

**Diplomarbeit**

**Vergleichende Charakterisierung des Zytoskeletts  
nativer und ex vivo generierter roter Blutzellen  
Immuncytochemical staining of cytoskeletal proteins**

eingereicht von

**Felix Wohlgenannt**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Universitätsklinikum für Blutgruppenserologie und**

**Transfusionsmedizin**

unter der Anleitung von

Priv.-Doz.<sup>in</sup> Mag.<sup>a</sup> Dr.<sup>in</sup> Claudia Bernecker

Univ.-FÄ Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> Isabel Dorn

Graz, 05.05.2022

*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 05.05.2022*

*Felix Wohlgenannt eh.*

## Danksagung

Hier möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin Priv.-Doz.in Mag.a Dr.in Claudia Bernecker für die großartige Betreuung durch den gesamten Prozess dieser Arbeit bedanken.

Weiters möchte ich mich bei Annika Lampl BSc für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Großer Dank gilt auch meiner Freundin Kristina für ihre Zeit und Mühe als Korrekturleserin und die liebevolle Unterstützung in dieser Phase.

Abschließend möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern Gunhild und Martin bedanken, die mir durch ihre Unterstützung das Medizinstudium erst ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Allgemeiner Teil .....	3
2.1 Die humane Erythropoese in vivo .....	3
2.1.1 Die Regulation der Erythropoese .....	4
2.2 Der Abbau von Erythrozyten .....	5
2.3 Der Erythrozyt .....	7
2.4 Zellmembran und Zytoskelett .....	8
2.4.1 Die Zellmembran .....	9
2.4.2 Das Zytoskelett .....	10
2.5 Die Erythropoese ex vivo .....	12
3. Methoden .....	13
3.1 Ethik .....	13
3.2 Testzellen .....	13
3.3 Zellzahlbestimmung .....	15
3.4 Charakterisierung der cRBCs .....	16
3.4.1 Färbung von Zytopspinpräparaten .....	16
3.4.2 Durchflusszytometrie .....	17
3.5 Immunzytochemische Färbung .....	18
3.5.1 Beschichtung der Objektträger .....	18
3.5.2 Aufbringen der Zellen am Objektträger .....	18
3.5.3 Reagenzien .....	19
3.5.4 Färbungsablauf .....	19
4. Ergebnisse .....	21
4.1 Die Charakterisierung der cRBCs .....	21
4.2 Kontrolle der Differenzierung der cRBCs .....	25
4.3 Etablierung der Färbung .....	26
4.3.1 Verdünnung der Antikörper .....	27
4.3.2 Austestung der Inkubationszeit .....	29
4.3.3 F-Aktin Färbung .....	31
4.3.4 Vergleich von Sedimentation und Zytopspin .....	32

4.3.5	Austestung Doppelfärbung.....	34
4.3.6	Negativkontrollen .....	35
4.3.7	Beschichtung der Objektträger.....	35
4.4	Ankyrinfärbung .....	36
4.5	Spektrinfärbung .....	44
4.6	Bande 3-Färbung .....	52
4.7	Aktinfärbung .....	62
5.	Diskussion .....	72
	Literaturverzeichnis .....	i

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Contractile actinomyosin ring, kontraktiler Akinomyosinring
CD34+	Cluster of Differentiation 34 positiv
CD45	Cluster of Differentiation 45
CD71	Cluster of Differentiation 71
cRBCs	Cultivated red blood cells, kultivierte rote Blutzellen
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
EKs	Erythrozytenkonzentrate
HPL	Humanes Plättchenlysate
HSCs	Human Stem Cells, menschliche Stammzellen
HSPCs	Hämatopoetic stem and progenitor Cells, menschliche Stamm- und Vorläuferzellen
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
iPSZ	Induzierte pluripotente Stammzellen
LG	Ligand gel, virusinaktiviertes Humanplasma
nRBCs	Native red blood cells, native rote Blutzellen
nRET	Native reticulocyte, nativer Retikulozyt
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PHA-E	Phytohemmagglutinin Lectin form Phaseolus Vulgaris
PI	Propium Iodid
PLL	Poly-L-Lysin
RBCs	Red blood cells, rote Blutzellen
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 EPO 80, TAG 1, 60X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), MAY-GRÜN WALD-GIEMSA FÄRBUNG	22
ABBILDUNG 2: EPO 80, TAG 8, 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), MAY-GRÜN WALD-GIEMSA FÄRBUNG	22
ABBILDUNG 3 EPO 80, TAG 11, LG-MEDIUM, 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), KO-FÄRBUNG AUS MAY GRÜN WALD-GIEMSA UND BENZIDIN-FÄRBUNG	22
ABBILDUNG 4 EPO 80, TAG 11, HPL-MEDIUM, 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), KO-FÄRBUNG AUS MAY GRÜN WALD-GIEMSA UND BENZIDIN-FÄRBUNG	22
ABBILDUNG 5 EPO 80, TAG 15, LG-MEDIUM, 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), KO-FÄRBUNG AUS MAY GRÜN WALD-GIEMSA UND BENZIDIN-FÄRBUNG	23
ABBILDUNG 6 EPO 80, TAG 15, HPL-MEDIUM, 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), KO-FÄRBUNG AUS MAY GRÜN WALD-GIEMSA UND BENZIDIN-FÄRBUNG	23
ABBILDUNG 7 EPO 80, TAG 18, LG-MEDIUM, NACH FILTRATION 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), MAY GRÜN WALD-GIEMSA FÄRBUNG	23
ABBILDUNG 8 EPO 80, TAG 18, HPL-MEDIUM, NACH FILTRATION, 100X-VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE 25 µM), MAY GRÜN WALD-GIEMSA FÄRBUNG	23
ABBILDUNG 9: REIFEGRADBESTIMMUNG VON NRET, CRBCS TAG 18 NACH FILTRATION UND NRBCS; 100X VERGRÖßERUNG (SKALENLEISTE=20 µM)	24
ABBILDUNG 10: KUMULATIVE EXPANSION DER UNTERSUCHTEN KULTUREN	25
ABBILDUNG 11: DIFFERENZIALZÄHLUNG DER ZELLEN MIT %-ANTEILEN BASOPHILER ERYTHROBLASTEN (BASOPHIL), POLYCHROMATISCHER ERYTHROBLASTEN (POLYCHROMATISCH) UND RETIKULOZYTEN	25
ABBILDUNG 12: AUSPRÄGUNG DER OBERFLÄCHENMERKMALE IM LAUFE DER DIFFERENZIERUNG DER BEIDEN VERGLEICHSKULTUREN. ANALYSIERT MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.	26
ABBILDUNG 13 EPO 64 ZELLEN AN TAG 8 -ZYOSPIN AUF UNBESCHICHTEN OT; LINKS: 1:100/1:500, MITTE: 1:200/1:500, RE:1:200/1:1000 VERDÜNNUNG; SKALENLEISTE 25 µM.	27
ABBILDUNG 14 EPO 64 ZELLEN AN TAG 8 -SEDIMENTATION AUF UNBESCHICHTETE OT; LINKS 1:100/1:500 MITTE: 1:200/1:500 RECHTS: 1:200/1:1000 VERDÜNNUNG; SKALENLEISTE BILD 1 UND 3: 75 µM, BILD 2: 25 µM.	28
ABBILDUNG 15 EPO 64 ZELLEN AN TAG 8 -OBEN SEDIMENTATION, UNTEN ZYTOSPIN AUF BESCHICHTETE OT; LINKS 1:100/1:500, RECHTS:1:200/1:500 VERDÜNNUNG, SKALENLEISTE 25 µM.	28
ABBILDUNG 16 AUSTESTUNG INKUBATIONSZEITEN DES ERSTANTIKÖRPERS: FÄRBUNG VON ANKYRIN, SPEKTRIN UND BANDE 3 UNTEREINANDER; LINKE SPALTE INKUBATIONSZEIT EINE STUNDE, RECHTE SPALTE INKUBATIONSZEIT ÜBER NACHT. A: ANKYRIN ERSTANTIKÖRPER INKUBATIONSZEIT EINE STUNDE, B: ANKYRIN ERSTANTIKÖRPER INKUBATIONSZEIT ÜBER NACHT, C: SPEKTRIN ERSTANTIKÖRPER INKUBATIONSZEIT EINE STUNDE, D: SPEKTRIN ERSTANTIKÖRPER INKUBATIONSZEIT ÜBER NACHT, E: BANDE 3 ERSTANTIKÖRPER INKUBATIONSZEIT EINE STUNDE, F: BANDE 3 ERSTANTIKÖRPER INKUBATIONSZEIT ÜBER NACHT; 60X VERGRÖßERUNG; SKALENLEISTE 20 µM.	30
ABBILDUNG 17 F-AKTIN FÄRBUNG: LINKS INKUBATIONSZEIT DER FÄRBUNG 45 MINUTEN, RECHTS INKUBATIONSZEIT 60 MINUTEN; 60X VERGRÖßERUNG; SKALENLEISTE 20 µM.	31
ABBILDUNG 18 VERGLEICH AUFBRINGUNG MITTELS ZYTOSPIN UND SEDIMENTATION: DIE 4 AUSGETESTETEN FÄRBUNGEN ANKYRIN, SPEKTRIN, BANDE 3 UND F-AKTIN UNTEREINANDER; LINKE SPALTE: AUFBRINGUNG MITTELS ZYTOSPIN, RECHTE SPALTE: SEDIMENTATION DER ZELLEN; 60X VERGRÖßERUNG; SKALENLEISTE 20 µM.	33
ABBILDUNG 19 DOPPELFÄRBUNG ANKYRIN & BANDE 3; A: BANDE 3 FÄRBUNG, B: ANKYRIN UND BANDE 3 DOPPELFÄRBUNG, C: ANKYRIN FÄRBUNG; 60X VERGRÖßERUNG; SKALENLEISTE 20 µM.	34

