert) gewonnen werden (Y. Zhang *et al.*, 2017). In einer Studie im Jahr 2002 konnte allerdings gezeigt werden, dass auch Erythrozyten mit dieser primitivierten Globin-Variante nach Injektion in Mäuse *in vivo* zu adulten Erythrozyten ausdifferenzieren konnten (Neildez-Nguyen *et al.*, 2002). Ein Problem, welches bei Zellen sowohl aus PB als auch aus UCB vorliegt, ist das limitierte Selbsterneuerungspotenzial der HSZ, sodass die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Erythrozyten für eine Transfusion über diesen Weg nur schwer möglich ist (Y. Seo *et al.*, 2019).

Abbildung 3 zeigt das im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendete Modell für die *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ. Dabei sind Zytospins mit Zellen der unterschiedlichen Kulturtage dargestellt. An Tag 8 sind überwiegend basophile Erythroblasten zu erkennen, an Tag 15 Normoblasten und Retikulozyten und an Tag 18 überwiegend Retikulozyten. Die letzte Abbildung zeigt das Zellmaterial nach Filtrierung der kernlosen Retikulozyten.

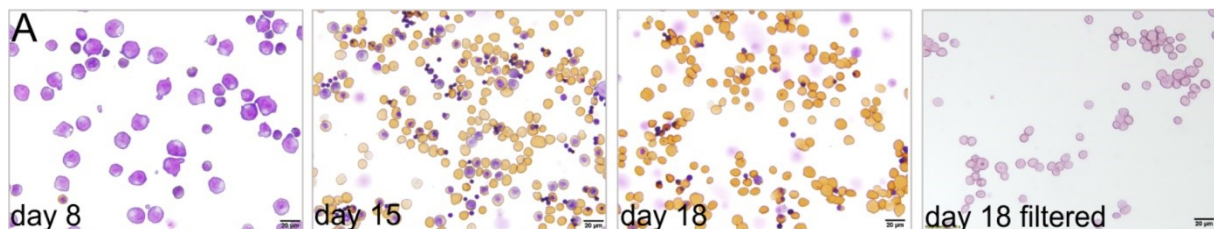


Abbildung 3: Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus HSZ nach Tagen. Abbildung aus: Bernecker *et al.*, 2019 in *Frontiers in Physiology*.

1.3. E nukleation

Die E nukleation der Erythrozyten erfolgt auf der Ebene der orthochromatischen Erythroblasten und bildet den Übergang zum Retikulozyten. Dabei kommt es neben der Bildung der Retikulozyten zu sogenannten Pyrenozyten (Abbildung 1), welche einen Zellkern und einen dünnen Cytoplasma-Saum enthalten. Der Kern wird also im Gegensatz zu Mitochondrien und Ribosomen nicht im Rahmen eines Autophagie-Prozesses innerhalb der Zelle degradiert, sondern wird als ganzer aus der Zelle entfernt. In den äußeren Teil der Doppelmembran der Pyrenozyten wird in der Folge

Phosphatidylserin eingelagert, welches als Signal für Makrophagen dient die Pyrenozyten abzubauen (Yoshida *et al.*, 2005).

Dabei werden zunächst der Kern und das Chromatin abhängig von der Acetylierung der Histone H3 und H4 kondensiert. Dieser Vorgang wird durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen reguliert (Popova *et al.*, 2009). Eine wichtige Rolle spielen auch Veränderungen des Zytoskeletts der Zelle, zum Beispiel die Ausbildung des CAR (*engl.*: kontraktile actin ring), welcher aus F-Aktin gebildet wird. Die Bildung des CAR ist abhängig von der RAC1 GTPase und mDia2. Eine verminderte Expression dieser Gene führt zu einer Unterbrechung der CAR-Formation (Ji *et al.*, 2008). Zudem formen Mikrotubuli eine Art Korb um den Nukleus, welcher sich in späten Erythroblasten-Stadien in der Nähe der Plasmamembran befindet und vermutlich eine wichtige Rolle bei der Polarisation des Kerns spielt (Koury *et al.*, 1989; Moras *et al.*, 2017). Für die Formation des Vesikels und damit die Ausschleusung des Pyrenozyten wird schlussendlich Clathrin benötigt (Keerthivasan *et al.*, 2010).

Ein weiterer essenzieller Faktor für die E nukleation ist KLF1 (Perkins *et al.*, 1995). Es reguliert die Expression von Proteinen des Zellzyklus, Deacetylasen, Caspasen und Proteinen der Kernmembran (Gnanapragasam & Bieker, 2017). Dabei erfolgt der Signalweg von KLF1 unter anderem über E2F, welches die Expression von CR1 induziert. CR1 wiederum spielt eine gewichtige Rolle bei der Organisation der Mikrotubuli und der Kondensation des Nukleus (Swartz *et al.*, 2016).

1.4. TRIM58

Tripartite Motif Containing 58 (TRIM58) gehört zur Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen, welche weitgehende Funktionen in physiologischen und pathologischen Prozessen haben (Napolitano & Meroni, 2012). GWAS (*engl.*: Genome wide association studies) zeigen verschiedene SNPs (*engl.*: single nuclear polymorphisms), welche mit TRIM58 assoziiert sind und zu einer Variation der Größe und Anzahl der zirkulierenden Erythrozyten führen (Kamatami *et al.*, 2010; van der Harst *et al.*, 2012). TRIM58 ist mit verschiedenen Pathologien assoziiert. So zeigen Zellen von Magenkarzinomen eine verminderte TRIM58 Expression. Eine Steigerung der TRIM58 Expression in diesen Zellen könnte zu einer Suppression des Tumorstwachstums über eine Inaktivierung von β -Catenin führen (Liu *et al.*, 2019). Weiter ist eine verminderte Expression in

Patient*innen mit Kolorektalem Karzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert (Liu *et al.*, 2018).

Im Rahmen der Erythropoese ist TRIM58 möglicherweise für die E nukleation von Bedeutung. Diese Hypothese wurde bislang in einer einzigen Studie an murinen Zellen aufgestellt, in der TRIM58 im Zusammenhang mit der Degradation von Dynein stand. Dynein scheint für die Positionierung des Kerns und die Organisation der Mikrotubuli von Bedeutung. TRIM58 stimuliert möglicherweise die Degradation des Dynein-Komplexes durch Proteasomen. Eine verminderte Expression von TRIM58 in murinen Erythroblasten führte zu einer geringeren prozentualen Rate an entkernten Zellen (Thom *et al.*, 2014).

In Microarray Analysen zeigte sich eine verminderte Expression von TRIM58 in Erythroblasten aus embryonalen Stammzellen (ESZ, *engl.*: ESC) und iPSC (*engl.*: iPSC) verglichen zu Erythroblasten der adulten (PB) Erythropoese und Erythroblasten der Erythropoese aus Stammzellen, welche aus Nabelschurblut (CB) gewonnen wurden (Abbildung 4; K. Kessel, 2016).

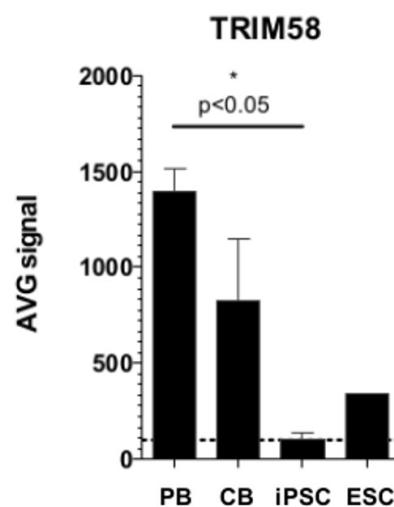


Abbildung 4: Expression von TRIM58 RNA in Erythroblasten kurz vor der E nukleation (Tag 15) der *ex vivo* Erythropoese aus verschiedenen Stammzellquellen (K. Kessel, 2016)

In Folgeexperimenten wurde die Expression von TRIM58 auf RNA-Ebene mittels digitaler Polymerase-Kettenreaktion (dPCR) quantitativ untersucht (Abbildung 5; V. Schaberl, 2019). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der TRIM58 Expression zwischen adulten Stammzellen und iPSC bis zu Tag 11. Im Anschluss stieg die Expression in den Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ jedoch stark an, während in den Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSC nur ein leichter Anstieg

zu beobachten war. An Tag 15 lag die Expression von TRIM58 im Ansatz aus den adulten HSZ im Vergleich zum iPSZ-Ansatz ca. dreifach höher (V. Schaberl, 2019).

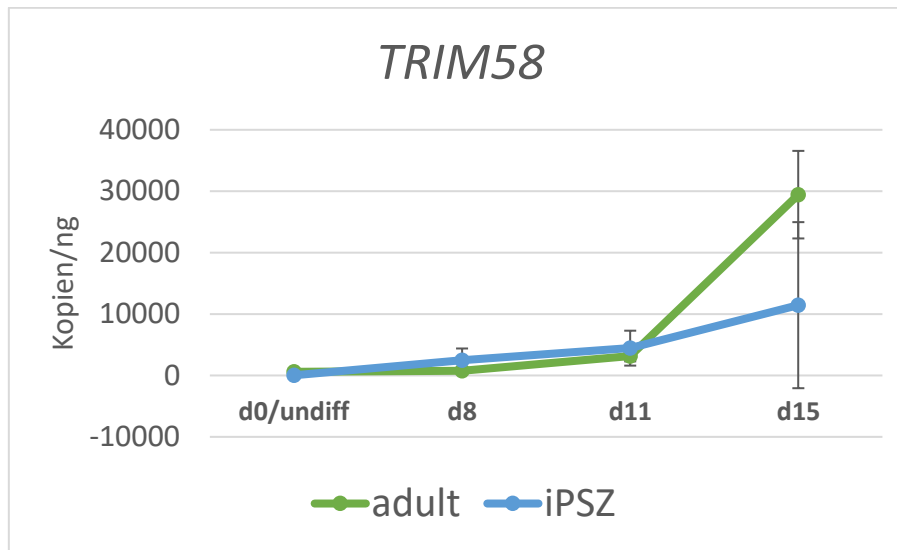


Abbildung 5: Expression von TRIM58 im zeitlichen Verlauf. Vergleich zwischen erythrozytären Zellen aus der *ex vivo* Erythropoese aus HSZ und iPSZ auf RNA-Ebene (V. Schaberl, 2019)

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben zeigen *ex vivo* Erythropoese-Modelle aus iPSZ eine verminderte E nukleation im Vergleich zu solchen Modellen aus adulten HSZ. Die Ergebnisse des beschriebenen Microarrays und der dPCR in Kombination mit den Ergebnissen der Arbeit von Thom *et al.* von 2014 aus der Maus unterstützen die Hypothese, dass eine verminderte TRIM58 Expression in Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ in Zusammenhang mit einer verminderten E nukleation stehen könnte. Aus diesem Grund ist eine vergleichende Darstellung der TRIM58 Expression zwischen den beiden Modellen der *ex vivo* Erythropoese auf Proteinebene im Rahmen von Western Blot Experimenten von Interesse. Weiter ist es interessant die Effekte einer verminderten bzw. fehlenden TRIM58 Expression in Zellen der adulten *ex vivo* Erythropoese zu untersuchen, weshalb im Rahmen dieser Diplomarbeit Vorarbeiten für die Etablierung eines TRIM58-KO in Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ durchgeführt werden.

1.5. CRISPR/Cas9

CRISPR (*engl.*: clustered regularly interspaced palindromic repeats) wurden 1987 erstmals in *E. Coli* beschrieben (Y. Ishino *et al.*, 1987). 2005 wurde beschrieben, dass viele Sequenzen innerhalb dieser CRISPRs aus Plasmiden oder Viren, also aus extrachromosomalen Quellen, stammen (A. Bolotin *et al.*, 2005; F. J. M. Mojica Caset

al., 2005). Die darauffolgende Entdeckung von *cas*-Genen (*engl.*: CRISPR-associated) zeigte, dass dieses System eine gewichtete Rolle in der adaptiven Immunität spielt und es dazu dient, gewisse Signaturen vergangener Invasionen und Infektionen abzuspeichern (K. S. Makarove *et al.*, 2006).

Cas9 besitzt zwei Endonuklease-Domänen, die *HNH-Nuklease* und *RuvC* (K. S. Makarove *et al.*, 2006). Es interagiert mit trans-aktivierender crRNA (*tracrRNA*), welche für die sequenz-spezifische Immunität gegen Parasiten in *Streptokokkus pyogenes* von Bedeutung ist. Dabei bildet die crRNA zunächst einen Doppelstrang mit der *tracrRNA*, welcher durch die RNase 3 aufgelöst wird und so die crRNA aktiviert (E. Deltcheva *et al.*, 2011). Die *HNH*-Domäne schneidet dabei den DNA-Strang, der komplementär zur crRNA ist, während *RuvC* den nicht-komplementären Strang schneidet (G. Gasiunas *et al.*, 2012). Zur Erkennung der Zielsequenz in der DNA ist neben der crRNA auch eine kurze benachbarte DNA-Sequenz PAM (*engl.*: protospacer adjacent Motif) notwendig (G. Gasiunas *et al.*, 2012). PAM dient als Bindestelle für die Endonukleasen. Der crRNA:*tracrRNA* Komplex wurde in der Folge als sgRNA (*engl.*: single guide RNA) konstruiert, um experimentelle Arbeiten zu erleichtern. Diese sgRNA muss zwei Eigenschaften aufweisen. Zum einen beinhaltet sie die 20 Nukleotide strangaufwärts (in 5'-Richtung) der PAM-Sequenz der jeweiligen Ziel-DNA und zum anderen die Sequenz zur Bindung an Cas9 in 3'-Richtung. Damit ist es möglich mit dem CRISPR/Cas9-System jede DNA-Sequenz anzuvisieren, solange sie neben einer PAM-Sequenz liegt (G. Gasiunas *et al.*, 2012). Dabei ist die Effizienz gegenüber anderen Nuklease-Technologien wie ZFN (Zinkfingernukleasen) oder TALEN (*engl.*: Transcription Activator-like Effector Nuclease) abhängig vom gewählten Ziel um bis zu 80 % erhöht (S. Kim *et al.*, 2014).

Das CRISPR/Cas9-System wird im Rahmen dieser Diplomarbeit genutzt, um erste Arbeiten zur Etablierung eines TRIM58-KO in Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ durchzuführen.

1.6. Autophagie in der Erythropoese

Die Autophagie bezeichnet einen zellulären Prozess, in dem Makroproteine oder auch ganze Organellen in Lysosomen verpackt und degradiert werden (Shintani *et al.*, 2004). Die Endprodukte dieser Degradation werden dann entweder wiederverwendet und zum Aufbau anderer zellulärer Strukturen genutzt oder zur Energiegewinnung

abgebaut. Es gibt drei Formen der Autophagie. Die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die selektive Autophagie (Cuervo, 2004), wobei die Makroautophagie die meistbeschriebene Variante darstellt. Bei dieser bilden sich sogenannte Autophagosomen, welche ganze Bereiche der Zelle umschließen können. Diese verschmelzen mit Lysosomen zu Autophagolysosomen, deren Inhalt degradiert wird (D'Arcy, 2019). Bei der Mikroautophagie interagieren die zu degradierenden Substanzen direkt mit den Lysosomen und werden von selbigen aufgenommen und abgebaut (Li *et al.*, 2012). Bei der selektiven Autophagie, auch Chaperon-vermittelte-Autophagie, werden spezifische Proteine im Zytoplasma von einem Chaperon gebunden und in der Folge mit einem Lysosom fusioniert, indem sie an den lysosomalen Rezeptor LAMP-2A binden (Dice, 2007).

Die Initiation der Autophagie erfolgt unter anderem durch den ULK1 Komplex, bestehend aus Ulk1, ATG13, FIP200 und ATG101. Der Komplex initiiert die Formung einer Phagophore, wofür der Phosphoinositol-3-Komplex (PI3K) benötigt wird. Eine Inhibition von PI3K zeigte in Mäusen eine verlangsamte E nukleation der Erythrozyten (Wang *et al.*, 2012). Ein weiterer Komplex aus ATG5, ATG12, ATG16L und LC3 (*engl.*: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) stimuliert die Elongation der Phagophore und ist essenziell für die Entstehung des Autophagosoms. Zu degradierende Proteine werden durch Ubiquitinierung markiert und vom Protein p60 gebunden. P60 bindet wiederum an LC3, das Autophagosom bildet sich und fusioniert schlussendlich mit dem Lysosom (Ndoye and Weeraratna, 2016).

Es gibt weitere Unterformen der Autophagie, welche sich jeweils vom Namen der abzubauenen Struktur ableiten. So spielt im Rahmen der Erythropoese v.a. der Abbau der Mitochondrien eine wichtige Rolle. Dieser wird folgerichtig als Mitophagie bezeichnet (D'Arcy, 2019). Für die Autophagie-Induktion in der Erythropoese sind mehrere Signalwege beschrieben. So gibt es neben dem ULK1-Komplex noch Signalwege mit Beteiligung von FoxO3, NIX (auch BNIP3L) und GABARAPL1 (Zhang, Wu *et al.*, 2015).

Im Rahmen von Microarray Analysen wurde das Expressionsprofil zwischen Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ (PB), Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese von aus Nabelschurblut (CB) gewonnenen HSZ, Erythroblasten aus embryonalen Stammzellen (*engl.*: ESC) und iPSZ (*engl.*: iPSC) verglichen (K. Kessler,

2016). Dabei zeigte sich eine Diskrepanz in der Expression der LC3-Paraloge GABARAPL1, GABARAPL2 und MAP1LC3A (Abbildung 6).

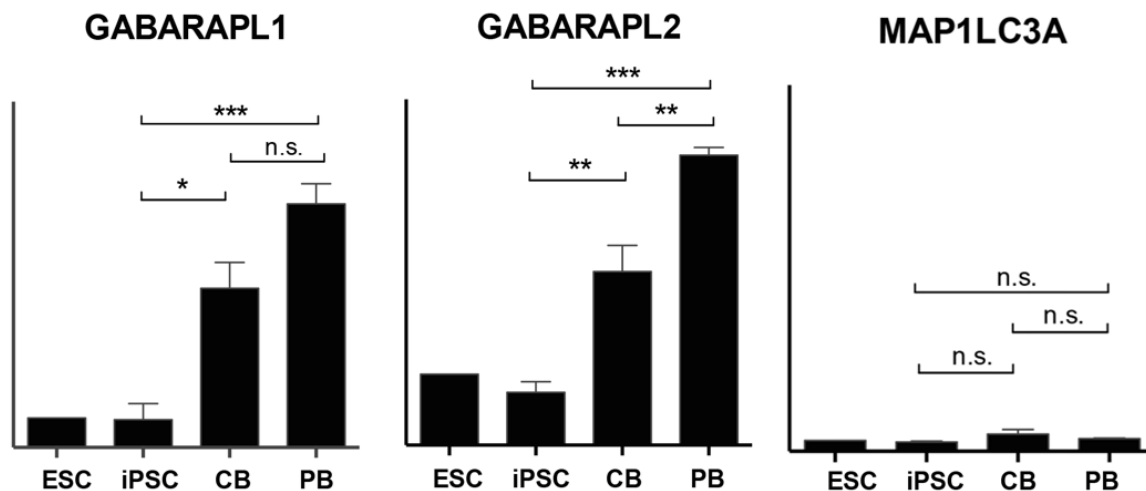


Abbildung 6: Expression von GABARAPL1, GABARAPL2 und MAP1LC3A in *ex vivo* kultivierten Erythroblasten kurz vor der Enukleation (Tag 15) aus verschiedenen Stammzellquellen (K. Kessel, 2019).

In der Folge wurden diese Expressionen mittels dPCR untersucht (Abbildung 7, V. Schaberl, 2019). Dabei zeigte sich, dass die Expression von LC3 in Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSC erhöht war in Vergleich zu Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ. Diese Differenz in der Expression zeigte sich insbesondere an den Tagen 11 und 15, also zu Zeitpunkten in denen polychromatische Erythroblasten und Retikulozyten einen Großteil der Zellpopulation bilden (V. Schaberl, 2019). Diese Ergebnisse widersprechen den Microarray Ergebnissen, da dort eine verminderte Expression der LC3-Paraloge in Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese im Vergleich zur Expression in Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ vorlag. Dabei ist die Vergleichbarkeit aber eingeschränkt, da die Microarray Untersuchungen lediglich einen Zeitpunkt betrachten, während die dPCR Experimente den Verlauf der Expression über vier Zeitpunkte der Kultur darstellen.

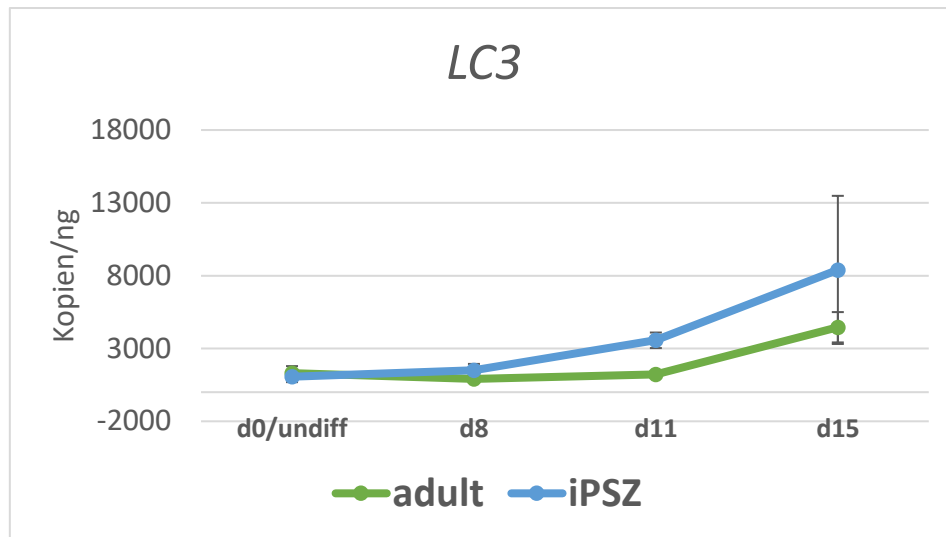


Abbildung 7: Expression von LC3 im Verlauf im Vergleich zwischen erythrozytären Zellen aus der ex vivo Erythropoese aus HSZ und iPSZ auf RNA-Ebene (Verena Schaberl, 2019)

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wird mit LC3 ein zentraler Faktor der Autophagie gewählt und die Expressionskinetik zwischen der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ und iPSZ auf Proteinebene verglichen, um etwaige Differenzen darstellen zu können und so möglicherweise Hinweise auf die Funktion von LC3 und der Autophagie in der Erythropoese zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Western Blot

2.1.1. Proteinisolation

Es wird zunächst ausgetestet, ob es bzgl. der Proteinkonzentration zu Variationen kommt, wenn das Proteom nicht umgehend aus den Zellen isoliert wird, sondern diese zunächst auf -20 °C bzw. -80 °C eingefroren werden.

Dabei werden die Pellets zunächst zweimal mit gekühltem (4 °C) PBS gewaschen und bei 500 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. In der Folge werden die Pellets bei -20 °C bzw. -80 °C eingefroren. Die Lyse erfolgt in RIPA-Puffer, wobei das Volumen der zu erwartenden Proteinkonzentration angepasst wird. So werden Proben von früheren Vorläuferzellen (Undifferenzierte HSZ oder Tag 8 und Tag 11) in 100 bis 200 µl RIPA-Puffer aufgenommen, wohingegen Proben mit weiter differenzierten Reifungsstadien (Tag 13 bis Tag 18) in 50 µl RIPA Puffer resuspendiert werden. In der Folge wird die Suspension in flüssigen Stickstoff schockgefroren und später unter schütteln aufgetaut. Das Prozedere aus Schockfrieren und folgendem Auftauen wird ein zweites Mal wiederholt und die Suspension daraufhin mit 13000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.1.2. Konzentrationsbestimmung mittels Lowry-Assay

Der Lowry-Assay wird nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) durchgeführt. Dabei wird zunächst 1000 µl von Lösung A mit 20 µl Reagenz S vermischt. Von diesem Gemisch werden jeweils 25 µl in jedes benötigte Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert (alle Proben und Standards werden in Duplikaten vermessen). Daraufhin wird jeweils in Duplikaten pro Loch 5 µl Probe bzw. Standard hinzu pipettiert. Die Standards sind so zu wählen, dass die zu erwartende Proteinkonzentration sich innerhalb des Bereichs befindet, welchen die Standards abdecken. Hierzu werden die Proben ggf. mit RIPA Puffer verdünnt. Für die Standards wird BSA (Bovines Serumalbumin) verwendet. Daraufhin werden 200 µl von Reagenz B in jedes Loch pipettiert, alles durch Auf- und Abpipettieren vermischt und für 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Zur Vermessung wird ein ClarioStar-Gerät der Firma BMG Labtech verwendet. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgt mittels Microsoft Excel. Dabei wird den mittels

Photometrie gemessenen Werte der Leerwert (nur RIPA-Puffer) subtrahiert. In der Folge wird zu den Werten der BSA-Reihe die Regressionsgerade bestimmt. In die Funktion der Regressionsgerade werden in der Folge die Werte der Proben eingesetzt und so die Konzentration erhalten.

2.1.3. SDS-Page

Die gewünschte Menge Protein (im Rahmen dieses Projektes 20 µg oder 30 µg) wird mit Protease-freies Wasser und 4x Laemmli Puffer (enthält 1:10 verdünnt Beta-Mercaptoethanol) zu einem Gemisch mit dem Volumen von maximal 30 µl zusammen pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Dabei wird bei allen Proben einer SDS-Page das gleiche Volumen anvisiert. Des Weiteren wird in Folgeexperimenten die Proteinmenge einer zuvor definierten Zellzahl aufgetragen. In der Folge wird die Protein-Lösung bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Das Gel (Mini-Protean TGX stain-free gels (4-20 %), Bio-Rad)) wird ausgepackt und in die Gelkammer eingespannt, welche mit Laufpuffer (100 ml 10x TGS-Puffer (Bio-Rad) und 900 ml ddH₂O) befüllt wird. Die Taschen des Gels werden in der Folge mit einer 100 µl Pipette gespült und mit dem Protein-Gemisch befüllt. Als Standard wird der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard von Bio-Rad verwendet. Das Gel wird bei 60 V für ca. 30 Minuten gestartet bis die Proben aus dem Sammelgel gelaufen sind und dann auf 100 V erhöht.

2.1.4. Proteintransfer

2.1.4.1. Trockentransfer

Die PVDF-Membran wird in 100 % Methanol aktiviert für ca. 3 Minuten bis diese durchsichtig wird. Zwei Stapel Filterpapier (Bio-Rad) werden in Transferpuffer (200 ml Trans-Blot® Turbo™ 5x Transferpuffer (Bio-Rad), 200 ml Ethanol, 600 ml ddH₂O) gelegt und in der Folge einer der Stapel in der Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) Kassette platziert. Darauf kommt die PVDF-Membran, dann das Gel aus der SDS-Page und der zweite Stapel der Mini Transfer Packs. Dabei ist nach jedem Schritt darauf zu achten eventuelle Luftblasen zu entfernen. Die Kassette wird verschlossen, in den Transblot Turbo (Bio-Rad) eingespannt und das Programm (25 V, 2,5 A, 6 Minuten) gestartet.

2.1.4.2. Feuchttransfer

Die Schwämme und Filterpapiere werden in Transferpuffer befeuchtet (100 ml 10x TG-Puffer (Bio-Rad), 200 ml Methanol, 700 ml ddH₂O; bei -20 °C gelagert). Die PVDF-Membran wird für 3 Minuten in Methanol aktiviert, bis sie durchsichtig wird. Auf die

schwarze Seite der „Sandwich“-Kammer wird nun zunächst ein Schwamm, dann Filterpapier, Gel, Membran, wieder Filterpapier und ein zweiter Schwamm gelegt und alles eingespannt. Dabei ist nach jedem Schritt darauf zu achten eventuelle Luftblasen zu entfernen. Die „Sandwich“-Kammer wird in die Transferkammer eingelegt und diese mit Transferpuffer befüllt und unter stetigem Rühren mittels eines Magnetrührers der Transfer gestartet (400 mA, 100 V für eine Stunde). Der Transfer erfolgt gekühlt bei 4 °C.

Nach dem Transfer wird die Membran mit Ponceau S gefärbt (Inkubation unter Schwenken für ca. 10 Sekunden) und so der Proteintransfer überprüft.

2.1.5. Immunoblotting

Die Membran wird mit 5 % Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wird der Primärantikörper auf die Membran gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert (Verdünnungen der jeweiligen Antikörper im Materialteil). Am Folgetag wird dieser entfernt, aufgehoben und bei -20 °C gelagert. Die Membran wird 3x mit TBS-T (100 ml TBS (Bio-Rad), 900 ml ddH₂O, 1 ml Tween (Bio-Rad)) für 10 Minuten gewaschen, woraufhin der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben wird und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wird (Verdünnungen der verwendeten Antikörper im Materialteil). In der Folge wird die Membran erneut 3x mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen. Daraufhin wird das HRP-Substrat (Clarity Western ECL Substrate Kit von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers vorbereiten) auf die Membran gegeben und diese wird für 3 Minuten im Dunkeln inkubiert. Das Substrat wird in der Folge entfernt und die Membran in der Folge im ChemiDoc (Bio-Rad) vermessen. Nach Detektion der Chemilumineszenz wird die Membran 3x gewaschen und mit dem Antikörper der Ladekontrolle nach obigem Schema inkubiert. Sollte sich die Ladekontrolle bzgl. der Größe in etwa auf Höhe des vorherig vermessenen Proteins befinden, erfolgt eine 15-minütige Inkubation mit Stripping-Puffer (Bio-Rad), um alle Antikörper zu entfernen. Daraufhin ist zunächst eine erneute Inkubation mit 5 % Milchlösung für 1 Stunde notwendig, ehe der Ladekontroll-Antikörper auf die Membran gegeben werden kann. Bei der Inkubation der Ladekontroll-Antikörper wird gleich dem oben beschriebenen Prozedere für Primär- und Sekundärantikörper vorgegangen.

2.1.6. Auswertung

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgt mit ImageLab und Excel. Dabei werden zunächst in ImageLab die Banden markiert und so die Volumina bestimmt. In Excel wird nun das Volumen der Bande durch die Bande der Ladekontrolle (GAPDH) dividiert und so die Werte korrigiert. Bei unterschiedlichen Proteinmengen, welche bei den Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ aufgetragen werden (Epo45 und Epo47 20 µg, Epo79 30 µg), ist weiterhin eine Normalisierung der Werte auf den höchsten Wert notwendig, um die Berechnung eines Mittelwertes und damit auch eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Ansätzen der *ex vivo* Erythropoese zu ermöglichen. Bei Epo45 und Epo47 können aufgrund mangelnden Proteinmaterials nur 20 µg aufgetragen werden. Die graphische Darstellung und Berechnung des Mittelwertes bzw. der Standardabweichungen erfolgt mit GraphPad Prism. Eine statistische Auswertung erfolgt nicht, da aufgrund der Komplexität der Kulturen der *ex vivo* Erythropoese nur eine geringe Fallzahl zur Verfügung steht.

2.2. TRIM58-KO mittels CRISPR/Cas9

2.2.1. sgRNA-Design

Die sgRNA wird mittels GPP (*Genetic Perturbation Platform*) entworfen, welches vom Broad Institute zur Verfügung gestellt wird (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>). Das Programm verwendet die "Rule Set 2" Methode und den CFD-Score (*Cutting Frequency Determination*) für die Berechnung und Prognostizierung der sgRNAs für TRIM58. In die sgRNA wird eine Schnittstelle für *BbsI* eingebaut, um die Klonierung in das px458-Plasmid zu ermöglichen (Addgene Plasmid #48138, welches freundlicherweise von Feng Zhang zur Verfügung gestellt wurde). Das px458-Plasmid trägt neben der genetischen Information für Cas9 weiter GFP (*engl.*: green fluorescent protein) als Expressionsmarker und Schnittstellen verschiedener Enzyme wie z.B. *BbsI*.

Es werden insgesamt 4 sgRNAs gewählt. Diese zielen auf die Exons 1,2,3 und 5 des TRIM58 Gens ab. Tabelle 1 zeigt die verwendeten sgRNAs und die Exons, auf welche diese abzielen.

Tabelle 1: Erstellte und verwendete sgRNAs

sgRNA	Sequenz 5' → 3'	Exon
1	AGAACTCGGAGATGCACCTG	1
2	GGAGGACGCCTTGACTCAGG	2
3	TTGGAGTTTGAGAAGCATCG	3
4	ATGCTGTCTTCAGTTCCATG	5

2.2.2. Annealing

Zum Annealing der sgRNAs werden jeweils 100 µM von diesen in 1 µl mit 1 µl 10x T4 Ligation-Puffer (New England Biolabs), 6,5 µl ddH₂O und 0,5 µl T4 PNK (New England Biolabs) zusammen pipettiert. In der Folge wird das Gemisch bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, dann auf 95 °C für Minuten erhitzt und abschließend auf 25 °C abgekühlt (Abkühlen mit 5 °C/Minute).

2.2.3. Ligation mit px458-Plasmid

50 ng des durch *Bbs*I geschnittenen px458-Plasmids werden mit 1 µl der sgRNAs nach dem Annealing (1:200 verdünnt), 5 µl 2x Quickligation Buffer (New England Biolabs) und ddH₂O (auffüllen auf 10 µl= vermischt. Dazu wird 1 µl Quick Ligase (New England Biolabs) pipettiert und alles für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.4. Transformation

Die Transformation erfolgte in NEB (New England Biolabs) 5-alpha kompetente *E. coli* nach Angaben des Herstellers. Es werden anschließend 200 µl der unverdünnten Bakterien 1:4 in SOC-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. In Folge werden die Bakterien auf einer LB-Agar-Platte (mit 50 mg/l Ampicillin) ausgestrichen und für ca. 17 Stunden bei 37 °C im Inkubator gelagert. Über eine Plasmid vermittelte Ampicillin-Resistenz wird sichergestellt, dass lediglich Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, auf der Platte Kolonien bilden können.

2.2.5. Mini-Präparation

Eine Kolonie von der Agarplatte wird entnommen und in 3 ml LB-Medium gelöst und bei 37 °C und 250 Upm für weiterhin ca. 17 Stunden inkubiert.

2.2.6. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus den kultivierten E. Coli wird mittels des Kits von Qiagen (QIAprep® Spin Miniprep Kit) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Konzentration mittels NanoDrop™ One bestimmt. In der Folge wird die DNA zur Sequenzierung durch Eurofins eingeschickt (Mix2Seq-Kit; Durchführung nach Angaben des Herstellers).

2.2.7. Nukleofektion

Die Nukleofektion der Plasmide wird mit dem Lonza 4D-Nucleofector™ durchgeführt. Zunächst wird die erste Nukleofektion an K562-Zellen absolviert. Es werden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Plasmid verwendet. Das zu verwendende Programm ist FF120. Die Nukleofektions-Lösungen 1 und 2 werden zunächst vorbereitet. Lösung 1 besteht aus 2 g ATP Disodium Salz (Sigma-Aldrich) und 1,2 g Magnesiumchlorid Hexahydrat (Sigma-Aldrich), welche in 10 ml Nuklease-freiem Wasser gelöst werden. Daraufhin wird die Lösung steril filtriert, aliquotiert (20 µl) und bei -20 °C gelagert. Lösung 2 besteht aus 6 g Potassium-Phosphat (Sigma-Aldrich), 0,6 g Natriumbikarbonat (Sigma-Aldrich) und 0,2 g Glukose (Sigma-Aldrich) gelöst in 500 ml Nuklease-freiem Wasser. Daraufhin wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, die Lösung steril filtriert und bei 4 °C in Aliquote zu jeweils 1 ml gelagert. Es werden zunächst 2 µg des jeweiligen Plasmids vorgelegt. Weiterhin wird eine 6-Loch-Platte vorbereitet, wobei in jedes Loch 2 ml von RPMI1640 Medium mit 10 % FBS pipettiert wird. Ein Antibiotikum wird dem Medium nicht hinzugegeben. Die 6-Loch-Platte wird in einem Inkubator bei 37 °C aufgewärmt. 3 ml des Mediums werden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen im Wasserbad aufgewärmt. 20 µl der Nukleofektions-Lösung 1 werden mit 1 ml der Nukleofektions-Lösung 2 vermischt und von diesem Gemisch werden 20 µl entnommen und die Zellpellets darin resuspendiert. Daraufhin werden 20 µl der resuspendierten Zellen entnommen und mit 2 µg des jeweiligen Plasmids vermengt. 20 µl dieses Gemischs werden nun in ein Loch der Nukleofektionsplatte pipettiert. Die Platte ist dem Cell Line Optimization 96-well Nucleofector™ Kit von Lonza entnommen. Diese wird in das Gerät gestellt und die Nukleofektion durchgeführt. Daraufhin wird die Platte entnommen und den verwendeten Löchern wird 80 µl des Mediums hinzu pipettiert, resuspendiert und in die vorbereitete 6-Loch-Platte überführt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C über Nacht. Am Folgetag wird dem Medium Penicillin/Streptomycin in einer Verdünnung von 1:100 hinzu pipettiert (Ausgangskonzentration 10,000 I.U./ml).

Für die Nukleofektion von primären Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ (Tag 8) werden folgende Programme verwendet: EO 100, EO 117, EO 115. Als Positivkontrolle wird das pmaxGFP-Plasmid verwendet, welches ebenfalls Teil des Cell Line Optimization 96-well Nucleofector™ Kit ist. Als Negativkontrolle wird das gesamte Protokoll der Nukleofektion mit Erythroblasten durchgeführt ohne Hinzugabe eines Plasmids.

2.2.8. Zellsortierung mittels Fluoreszenz-Aktivierter-Durchflusszytometrie

Die Zellen werden resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Daraufhin werden die Zellen für 7 min bei 350 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Pellet wird in 500 µl Medium (RPMI1640) resuspendiert und in ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt. Weiter wird in 1,5 ml Zentrifugationsgefäße 500 µl PBS vorgelegt. Als GFP negative Kontrolle werden CD34⁺ Zellen verwendet, welche nicht nukleofektiert wurden. Die Sortierung der Zellen wird in der *Flow Cytometry Core Facility* der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. In Abbildung 8 ist schematisch die Gating-Strategie dargestellt zur Selektierung der GFP-positiven Zellen.

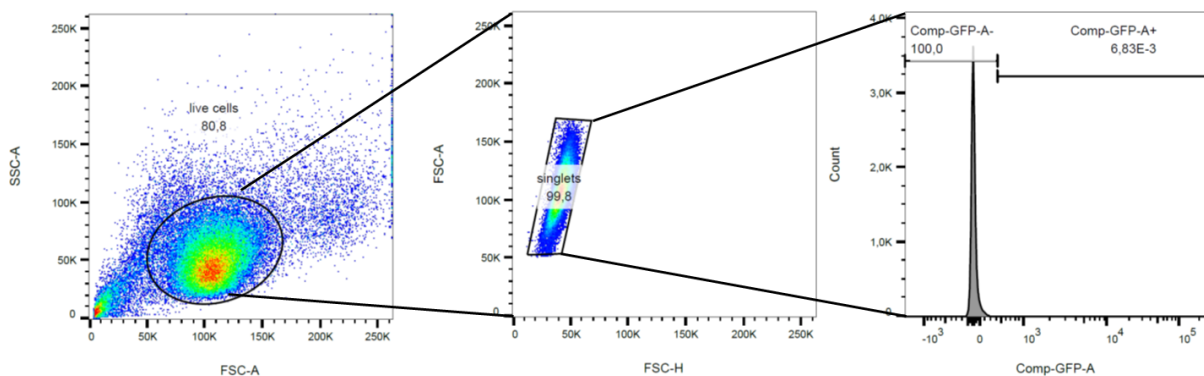


Abbildung 8: Gating-Strategie für die Selektion der GFP-positiven Zellen am Beispiel der Negativkontrolle (CD34⁺-Zellen).

2.2.9. DNA-Isolation aus sortierten Zellpellets

Zur DNA-Isolation wird das Quick-Extract Kit von Lucigen verwendet. Dabei wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgt mittels NanoDrop™ One von Thermo Fisher.