ABBILDUNG 20 ANKYRINFÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11, 15, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M; AN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	37
ABBILDUNG 21 ANKYRINFÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AM TAG 18 VOR FILTRATION, NACH FILTRATION UND NRET, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR, ANKYRINFÄRBUNG VON NRBCS AUF UNBESCHICHTETEN OT; SKALENLEISTE AN DEN TAGEN 18: 10 $\mu$ M, BEI NRET UND NRBCS: 20 $\mu$ M	38
ABBILDUNG 22 ANKYRINFÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11 UND 15; LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M, AN DEN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	41
ABBILDUNG 23 ANKYRINFÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AM TAG 18 VOR FILTRATION, NACH FILTRATION, NRET UND NRBCS; LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN DEN TAGEN 18 UND NRBCS: 10 $\mu$ M, BEI NRET: 20 $\mu$ M.	42
ABBILDUNG 24 SPEKTRINFÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11 UND 15, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M, AN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	45
ABBILDUNG 25 SPEKTRINFÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AM TAG 18 VOR FILTRATION, NACH FILTRATION UND NRET, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR, SPEKTRINFÄRBUNG VON NRBCS AUF UNBESCHICHTETEN OT; SKALENLEISTE AN DEN TAGEN 18: 10 $\mu$ M, BEI NRET UND NRBCS: 20 $\mu$ M	46
ABBILDUNG 26 SPEKTRINFÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11 UND 15, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M, AN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	49
ABBILDUNG 27 SPEKTRINFÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AN TAG 18 VOR FILTRATION, NACH FILTRATION, NRET UND NRBCS, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE: 10 $\mu$ M	50
ABBILDUNG 28 BANDE 3-FÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11, 15, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M, AN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	53
ABBILDUNG 29 BANDE 3-FÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AM TAG 18 VOR UND NACH FILTRATION, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR, REFERENZBILD VON NRET AUF PHAE-BESCHICHTETEN OT UND NRBCS AUF UNBESCHICHTETEN OT; SKALENLEISTE NRET UND NRBCS: 20 $\mu$ M, AN TAG 18 VOR UND NACH FILTER: 10 $\mu$ M	54
ABBILDUNG 30 BANDE 3-FÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11, 15, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M; AN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	58
ABBILDUNG 31 BANDE 3-FÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AM TAG 18 NACH FILTRATION, NRET UND NRBCS, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE NRET: 20 $\mu$ M; AN DEN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	59
ABBILDUNG 32 AKTINFÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11, 15, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M; AN DEN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	63
ABBILDUNG 33 AKTINFÄRBUNG VON PHAE-BESCHICHTETEN OT M TAG 18 VOR FILTRATION, NACH FILTRATION UND NRET, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN DEN TAGEN 18: 10 $\mu$ M, BEI NRET UND NRBCS: 20 $\mu$ M	64
ABBILDUNG 34 AKTINFÄRBUNG VON PLL- BESCHICHTETEN OT AN DEN TAGEN 8, 11, 15; LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE AN TAG 8: 20 $\mu$ M; AN RESTLICHEN TAGEN: 10 $\mu$ M	68
ABBILDUNG 35 AKTINFÄRBUNG VON PLL-BESCHICHTETEN OT AM TAG 18 VOR FILTRATION, NACH FILTRATION UND NRET, LINKS HPL-KULTUR, RECHTS LG-KULTUR; SKALENLEISTE: 10 $\mu$ M	69

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG ANKYRIN, SPEKTRIN, BANDE3 SOWIE DOPPELFÄRBUNGEN	20
TABELLE 2: FÄRBUNGSKIT FÜR F-AKTIN FÄRBUNG	21

## Zusammenfassung

In der modernen Medizin spielen Bluttransfusionen eine tragende Rolle. Die in-vitro Produktion von roten Blutzellen für Blutkonserven könnte einerseits helfen, Engpässe in der Versorgung zu verhindern, sowie andererseits einen weiteren Schritt Richtung personalisierter Medizin bedeuten.

Für die Funktionalität der roten Blutzellen ist ihr einzigartiges Membranzytoskelett von essenzieller Bedeutung. Um ex vivo generierte Blutzellen in Zukunft klinisch einsetzen zu können, müssen hohe Qualitätsansprüche erfüllt werden. Das inkludiert die mechanische Belastbarkeit, sowie die Verformbarkeit der Zellen, die mit einem intakten Zytoskelett einhergehen. Die Erforschung neuer, sowie die Perfektionierung schon bestehender Kulturmethoden, stehen im Zentrum der Forschung. Neue Nährmedien helfen dabei, die mechanische Belastbarkeit der Zellen zu erhöhen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit sich der Aufbau des Zytoskeletts von nativen roten Blutzellen und ex vivo generierten roten Blutzellen in ausgewählten Markern unterscheidet. Als Hauptvertreter des erythroiden Membranzytoskeletts wurden die drei Zytoskelettproteine Ankyrin, Spektrin und Aktin sowie das Transmembranprotein Bande 3 für die Untersuchungen ausgewählt.

Für die Versuche wurden über CD34+ Selektion humane Stammzellen gewonnen und in einem etablierten dreistufigen Erythropoese-Kulturmodell zu entkernten roten Blutzellen differenziert. Für die Entwicklung der Zellen wurden zwei unterschiedliche Nährmedien verwendet, die sich in der Lipidzusammensetzung unterschieden. Die ex vivo generierten Zellen wurden in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung aus den jeweiligen Nährmedium entnommen. Diese Zellen, sowie die nativen Vergleichszellen wurden mittels Sedimentation auf die Objektträger gebracht, dort fixiert und für den Färbevorgang permeabilisiert. Im Anschluss folgte die immunzytochemische Färbung der ausgewählten Zytoskelett- und Membranbestandteile, sowie deren Detektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. In weiterer Folge wurden Bilder angefertigt, welche visuell ausgewertet und beurteilt wurden.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden: Die Entwicklung der ausgesuchten Marker wurde festgehalten und die Zellen der unterschiedlichen Nährmedien miteinander verglichen. Hier wurde ein Entwicklungsvorsprung jener Zellkultur beobachtet, deren Nährmedium mit Lipiden angereichert war.

Weiters erfolgte ein Vergleich der ex vivo generierten Zellen am Ende ihrer Entwicklung mit den nativen Retikulozyten und Erythrozyten. Insbesondere im Vergleich zu den nativen Retikulozyten konnten große Übereinstimmungen im Muster der Färbungen nachgewiesen werden.

## Abstract

Blood transfusions play a key role in modern medicine. The *in vitro* production of red blood cells could, on the one hand, help to prevent bottlenecks in the blood supply and, on the other hand, represent a further step towards personalized medicine.

For the functionality of red blood cells, their unique membrane cytoskeleton is essential. In order to be able to use *ex vivo* generated blood cells clinically in the future, high quality standards must be met. This includes the mechanical resilience as well as the deformability of the cells, which go hand in hand with an intact cytoskeleton. Research focuses on the development of new culture methods and the improvement of existing ones. New culture media help to increase the mechanical resilience of the cells.

This work deals with the question to what extent the structure of the cytoskeleton of native red blood cells and *ex vivo* generated red blood cells differs in selected markers. As main representatives of the erythroid membrane cytoskeleton, the three cytoskeletal proteins ankyrin, spectrin and actin as well as the transmembrane protein band 3 were chosen for the investigations.

For the experiments, human stem cells were obtained via CD34+ selection and differentiated into enucleated red blood cells in an established three-stage erythropoiesis culture model. Two different culture media differing in lipid composition were used for cell development. Cells generated *ex vivo* were harvested from the respective culture media at different stages of their development. These cells, as well as the native comparison cells, were transferred to slides by sedimentation, where they were fixed and permeabilized for the staining procedure. Immunocytochemical labelling of the selected cytoskeletal and membrane components and their detection by immunofluorescence microscopy followed. Subsequently, images were obtained, which were visually evaluated and assessed.

The following results were obtained: The development of the selected markers was recorded and the cells of the different culture media were compared. A developmental advantage was observed for the cell culture whose nutrient medium was enriched with lipids.

Furthermore, the *ex vivo* generated cells at the end of their development were compared with the native reticulocytes and erythrocytes. Especially in comparison to the native reticulocytes, great similarities in the pattern of staining could be detected.

# 1. Einleitung

Bluttransfusionen spielen in der modernen Medizin eine bedeutende Rolle. Sie werden zur symptomatischen Behandlung von Blutarmut aufgrund unterschiedlichster Ursachen wie Krebserkrankungen, genetischer Erkrankungen, oder zur Kompensation von Blutverlusten im Rahmen von Unfällen oder operativen Eingriffen angewendet (1,2). Die Bluttransfusionen stammen von gesunden, freiwilligen Spenderinnen und Spendern. In einer immer älter werdenden Bevölkerung, mit somit wachsendem Bedarf, stellt das gespendete Blut eine begrenzte Ressource dar (1). Viele Entwicklungsländer berichten über Engpässe in der Blutkonservenversorgung (3). Während der Bedarf an Blutkonserven in den westlichen Ländern derzeit noch gedeckt ist, sagen demografische Prognosen auch hier eine unzureichende Versorgung bereits für das Jahr 2050 voraus (1,2). Ein weiteres Problem, vor allem für Menschen, die auf regelmäßige Bluttransfusionen angewiesen sind, ist die Alloimmunisierung (4). Sie ist eine komplexe Immunreaktion, die zur Entwicklung von Antikörpern gegen fremde Antigene auf transfundierten Erythrozyten führt (1,2). Je öfter eine Patientin oder ein Patient eine fremde Blutkonserve erhält, umso größer wird das Risiko einer Immunisierung gegen die allogenen Erythrozyten (4). Wenn solche Antikörper einmal gebildet sind und die Patientin oder der Patient erneut Erythrozyten mit diesen Antigenen transfundiert bekommt, können schwerwiegende Komplikationen wie Hämolyse, Organversagen oder sogar der Tod eintreten (2). Weiters stellt die Übertragung bekannter oder neu auftretender Infektionserreger ein ständiges Problem bei Bluttransfusionen dar (4). Um dem ständig wachsenden Bedarf an Blutkonserven gerecht zu werden und einen weiteren Schritt Richtung personalisierte Medizin machen zu können, rückt die Möglichkeit Erythrozyten ex vivo herzustellen immer mehr in den Fokus der Forschung (1,2,5).

Die in-vitro-Produktion von transfusionsfähigen roten Blutkörperchen kann die Verfügbarkeit von passenden Blutgruppen erhöhen und somit die Alloimmunisierung verhindern (5). Weiters sind die ex vivo hergestellten Erythrozyten sicher im Hinblick auf die Ausbreitung von Infektionen (4,5).

Die Produktion von ex vivo generierten roten Blutkörperchen steht jedoch noch vor einigen Herausforderungen. Zum einen sind die derzeit bestehenden

Laborkultursysteme nicht in der Lage, die immense Anzahl an benötigten roten Blutkörperchen auf effiziente und kostengünstige Weise zu erzeugen (5). Zum anderen ist die Qualität des Produktes noch eine Herausforderung. Durch verschiedenste Optimierungen in der Kultivierung arbeitet man an der Eliminierung der Unterschiede zwischen ex vivo hergestellten und nativen Erythrozyten, um die hohen Qualitätsansprüche für eine Bluttransfusion zu erreichen (1,5). Für eine erfolgreiche Transfusion müssen die gezüchteten Erythrozyten in Form und Funktion den nativen Erythrozyten entsprechen, das bedeutet vollständig entkernt, ebenso verformbar sein und dieselbe Sauerstoffkapazität wie das Original aufweisen (1).

Entsprechende Nährmedien können die Qualität von gezüchteten RBCs erhöhen. So konnten *Bernecker* et al. in ihrer Forschung zeigen, dass eine Lipidanreicherung im Nährmedium zu einer höheren mechanischen- und osmotischen Stabilität der kultivierten Zellen führt (6). Ausschlaggebend für die mechanische Stabilität, sowie die Verformungseigenschaften der Erythrozyten ist das Membranzytoskelett (7,8). Das Zytoskelett ist über Transmembranproteine mit der Lipiddoppelschicht verbunden. So kann die notwendige Verformbarkeit für die Funktion und das Überleben der roten Blutzellen im Blutkreislauf gewährleistet werden (8).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es Unterschiede im Membranzytoskelett von nativen und ex vivo generierten roten Blutzellen hinsichtlich ausgewählter Marker gibt. Als Hauptvertreter des erythroiden Membranzytoskeletts wurden Ankyrin, Spektrin, Bande 3 und Aktin für die Untersuchungen ausgewählt. Für diese Membran- und Zytoskelettproteine wurden fluoreszenzbasierte immunzytochemische Färbemethoden etabliert und mittels entsprechender Bildgebung ausgewertet. Somit konnten die ex vivo generierten Zellen mit nativen Retikulozyten und Erythrozyten verglichen werden.