2.2.10. Bestimmung der Annealing-Temperatur mittels PCR und Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur der Primer an die DNA wird eine PCR durchgeführt mit verschiedenen Temperatur-Leveln. Abbildung 9 zeigt die verwendete Gradienten-PCR. Bei dieser werden acht Temperatur-Level zwischen 58 °C und 70,5 °C betrachtet. Dabei werden 5 µl vom 2x Phusion Green HSII High Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher) mit 0,5 µl der Primer, 3 µl Wasser und 1 µl (10 µM) der jeweiligen aus den K562-Zellen aufgereinigten DNA zusammen pipettiert. In der Folge werden die Produkte in einem 1 %-igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Farbstoff werden 8 µl Midori Green (NIPPON Genetics) verwendet, als Standard der GeneRuler 100Bp Plus DNA Ladder von Thermo Fisher. Die Gelelektrophorese läuft für 30 min bei 100 Volt. Daraufhin wird das Gel im Chemidoc (Bio-Rad) betrachtet und in der Folge in UV-Licht die passenden Banden ausgeschnitten (sgRNA1: 572 bp, sgRNA3: 506 bp, sgRNA4 343 bp) und die DNA nach Angaben des Herstellers extrahiert (QIAquick® Gel Extraction Kit) und via NanoDrop™ One (Thermo Fisher) vermessen. Die DNA wird in der Folge zur Sequenzierung durch Eurofins eingeschickt (Mix2Seq-Kit; Durchführung nach Angaben des Herstellers).

Tabelle 2: Verwendete Primer für Gradienten-PCR und Sequenzierung

Primerpaar 1	
	Sequenz 5' -> 3'
Forward	GGCTCGTCTGAGCTCTTGAA
Reverse	GCGCCTCACCTGGTAGC
Länge	572
Primerpaar 3	
	Sequenz 5' -> 3'
Forward	CCTGTGGCAAATGGGAAC
Reverse	AGTCTCACATCTGCCTGCTTT
Länge	506
Primerpaar 4	
	Sequenz 5' -> 3'
Forward	TCCTTTTCAGGGTGTGTGAGAGG
Reverse	CCACAATACGAGGCAAACCC
Länge	343

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 dargestellt. Ebenfalls zeigt Tabelle 2 die genaue Größe der amplifizierten DNA-Abschnitte. Die Primer werden mit Primer Blast NCBE erstellt und von Eurofins synthetisiert. Bei der Erstellung der Primer wird darauf geachtet, dass die amplifizierten Fragmente das jeweilige Exon von TRIM58 enthält, welches durch die sgRNA anvisiert wird. So beinhaltet z.B. das von Primerpaar 1 amplifizierte Fragment das Exon 1, in welchem sgRNA1 ansetzt.

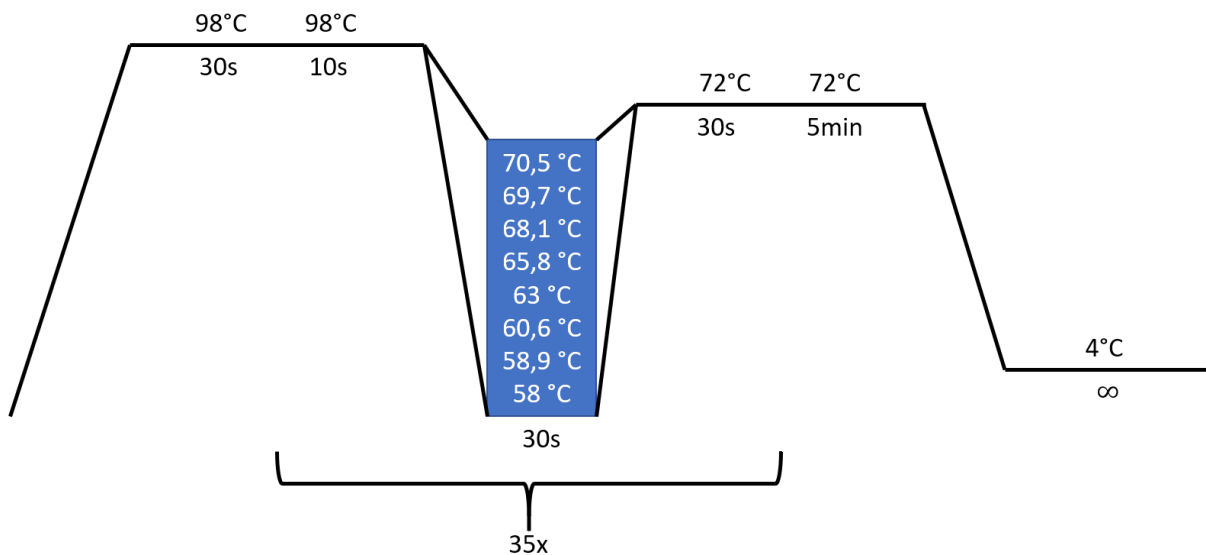


Abbildung 9: Gradienten PCR zur Bestimmung der Annealing-Temperatur der Primer.

2.3. Material

2.3.1. Western Blot

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Produktnummer
Methanol	Roth	7342.2
β -Mercaptoethanol	Aldrich	#STBH3182
Ampuwa®	Fresenius	13CAP291
Mikrotiterplatte 96er	Costar	3595
RIPA Buffer	Pierce	89900
Protease+Phosphatase Inhibitor	Sigma	PPC1010
Prot. Assay Reagenz A	Bio-Rad	5000114
Prot. Assay Reagenz B	Bio-Rad	5000113
Prot. Assay Reagenz S	Bio-Rad	5000115
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad	1610394
Filterpapier	Bio-Rad	1703932
TBS 10x	Bio-Rad	1706435
Clarity Western ECL Substrate Kit	Bio-Rad	1705060
Ponceau S	Sigma	P7170
Milchpulver	Roth	T145.2
BSA	Sigma	A7906
Tris/Glycerin/SDS Buffer 10x	Bio-Rad	1610732
Tris/Glycin Buffer 10x	Bio-Rad	1610734
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	1610747
TGX Stain Free Gel 4-20%	Bio-Rad	4568093
Immun-Blot® PVDF Membrane	Bio-Rad	1620174
Stripping Buffer	Pierce	21059
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transferpuffer	Bio-Rad	10026938

Antikörper

Name	Typ/Spezies	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung
GAPDH Antikörper	Primär/Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-32233	1:1000
α -Tubulin	Primär/Hase	Cell Signalling	2144S	1:1000
Dynein-IC- AK	Primär/Hase	Abcam	Ab171964	1:1000
TRIM58 Polyclonal	Primär/Hase	Invitrogen	PA549123	1:1000
LC3 Antikörper	Primär/Hase	Cell Signalling	2775S	1:1000
Anti-Mouse igG	Sekundär	Cell Signalling	7076S	1:3000
Anti-Rabbit	Sekundär	Invitrogen	G21234	1:10000

Geräte und Kits

Name	Hersteller	Produktnummer
PowerBac™ Basic	Bio-Rad	1645050
ClarioStar	BMG LABTECH	n.V.
Waage	Mettler Toledo	M54002TSDR
ChemiDoc™ Touch	Bio-Rad	1708381
C1000 Touch™	Bio-Rad	1851196
ThermoMixer C	Eppendorf	5382000015
Mini-PROTEAN® Tetra Cell, 2- Gel System	Bio-Rad	1658005EDU
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad	1704150

2.3.2. TRIM58-Knockout

Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Produktnummer
pSpCas9(BB)-2A-GFP (px458)	Addgene	48138
LB Broth with Agar	Sigma	L7533

BbsI-HF	New England Biolabs	R3539L
T4 Ligation-Puffer	New England Biolabs	B0202S
T4 PNK	New England Biolabs	M0201S
NEB 5-alpha kompetente E. coli	New England Biolabs	C2987I
Ampicillin Sodium Salt	Sigma-Aldrich	A0166
SOC-Medium	New England Biolabs	B9020S
Midori Green DNA Staining Solution	Bulldog Bio	MG04
Dream Taq Green PCR Master Mix	Thermo Fisher	K1081
Phusion Green Hot Start II High Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher	F566L
Gene Ruler 100 Bp Plus	Thermo Fisher	SM0324
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140122
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco	14190-094
LB Broth Lennox	Sigma-Aldrich	L7658
FBS	Hyclone	TX 40001
RPMI1640	Sigma-Aldrich	R8758
ATP Disodium Salz	Sigma-Aldrich	A3377
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich	M2393
Potassium-Phosphat	Sigma-Aldrich	P5655
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich	S5761
Glukose	Sigma-Aldrich	G8270

Geräte und Kits

Name	Hersteller	Produktnummer
PowerBac™ Basic	Bio-Rad	1645050
Waage	Mettler Toledo	M54002TSDR
ThermoMixer C	Eppendorf	5382000015
Quick-Extract Kit	Lucigen	QE09050
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	28704

QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	27104
Mix2Sec Kit	Eurofins	3094-000SSK
Quick Ligase Kit	New England Biolabs	M2200S
4D-Nucleofector™	Lonza	AAF-1002B
6-well-Platte	Sarsted	20007261
15 ml Schraubröhre mit Spitzboden	Sarsted	20010118
Culture Dish 55cm ²	Corning	430167
Cell Line Optimization 96-well Nucleofector™ Kit	Lonza	V4SC-9096
NanoDrop™ One	Thermo Fisher	ND-ONE-W

2.3.3. Zellmaterial

Für das CRISPR/Cas9-Projekt werden K562-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane, immortalisierte Zelllinie, welche auf Zellen einer myeloischen Leukämie basiert. Weiterhin werden Tag 8 Proben (Erythroblasten) verwendet. Diese werden dem aktuellen Modell der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ der Gruppe entnommen (Bernecker *et al.*, 2019, *Frontiers in Physiology*).

Im Rahmen der Western Blot Experimente wird die Expressionskinetik in Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ und adulten HSZ verglichen. Die dazu entnommenen Zellen entsprechen Tag 0, Tag 8, Tag 11, Tag 13, Tag 15 und Tag 18 vor und nach Retikulozyten Filtrierung (je nach verfügbarem Material). Das verwendete *ex vivo* Erythropoese Modell aus iPSZ wurde von Bernecker *et al.* 2019 in *Stem Cells and Development* beschrieben. Das Modell für die *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ ist in Bernecker *et al.* von 2019 in *Frontiers in Physiology* beschrieben.

Es werden 3 biologische Replikate der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ (Epo45, Epo47 und Epo79) und 2 biologische Replikate der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ (Cml-1 und PEB-7) verwendet. Für den Vergleich der LC3 Expression an Tag 0 werden mit SZ18 (Stammzelle) und SZ19 auf Seite der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ und Tag 0 von Cml-1 und PEB-7 für die *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ jeweils 2 biologische Replikate verwendet. Die Vorexperimente bzgl. der Isolation und

Transfermethodik werden mit einem weiteren biologischen Replikat der adulten Erythropoese (Epo49) durchgeführt.

Die verwendeten Pellets und die in diesem Stadium vorherrschenden Zellen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Zellpellets und vorherrschendes Zellmaterial

Tag der Gewinnung des Zellpellets	Zellmaterial
Tag 0	Hämatopoetische Stammzelle (adulte Erythropoese) bzw. iPSZ
Tag 8	Basophile Erythroblasten
Tag 11	Polychromatische Erythroblasten
Tag 13	Polychromatische Erythroblasten und Normoblasten
Tag 15	Normoblasten und Retikulozyten
Tag 18	Retikulozyten

Das im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendete humane Zellmaterial der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ (Epo45, Epo47, Epo49, Epo79, SZ18 und SZ19 für die Western Blot Experimente; Tag 8 Erythroblasten für die CRISPR/Cas9 Experimente) wird Stammzellspender*innen nach deren Aufklärung und schriftlichem Einverständnis entnommen. Die Stammzellspende dient zum Zwecke der allogenen Stammzelltransplantation und lediglich überschüssige Stammzellen werden zu Forschungszwecken verwendet. Dies erfolgt in Einklang mit der Deklaration von Helsinki und nach positivem Votum der lokalen Ethikkommission (EK 27 165ex 14/15). Dasselbe gilt das Zellmaterial der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ. Die aus kultivierten Erythroblasten hergestellten Cml-1 und PEB-7 iPSZ werden ebenfalls nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis gemäß der Deklaration von Helsinki und nach positivem Votum durch die lokale Ethikkommission verwendet (PEB-7: EK27–165ex 14/15; Cml-1: Ethikvotum aus Bonn, Deutschland, Lfd. Nr. 244/19). Die Kultivierung der adulten HSZ und die Generierung und Kultivierung der iPSZ erfolgt durch die Labor-AG des Universitätsklinikums für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Universität Graz, und wird in der Folge für die Experimente im Rahmen dieser Diplomarbeit zur Verfügung gestellt. Die Spender*innendaten werden anonym behandelt.

3. Ergebnisse

3.1. Western Blot Experimente

3.1.1. Isolation und Transfermethodik

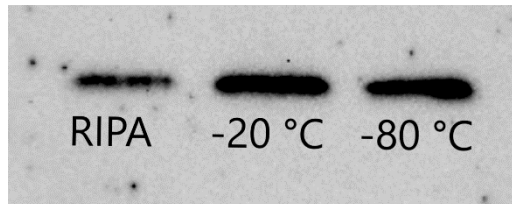


Abbildung 10 GAPDH Expression nach Trockentransfer. Auftrag von 20 µg Protein von Epo49, Tag 8.

Sowohl beim Feuchtttransfer, als auch beim Trockentransfer zeigen sich vergleichbar ausgeprägte Banden (Abbildung 10 und Abbildung 11) für GAPDH im Western Blot, was in beiden Fällen für eine erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran des Western Blots spricht. In beiden Fällen zeigt sich die Proteinausbeute bei der Isolation unabhängig davon, ob die Isolation der Proteinpellets umgehend mittels RIPA-Puffer erfolgt oder durch die Pellets zunächst bei -20 bzw. -80°C gelagert werden.

Für die Folgeexperimente werden Zell-Pellets zunächst bei -20 °C eingefroren und später weiterverarbeitet sowie die Methodik des Feuchtttransfers zur Übertragung des Proteoms auf die Membran festgelegt.

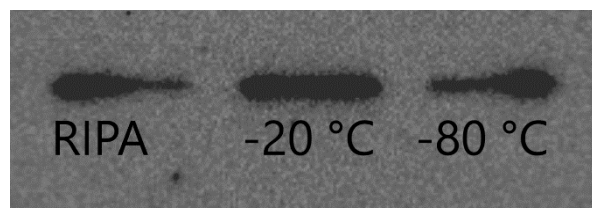


Abbildung 11: GAPDH Expression nach Feuchtttransfer. Auftrag von 20 µg Protein von Epo49, Tag 8.

3.1.2. Ladekontrolle

Aufgrund des sich im Rahmen der Erythropoese stark verändernden Zellmaterials ist die Bestimmung einer passenden Ladekontrolle für WB-Experimente schwierig, da sich das Proteom in den verschiedenen Entwicklungsstadien von der HSZ bzw. der iPSZ hin zum kernlosen Retikulozyten stetig verändert. Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden mit GAPDH, β -Aktin und α -Tubulin drei Ladekontrollen getestet und verglichen.

α -Tubulin

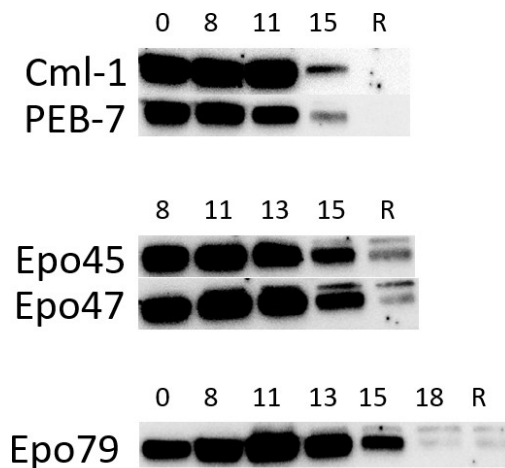


Abbildung 12: α -Tubulin Expression in den jeweiligen Zellreihen nach Tagen (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils 30 μ g. Epo45 und Epo47 jeweils 20 μ g pro Probe.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse bei Verwendung von α -Tubulin als Ladekontrolle. So ist bei allen Zellreihen zu erkennen, dass die Expression mit steigender Differenzierung der Zellen deutlich abnimmt. So ist im Vergleich von Tag 13 zu Tag 15 eine deutliche Abnahme der Expression erkennbar. An Tag 18 sowie den Retikulozyten Pellets ist kaum noch eine Expression von α -Tubulin erkennbar. Auffällige Doppelbanden zeigen sich bei Epo45, Epo47 und Epo79, vor allen Dingen in den differenzierteren Stadien, in denen die α -Tubulin Banden, schwächer erscheinen. Bei diesen Banden handelt es sich vermutlich um TRIM58, welches sich auch nach mehrmaliger Behandlung mit Stripping Puffer nicht gänzlich von der Membran des Western Blots entfernen ließ. α -Tubulin und TRIM58 weisen mit 50 kDa und 55 kDa sehr ähnlichen Proteingrößen auf.

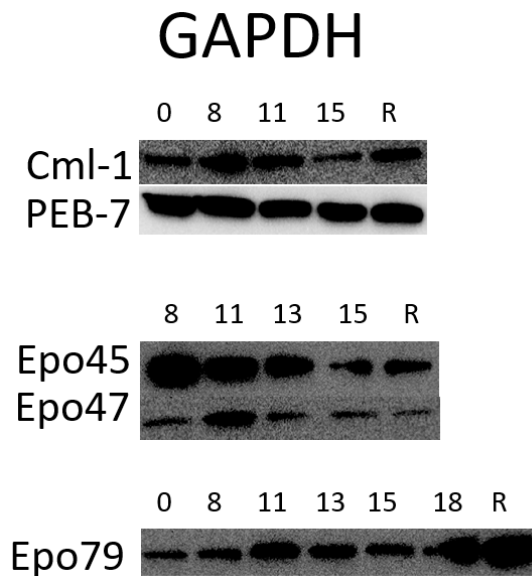


Abbildung 13: GAPDH Expression in den jeweiligen Zellreihen nach Tagen (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils 30 μg Protein. Epo45 und Epo47 jeweils 20 μg pro Probe.

Abbildung 13 zeigt die GAPDH Expression zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. in den verschiedenen Differenzierungsstadien. Im Vergleich zur Expression von α -Tubulin, ist die Expression von GAPDH gleichmäßiger einschließlich der späteren Analysezeitpunkte. Die Expression von GAPDH unterliegt allerdings auch Schwankungen im Laufe der Erythropoese.

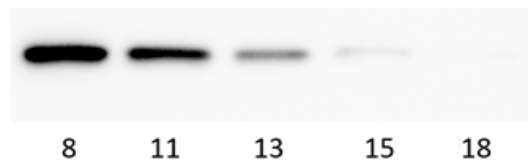


Abbildung 14: β -Aktin Expression nach Tagen 8-18. Auftrag von 20 μg Protein aus Epo49.

Abbildung 14 zeigt die Expression von β -Aktin während der verschiedenen Zeitpunkte der Erythropoese, die im Rahmen von Vorexperimenten mit der Epo49-Reihe gemessen wurden. Auch hier zeigt sich wie schon zuvor bei α -Tubulin eine Abnahme der Expression mit zunehmender Ausreifung der erythrozytären Zellen. Die späten Zeitpunkte Tag 15 und Tag 18 zeigen kaum noch eine Expression von β -Aktin.

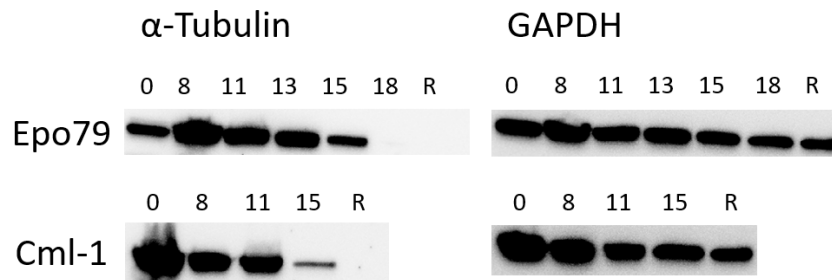


Abbildung 15: α -Tubulin und GAPDH Expression zu verschiedenen Zeitpunkten (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten) Auftrag nach Zellzahl. Pro Probe wurde die Proteinmenge aus 900.000 Zellen aufgetragen.

Abbildung 15 zeigt die Expression von α -Tubulin und GAPDH bei Auftrag einer Proteinmenge, welche aus einer konstanten Zahl von 900.000 Zellen gewonnen wird. Dabei zeigt sich wie im vorherigen Versuch die stetige Abnahme der α -Tubulin Expression mit zunehmender Zelldifferenzierung bzw. Zeitdauer. Die Reduzierung der Expression tritt besonders ab dem 15. Tag ein und es zeigt sich an Tag 18 sowohl vor als auch nach Retikulozyten-Filtration keine α -Tubulin Expression. GAPDH zeigt im Laufe der Erythropoese kaum Schwankungen der Expression. Dies trifft insbesondere auch auf die späten Differenzierungsstadien, wie z.B. den Retikulozyten zu.

Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse wird in den folgenden Experimenten GAPDH als Ladekontrolle zur Korrektur der Expressionswerte festgelegt.

3.1.3. TRIM58 Expression

Bei Betrachtung der Färbungen im Western Blot fällt zunächst die Ausbildung einer Doppelbande auf (Abbildung 16 A, Abbildung 17 A). Diese beiden Banden werden für die Auswertung und Ermittlung des Ergebnisses in ihrer Expression summiert, da eine genaue Differenzierung nicht möglich ist.

Nach Korrektur mit GAPDH (Abbildung 13 dargestellt) zeigt sich die Expression von TRIM58 in Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ ansteigend von Tag 8 bis zu Tag 15 (Abbildung 16 B und C). In der Epo79-Linie zeigt sich die Expression an Tag 0 allerdings im Vergleich zu den folgenden Tagen 8 und 11 erhöht (Abbildung 16 B). In allen verwendeten biologischen Replikaten trat das deutliche Maximum der Expression an Tag 15 auf. Im Anschluss (Tag 18, Epo79) und nach Filtrierung der Retikulozyten in allen Zellreihen zeigte sich ein deutlicher Abfall der TRIM58 Expression (Abbildung 16 B und C). Vor Korrektur mit GAPDH ist dieser Abfall der TRIM58 Expression in Epo79 nicht zu erkennen (Abbildung 16 A) Insgesamt zeigt sich

in allen Zellreihen die geringsten TRIM58 Expressionen somit in den primitiveren Entwicklungsstadien (Tag 8, Tag 11), sowie den stark ausdifferenzieren Stadien (Tag 18 und Retikulozytenstadium), getrennt durch einen Expressionsmaximum an Tag 15 (Abbildung 16 B und C).

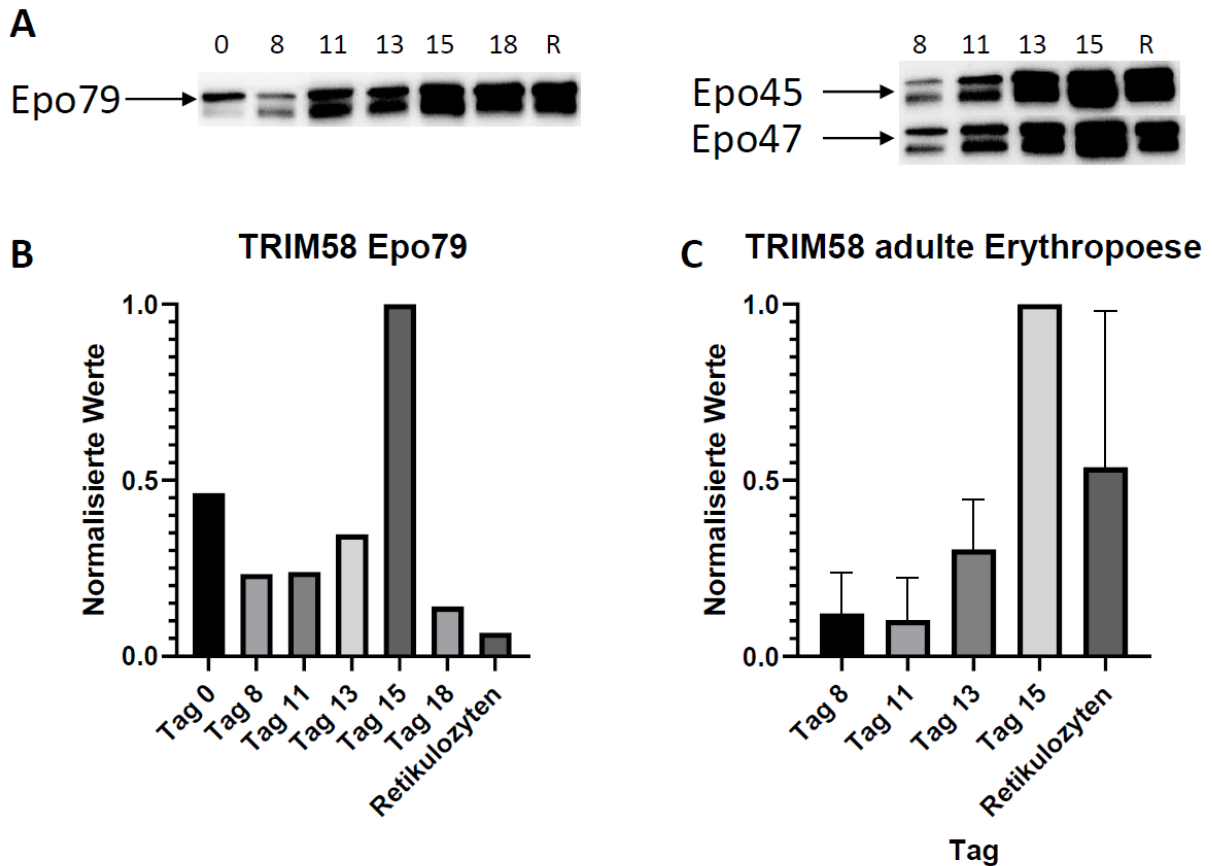


Abbildung 16: Expression von TRIM58 in den Adulten-Zellreihen Epo79, Epo45 und Epo47 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag 30 μ g bei Epo79, jeweils 20 μ g bei Epo45 und Epo 47. A: Western Blot Banden von TRIM58. B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte der Expression in Epo79. C: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Epo 45, Epo47 und Epo 79 nach Zeitpunkt.

Bei der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ fällt auf, dass TRIM58 in undifferenzierten iPSZ (Tag 0) nicht exprimiert wird und bis Tag 15 der Erythropoese zunimmt und dort sein Maximum erreicht (Abbildung 17 A und B). In den Retikulozyten zeigt sich daraufhin wieder eine verminderte Expression. Der Verlauf der Expression von TRIM58 im Verlauf der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ ist also ähnlich zu der in Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ. Ein Unterschied zeigt sich zwischen den Tagen 8 und 11. Während im adulten System die Expression konstant bleibt (Abbildung 16 B und C), zeigt sich im iPSZ-System ein deutlicher Anstieg der Expression zwischen diesen beiden Zeitpunkten (Abbildung 17 B). Dabei ist aber zu

erwähnen, dass gerade an Tag 11 die Standardabweichung bei den Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ sehr hoch ist.

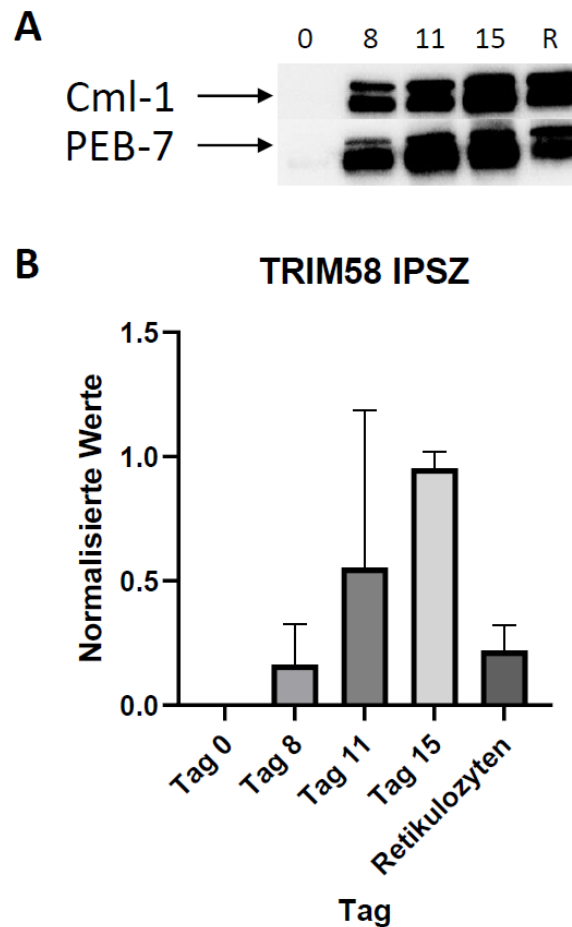


Abbildung 17: Expression von TRIM58 in den IPS-Zellreihen Cml-1 und PEB-7 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 15, R – Retikulozyten – Tag 18 nach Filtrierung). Auftrag jeweils 30 μ g. A: Western-Blot-Banden von TRIM58. B: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte nach Zeitpunkt.

Abbildung 18 stellt die normalisierte Expressionskinetik von TRIM58 in den beiden Ansätzen der *ex vivo* Erythropoese dar. Dabei fällt auf, dass diese in etwa gleich verläuft. Lediglich an Tag 11 ist eine Diskrepanz zwischen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ und adulten HSZ darzustellen, welche allerdings, wie zuvor beschrieben, durch die hohe Standardabweichung an Tag 11 der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ zu erklären wäre. Abgesehen davon erkennt man auch hier den Anstieg der TRIM58 Expression bis zu Tag 15 mit folgender Abnahme der Expression hin zu Tag 18 bzw. dem Retikulozytenstadium.

Expression Vergleich TRIM58

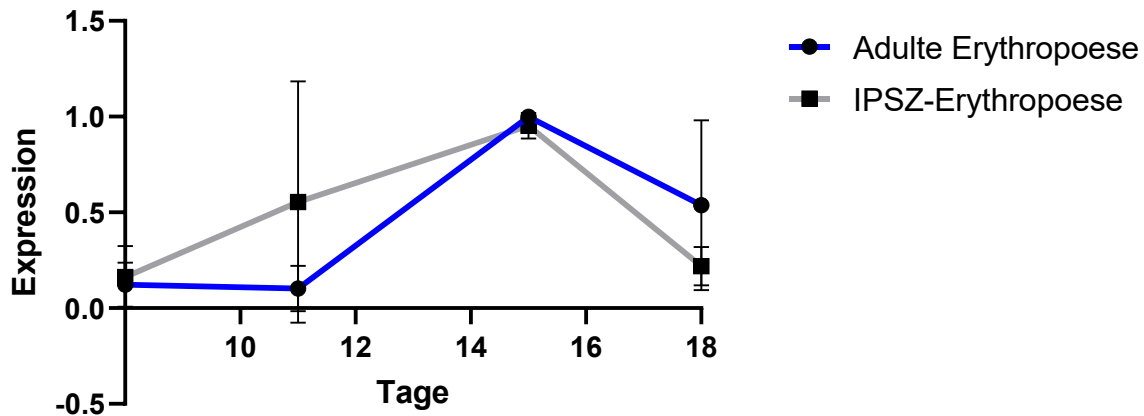


Abbildung 18: Vergleich der TRIM58 Kinetik zwischen *ex vivo* Erythropoese aus adulten HDZ und iPSZ zwischen den Tagen 8 und 18 (Retikulozytenpellets). Werte mit GAPDH Expression korrigiert, normalisiert und gemittelt. Auftrag jeweils 30 µg.

3.1.4. Dynein Expression

Bei Betrachtung der Dynein Expression im Rahmen der adulten Erythropoese fällt auf, dass die Expression im Verlauf der *ex vivo* Erythropoese deutlich schwankt (Abbildung 19 A). Dies zeigt sich auch nach Korrektur der Werte mittels GAPDH (Abbildung 19 B und C). Dabei ist zu erwähnen, dass der Dynein-Antikörper bezogen auf die Intensität der Banden deutlich schwächer ist als die anderen verwendeten Antikörper (TRIM58, LC3, Ladekontrollen). Trotzdem zeigt sich für die Epo79-Zelllinie ein deutliches Expressionsmuster mit einem Maximum an Tag 8 und Abnahme der Expression mit zunehmender Ausdifferenzierung der Zellen (Abbildung 19 B). Nach Normalisierung und Mitteln der Expressionen von Epo45, Epo47 und Epo79 zeigt sich aber, dass dieses Ergebnis nicht für die *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ konsistent ist. So zeigt Abbildung 19 C, dass die Standardabweichungen an den jeweiligen Tagen sehr hoch sind und somit keine fundierte Aussage über das Expressionsmuster von Dynein in der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ zu treffen ist.

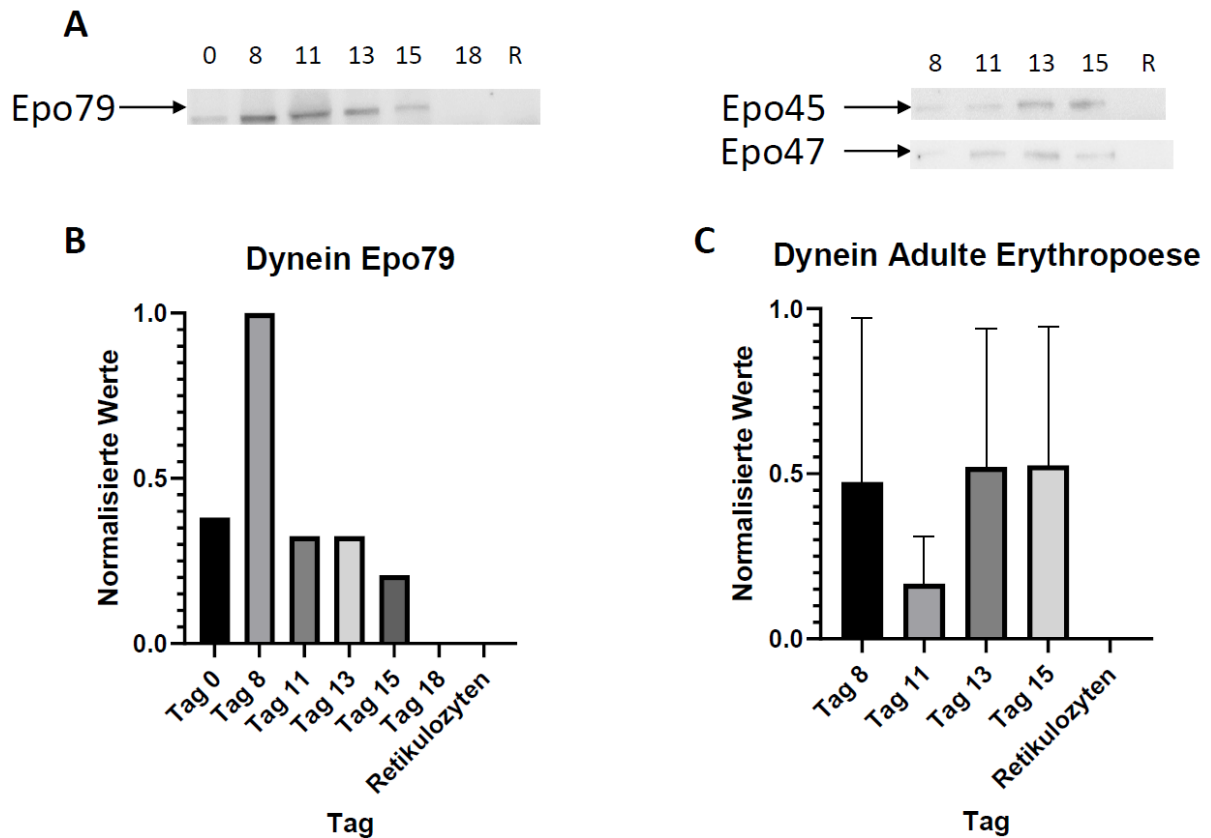


Abbildung 19: Expression von Dynein in der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ. Epo79, Epo45 und Epo47 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag 30 μ g bei Epo79, jeweils 20 μ g bei Epo45 und Epo 47. A: Western Blot Banden von Dynein. B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte der Expression in Epo79. C: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Epo 45, Epo47 und Epo 79 nach Zeitpunkt.

Die Dynein Expression innerhalb der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ zeigt ihr Maximum an Tag 0 und somit auf der Ebene der undifferenzierten iPSZ. Ab diesem Zeitpunkt nimmt sie mit Ausdifferenzierung der Zellen bis zu Tag 18 nach Retikulozyten-Filtrierung ab (Abbildung 20 A und B). Dabei ist auch hier eine große Standardabweichung an Tag 8 zu beobachten. Insgesamt ist aber im Gegensatz zur *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ die progressive Abnahme der Dynein Expression klar ablesbar.

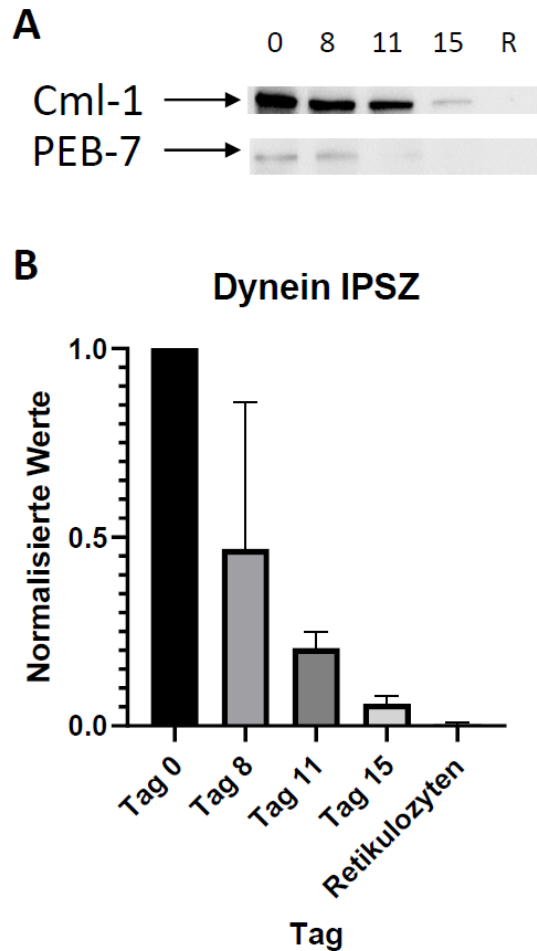


Abbildung 20: Expression von Dynein in der *ex vivo* Erythropoese aus IPSZ. Cml-1 und PEB-7 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 15, R – Retikulozyten – Tag 18 nach Filtrierung). Auftrag jeweils 30 μ g. A: Western Blot Banden, B: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte (Cml-1, PEB-7) nach Zeitpunkt.

Abbildung 21 zeigt die Dynein Expression nach Auftrag einer identischen Anzahl an Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ (Epo79) im Vergleich zu derer aus iPSZ (Cml-1). Die *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ zeigt dabei in Abhängigkeit der Zeit bzw. des Differenzierungsstadiums sehr schwankende Expressionslevel mit deutlichem Maximum an Tag 13 (Abbildung 21 A). Bei der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ hingegen zeigt sich ein stetiger Rückgang der Dynein Expression mit zunehmender Differenzierung und somit ein gegensätzliches Bild der Expressionskinetik zur *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ (Abbildung 21 B).