Bevor diese Aspekte im Hauptteil erörtert werden, wird zuvor noch zum besseren Verständnis ein Überblick über die theoretischen Grundlagen geschaffen.

## 2. Allgemeiner Teil

### 2.1 Die humane Erythropoese in vivo

Der Bildungsort der Erythrozyten ist nach der Geburt das rote Knochenmark (9). Dort entstehen aus mehreren Vorstufen und unter Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren alle Zellen des menschlichen Blutes. Im roten Knochenmark befinden sich Stammzellen, welche zwei herausragende Eigenschaften besitzen. Zum einen sind diese Stammzellen pluripotent. Das bedeutet, sie können sich in verschiedene Blutzellen entwickeln. Zum anderen können sich diese Stammzellen selbst erneuern, was zu einem unerschöpflichen Vorrat an blutbildenden Zellen führt (9,10).

Die Blutbildung, auch Hämatopoese, beginnt mit der pluripotenten Stammzelle. Nach erfolgter Teilung, bleibt eine der beiden Tochterzellen eine Stammzelle. So wird die oben bereits erwähnte Selbsterneuerung gewährleistet (11). Die andere Tochterzelle proliferiert und entwickelt sich weiter zur multipotenten Progenitorzelle. Ab diesem Stadium verliert die Zelle die Fähigkeit der Selbsterneuerung (9).

Im nächsten Entwicklungsschritt muss sich die Zelle zwischen dem lymphatischen und dem myeloischen Weg entscheiden (9). Ab dieser Entwicklungsstufe spricht man von „terminaler Differenzierung“, da die weitere Entwicklung unumkehrbar ist und nur in die Richtung der reifen Blutzelle ablaufen kann (10). Aus den lymphatischen Progenitorzellen entstehen über weitere Entwicklungsstufen alle Lymphozyten. Während aus den myeloischen Progenitorzellen neben Thrombo-, Granulo- und Monozyten auch Erythrozyten entstehen können (9,10).

Auf dem Weg zum fertigen Erythrozyten stellt die myeloische Progenitorzelle die nächste Entwicklungsstufe dar. Diese entwickelt sich weiter zur Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitorzelle und anschließend zur unipotenten Erythrozytenprogenitorzelle (9). Die Progenitorzellen sind sehr teilungsfreudige Zellen. Dies stellt eine wichtige Eigenschaft dar, um die benötigte Massenproduktion der Blutzellen zu gewährleisten (9).

Nach neuesten Erkenntnissen sollte diese Abfolge der Blutzellentwicklung nur als klassisches Modell betrachtet werden. Es konnte in Studien festgestellt werden, dass sowohl bei der Erythrozyten- als auch bei der Megakaryozytenlinie schon im

Stammzellstadium oder im unmittelbar nachgeschalteten Vorläuferstadium, eine Festlegung der zukünftigen Differenzierung stattfindet (12).

Anschließend an das Stadium der unipotenten Progenitorzelle folgt eine weitere Abfolge von Entwicklungsstufen. Diese Entwicklungsstufen kann man bereits im Knochenmarkausstrich erkennen und voneinander abgrenzen.(9,13)

Aufgrund unterschiedlicher Benennung der weiteren Vorstufen in der Literatur werden diese mit E1-5 benannt.

Die erste morphologisch erkennbare Vorstufe der Erythropoese ist der Proerythroblast (E1). Dann folgt der basophile Erythroblast (E2) und der polychromatische Erythroblast (E3). Die ersten drei Stadien sind geprägt von Mitosen zur Proliferation, sowie weiteren Differenzierungen. In den darauffolgenden Stadien des polychromatischen Normoblast (E4), sowie des orthochromatischen (oder auch oxyphilen) Normoblast (E5) findet jedoch nur noch Differenzierung statt. Ab der Stufe E5 beginnt die Zelle ihren Kern abzuschneiden und diesen dann schlussendlich auszustoßen. (9,14) Das Ergebnis dieser Eukleation ist eine kernlose Zelle mit Resten von Polyribosomen, ein Retikulozyt (9). Innerhalb von 1-3 Tagen werden diese Reste durch Autophagie aus der Zelle entfernt und übrig bleibt der reife Erythrozyt, der in den Blutkreislauf entlassen wird. Normalerweise dauert die Erythropoese vom Stadium des Proerythroblasten (E1) bis zum Endprodukt circa 8 Tage (9).

## 2.1.1 Die Regulation der Erythropoese

### 2.1.1.1 *Knochenmark der Ort der Blutbildung*

Das rote Knochenmark bietet durch seinen Aufbau eine günstige Umgebung für die Blutbildung (9). Das Stroma wird durch einen Verband von verschiedenen Zellen gebildet. Fibroblastische Retikulumzellen bilden zusammen mit retikulären Fasern ein Maschenwerk, in welchem sich die Vorstufen der Blutzellen befinden (9). Zahlreiche ortsansässige Makrophagen übernehmen den Abbau von abgestorbenen Vorläuferzellen sowie der von Normoblasten ausgestoßenen Kerne (9). Durch den Abbau alter Erythrozyten, der von Makrophagen erledigt wird, wird Eisen gelöst und ins Blutplasma abgegeben. Vor allem für die Blutneubildung wird Eisen benötigt, welches dann über Transferrin vom Plasma zu den Zellen

transportiert wird. Somit übermitteln die Makrophagen das Eisen von der alten an die neue Generation der Erythrozyten (9,15).

Die Retikulumzellen und die Makrophagen sind durch die Sekretion und Weitergabe von Zytokinen maßgeblich an der Steuerung der Blutbildung beteiligt (9,15). Fettzellen dienen im Stroma als Platzhalter. Aus ihnen kann im Bedarfsfall Fett freigesetzt werden, um der Erythropoese genügend Platz zu verschaffen (9,16).

Ein flaches Endothel bildet die Grenze zu den zahlreichen Sinusoiden im Knochenmark. Diese Barriere hält unreife Blutvorstufen vor einem verfrühten Eintritt in den Blutstrom zurück (9).

#### 2.1.1.2 *Wachstumsfaktoren*

Die Bildung von Blutzellen wird von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gesteuert. Über mehrere Regulationsmechanismen wird der genaue Differenzierungsweg der Vorläuferzellen bestimmt. Durch Aktivierung der Zellvermehrung oder Induktion von verfrühtem Ableben der Vorstufen (Apoptose) wird ein Gleichgewicht zwischen Verbrauch und Neubildung eingestellt. Viele dieser Wachstumsfaktoren (Zytokine) werden lokal im Knochenmark gebildet und wirken auch dort auf benachbarte Zellen ein (9).

Der Stammzellfaktor ist für das Langzeitüberleben von sich nicht teilenden Stammzellen von Bedeutung. Er wird von Stromazellen gebildet (11). Verschiedene Interleukine sowie koloniestimulierende Faktoren wirken auf die frühen Stufen der Hämatopoese ein und bestimmen ihren Differenzierungsweg (10).

Die Sauerstoffversorgung des Körpers hat auch einen regulativen Einfluss auf die Erythropoese. Bei absinkendem Sauerstoffgehalt im Blut wird in der Niere das Hormon Erythropoetin vermehrt ausgeschieden. Dieser erhöhte Hormonspiegel führt zu einer erhöhten erythropoetischen Aktivität im Knochenmark, die somit um das 10-fache der normalen Produktion gesteigert werden kann. Dieser Vorgang ist bei Anämien zu beobachten, kann aber auch durch äußere Einflüsse wie Höhengaufenthalte beeinflusst werden (14).

## 2.2 Der Abbau von Erythrozyten

Die Lebensdauer eines Erythrozyten beträgt ungefähr 120 Tage. Während dieser Zeit erfährt die rote Blutzelle eine ganze Reihe an physischen und metabolischen

Schäden (17). Altersabhängige Veränderungen der Erythrozyten sind unter anderem eine Abnahme der Stoffwechselaktivität, eine fortschreitende Zellformveränderung, Membranumbauprozesse, Mikrovesikulationen, oxidative Verletzungen und die Offenlegung von Markern für den Abbau der Zellen (17). Obwohl die Prozesse, die die Zelle altern lassen, kontinuierlich auf diese einwirken, erscheinen die Alterssignale schlagartig, möglicherweise erst kurz bevor die Zellen abgebaut werden. Der Erythrozyt kann keine Proteine herstellen, die seinen Abbau einleiten könnten. Deshalb werden schon bestehende Mechanismen umfunktioniert, um diese Aufgabe zu erfüllen (17).

Der Abbau der Erythrozyten kann als 2-teiliger Prozess gesehen werden.

Zum einen erfüllt die Milz eine Filterfunktion des Blutes. Die Mikrovesikulation, also die Bildung und Abschnürung von kleinen Bläschen mit Zellmaterial, ist fester Bestandteil der normalen Reifung von Erythrozyten. Durch den unumkehrbaren und kontinuierlichen Verlust von Membranstücken nimmt die Verformungsfähigkeit der Erythrozyten mit dem Alter ab (17). Die spezielle Struktur der Milzgefäße erlaubt nur jungen, noch verformungsfähigen Zellen den Durchtritt. So werden alte Erythrozyten aus dem Blutkreislauf gefiltert und können dann weiters von Makrophagen in der Milz abgebaut werden. Die verminderte Verformbarkeit von Erythrozyten kann neben dem physiologischen Alterungsprozess auch bei verschiedenen Erkrankungen, wie zum Beispiel der hereditären Sphärozytose oder der Sichelzellanämie, auftreten.(15) Erwähnenswert ist aber auch, dass die Abschnürung von beschädigten Proteinen, oder von Altersmerkmalen zu einem gegenteiligen Effekt, nämlich einer Lebenszeitverlängerung, führen kann (17).

Der zweite Teil des Abbaus von Erythrozyten besteht aus einer Markierung von abbaubedürftigen Zellen. Verschiedene Membranbestandteile wie Bande 3 oder Phosphatidylserin fungieren nach bestimmten Modifikationen als „Eat- me“ Signale. Sie zeigen so den Makrophagen in der Milz an, dass der markierte Erythrozyt abgebaut werden muss (15). Auf diese Mechanismen wird später genauer eingegangen.

Neben der Milz ist auch die Leber am Abbau von Erythrozyten beteiligt. Das Vorhandensein von beschädigten Erythrozyten führt zu einer schnellen Rekrutierung von Monozyten in der Leber. Diese werden zu speziellen

Makrophagen, die in der Lage sind die Erythrozyten zu phagozytieren und das frei werdende Eisen zu recyceln (15).

### 2.3 Der Erythrozyt

Der menschliche Körper braucht bereits bei Ruhebedingungen 400 Liter Sauerstoff. Diese Versorgung ist die Hauptaufgabe der roten Blutkörperchen (10). Ihren Namen haben die Erythrozyten, altgriechisch (έρυθρός) *erythrós* „rot“, bekanntermaßen durch ihren roten Blutfarbstoff Hämoglobin, welcher sich gut mit Eosin rot anfärben lässt (18). Hämoglobin besitzt die Fähigkeit Sauerstoff, sowie dessen Abfallprodukt CO<sub>2</sub> zu binden. So wird Sauerstoff von den Lungen zu den verbrauchenden Organen transportiert. Der Großteil des durch den Stoffwechsel entstandenen CO<sub>2</sub> wird im Blut gelöst, jedoch kann ein kleiner Anteil an den Erythrozyten gebunden abtransportiert werden.(10,18,19)

Erythrozyten besitzen in Ruhe die Form einer von beiden Seiten eingedellten Scheibe. Zum einen optimiert diese bikonkave Form den Gasaustausch durch eine Vergrößerung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses. Zum anderen ist durch sie eine extreme Verformbarkeit gegeben, welche für die Blutkörperchen erforderlich ist, um in der zum Teil engen Mikrozirkulation ihre Aufgabe des Sauerstofftransportes zu erfüllen (14,19).

Der Grund für diese besondere Form, sowie für die gute mechanische Flexibilität der Erythrozyten, ist das Membran- beziehungsweise Zytoskelett (10). Die Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in der verschiedene Proteine, zum Beispiel für den Transmembranösen Stofftransport, eingebunden sind. Auf der Innenseite der Membran befindet sich das Zytoskelett, ein molekulares Maschenwerk, bestehend aus fadenförmigen Spektrinmolekülen, und weiteren Zytoskelettproteinen wie etwa Aktin und Ankyrin (20).

Glykolipide auf der erythrozytären Membranoberfläche fungieren als Blutgruppenantigene und ermöglichen so eine Einteilung in die verschiedenen Blutgruppen (10). Es gibt eine Vielzahl an Blutgruppensysteme, wobei das AB0- sowie das Rhesus- System in der täglichen klinischen Praxis am bedeutendsten sind (10).

Ein weiterer Grund für die besondere Verformbarkeit der roten Blutkörperchen ist das Fehlen des Zellkerns sowie der Zellorganellen. Ihren Energiebedarf decken die Erythrozyten, da ihnen die Mitochondrien fehlen, durch anaerobe Glykolyse. (19)

Um durch kleinste Blutgefäße, sowie durch die Endothelspalten der Milz zu gelangen, müssen die Erythrozyten laufend ihre Form verändern. Die Formveränderung geschieht passiv, sobald keine Kräfte mehr wirken, kehrt der Erythrozyt wieder in seine Ausgangsform zurück (18). Bei hoher Blutflussgeschwindigkeit nimmt die Zelle dank ihrer bikonkaven Form ein Maximum an Verformung an und wird zu einer für die Strömungsdynamik günstigen, besonders widerstandsarmen, glockenförmigen (paraboloidförmigen) Gestalt. Bei niedriger Blutflussgeschwindigkeit lagern sich die roten Blutkörperchen zu „Geldrollen“ zusammen. Durch diese Formation halten sich die strömenden Zellen in der Gefäßmitte auf (19,21).