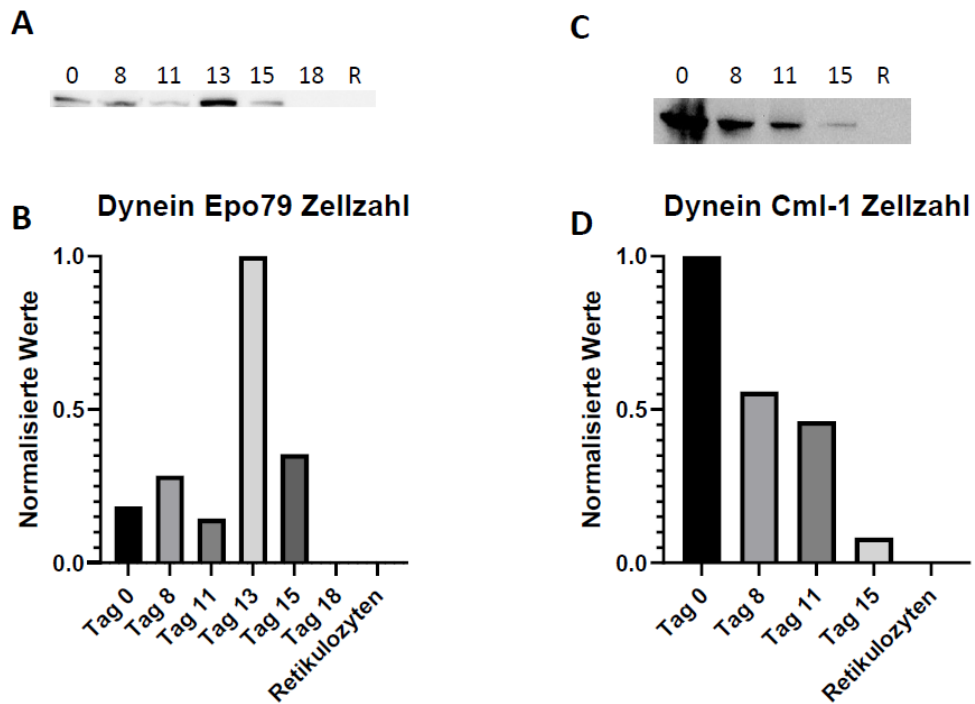


Abbildung 21: Expression von Dynein in der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ (Epo79) und aus IPSZ (Cml-1) zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tage 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils Proteinmenge aus 900.000 Zellen. A: Western Blot Banden, B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte nach Zeitpunkt.

3.1.5. LC3 Expression

Die LC3 Expression im Verlauf der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ zeigt ein deutliches Maximum an Tag 8 (Abbildung 22 A, B und C). In der Folge nimmt die Expression von LC3 bis zum filtrierten Retikulozyten-Pellet an Tag 18 deutlich ab. Die Expression an Tag 0, also den HSZ, konnte nur für Epo79 untersucht werden (Abbildung 22 B). Zu diesem Zeitpunkt weisen die Zellen noch keine Expression von LC3 auf.

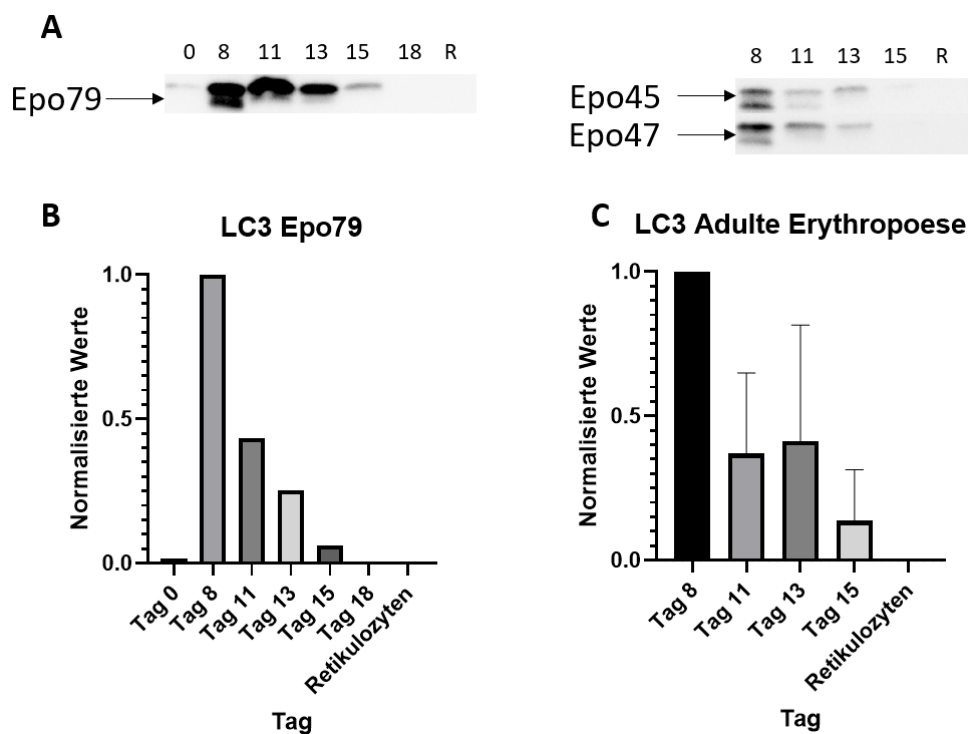


Abbildung 22: Expression von LC3 im Verlauf der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ: Epo79, Epo45 und Epo47 zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag 30 μ g bei Epo79, jeweils 20 μ g bei Epo45 und Epo47. A: Western Blot Banden von LC3, B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte der Expression in Epo79. C: Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Epo45, Epo47 und Epo79 nach Zeitpunkt.

Im Vergleich dazu liegt in Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ an Tag 0 das Maximum der LC3 Expression vor. In der Folge nimmt die LC3 Expression bis zum filtrierten Retikulozyten-Pellet an Tag 18 stetig ab (Abbildung 23 A und B). Im Retikulozytenstadium ist keine Expression von LC3 nachweisbar. Bezüglich der Beobachtung einer stetigen Abnahme ist allerdings anzumerken, dass sowohl an Tag 8 also auch an Tag 11 hohe Standardabweichungen vorliegen.

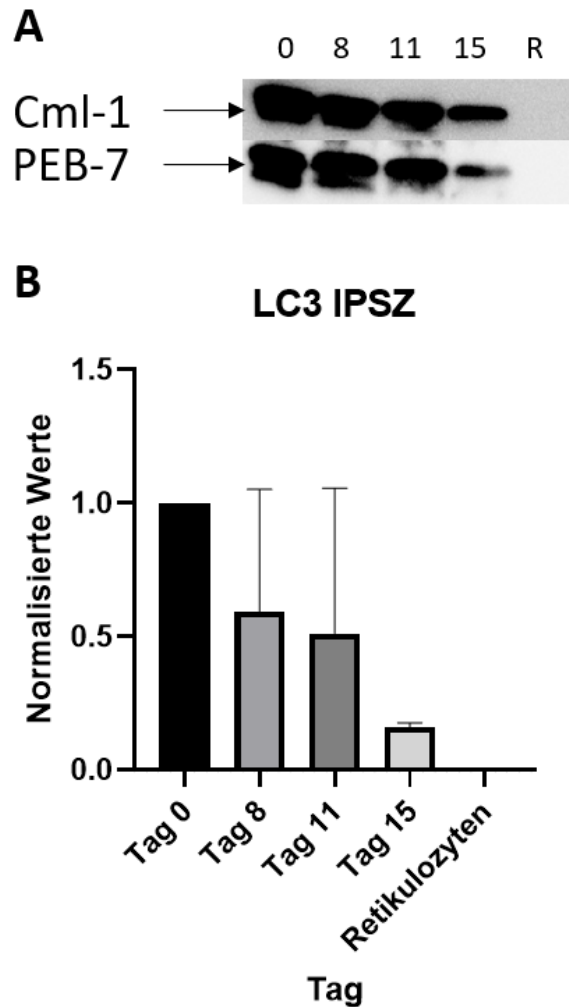


Abbildung 23: Expression von LC3 im Verlauf der ex vivo Erythropoese aus IPSZ (Cml-1 und PEB-7) zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag jeweils 30 µg. A: Western Blot Banden von LC3. B Mit GAPDH korrigierte, normalisierte und gemittelte Werte von Cml-1 und PEB-7 nach Zeitpunkt.

Abbildung 24 zeigt die Expression von LC3 an Tag 0 also in adulten, multipotenten HSZ (SZ18 und SZ19) und induziert pluripotenten Stammzellen (iPSZ; PEB-7 und Cml-1) im direkten Vergleich. Hierbei fällt konsistent zu den vorherigen Ergebnissen auf, dass eine Expression von LC3 in adulten HSZ nicht nachweisbar ist, während LC3 in iPSZ deutlich exprimiert wird. Diese Beobachtung hat auch Bestand berücksichtigt man die leicht stärkeren Banden der Ladekontrollen in iPSZ im Western Blot (Abbildung 24 A).

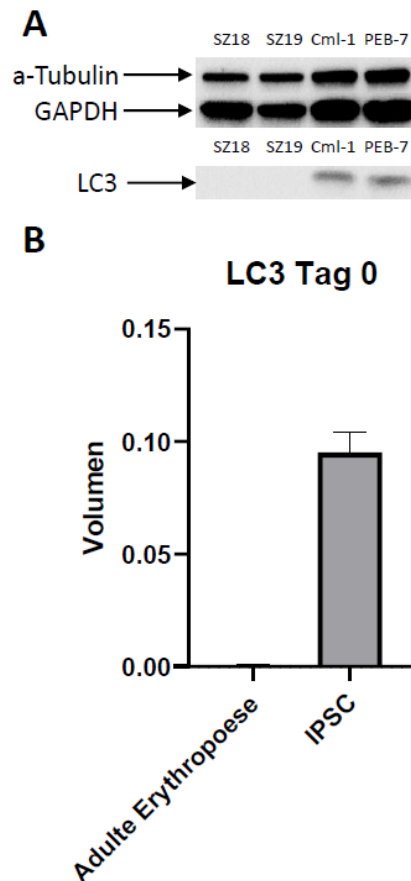


Abbildung 24: Vergleich der Expression von LC3 in multipotenten adulten HSZ zu induzierten pluripotenten Stammzellen. SZ18 und SZ19 als adulte und PEB-7 bzw. Cml-1 als IPSZ. Auftrag von jeweils 30 µg. A: Western Blot Bilder der LC3 Expression. B: Auswertung nach Korrektur durch GAPDH.

Bei Auftrag der Proteinmenge gewonnen aus einer konstanten Anzahl an Zellen (Abbildung 25 A-D) zeigen sich vergleichbare Ergebnisse zum Auftrag nach konstanter Proteinmenge. So liegt auch hier bei der Epo79-Zelllinie das deutliche Maximum der Expression an Tag 8, während bei der Cml-1-Zelllinie das Maximum an Tag 0 vorliegt. Auffällig sind die deutlich größeren und verschwommenen Banden an den Tagen, an denen das jeweilige Maximum (Tag 0 bzw. Tag 8) erreicht wird (Abbildung 25 A und C). Dies war bei Auftrag nach Proteinmenge nicht zu beobachten.

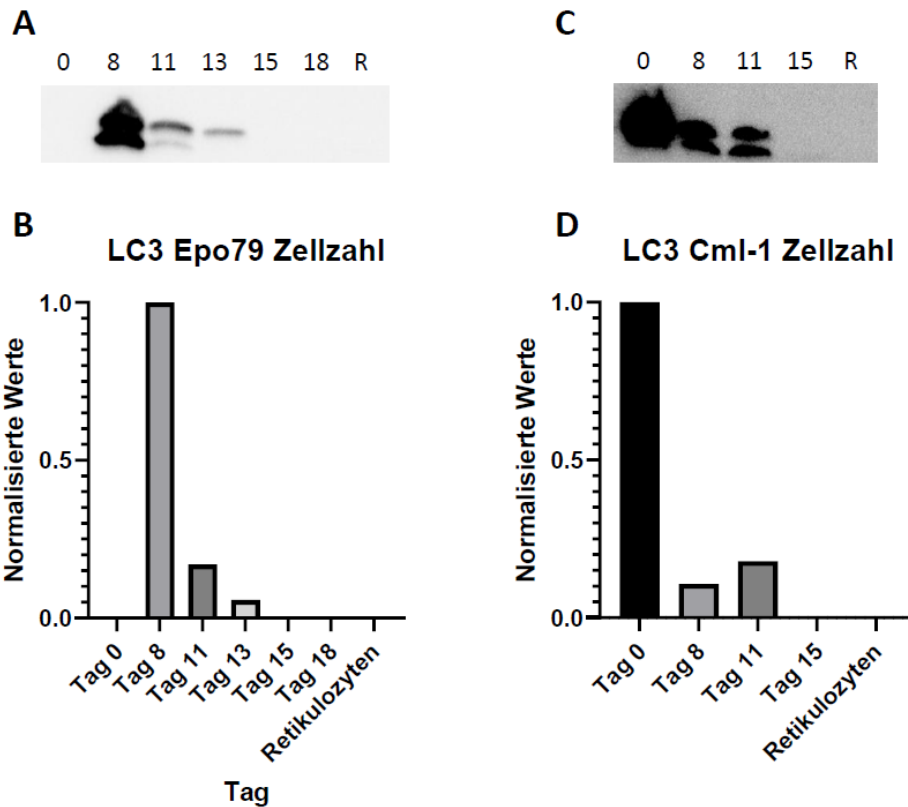


Abbildung 25: Expression von LC3 in den Zellen der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ (Epo79) und in Zellen aus der ex vivo Erythropoese aus iPSZ (Cml-1) zu verschiedenen Messzeitpunkten (Tag 0, 8, 11, 13, 15, 18; R – Tag 18 nach Filtrierung – Retikulozyten). Auftrag einer Proteinmenge aus jeweils 900.000 Zellen. A: Western Blot Banden von LC3 in Epo79, C: Western Blot Banden von LC3 in Cml-1. B: Mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte in Epo79 nach Zeitpunkt. D: mit GAPDH korrigierte und normalisierte Werte in Cml-1 nach Zeitpunkt.

Abbildung 26 zeigt die Expression von LC3 im direkten Vergleich der mit GAPDH korrigierten Expressionswerte von Zellen der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ (Epo79) und Zellen der Erythropoese aus iPSZ (Cml-1) ohne Normalisierung auf den höchsten Wert. Dabei werden erneut die unterschiedlichen Zeitpunkte der Maxima deutlich. So zeigt im Rahmen der adulten Erythropoese das Expressions-Maximum an Tag 8, während die Cml-1-Zellen ihr Maximum an Tag 0 auf Ebene der undifferenzierten iPSZ an Tag 0 aufweisen. In den späteren Zellpellets an Tag 15 und Tag 18 zeigen Epo79- und Cml-1-Zellen vergleichbare Expressionen von LC3 auf. An Tag 8 zeigt Epo79 eine höhere Expression von LC3 als Cml-1. Die Tendenz der Abnahme der Expression hin zu den ausgereifteren Zellstadien an Tag 18, welche sich auch schon bei Betrachtung der normalisierten Werte zeigt, lässt sich hier ebenfalls wieder darstellen.

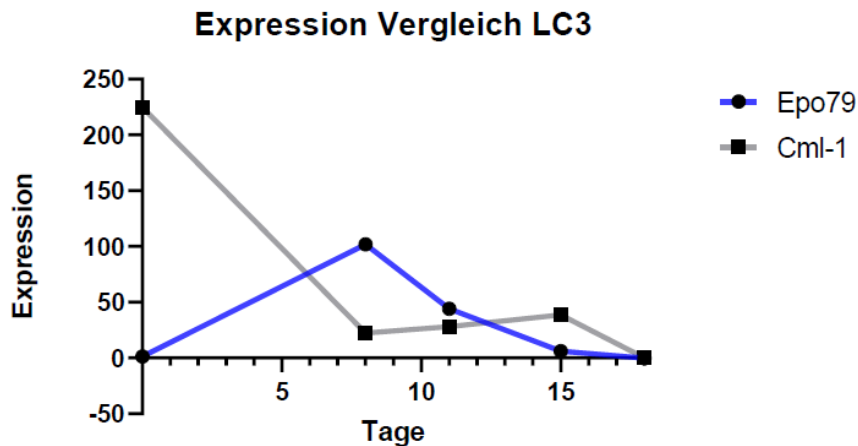


Abbildung 26: Expression von LC3 im Vergleich zwischen adulter Erythropoese (Epo79) und IPSZ (Cml-1) nach Korrektur der Expressionswerte mit GAPDH ohne Normalisierung auf den höchsten Wert. Messpunkte Tag 0, 8, 11, 15 und Tag 18 nach Retikulozyten-Filtrierung. Auftrag jeweils 30 µg.

3.2. TRIM58 Knock-Out

3.2.1. Klonierung, Ligation der Primer mit dem px458-Plasmid

Abbildung 27 zeigt die Sequenzierungsergebnisse. Die Sequenzierung wird mit dem Mix2Seq-Kit vorbereitet und erfolgt durch die Firma Eurofins. Es wird deutlich, dass die verschiedenen sgRNA (linker Rand der Abbildung) erfolgreich in die Plasmide eingebaut werden konnten. Die Sequenzen der sgRNA sind innerhalb der Sequenzen eingerahmt. Somit verliefen sowohl die Klonierung als auch die Ligation, Transformation und Mini-Präparation erfolgreich. Die Sequenzierung im Anschluss der DNA-Isolation aus E. Coli zeigt die erfolgreiche Ligation der sgRNA in die px458-Plasmide (Abbildung 27).

Original Sequence	cttggctttatatactttgtggaaggacgaaacaccg	g	gtcttcgagaag acctg ttttagagctagaaatagcaagtta
sgRNA1	CTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACC	SAGA ACTCGGAGATGC	-----ACCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
sgRNA2	CTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACC	SAGA ACTCGGAGATGC	-----ACCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
sgRNA3	CTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACC	GAGGACGCCTTGACTCAGG	-----TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
sgRNA4	CTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACC	ATGCTGTCTTCAGTTCCATG	-----TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA

Abbildung 27: Sequenzierung der px458-Plasmide nach Klonierung und Ligation mit den sgRNA1-4. Die Sequenzen der sgRNA sind eingerahmt.

In der Folge können die ligierten Plasmide für die Nukleofektion in die K562-Zellen bzw. in die primären Erythroblasten der ex vivo Erythropoese aus adulten HSZ verwendet werden. Aufgrund von mangelndem Zellmaterial werden in der Folge nur drei der sgRNA-tragenden Plasmide für die folgende Nukleofektion verwendet. Das

sgRNA2-tragende Plasmid wird dabei nicht verwendet, da es die geringste Konzentration im Vergleich zu den anderen Plasmiden aufweist.

3.2.2. Nukleofektion

Durch die Inkorporation von GFP über das Plasmid können die positiv nukleofektierten Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert und sortiert werden (Abbildung 28). Die Nukleofektion mit dem sgRNA1-tragenden Plasmid zeigt eine Effizienz von 47,1 % (Abbildung 28 A). Bei sgRNA3 liegt die Rate mit 29 % GFP-positiver Zellen am niedrigsten (Abbildung 28 B) allerdings reicht die absolute Menge an Zellen für die weiteren Versuchsschritte aus. Die höchste Rate nukleofektierter Zellen von 48,4 % wird mit sgRNA4-tragenden Plasmid erreicht (Abbildung 28 C).

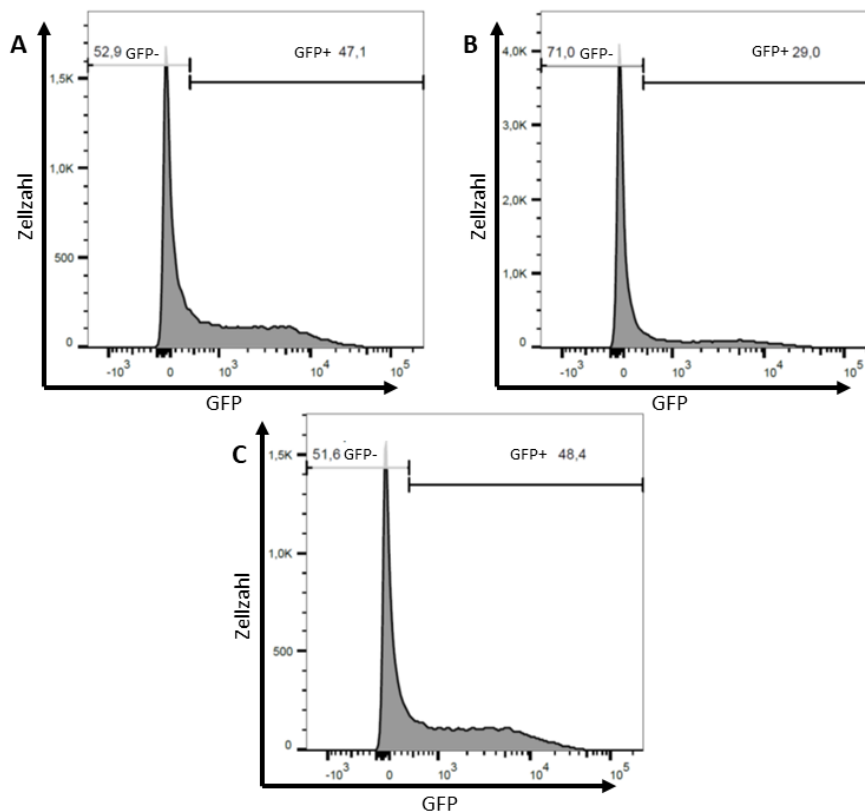


Abbildung 28: GFP Expression in K562-Zellen nach Nukleofektion mit dem sgRNA1 (A), sgRNA3 (B), sgRNA4-tragenden Plasmid (C).

Bei der Durchführung der Nukleofektion der sgRNA-tragenden Plasmide mit *ex vivo* kultivierten Erythroblasten (Tag 8 der Kultur) zeigen die Zellen eine sehr hohe Letalität. Die Vitalität lag deutlich unter 0,1 %. Bei Verwendung des pmaxGFP-Plasmids (Positivkontrolle), zeigt sich im Vergleich eine deutlich höhere Vitalität von etwa 50 %, die in etwa der Vitalität der Negativkontrolle (Zellen ohne Plasmid aber

nach Nukleofektion) entspricht. Somit scheint das sgRNA-tragende Plasmid im Rahmen der Nukleofektion eine starke Toxizität auf die Zellen auszuüben. Es werden keine weiteren Nukleofektion mit primären Erythroblasten durchgeführt und keine Sortierung der Zellen nach GFP-Positivität vorgenommen, da die Vitalität der Erythroblasten dies nicht ermöglicht. Auch Folgeversuche mit anderen Pulsschemata zeigen eine ähnlich geringe Vitalität der Zellen, weshalb eine Nukleofektion mit den sgRNA-tragenden Plasmiden nicht zielführend erscheint.

3.2.3. Bestimmung der Annealing-Temperatur

Das Ergebnis der Gradienten-PCR ist in Abbildung 29 dargestellt. Da die Annealing-Temperatur der Primer an die DNA der nukleofektierten K562-Zellen nicht bekannt ist, ist es notwendig eine Gradienten-PCR durchzuführen und in der Folge im Rahmen einer Gelelektrophorese die entsprechende Bande für die Sequenzierung auszuwählen. Dabei zeigen sich für sgRNA1 zwei deutliche Banden bei 58 °C was für eine unspezifische Primerbindung spricht. Gegebenenfalls könnte eine Modifikation der Primersequenzen diese unspezifische Bindung verhindern und die PCR wiederholt werden. Da die beiden Banden deutlich voneinander getrennt liegen und zudem die Länge des Zielfragmentes bekannt ist (572 Bp) konnte die in diesem Fall obere Bande als die entsprechend richtige identifiziert und für die weitere DNA-Isolation und Sequenzierung verwendet werden. SgRNA3 zeigt bei allen Temperaturen eine einzige, deutlich ausgeprägte Bande. Lediglich bei 70,5 °C fällt die Bande schwächer aus, da hier optimale Annealing Temperatur zu weit überschritten scheint. Die Bande liegt bei etwa 500 Bp, was mit dem erwarteten Fragment von 506 Bp übereinstimmt. Es wird die Bande bei 63 °C verwendet, da sich diese am deutlichsten abhebt. Bei sgRNA4 zeigt sich ein ähnliches Bild zu sgRNA3. Allerdings zeigt sich bei 69,7 °C keine und bei 70,5 °C eine deutlich schwächere Bande. Die stärkste Bande liegt jedoch ebenfalls bei 63 °C, weshalb diese zur weitere DNA-Isolation und Sequenzierung verwendet wird, da auch die Fragmentlänge mit der zu erwarteten Länge von 343 Bp übereinstimmt.

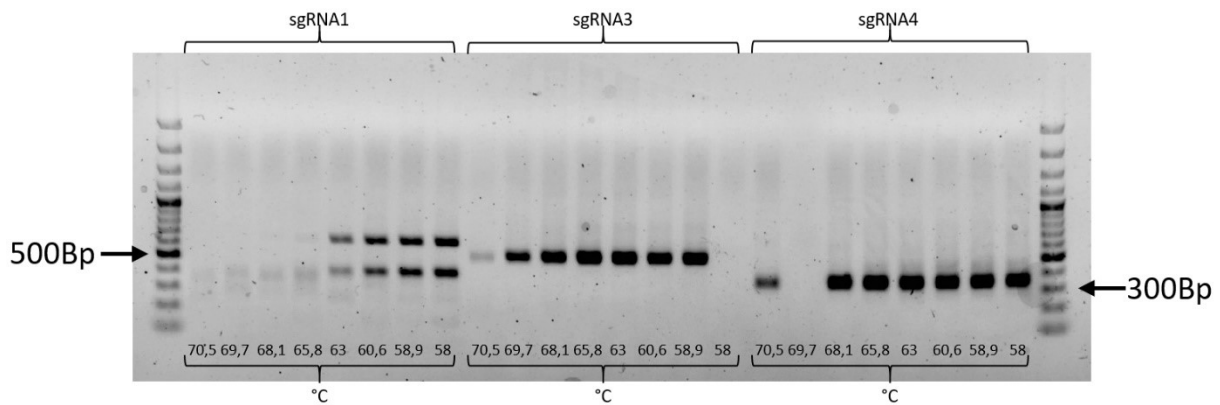


Abbildung 29: Gradienten-PCR der Klonierten und nukleofektierten sgRNA1, 3 und 4 aus K562-Zellen

3.2.4. Sequenzierung der Gradienten-PCR

Abbildung 30 zeigt die Sequenzierungsergebnisse des aus der Gradienten-PCR extrahierten Fragments der mit dem sgRNA1-tragenden Plasmid transfizierten K562-Zellen. Dabei zeigt sich keine Übereinstimmung mit der Sequenz von den nicht nukleofektierten K562 Kontrollzellen, obwohl diese im Bereich vor der Cas9 Schnittstelle identisch sein sollte. Der Grund könnte eine mangelnde Spezifität der Primer sein aber auch eine fehlerhafte Selektion der Bande für die Sequenzierung.

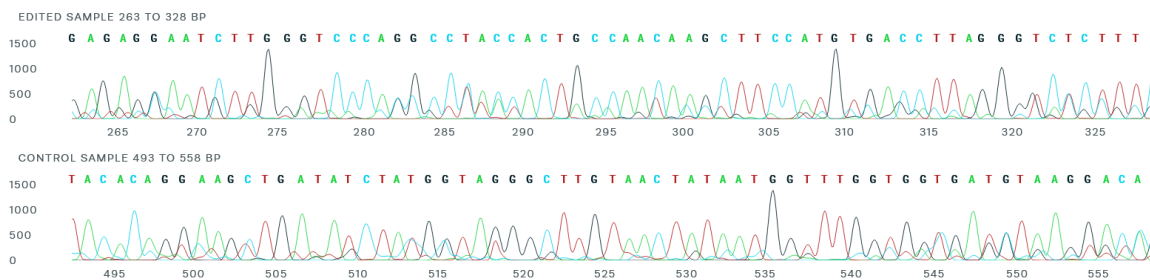


Abbildung 30: Sequenzierung der Gradienten-PCR des nukleofektierten Plasmids mit sgRNA1 in K562-Zellen.

Abbildung 31 zeigt die Sequenzierungsergebnisse analog für die K562-Zellen, welche mit dem sgRNA3-tragenden Plasmid transfiziert wurden. Dabei stimmt die Sequenz bis zur Schnittstelle von Cas9 (gestrichelte Linie) mit der Kontrolle überein und unterscheidet sich wie erwartet im folgenden Sequenzabschnitt.

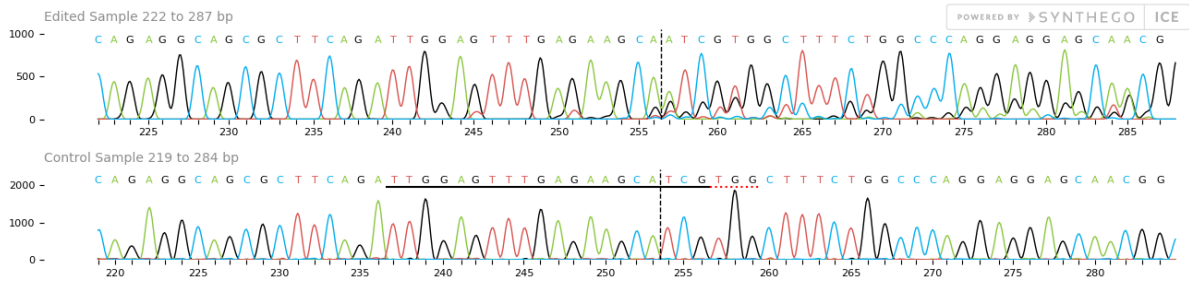


Abbildung 31: Sequenzierung der Gradienten-PCR des nukleofektierten Plasmids mit sgRNA3 in K562-Zellen.

Abbildung 32 zeigt die Insertionen bzw. Deletionen die durch den Cas9-Verdau innerhalb des Exons 3 des TRIM58 Gens entstanden sind. Dabei fällt auf, dass die Zahl der inserierten bzw. deletierten Basen in keinem Fall durch 3 teilbar ist und es daher in jedem Fall zu einer *frame-shift*-Mutation gekommen ist, was einen Knock-Out des Gens zur Folge hat. Insgesamt ist die KO-Effizienz der sgRNA3 mit 95 % (Summe der Prozente der Mutationen aus Abbildung 32) sehr hoch.



Abbildung 32: Veränderte DNA-Sequenzen nach Nukleofektion mit sgRNA3-tragendem Plasmid in K562-Zellen

Abbildung 33 zeigt die DNA-Sequenz der mit dem die sgRNA4-tragenden Plasmid nukleofektierten K562-Zellen. Dabei ist auch hier wie schon bei sgRNA3 auffällig, dass nach der Schnittstelle von Cas9 (gestrichelte Linie) die Variation innerhalb des Fragments auf Seiten der transfizierten Probe stark zunimmt.

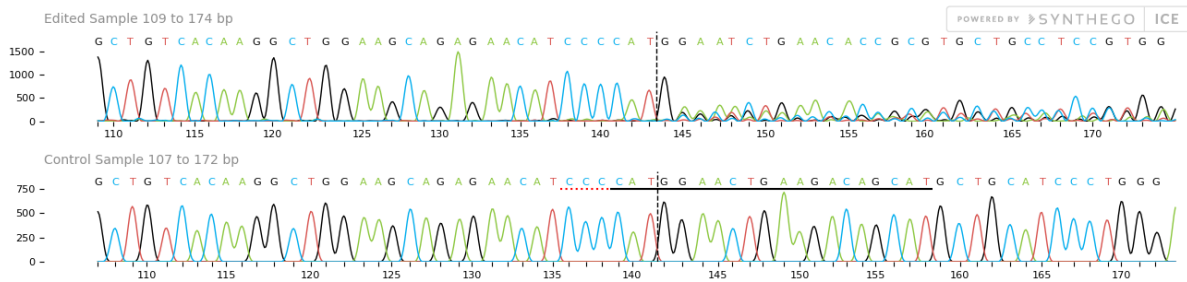


Abbildung 33: Sequenzierung der Gradienten-PCR des nukleofektierten Plasmids mit sgRNA4 in K562-Zellen.

In Abbildung 34 sind nun wiederum die durch den Cas9-Verdau mit sgRNA4 veränderten DNA-Sequenzen dargestellt. Hier findet sich ein kleiner Anteil an Zellen mit einer Deletion von 6 Bp. Das bedeutet, dass es in diesen Zellen nicht zu einer *frame-shift*-Mutation und somit nicht zwangsläufig zu einem Knock-Out von TRIM58 kam. Beim größeren Teil der sgRNA4 nukleofektierten Zellen besteht hingegen ein großes Knock-Out Potential. Auch hier war die Mutations-Effizienz der sgRNA4 mit 92 % sehr hoch.



Abbildung 34: Veränderte DNA-Sequenzen nach Nukleofektion mit sgRNA4-tragendem Plasmid in K562-Zellen

4. Diskussion

4.1. Western Blot

4.1.1. Ladekontrolle

Für die Interpretation von Western Blot Analysen spielen Ladekontrollen eine wichtige Rolle, da diese nicht nur die Funktion einer experimentellen Positivkontrolle einnehmen, sondern auch Rückschlüsse auf die Quantität des übertragenen Proteoms zulassen. Letztere Eigenschaft kann zur Korrektur der Analyseergebnisse genutzt werden, sodass unabhängig durchgeführte Western Blot Experimente quantitativ miteinander verglichen werden können. In Modellen, die den Verlauf einer zellulären Differenzierung wie der humanen Erythropoese abbilden, ist die Auswahl einer Ladekontrolle, welche die genannten Eigenschaften aufweist, schwierig. Dies liegt im genannten Beispiel daran, dass die Zellen im Verlauf der Differenzierung von der hämatopoetischen Stammzelle bis zum reifen Erythrozyten zahlreiche epigenetische Veränderungen durchlaufen, die im direkten Zusammenhang mit der Genexpression stehen. Als Ladekontrollen sollten solche Proteine gewählt werden, deren Expression von den genannten Veränderungen möglichst wenig beeinflusst wird. Allerdings ist fraglich, ob die extremen zellulären Veränderungen während der Erythropoese eine solch konstante Expression der Ladekontrolle überhaupt zulassen.

In dieser Arbeit werden die gängigen Ladekontrollen GAPDH, β -Aktin und α -Tubulin zunächst auf die oben beschriebene Eignung als Ladekontrolle überprüft. β -Aktin und α -Tubulin zeigen mit zunehmender Differenzierung der Zellen eine so starke Abnahme der Expression, sodass sie in reifen Stadien (Tag 15 und später entsprechend dem Stadium der Normoblasten und Retikulozyten) kaum bis nicht mehr nachweisbar sind. Somit kommen diese nicht als Ladekontrolle für die folgenden Experimenten in Frage. Ein weiterer Nachteil von α -Tubulin als Ladekontrolle ist, dass es mit 50 kDa eine sehr ähnliche Molekülgröße wie TRIM58 (55 kDa) aufweist. Bei der Detektion im Western Blot würden die entsprechenden Proteinbanden nur mit Einschränkungen differenzierbar und somit auswertbar sein. GAPDH zeigt im Vergleich der Ladekontrollen die konstanteste Expression über die untersuchten Zeitpunkte respektive Differenzierungsstadien. So ist die Expression bis in die späten Differenzierungsstadien nachweisbar. Daher wird GAPDH in den Experimenten als

Ladekontrolle verwendet und zur Korrektur bei der Berechnung der Expressionswerte herangezogen.

4.1.2. TRIM58

Bei der Western Blot Analyse von TRIM58 zeigen sich zwei Proteinbanden unterschiedlicher Größe. Dies kann das Resultat verschiedener Effekte sein. Zum Beispiel könnte der Antikörper nicht ausreichend spezifisch binden und so neben TRIM58 ein weiteres Protein markieren. Weiter könnte es sein, dass im Rahmen der Erythropoese TRIM58 leicht modifiziert wird und diese Modifikation zu einer zweiten Proteinvariante mit leicht abweichender Molekülgröße führt. Auch könnten grundlegende Probleme bei der Transkription und Translation des Proteins eine Rolle spielen, jedoch wären in diesem Szenario deutlich mehr als nur eine Doppelbande zu erwarten.

Eine sichere Aussage über die Entstehung der Doppelbande ist im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht möglich. In Rücksprache mit dem Hersteller wird ein neuer Antikörper für TRIM58 zur Verfügung gestellt, um zu überprüfen, ob die angesprochene unspezifische Antikörperbindung Grund für die Doppelbande ist. Dieser Test ist aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Stattdessen wird zur Auswertung die Expression beider Banden in summiert, auch wenn die Ergebnisse bis zur Ursachenklärung der Doppelbanden vorbehaltlich sind.

Grundsätzlich zeigt sich sowohl bei *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ als auch aus adulten HSZ, dass es zu einer Zunahme der Expression von TRIM58 bis hin zu Tag 15 kommt, welche dann im Verlauf zu Tag 18 und besonders zum folgenden Retikulozytenstadium stark abnimmt. In filtrierten Retikulozyten ist sowohl im Rahmen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ als auch bei *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ kein TRIM58 nachweisbar. Somit ist der Anstieg der Expression nur auf die kernhaltigen Entwicklungsstadien begrenzt und endet beim Stadium des noch kernhaltigen Normoblasten. Das Ereignis der E nukleation zu Retikulozyten ist mit einer starken Abnahme der TRIM58 Proteinkonzentration assoziiert. Hinsichtlich der Proteinkinetik zeigen die Ergebnisse dieser Diplomarbeit keinen Unterschied zwischen den beiden Ansätzen der *ex vivo* Erythropoese (iPSZ und HSZ). Diese Ergebnisse sind wie oben beschrieben vorbehaltlich und müssen in einer Folgestudie validiert werden. In dieser sollte auch die Zahl der untersuchten biologischen Replikate (in

dieser Versuchsreihe n = 3 für die *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ und n = 2 für die *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ) gesteigert werden.

Der direkte Vergleich der beiden Ansätze der *ex vivo* Erythropoese (Abbildung 18) bestätigt die ähnliche Expressionskinetik von TRIM58. Der Vergleich mit den Microarray (K. Kessel, 2016) und dPCR Versuchen (V. Schaberl, 2019) gestaltet sich dabei schwierig, da die Microarray Untersuchungen keine Kinetik darstellen und die dPCR Experimente die RNA Expression nur bis einschließlich Tag 15 betrachten, da die kernlosen Retikulozyten an Tag 18 keine RNA exprimieren können. Die steigenden Expressionswerte bis hin zu Tag 15, welche im Rahmen der dPCR Experimente aufgezeigt wurden, zeigen sich auf Proteinebene ebenfalls. Da die Expressionswerte der Western Blot Experimente auf den höchsten Wert normalisiert werden, ist ein Vergleich der Expressionswerte abseits der Kinetik schwierig. Die nicht auf den Höchstwert normalisierten Expressionswerte zeigen hingegen so große Standardabweichungen, dass deren Vergleich nicht sinnvoll erscheint. Zur weiteren inhaltlichen Beurteilung dieser Beobachtungen sind gegebenenfalls Folgestudien nötig, welche valide Aussagen über die absoluten, nicht auf den höchsten Wert normalisierten, Expressions-Level zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zulassen. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass sich das Modell der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ in den letzten Jahren seit den Microarray Untersuchungen stark verändert und das in dieser Arbeit verwendete Modell eine höhere E nukleationsrate aufzeigt. Das Modell, welches zum Zeitpunkt der Microarray Experimente verwendet wurde, ist in Dorn *et al.*, 2015 beschrieben. Somit ist es auch möglich, dass sich die Microarray Ergebnisse nicht ohne weiteres auf das aktuelle Modell übertragen lassen. Das im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendete Modell ist in Bernecker *et al.* von 2019 (Stem Cell and Development) beschrieben. Es wäre also auch interessant diese Experimente mit Zellproben des Modells der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ von 2015 durchzuführen, um dortige Schwankungen der TRIM58 Expression aufzudecken.

Ein weiterer Faktor, welcher bei der Auswertung der Western Blot Analysen eine Rolle spielt, ist die vorliegende Zellpopulation. So befinden sich zwar an Tag 8 die überwiegende Mehrheit an Zellen im basophilen Erythroblastenstadium, jedoch ist die Differenzierung der Population nicht vollständig synchron, so dass auch anteilig andere Entwicklungsstadien vorliegen. Zudem ist es möglich, dass sich der zeitliche

Ablauf der Differenzierung während der Erythropoese zwischen den Ansätzen aus iPSZ und adulten HSZ leicht unterschiedet. Daraus würde folgen, dass nicht exakt dieselben Differenzierungsstadien untersucht und verglichen werden.

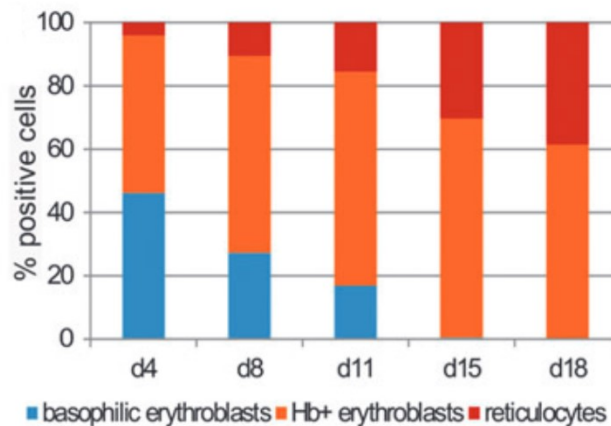


Abbildung 35: Vorherrschendes Zellmaterial nach Tagen in aus der Erythropoese von iPSZ gewonnenem Material. Abbildung aus Bernecker et al., 2019, Stem Cells and Development.