Der mittlere Durchmesser der Erythrozyten beträgt 7,5  $\mu\text{m}$ . Die Größe aller Erythrozyten verteilt sich als Glockenkurve um diesen Mittelwert. Man bezeichnet diese Normalverteilung als Price-Jones-Kurve, wobei ein Abweichen der Zellen nach unten mit Mikrozytose, ein Abweichen nach oben als Makrozytose bezeichnet wird. Diese Einteilung bietet Rückschlüsse auf verschiedene Erkrankungen. Zum Beispiel kann ein Eisenmangel zu geringem Hämoglobingehalt und somit zu einer Mikrozytose führen. Eine Häufung abnormal großer Erythrozyten, also Makrozyten, deutet wiederum auf eine Reifestörung hin, welche zum Beispiel durch einen Mangel an Vitamin B12 oder Folsäure verursacht wird. (19)

## 2.4 Zellmembran und Zytoskelett

Während seiner 4-monatigen Lebensdauer durchquert der Erythrozyt die Blutgefäße. Er bahnt sich seinen Weg durch Arterien, Venen und Kapillaren und legt somit eine Distanz von bis zu 500 km zurück. Um durch Gefäße zu gelangen, die einen kleineren Durchmesser besitzen als der Erythrozyt selbst, ist die bereits erwähnte Verformbarkeit der Zelle von immenser Bedeutung. Eine dichte Verknüpfung von Zellmembran und Zytoskelett gewährleistet die besondere Form, sowie deren Anpassung an die lokalen Gegebenheiten. (8)

Der Erythrozyt kommuniziert und interagiert mit allen Zellen des Blutstroms, wie den Endothelzellen, Blutplättchen, Makrophagen, aber auch Pathogenen. Der

Stoffaustausch gelingt über verschiedenste Kanäle und Transporter in der Zellmembran. Durch sie wird die Ernährung der Zelle sichergestellt (GLUT-1-Transporter für Glukose) oder ein Gleichgewicht im Volumenhaushalt erzielt (Piezo1-Transporter). (20)

### 2.4.1 Die Zellmembran

Der reife Erythrozyt besitzt eine Lipid Doppelschicht als Zellmembran. Sie setzt sich zu gleichen Teilen aus Cholesterol und Phospholipiden zusammen. Die genaue Zusammensetzung der Phospholipidanteile unterscheidet sich zwischen innerer und äußerer Schichte (20). Die Phospholipidtranslokatoren Flippase, Floppase und Scramblase sind Enzyme, die für die Wanderung der Phospholipide von der Membranaußenseite zur Innenseite und umgekehrt verantwortlich sind. So wird eine für das Überleben der Zelle wichtige Asymmetrie der Membranlipide aufrechterhalten (22).

Die veränderte Position des Aminophospholipids Phosphatidylserin spielt eine wichtige Rolle im Abbau von alten oder verletzten Erythrozyten. Das Enzym Scramblase transferiert im Falle einer abbaubedürftigen roten Blutzelle das Phosphatidylserin von der Membranninnenseite nach außen (20). Dort fungiert es dann als Abbausignal für Makrophagen (22).

Mehr als 50 verschiedene Typen von Transmembranproteinen sind in der doppelschichtigen Zellmembran eingelagert. Neben dem Stofftransport und der Adhäsion zu anderen Blut- und Endothelzellen gehört auch die Herstellung von struktureller Stabilität zu ihren Aufgaben(20).

Die Hälfte dieser Transmembranproteine, ungefähr 25, stellen die verschiedenen Blutgruppenantigene dar (22).

#### 2.4.1.1 *Bande 3*

Das Transmembranprotein Bande 3, auch Anion Exchanger 1 (AE1) oder SLC4A1, ist das am häufigsten vorkommende Zellmembranprotein der Erythrozyten und gleichzeitig sein wichtigster Anionenaustauscher (20,23).

Zu seinen Aufgaben zählt die Herstellung eines Anionen Gleichgewichts, die Interaktion von Membran mit verschiedenen zytosolischen Proteinen sowie die Verbindung zwischen Zellmembran und Zytoskelett (24).

Als Anionenaustauscher spielt Bande 3 eine wichtige Rolle im Gastransport. Das vom Gewebe produzierte Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) diffundiert in die Erythrozyten.

Dort reagiert es mit Wasser zu Bicarbonat und Protonen. Sobald die Bicarbonatkonzentration ansteigt, werden die Anionen von Bande 3 im Austausch mit Chlorid Ionen ins Blutplasma geschleust. Somit werden 90 % des CO<sub>2</sub> in der löslicheren Form von Bikarbonat aus dem Gewebe in die Lunge transportiert. Die Anhäufung von Protonen im Erythrozyten führt zu einem verminderten pH-Wert wodurch das Hämoglobin den Sauerstoff freigibt und dieser wiederum ins Gewebe diffundieren kann (25).

Das Protein Bande 3 besteht aus 2 funktionellen Teilen. Der oben erwähnte Anionenaustausch geschieht im C-terminalen Teil. Der N-terminale Rest ragt in Richtung Zytosol und bildet einen Verankerungspunkt für Desoxyhämoglobin, glykolytische Enzyme und für das Gerüstprotein Ankyrin. (23) Somit verbindet Bande 3 die Membran mit dem Zytoskelett (23).

Wie bereits erwähnt, spielt Bande 3 auch beim Abbau von gealterten Erythrozyten eine Rolle. Antikörper binden an gealterte Erythrozyten und kennzeichnen sie so für den Abbau durch Makrophagen (26). Mit der Zeit wird das Bande 3 Protein im Zuge von oxidativen Schäden modifiziert und fungiert somit als Antigen für die Antikörper (15). Es gibt 2 Hypothesen wie aus dem Bande 3 ein Neo-Antigen (auch Seneszenz-Antigen) entsteht. Die erste Erklärung ist, dass die Bindung von denaturiertem Hämoglobin an Bande 3 zu einer Oligomerisierung und Clusterbildung von Bande 3 führt. Die zweite Hypothese besagt, dass die proteolytische Zerstörung von Bande 3 zu Konformationsänderungen und dadurch zur Bildung des Seneszenz-Antigens führt. Beide Szenarien haben gemeinsam, dass sie durch oxidative Schäden ausgelöst werden. (15)

#### 2.4.2 Das Zytoskelett

Das erythrozytäre Zytoskelett besteht aus vielzähligen, pseudo-hexagonal angeordneten Proteinen. Diese Proteine bilden ein dichtes Netzwerk, welches die Lipiddoppelschicht von innen stärkt und so der Membran ihre Stabilität und Flexibilität verleiht. Die Proteine Spektrin, Ankyrin, Protein 4.1R und Aktin sowie Aktin-assoziierte-Proteine bilden diese innere Stütze der Membranoberfläche.(23) Die Hauptverbindung zwischen Zytoskelett und der Membran bildet das Ankyrin, welches das zytoplasmatische Ende von Bande 3 mit einer Untereinheit vom Spektrin verbindet (23).

#### 2.4.2.1 *Spektrin*

Spektrin ist ein längliches und flexibles Protein, das sich aus Alpha- und Beta Untereinheiten zusammensetzt (23). Die beiden parallel angeordneten Untereinheiten sind seitlich ineinander verschlungen und bilden so ein Dimer. Dieses Dimer ist wiederum Kopf an Kopf mit einem weiteren Spektrindimer verbunden. Man bezeichnet diese Anordnung als Tetramer. Es besteht auch die Möglichkeit, dass sich mehrere Dimere zu einem sogenannten Oligomer verknüpfen, jedoch überwiegt die Anordnung zu Tetrameren (27).