Abbildung 35 zeigt die Zellkomposition zu den verschiedenen Zeitpunkten der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ, und Abbildung 36 analog aus adulten HSZ. Es zeigen sich an allen aufgeführten Zeitpunkten deutliche Unterschiede in den relativen Anteilen von basophilen Erythroblasten, Hämoglobin-haltigen (Hb+) Erythroblasten (polychromatische Erythroblasten) und Retikulozyten zwischen den beiden *ex vivo* Erythropoese Ansätzen. Besonders eindrucksvoll ist dies an Tag 8 zu erkennen, an dem im Ansatz aus adulten HSZ ausschließlich basophile Erythroblasten vorliegen, wohingegen im iPSZ Ansatz bereits ca. 70% der Zellen zu Hb+ Erythroblasten und Retikulozyten ausdifferenziert sind. Diese Daten verdeutlichen, dass sich das Zellmaterial zwischen den beiden *ex vivo* Ansätzen der Erythropoese durchaus unterscheidet und dieser Fakt bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss.

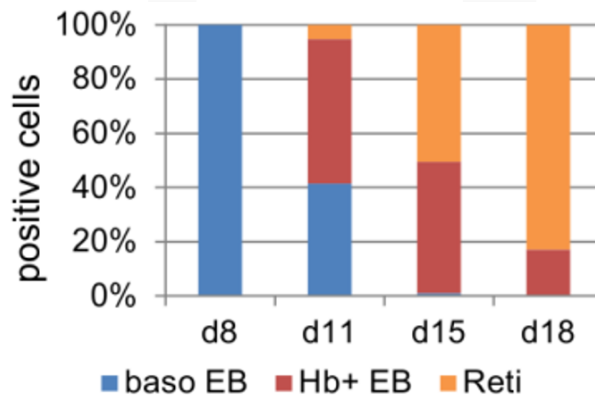


Abbildung 36: Vorherrschendes Zellmaterial nach Tagen in aus der Erythropoese von HSZ gewonnenem Material. Abbildung aus Bernecker et al., 2019, *Frontiers in Physiology*.

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit gemessenen Zellpopulationen in den jeweiligen Erythropoese Ansätzen (Abbildung 37) decken sich mit denen aus den beiden Populationen von Bernecker *et al.* von 2019. Dabei ist neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellpopulationen an den Untersuchungstagen auch die verminderte Enukleation der Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ auffällig, welche nur zu ca. 40 % zu Retikulozyten entkernen (Abbildung 35, Abbildung 37 B). Im Vergleich dazu liegt der Anteil an Zellen, die zu Retikulozyten entkernen im Ansatz aus adulten HSZ bei ca. 80 % (Abbildung 38 A, Abbildung 36). Interessanterweise ist die Expressionskinetik von TRIM58 auf Proteinebene trotz der deutlich verminderten Enukleation von Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ vergleichbar mit der innerhalb der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ. Dabei ist anzumerken, dass im Rahmen dieser Diplomarbeit filtrierte Retikulozyten aus beiden Quellen verglichen werden, was eine Vergleichbarkeit ermöglicht. Zu diesem Zeitpunkt zeigen beide Ansätze keine TRIM58 Expression.

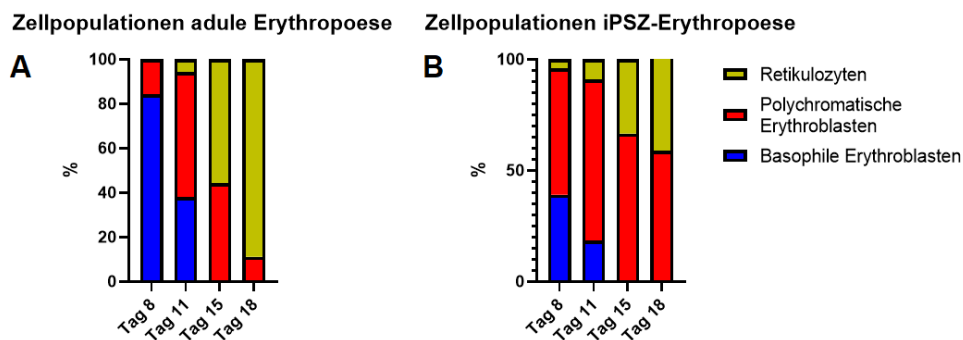


Abbildung 37: Vorliegendes Zellmaterial nach Tagen in der adulten Erythropoese (A) und in der iPSZ-Erythropoese (B). Mittelwerte aus den jeweiligen verwendeten Zellen (Epo45, Epo47, Epo79 – adulte Erythropoese; Cml-1 und PEB-7 – iPSZ-Erythropoese). Auswertung von Zytospins und Zurverfügungstellung durch die Labor-AG der Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin.

In einem Folgeexperimenten wäre es interessant, das untersuchte Zellmaterial der beiden Ansätze nach deren Gewinnung über Oberflächenmarkern zu sortieren, bspw. mittels Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie, um die Proteinexpression innerhalb der jeweiligen Zellpopulation zwischen den beiden Ansätzen der *ex vivo* Erythropoese zu vergleichen. So könnte sich das Problem zweier nicht möglicherweise nicht vergleichbarer Zellkompositionen beseitigen lassen.

Thom *et al.* zeigten 2014 in einem murinen Modell, dass TRIM58 eine Rolle bei der E nukleation während der Erythropoese spielen könnte. Dabei wurde die TRIM58 Expression über Lentiviren in murinen Erythroblasten-Zelllinien um 60-90 % vermindert und in der Folge eine verminderte E nukleation nachgewiesen (Thom *et al.*, 2014). Eine Beschreibung dieser möglichen Funktion von TRIM58 im humanen Modell erfolgte bisher nicht. Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden Erkenntnisse gewonnen, die darauf hindeuten, dass sich die Expressionskinetik von TRIM58 im Rahmen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ nicht von der aus adulten HSZ unterscheidet. Es zeigt sich weiterhin in beiden Systemen, dass die Expression von TRIM58 im Verlauf der Erythropoese zunimmt und in etwa auf Ebene der Normoblasten (Tag 15) ihr Maximum erreicht. Da dies in etwa das Stadium des Übergangs zwischen kernhaltigen Erythroblasten und kernlosen Retikulozyten bildet, könnten diese Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, dass TRIM58 eine Rolle bei der E nukleation spielt. Dabei lässt sich aber nicht durch eine veränderte Expressionskinetik von TRIM58 die verminderte E nukleation innerhalb der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ im Vergleich zu derer aus adulten HSZ erklären. Diese Erkenntnisse, sowie auch die Aussagen über die absoluten Expressionsdaten von TRIM58 müssen allerdings in Folgeexperimenten mit größerer Probenanzahl sowie auch einem optimierten Versuchsaufbau (z.B. Antikörperspezifität) bestätigt werden.

4.1.3. Dynein

Die Analyse der Dynein Expression gestaltet sich in den Versuchen dieser Diplomarbeit als Herausforderung, da die sich die Banden im Western Blot nur sehr schwach zeigen. Dies könnte mit einer mangelnden Sensitivität sowie Spezifität des verwendeten Antikörpers zusammenhängen und sollte mit dem Hersteller besprochen werden. Trotz der schwachen Banden und dem geltenden Vorbehalt aufgrund des potenziell unspezifischen Antikörpers, kann die Expression von Dynein nachgewiesen werden. Zwischen den Untersuchungstagen schwankt die Expression von Dynein

dabei stark, sodass sich besonders bei der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ keine von der Zeit bzw. vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängige kontinuierliche Zu- oder Abnahme der Dynein Expression ableiten lässt. Durch die besprochenen Unsicherheiten bei der Messung ist es allerdings nicht zulässig, dies als fundierte Aussage zu beschreiben. Allerdings ist bei beiden Ansätzen der *ex vivo* Erythropoese keine Dynein Expression in Retikulozyten nachweisbar. Dabei spielt auch hier bzgl. der Vergleichbarkeit der beiden Ansätze der *ex vivo* Erythropoese die möglicherweise nicht vergleichbare Zellkomposition eine Rolle.

In einem murinen Modell wurde 2014 ein möglicher Zusammenhang zwischen der Degradation von Dynein durch TRIM58 und der E nukleation im Verlauf der Erythropoese beschrieben (Thom *et al.*, 2014). Dieser mögliche Zusammenhang wurde bisher noch nicht im humanen Modell untersucht. Im Rahmen dieser Diplomarbeit kann im Vergleich zweier Ansätze der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ und iPSZ keine grundlegende Aussage zur Expressionskinetik von Dynein getroffen werden. Für die *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ lässt sich eine Kinetik ableiten, welche eine absteigende Expression mit fortschreitendem Differenzierungsgrad vermuten lässt. Sowohl im Rahmen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ also auch bei der aus iPSZ zeigt sich, dass Dynein in späten Stadien Erythropoese, insbesondere in Retikulozyten, nicht nachweisbar ist. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Funktion von Dynein bei der E nukleation sein. Aufgrund von hohen Standardabweichungen sind aber Folgeexperimente notwendig, um diese Tendenz zu bestätigen. Weiter wäre die Verwendung eines alternativen Antikörpers gegen Dynein interessant, welcher eine möglicherweise höhere Spezifität und Signalstärke aufweist.

4.1.4. LC3

Die Expression von LC3 zeigt ihr Maximum in den frühen Stadien der Erythropoese (*ex vivo* Erythropoese aus iPSZ: Tag 0 undifferenzierte iPSZ, *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ: Tag 8 basophile Erythroblasten) und nimmt mit zunehmender Differenzierung der Zellen in beiden *ex vivo* Erythropoese Ansätzen ab. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Autophagie insbesondere in den frühen Stadien der Erythropoese für die Eliminierung von Organellen von Bedeutung ist. In den späteren Differenzierungsstadien der Zellen kann kein wesentlicher Unterschied in der Expressionskinetik zwischen *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ und HSZ beobachtet

werden. Diese Ergebnisse sind konträr zu der in den dPCR Ergebnissen beschriebenen Zunahme der Expression von LC3 bis hin zum Tag 15 sowohl für Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ als auch aus iPSZ-Erythropoese (Abbildung 7; V. Schaberl, 2019). Ein Grund könnten posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA von LC3 sein, welche zur einer abweichenden Proteinbildung von LC3 führen. Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit geben somit keinen Hinweis auf eine gestörte Autophagie als Ursache der verminderten E nukleation der Zellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ.

Auffällig ist in dieser Studie die hohe Expression von LC3 in den undifferenzierten iPSZ, während in adulten HSZ kaum eine Expression nachweisbar ist. Dies könnte auf eine Rolle der Autophagie bei der Generierung von iPSZ hindeuten. Diese Hypothese unterstützend beschreibt Naik *et al.* 2018, dass die Autophagie bei der Dedifferenzierung der ausdifferenzierten Zellen zu iPSZ von Bedeutung sein könnte. Ein weiterer Anhaltspunkt ist die veränderte Morphologie der Mitochondrien in iPSZ im Vergleich zu embryonalen Stammzellen (ESZ). In ESZ sind die Mitochondrien, anders als in iPSZ, perinukleär verteilt. Ebenfalls weisen Mitochondrien in iPSZ keine sphärische Morphologie wie in ESZ auf (Naik *et al.*, 2018). Während der Dedifferenzierung von somatischen Zellen zu iPSZ verändert sich das metabolische Verhalten der Zelle von der oxidativen Phosphorylierung der somatischen ausdifferenzierten Zelle zur Glykolyse in iPSZ (C. Xihang *et al.*, 2018). Dabei spielt der mTOR-Signalweg bei der Autophagie-Induktion und der Reorganisation der Mitochondrien eine wichtige Rolle (J. A. Menendez *et al.*, 2011). Zu Beginn der Dedifferenzierung wird mTOR Sox2-abhängig herunterreguliert und so die Autophagie induziert. In Abwesenheit von Sox2 hemmt mTOR die Autophagie (S. Wang *et al.*, 2013). Dies würde erklären, warum LC3 als zentrales Protein der Autophagie bereits in undifferenzierten iPSZ deutlich stärker exprimiert ist als in adulten HSZ.

Die in 5.1.2 beschriebene Heterogenität der Zellkompositionen innerhalb der beiden Ansätze der *ex vivo* Erythropoese an den unterschiedlichen Analysezeitpunkten spielt auch bei der Messung der Expression von LC3 und derer Interpretation eine Rolle. Daher wäre auch hier für eine genauere Eruierung der Expression und Kinetik zum Vergleich dieser Ansätze eine Aufreinigung der Zellen nach Oberflächenmarker interessant, um genau definierte Populationen zu untersuchen.

Zudem wäre es interessant, die Expression und Kinetik weiterer Proteine, die bei der Autophagie im Verlauf der Erythropoese eine Rolle spielen, zu untersuchen. Ein Beispiel wäre ULK1 als zentraler Faktor für die Autophagie in der Erythropoese. Der Komplex ist essenziell für die Elimination von Mitochondrien und Ribosomen (Moras *et al.*, 2017). Dabei induziert dieser Komplex zwei unterschiedliche Signalwege, welche die Elimination der Organellen ermöglichen. Ein ATG7/5 abhängiger Weg und ein ATG7/5 unabhängiger Weg (Zachari & Ganley, 2017).

Ein weiterer Faktor wäre FOXO3, welcher im von GATA1 induzierten Signalweg von zentraler Rolle ist und zur Induktion von LC3 und damit zur Formation der Autophagosomen führt (Zhang *et al.*, 2015). So konnte eine Hochregulation von GATA1 und verschiedener GATA1 abhängiger Gene, während der Erythropoese gezeigt werden (Kang *et al.*, 2012).

Auch die Untersuchung von NIX, einem integralen Protein der äußeren mitochondrialen Membran, welches während der Erythropoese hochreguliert ist, wäre interessant. Es induziert die Depolarisation der Mitochondrienmembran und die Konjugation von LC3 an die Membran (Moras *et al.*, 2017). Ein KO von NIX zeigte eine Retention der Mitochondrien in den Zellen und reduzierte die Lebensdauer der Zellen *in vivo*. Die Ribosomen-Elimination war davon allerdings nicht beeinflusst (Sandoval *et al.*, 2008). Es sind weiterhin Interaktionen zwischen LC3 und Nix u.a. im Rahmen der Mitophagie von Rückenmarkszellen beschrieben (Nie *et al.*, 2021).

4.2. TRIM58 Knock-Out

Die CRISPR/Cas9-Experimente in robusten K562-Zellen zeigen eine hohe Transfektionseffizienz mit ausreichend hoher Vitalität der Zellen. Die Sequenzierung zeigt in der Folge, dass die verwendeten sgRNA3 und sgRNA4 auch die nötige Effizienz aufweisen, um damit einen KO in Zellen der Erythropoese zu erzielen. Diese Effizienz liegt deutlich über 90 % (s. Abschnitt 3.2.4). Es wäre nun in der Folge interessant den KO in den K562-Zellen auf RNA- und Protein-Ebene mittels dPCR und Western Blot nachzuweisen und das exakte Ausmaß der TRIM58 Expression zu bestimmen. Für sgRNA1 sollte unter Verwendung eines spezifischeren Primers eine erneute Gradienten-PCR und Gelelektrophorese durchgeführt werden, um die genaue KO-Effizienz zu bestimmen.

Eine direkt Elektroporation der Plasmide in primäre Erythroblasten der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ zeigt sich indes nicht erfolgreich. Trotz Verwendung verschiedener Pulsschemata zeigen sich nicht ausreichend vitale Zellen für weitere Experimente. Das pmaxGFP-Plasmid (ca. 3500 Bp), welches deutlich kleiner ist als das px458-Plasmid (ca. 9300 Bp) kann ohne verstärkte Letalität der Zellen transfiziert werden, weshalb die Letalität in Zusammenhang mit der Größe des Plasmids stehen könnte. Sehr große Plasmide sind schwieriger zu transfizieren (Hornstein *et al.*, 2016). Es gibt zwar Projekte, welche mittels Elektroporation Plasmide in Tag 10 Erythroblasten transfizierten, dabei wurden aber Plasmide verwendet, welche wesentlich kleiner sind als px458 (Geiler *et al.*, 2016). Es wäre also interessant weitere Pulsschemata zu testen sowie das Protokoll anzupassen, um eine Nukleofektion des Plasmids in die primären Erythroblasten zu ermöglichen.

Weiterhin ist anzumerken, dass die Funktion von TRIM58 nicht ausreichend beschrieben ist. So könnte TRIM58 auch in Erythroblasten bereits eine wichtige Funktion erfüllen, welche bei vollständigem KO des Gens zum Absterben der Zellen führt. Letzteres könnte auch ein alternativer Grund für die Hohe Letalität nach Elektroporation in den Erythroblasten sein. Es wäre interessant in Folgeexperimenten px458 ohne sgRNA als Kontrolle zu verwenden, um zu eruieren, ob die Letalität von der Größe des Plasmids oder dem TRIM58-KO ausgeht.

Mit den Ergebnissen aus den K562-Zellen ist es nun möglich weitere Experimente durchzuführen mit dem Ziel des Knock-Outs von TRIM58 in humanen Erythroblasten. So sind Folgeexperimente geplant, in welchen die sgRNA mittels Virus-ähnlicher Partikel (rAAV6-Vektoren) zusammen mit CRISPR/Cas9 in Form von Ribonukleoproteinen (RNPs) in die Erythroblasten eingebracht werden. Diese Vorgehensweise ist für hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren bereits etabliert (O. Bak *et al.*, 2017). Der so erfolgte KO soll dann mittels Western Blot und dPCR nachgewiesen werden. Anhand dieses KO und dem damit verbundenem Fehlen der TRIM58 Aktivität könnte beobachtet werden, ob letztere die E nukleation der Erythroblasten hin zu Retikulozyten beeinflusst. Die Ergebnisse könnten wichtige Erkenntnisse über die E nukleation im Rahmen der Erythropoese beitragen. Ein fundiertes und vollumfängliches Verständnis der Prozesse der Erythropoese, wäre nicht nur im Rahmen der allgemeinen Erforschung der iPSZ als mögliche Quelle von Erythrozyten von Interesse. Es könnte weiterhin genutzt werden, um die Diagnostik

und Therapie und somit das Outcome von zahlreichen hämatologischen Erkrankungen, welche auf einer gestörten Erythropoese basieren, zu verbessern.

4.3. Ausblick

Die genaue Entschlüsselung der terminalen Differenzierung von Erythrozyten inklusive der Enukleation und die Offenlegung der zugrundeliegenden Prozesse ist von großem Interesse für die medizinische Forschung. So ist nicht nur für die *ex vivo* Herstellung von Erythrozyten-Konzentraten aus iPSZ oder anderen Quellen ein exaktes Wissen von Bedeutung, sondern auch für die Grundlagenforschung und das Verständnis verschiedener Pathologien, welche die Erythropoese betreffen. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Experimente konnten aufzeigen, dass die Expressionskinetik von TRIM58 in Modellen der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ nicht von der in Modellen der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ abweicht. Allerdings sind weitere umfangreichere Experimente notwendig, um dieses Ergebnis zu endgültig bestätigen. Insbesondere der Vergleich von absoluten Expressionswerten wäre in Zukunft interessant. Generell stellen Experimente, welche die Expression und die Kinetik während der gesamten Erythropoese betrachten, sowohl auf RNA als auch insbesondere auf Protein-Ebene eine Herausforderung dar, da es aufgrund der sich stark verändernden Zellpopulation und Epigenetik sehr schwierig ist passende Ladekontrolle zu eruieren. In diesem Zusammenhang wäre die Identifizierung einer passenden Ladekontrolle sehr wünschenswert, konnte bislang aber auch im internationalen Forschungsfeld nicht gelöst werden. Eine Alternativ zur Korrektur wäre das in dieser Arbeit praktizierte Abzählen einer definierten Zellzahl vor Auftragung auf die Membran des Western Blots.