Als zentrales Protein im Netzwerk erfüllt Spektrin die Aufgabe die bikonkave Scheibenform der Erythrozyten zu erhalten. Wenn keine Kräfte auf den Erythrozyten wirken, liegen die Spektrinmoleküle in gefalteter Formation vor. Bei Membranverformungen kommt es zu einer reversiblen Umordnung im Skelettnetzwerk. Manche Spektrinmoleküle werden abgewickelt und gedehnt, während andere wiederum stärker komprimiert werden (27).

Die beiden parallelen Untereinheiten des Spektrins haben eine relativ schwache Bindung zueinander. Sollte sich das Spektrinmolekül durch Membranverformungen ausdehnen oder verbiegen, ist ein Vorbeigleiten der Untereinheiten aneinander möglich (23). Trotz der Änderung der geometrischen Form bleibt die Oberfläche des Erythrozyten konstant (27).

Für die Verbindung der Spektrintetramere mit den anderen Zytoskelettproteinen sorgt die Betauntereinheit. Sie besitzt eine Carboxyl- und eine Amino-Endung.

Das Protein Ankyrin, welches weiter über Bande 3 die wichtigste Verbindung zwischen Zytoskelett und Membran darstellt, hat eine Verbindung zur carboxyl-terminalen Region. Die amino-terminale Region verbindet über das Protein 4.1 das in der Membran verankerte Glycophorin C. Dies stellt die zweite Verbindung zwischen Zytoskelett und Membran dar. Des Weiteren verbindet sich die Amino-terminale Region mit mehreren kurzen Aktinfilamenten (23,27).

Die pseudohehexagonale Form des Zytoskeletts entsteht dadurch, dass im Schnitt 6 Spektrinproteine an ein Aktin binden(23).

#### 2.4.2.2 *Aktin, Protein 4.1 und der Junktionale Komplex*

Die kurzen Aktinfilamente im Zytoskelett besitzen eine einzigartige Formation (23). Sie bestehen aus 15- 20 Monomeren (28). Die zentrale Aufgabe der Aktinoligomere ist die Bildung des Junktionskomplex. Dieser besteht aus Aktin, Spektrin und Protein 4.1. Das eine Ende des Spektrin verbindet sich mit einem Aktinoligomer. Protein 4.1

bindet sowohl an das Spektrin als auch an das Aktin und führt somit zu einer Verstärkung der Bindung.(23,27,29)

Dieser somit aus 3 Grundeinheiten bestehende Komplex, stellt neben der Spektrin-Spektrin Dimer Verbindung die zweite horizontale Verknüpfung des Zytoskeletts dar. Er erfüllt eine wichtige Aufgabe in der Regulation der mechanischen Stabilität der Membran (30).

#### 2.4.2.3 *Ankyrin*

Für die Aufrechterhaltung des Zusammenhalts der Membran sind die senkrechten Verbindungen zwischen Zytoskelett und Membran essenziell (29). Das Verbindungsprotein Ankyrin bindet mit dem einen Ende an der Betauntereinheit von Spektrin und mit dem anderen an der Zytosol gerichteten Seite des Transmembranprotein Bande 3 (23). So entsteht eine Verbindung zwischen Membran und Zytoskelett (23).

Neben dieser Verbindung gibt es noch eine Reihe weiterer Membranproteine, die die Verbindung zwischen Membran und Zytoskelett sicherstellen. Eine Schwächung oder gar der Verlust dieser Verbindungen führt über Lipidverluste und Verminderung der Membranoberfläche zu einer geringeren Überlebensrate der Zellen (29,30).

### 2.5 Die Erythropoese ex vivo

Aufgrund der potenziell revolutionären Auswirkung auf die Transfusionsmedizin ist die ex vivo Produktion von roten Blutzellen ein aktiv untersuchtes Thema. Bedeutende Fortschritte auf diesem Gebiet haben es möglich gemacht, erythroide Vorläuferzellen in vitro zu vermehren und bis zum Stadium der enukleierten roten Blutzelle zu differenzieren (31).

Einer der wichtigsten Aspekte in der ex vivo Produktion von roten Blutzellen ist die Quelle, aus der die Stammzellen bezogen werden. Idealerweise sollte diese Stammzellquelle unbegrenzt verfügbar sein, eine vollständige erythroide Reifung erreichen und ihr Produkt sollte nicht immunogen sein (2).

Die bisher erforschten Stammzellquellen für die ex vivo Erythropoese beinhalten embryonale Stammzellen, induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs), CD34+ Stammzellen aus peripherem Blut von Erwachsenen oder aus Nabelschnurblut, sowie mononukleäre CD34+-Zellen (1,2,31).

Um die Reifung und Differenzierung der Stammzellen in rote Blutzellen zu induzieren, werden verschiedene Zytokine wie Stammzellofaktor und Erythropoetin, Interleukin-3 oder auch Dexamethason dem Kulturmedium zugesetzt (1,2). Verschiedene Gruppen wenden unterschiedliche Kombinationen von Zytokinen und anderen Faktoren an, um Zellen zu produzieren, die den nativen roten Blutzellen möglichst ähnlich sind (1).

## 3. Methoden

### 3.1 Ethik

Vor der Probenentnahme wurde nach Aufklärung der Spenderinnen und Spender eine schriftliche Einwilligung eingeholt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki (EK 27 165ex 14/15) genehmigt.

### 3.2 Testzellen

Für die Arbeit wurden drei verschiedene Zellarten herangezogen.

#### 1. Native Erythrozyten

Die nativen roten Blutkörperchen (nRBCs) wurden aus Segmenten von frischen Erythrozytenkonzentraten gesunder Blutspenderinnen und Blutspender entnommen. Für die weiteren Analysen wurden die Zellen mit PBS auf die gewünschte Zellzahl verdünnt und anschließend den weiteren Schritten unterzogen.

#### 2. Native Retikulozyten (nRET)

Aus Nabelschnurblut wurden durch CD71 Positivselektion die nativen Retikulozyten gewonnen. Die Separierung der Zellen wurde mit CD71 Microbead Kit (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Dafür wurde das Blut auf das Dichtegradientenzentrifugationsmedium Ficoll-Paque™ gegeben und anschließend zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde das Blut in seine Bestandteile aufgeteilt. So konnten die roten Blutzellen, welche sich im Pellet unten sammelten, geerntet werden. Daraufhin wurden die Zellen 3 Waschzyklen mit CliniMACs und humanem Serum Albumin unterzogen. Anschließend wurden die Zellen mit CD71 MicroBeads (MicroBeads mit monoklonalen CD71 Antikörpern) bei 4°C für 15

Minuten inkubiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert, um nichtgebundene MicroBeads zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen über eine in einem Magnetischen Feld (MACS-Seperator) befindliche Säule (MACS Column) laufen gelassen. Die mit den Antikörpern markierten Zellen blieben so in der Säule haften. Die unmarkierten Zellen liefen in diesem Schritt durch die Säule durch und konnten so entfernt werden. Im letzten Schritt wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und so konnte die mit CD71 Antikörpern markierte Zellfraktion mit Hilfe von CliniMACs und humanem Serum Albumin aus der Säule gespült werden.

Die so gewonnenen nativen Retikulozyten wurden mit PBS auf die gewünschte Zellzahl verdünnt und anschließend den weiteren Analysen unterzogen.