Zur Untersuchung der Rolle der Autophagie in der Erythropoese wären Analysen weiterer Proteine des komplexen Signalweges von Interesse, um zu sehen, ob die Aktivität der Autophagie in iPSZ-basierten *ex vivo* Erythropoese Modellen von der in Modellen aus adulten HSZ abweicht. Es wäre weiterhin interessant die Expression von mTOR und Sox2 sowohl auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene im Verlauf der *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ zu messen und mit der *ex vivo* Erythropoese aus adulten HSZ zu vergleichen. So scheinen mTOR und Sox2 im Zusammenhang mit der Autophagie eine zentrale Rolle bei der Dedifferenzierung von somatischen Zellen zu iPSZ zu spielen (J. A. Menendez *et al.*, 2011). Weiter wäre es interessant mittels Elektronenmikroskopie die Morphologie der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

darzustellen und zu untersuchen. So könnten sich gezielt Autophagie-Strukturen darstellen lassen und im Vergleich zwischen unterschiedlichen Ansätzen der *ex vivo* Erythropoese untersucht werden.

Der TRIM58-KO mittels des CRISPR/Cas9-Systems könnte in Folgeexperimente die Bedeutung von TRIM58 im Rahmen der Erythropoese und E nukleation offenlegen. Dabei ist es von großem Interesse, ob ein Fehlen von TRIM58 in Erythroblasten der adulten Erythropoese dazu führt, dass diese in ihrer Entwicklung arretieren und es nicht zu einer E nukleation kommt. Tritt dies tatsächlich ein, wären Experimente von Interesse, die den Signalweg von TRIM58 aufdecken und beteiligte Gene beschreiben könnten. Alternativ könnte auch die Generierung eines heterozygoten TRIM58-KO oder einer verminderten TRIM58 Expression z.B. mittels eines lentiviralen Ansatzes zum Erkenntnisgewinn bzgl. der Funktion von TRIM58 in der Erythropoese beitragen. TRIM58 ist in der Literatur noch recht unbeschrieben und die Signalwege TRIM58 sind weitestgehend ungeklärt. Erkenntnisse über TRIM58 könnten wichtige Hinweise zur Physiologie und auch Pathologie der Erythropoese liefern. Da es laut Thom *et al.* seine Wirkung im Rahmen der E nukleation über die Degradierung von Dynein entfaltet, wäre Dynein als weiterer Faktor auch in Zukunft interessant (Thom *et al.*, 2014). Auch eine Überexpression von TRIM58 in Zellen der adulten Erythropoese könnte wichtige Kenntnisse über die Funktion von TRIM58 in der Entwicklung von roten Blutzellen liefern.

Über das Verständnis von TRIM58 könnten wichtige Erkenntnisse über die E nukleation von Normoblasten zu Retikulozyten gewonnen werden. Diese könnten unter anderem wichtig sein für die *ex vivo* Generierung von Erythrozyten aus iPSZ, da diese Ansätze eine verminderte E nukleation im Vergleich zu *ex vivo* Ansätzen aus adulten HSZ vorweisen (M. Hansen *et al.*, 2019; Y. Seo *et al.*, 2019; Dorn *et al.*, 2014). Da Ansätze aus iPSZ aber den Vorteil einer unlimitierten Quelle gegenüber adulten HSZ bieten, wäre es entscheidend die Gründe der verminderten E nukleation zu verstehen und möglicherweise in Zukunft auch beheben zu können. Dies könnte zum Beispiel über genetischer Modifikation mittels CRISPR/Cas9 erreicht werden. So könnte in Zukunft die *ex vivo* Erythropoese aus iPSZ eine alternative Quelle für Erythrozyten-Konzentrate gerade für Patient*innen mit multiplen Alloantikörpern oder seltenen Blutgruppen darstellen.

Zusammenfassend sind viele Faktoren der Erythropoese auch heute noch nicht bekannt und ausreichend verstanden. So ist gerade die E nukleation ein Forschungsbereich, welcher in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat. Experimente zum Verständnis von potenziellen Einflussfaktoren und deren Bedeutung für die E nukleation, wie z.B. TRIM58 sind somit von großem Interesse für die Forschung innerhalb der Grundlagenforschung, der Transfusionsmedizin und der Hämatologie.

Literaturverzeichnis

Ali, Akif; Auvinen, Marja-Kaisa; Rautonen, Jukka (2010): The aging population poses a global challenge for blood services. In: *Transfusion* 50 (3), S. 584–588. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02490.x.

Bak, Rasmus O.; Dever, Daniel P.; Reinisch, Andreas; Cruz Hernandez, David; Majeti, Ravindra; Porteus, Matthew H. (2017): Multiplexed genetic engineering of human hematopoietic stem and progenitor cells using CRISPR/Cas9 and AAV6. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.27873.

Bernecker, Claudia; Ackermann, Mania; Lachmann, Nico; Rohrhofer, Lisa; Zaehres, Holm; Araúzo-Bravo, Marcos J. et al. (2019): Enhanced Ex Vivo Generation of Erythroid Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Simplified Cell Culture System with Low Cytokine Support. In: *Stem cells and development* 28 (23), S. 1540–1551. DOI: 10.1089/scd.2019.0132.

Bernecker, Claudia; Köfeler, Harald; Pabst, Georg; Trötz Müller, Martin; Kolb, Dagmar; Strohmayer, Karl et al. (2019): Cholesterol Deficiency Causes Impaired Osmotic Stability of Cultured Red Blood Cells. In: *Frontiers in physiology* 10, S. 1529. DOI: 10.3389/fphys.2019.01529.

Bolotin, Alexander; Quinquis, Benoit; Sorokin, Alexei; Ehrlich, S. Dusko (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. In: *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 8), S. 2551–2561. DOI: 10.1099/mic.0.28048-0.

Chen, Xihang; He, Yunfan; Lu, Feng (2018): Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. In: *Stem cells international* 2018, S. 9131397. DOI: 10.1155/2018/9131397.

Cuervo, Ana Maria (2004): Autophagy: many paths to the same end. In: *Molecular and cellular biochemistry* 263 (1-2), S. 55–72.

D'Arcy, Mark S. (2019): Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. In: *Cell Biology International* 43 (6), S. 582–592. DOI: 10.1002/cbin.11137.

Deltcheva, Elitza; Chylinski, Krzysztof; Sharma, Cynthia M.; Gonzales, Karine; Chao, Yanjie; Pirzada, Zaid A. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 471 (7340), S. 602–607. DOI: 10.1038/nature09886.

Dice, J. Fred (2007): Chaperone-mediated autophagy. In: *Autophagy* 3 (4), S. 295–299. DOI: 10.4161/auto.4144.

Dorn, Isabel; Klich, Katharina; Arauzo-Bravo, Marcos J.; Radstaak, Martina; Santourlidis, Simeon; Ghanjati, Foued et al. (2015): Erythroid differentiation of human induced pluripotent stem cells is independent of donor cell type of origin. In: *Haematologica* 100 (1), S. 32–41. DOI: 10.3324/haematol.2014.108068.

Elliott, Steve; Pham, Elizabeth; Macdougall, Iain C. (2008): Erythropoietins: a common mechanism of action. In: *Experimental hematology* 36 (12), S. 1573–1584. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.08.003.

Gasiunas, Giedrius; Barrangou, Rodolphe; Horvath, Philippe; Siksnys, Virginijus (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39), E2579-86. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

Geiler, Cristopher; Andrade, Inez; Clayton, Alexandra; Greenwald, Daniel (2016): Genetically Engineered In Vitro Erythropoiesis. In: *International Journal of Stem Cells* 9 (1), S. 53–59. DOI: 10.15283/ijsc.2016.9.1.53.

Gnanapragasam, Merlin Nithya; Bieker, James J. (2017): Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF. In: *Current opinion in hematology* 24 (3), S. 183–190. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000327.

Hanna, J.; Wernig, M.; Markoulaki, S.; Sun, C.-W.; Meissner, A.; Cassady, J. P. et al. (2007): Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858), S. 1920–1923. DOI: 10.1126/science.1152092.

Hansen, Marten; Lindern, Marieke von; van den Akker, Emile; Varga, Eszter (2019): Human-induced pluripotent stem cell-derived blood products: state of the art and future directions. In: *FEBS letters* 593 (23), S. 3288–3303. DOI: 10.1002/1873-3468.13599.

Hattangadi, Shilpa M.; Wong, Piu; Zhang, Lingbo; Flygare, Johan; Lodish, Harvey F. (2011): From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. In: *Blood* 118 (24), S. 6258–6268. DOI: 10.1182/blood-2011-07-356006.

Hendrickson, Jeanne E.; Tormey, Christopher A. (2016): Understanding red blood cell alloimmunization triggers. In: *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2016 (1), S. 446–451. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.446.

Hornstein, Benjamin D.; Roman, Dany; Arévalo-Soliz, Lirio M.; Engevik, Melinda A.; Zechiedrich, Lynn (2016): Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. In: *PLoS ONE* 11 (12), e0167537. DOI: 10.1371/journal.pone.0167537.

Ishigaki, Hirohito; van Pham, Loi; Terai, Jun; Sasamura, Takako; Nguyen, Cong Thanh; Ishida, Hideaki et al. (2021): No Tumorigenicity of Allogeneic Induced Pluripotent Stem Cells in Major Histocompatibility Complex-matched Cynomolgus Macaques. In: *Cell transplantation* 30, 963689721992066. DOI: 10.1177/0963689721992066.

Ishino, Y.; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. (1987): Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. In: *Journal of bacteriology* 169 (12), S. 5429–5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

Ji, Peng; Jayapal, Senthil Raja; Lodish, Harvey F. (2008): Eucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. In: *Nature cell biology* 10 (3), S. 314–321. DOI: 10.1038/ncb1693.

Kamatani, Yoichiro; Matsuda, Koichi; Okada, Yukinori; Kubo, Michiaki; Hosono, Naoya; Daigo, Yataro et al. (2010): Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. In: *Nature genetics* 42 (3), S. 210–215. DOI: 10.1038/ng.531.

Kang, Yoon-A; Sanalkumar, Rajendran; O'Geen, Henriette; Linnemann, Amelia K.; Chang, Chan-Jung; Bouhassira, Eric E. et al. (2012): Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. In: *Molecular and cellular biology* 32 (1), S. 226–239. DOI: 10.1128/MCB.06166-11.

- Kapur, R.; Zhang, L. (2001): A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (2), S. 1099–1106. DOI: 10.1074/jbc.M007442200.
- Keerthivasan, Ganesan; Small, Sara; Liu, Hui; Wickrema, Amittha; Crispino, John D. (2010): Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. In: *Blood* 116 (17), S. 3331–3340. DOI: 10.1182/blood-2010-03-277426.
- Kessel, Katharina Ute (2016): Hematopoietic differentiation from human pluripotent stem cells of different origins, Dissertation, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster
- Kim, Sojung; Kim, Daesik; Cho, Seung Woo; Kim, Jungeun; Kim, Jin-Soo (2014): Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. In: *Genome research* 24 (6), S. 1012–1019. DOI: 10.1101/gr.171322.113.
- Koury, S. T.; Koury, M. J.; Bondurant, M. C. (1989): Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. In: *The Journal of Cell Biology* 109 (6 Pt 1), S. 3005–3013. DOI: 10.1083/jcb.109.6.3005.
- Lalit, Pratik A.; Salick, Max R.; Nelson, Daryl O.; Squirrell, Jayne M.; Shafer, Christina M.; Patel, Neel G. et al. (2016): Lineage Reprogramming of Fibroblasts into Proliferative Induced Cardiac Progenitor Cells by Defined Factors. In: *Cell stem cell* 18 (3), S. 354–367. DOI: 10.1016/j.stem.2015.12.001.
- Li, Wen-wen; Li, Jian; Bao, Jin-ku (2012): Microautophagy: lesser-known self-eating. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (7), S. 1125–1136. DOI: 10.1007/s00018-011-0865-5.
- Lin, C. S.; Lim, S. K.; D'Agati, V.; Costantini, F. (1996): Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. In: *Genes & development* 10 (2), S. 154–164. DOI: 10.1101/gad.10.2.154.
- Liu, Min; Zhang, Xiaowen; Cai, Jian; Li, Yichen; Luo, Qianxin; Wu, Haiyong et al. (2018): Downregulation of TRIM58 expression is associated with a poor patient outcome and enhances colorectal cancer cell invasion. In: *Oncology reports* 40 (3), S. 1251–1260. DOI: 10.3892/or.2018.6525.

Liu, Xiaowen; Long, Ziwen; Cai, Hong; Yu, Shengjia; Wu, Jianghong (2020): TRIM58 suppresses the tumor growth in gastric cancer by inactivation of β -catenin signaling via ubiquitination. In: *Cancer biology & therapy* 21 (3), S. 203–212. DOI: 10.1080/15384047.2019.1679554.

Makarova, Kira S.; Grishin, Nick V.; Shabalina, Svetlana A.; Wolf, Yuri I.; Koonin, Eugene V. (2006): A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. In: *Biology direct* 1, S. 7. DOI: 10.1186/1745-6150-1-7.

Menendez, Javier A.; Vellon, Luciano; Oliveras-Ferraros, Cristina; Cufí, Sílvia; Vazquez-Martin, Alejandro (2011): mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. In: *Cell Cycle* 10 (21), S. 3658–3677. DOI: 10.4161/cc.10.21.18128.

Mojica, Francisco J. M.; Díez-Villaseñor, César; García-Martínez, Jesús; Soria, Elena (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. In: *Journal of molecular evolution* 60 (2), S. 174–182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.

Moras, Martina; Lefevre, Sophie D.; Ostuni, Mariano A. (2017): From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. In: *Frontiers in physiology* 8, S. 1076. DOI: 10.3389/fphys.2017.01076.

Naik, Prajna Paramita; Birbrair, Alexander; Bhutia, Sujit Kumar (2019): Mitophagy-driven metabolic switch reprograms stem cell fate. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (1), S. 27–43. DOI: 10.1007/s00018-018-2922-9.

Napolitano, Luisa M.; Meroni, Germana (2012): TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. In: *IUBMB life* 64 (1), S. 64–71. DOI: 10.1002/iub.580.

Ndoye, Abibatou; Weeraratna, Ashani T. (2016): Autophagy- An emerging target for melanoma therapy. In: *F1000Research* 5. DOI: 10.12688/f1000research.8347.1.

Nie, Piming; Wang, Honggang; Yu, Datang; Wu, Hongchen; Ni, Bing; Kong, Jiming; Zhang, Zhengfeng (2021): NIX Mediates Mitophagy in Spinal Cord Injury in Rats by

Interacting with LC3. In: *Cellular and molecular neurobiology*. DOI: 10.1007/s10571-021-01082-7.

Perkins, A. C.; Sharpe, A. H.; Orkin, S. H. (1995): Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. In: *Nature* 375 (6529), S. 318–322. DOI: 10.1038/375318a0.

Popova, Evgenya Y.; Krauss, Sharon Wald; Short, Sarah A.; Lee, Gloria; Villalobos, Jonathan; Ezzell, Joan et al. (2009): Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 17 (1), S. 47–64. DOI: 10.1007/s10577-008-9005-y.

Raya, Angel; Rodríguez-Pizà, Ignasi; Guenechea, Guillermo; Vassena, Rita; Navarro, Susana; Barrero, María José et al. (2009): Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. In: *Nature* 460 (7251), S. 53–59. DOI: 10.1038/nature08129.

Rowe, R. Grant; Mandelbaum, Joseph; Zon, Leonard I.; Daley, George Q. (2016): Engineering Hematopoietic Stem Cells: Lessons from Development. In: *Cell Stem Cell* 18 (6), S. 707–720. DOI: 10.1016/j.stem.2016.05.016.

Sandoval, Hector; Thiagarajan, Perumal; Dasgupta, Swapan K.; Schumacher, Armin; Prchal, Josef T.; Chen, Min; Wang, Jin (2008): Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. In: *Nature* 454 (7201), S. 232–235. DOI: 10.1038/nature07006.

Schaberl, Verena (2019): Etablierung einer digitalen droplet PCR zur Quantifizierung Autophagie-assoziiierter Gene in der humanen Erythropoese. FH Joanneum, Master of Science

Seo, Yoojin; Shin, Kyung-Hwa; Kim, Hyung Hoi; Kim, Hyung-Sik (2019): Current Advances in Red Blood Cell Generation Using Stem Cells from Diverse Sources. In: *Stem cells international* 2019, S. 9281329. DOI: 10.1155/2019/9281329.

Shintani, Takahiro; Klionsky, Daniel J. (2004): Autophagy in health and disease: a double-edged sword. In: *Science (New York, N.Y.)* 306 (5698), S. 990–995. DOI: 10.1126/science.1099993.

Song, Guangqi; Pacher, Martin; Balakrishnan, Asha; Yuan, Qinggong; Tsay, Hsin-Chieh; Yang, Dakai et al. (2016): Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. In: *Cell Stem Cell* 18 (6), S. 797–808. DOI: 10.1016/j.stem.2016.01.010.

Swartz, Kelsey L.; Wood, Scott N.; Murthy, Tushar; Ramirez, Oscar; Qin, Gangjian; Pillai, Manoj M. et al. (2017): E2F-2 Promotes Nuclear Condensation and Enucleation of Terminally Differentiated Erythroblasts. In: *Molecular and cellular biology* 37 (1). DOI: 10.1128/MCB.00274-16.

Takahashi, Kazutoshi; Okita, Keisuke; Nakagawa, Masato; Yamanaka, Shinya (2007): Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. In: *Nature protocols* 2 (12), S. 3081–3089. DOI: 10.1038/nprot.2007.418.

Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Thom, Christopher S.; Traxler, Elizabeth A.; Khandros, Eugene; Nickas, Jenna M.; Zhou, Olivia Y.; Lazarus, Jacob E. et al. (2014): TRIM58 degrades Dynein and regulates terminal erythropoiesis. In: *Developmental cell* 30 (6), S. 688–700. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.07.021.

van der Harst, Pim; Zhang, Weihua; Mateo Leach, Irene; Rendon, Augusto; Verweij, Niek; Sehmi, Joban et al. (2012): Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. In: *Nature* 492 (7429), S. 369–375. DOI: 10.1038/nature11677.

Wang, Junxia; Ramirez, Tzutzuy; Ji, Peng; Jayapal, Senthil Raja; Lodish, Harvey F.; Murata-Hori, Maki (2012): Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 2), S. 340–349. DOI: 10.1242/jcs.088286.

Wang, Shuo; Xia, Pengyan; Ye, Buqing; Huang, Guanling; Liu, Jing; Fan, Zusen (2013): Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. In: *Cell Stem Cell* 13 (5), S. 617–625. DOI: 10.1016/j.stem.2013.10.005.

Wu, Hong; Liu, Xin; Jaenisch, Rudolf; Lodish, Harvey F. (1995): Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or

the erythropoietin receptor. In: *Cell* 83 (1), S. 59–67. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90234-1.

Yoshida, Hideyuki; Kawane, Kohki; Koike, Masato; Mori, Yoshimi; Uchiyama, Yasuo; Nagata, Shigekazu (2005): Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. In: *Nature* 437 (7059), S. 754–758. DOI: 10.1038/nature03964.

Zachari, Maria; Ganley, Ian G. (2017): The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. In: *Essays in biochemistry* 61 (6), S. 585–596. DOI: 10.1042/EBC20170021.

Zhang, Hang; Su, Bingnan; Jiao, Luyan; Xu, Ze-Hua; Zhang, Chang-Jun; Nie, Jinfu et al. (2021): Transplantation of GMP-grade human iPSC-derived retinal pigment epithelial cells in rodent model: the first pre-clinical study for safety and efficacy in China. In: *Annals of translational medicine* 9 (3), S. 245. DOI: 10.21037/atm-20-4707.

Zhang, Jieying; Wu, Kunlu; Xiao, Xiaojuan; Liao, Jiling; Hu, Qikang; Chen, Huiyong et al. (2015): Autophagy as a regulatory component of erythropoiesis. In: *International journal of molecular sciences* 16 (2), S. 4083–4094. DOI: 10.3390/ijms16024083.

Zhang, Yu; Wang, Chen; Wang, Lan; Shen, Bin; Guan, Xin; Tian, Jing et al. (2017): Large-Scale Ex Vivo Generation of Human Red Blood Cells from Cord Blood CD34+ Cells. In: *Stem cells translational medicine* 6 (8), S. 1698–1709. DOI: 10.1002/sctm.17-0057.