### 3. Ex vivo kultivierte Erythrozyten (cRBCs)

Aus peripherem Blut wurden über CD34<sup>+</sup>Selektion humane hämatopoetische Stammzellen (CD34<sup>+</sup>HSPCs) gewonnen. Die Trennung der Zellen wurde mit CD34 Microbead Kit Ultrapure (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Dafür wurde das Blut auf das Dichtegradientenzentrifugationsmedium Ficoll-Paque™ gegeben und anschließend zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde das Blut in seine Bestandteile aufgeteilt. Die Zellen wurden aus dem Überstand abgehoben und anschließend mit CliniMACs und Humanem Serum Albumin gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit Blocking Reagens für 5 Minuten bei 4°C. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit MicroBeads (MicroBeads konjugiert mit monoklonalen Maus Anti-Human-CD34-Antikörper) für 30 Minuten bei 4°C. Die Suspension wurde abzentrifugiert, um nichtgebundene MicroBeads zu entfernen.

Anschließend wurden die Zellen über eine in einem Magnetischen Feld (MACS-Seperator) befindliche Säule (MACS Column) laufen gelassen. Die mit den Antikörpern markierten Zellen blieben in der Säule haften. Die unmarkierten Zellen liefen in diesem Schritt durch die Säule und konnten so entfernt werden. Im letzten Schritt wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt. Die mit CD34 Antikörper markierte Zellfraktion wurde mit Hilfe von CliniMACs und Humanem Serum Albumin aus der Säule gespült.

Diese Stammzellen wurden anschließend in einem etablierten dreistufigen Erythropoese-Kulturmodell (6,32,33) in Iscove's Flüssigmedium (Biochrom) mit 5 %

Humanplasma (Octapharma), 10 µg/ml Insulin (Sigma Aldrich) und 330 µg/ml humanem Holo-Transferrin (Spicac) zu entkernten roten Blutzellen differenziert.

Die Zellen wurden von Tag 0-8 mit 5ng/ml Interleukin-3 (Peprotech) und  $10^{-6}$ M Hydrokortison (Sigma-Aldrich), von Tag 0-11 mit 100ng/ml Stammzellofaktor (Peprotech), sowie von Tag 0-18 mit 3 U/ml Erythropoietin (Erypo, Janssen Biologics B.V) stimuliert.

Um eine Lipidanreicherung zu erzielen, wurde von Tag 8 an im Nährmedium der „HPL-Zellen“ das humane Plasma (5 %) auf humanes Plättchenlysat 5 % (HPL) (hauseigene Produktion) getauscht. Bei den Vergleichszellen „LG“ wurde das humane Plasma 5 % über den gesamten Zeitraum im Medium belassen.

Um an Tag 18 nur die entkernten Retikulozyten für die nachfolgenden Analysen zu gewinnen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Acrodisc WBC Syringe Filter (Pall) filtriert.

### 3.3 Zellzahlbestimmung

Um die kumulative Expansion der Kulturen zu berechnen, wurde an den Tagen 0, 8, 11, 15 und 18 eine Zellzahlbestimmung mit Trypan Blue Solution (Sigma #T81549) durchgeführt.

Je nach Zelldichte wurde an den verschiedenen Tagen unterschiedliche Verdünnungen angewandt. Am Tag 0 wurde eine 1:2, am Tag 18 eine 1:50 und an den Tagen 8, 11 und 15 eine 1:20 Verdünnung verwendet. Für die 1:2 Verdünnung wurde 20 µl Trypanblau mit 20 µl Zellkultur vermischt. Für die 1:20 Verdünnung wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl PBS verdünnt. 20 µl dieser verdünnten Zellsuspension wurden mit 180 µl Trypanblau in einer Pipette durchgemischt. Das gleiche Prinzip ist auch für die 1:50 Verdünnung angewendet worden.

Anschließend wurde eine Malassez-Zählkammer mit 20 µl der jeweiligen Verdünnung befüllt. Nachdem die Zellen für eine Minute sedimentieren konnten, wurde zügig unter dem Mikroskop die Kammer mäanderartig ausgezählt und die Zellzahl nach der folgenden Formel berechnet.

Gezählte Zellen × Verdünnungsfaktor = Zellen / µl Probenmaterial

Verdünnungsfaktor: bei 1:2 Verdünnung=2

bei 1:20 Verdünnung=20

bei 1:50 Verdünnung=50

Die Gesamtzellzahl wird durch Multiplikation der bestimmten Zellzahl mit dem Volumen der Zellsuspension errechnet.

### 3.4 Charakterisierung der cRBCs

#### 3.4.1 Färbung von Zytospinpräparaten

Um die Entwicklungsstadien der cRBCs nachvollziehen zu können, wurden an Tag 0, 8, 11, 15 und 18 der Kultur Zytospins mit May-Grünwald-Giemsa (Hemafix™, Biomed) Färbung angefertigt.

Für die Herstellung der Zytospins wurden Objektträger in die Cytoclips gelegt, mit den Cytofunnels fixiert und in eine Zytospin-Zentrifuge (Thermo Scientific, Cytospin 4) gegeben. Es wurden 100 µl der entsprechenden Zellsuspension ans Ende des Cytofunnels pipettiert und anschließend die Zentrifuge mit 600 rpm für 3 Minuten eingeschaltet. Danach wurde der Objektträger für eine Stunde an der Luft trocknen gelassen.

Für die May- Grünwald-Giemsa Färbung wurde ein Hemafix Färbeset bestehend aus einer Fixierlösung, einer Eosin Färbelösung und einer Hämatoxylin Färbelösung verwendet. Die Zytospins wurden nach ihrer Zentrifugation 5x für je eine Sekunde in die Fixierlösung getaucht und der Objektträger am Rand abgestreift. Daraufhin wurde der Objektträger 5x für je eine Sekunde in eine Eosin Färbelösung getaucht und anschließend wieder am Rand abgestreift. Im letzten Schritt wurde der Objektträger 5x für je eine Sekunde in eine Hämatoxylin Färbelösung getaucht. Im Anschluss wurde langsam Leitungswasser über den Objektträger gespült, dann wurde dieser aufrecht angelehnt, für 10 Minuten trocknen gelassen und anschließend am Mikroskop beurteilt.

Ab Tag 8 wurden die Zellen mit einer Co-Färbung aus May-Grünwald-Giemsa und neutralem Benzidin (o-Dianisidin, Sigma-Aldrich) angefärbt, um zusätzlich die Hämoglobinexpression der Zellen sichtbar zu machen.

Dafür wurden die Zytospins, nach erfolgter Zentrifugation und Trockenzeit von einer Stunde, für 5 Minuten in 100% Methanol fixiert. Daraufhin für 90 Sekunden in 1% Benzidin getaucht. Anschließend für 90 Sekunden in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung gegeben und dann mit destilliertem Wasser für 30 Sekunden im Spülbecken abgespült. Nach der Benzidinfärbung erfolgte eine May-Grünwald-Giemsa Färbung wie bereits oben beschrieben. Nach diesem Färbeprozess wurden die Präparate im Mikroskop beurteilt.

Zur Bestimmung des Reifegrades diente die Brilliant-Kresylblau Färbung (Reticulocyte Stain; Sigma-Aldrich). Durch diese Supravitalfärbung werden in der Zelle verbliebene ribosomale Reste angefärbt. Je nach Gehalt an verbliebenen RNA-Resten können die Zellen in Reifungsstadien zwischen 0 und V eingeordnet werden. Stadium 0 stellt das unreifste Stadium mit dichten Chromatinanteilen dar, während Stadium V nur reife Zellen ohne RNA-Reste beinhaltet. Als Kontrollen wurden nRBCs (reife Zellen ohne RNA-Reste = Stadium V) und nRET verwendet.

### 3.4.2 Durchflusszytometrie

Weiters wurde die Differenzierung der Zellen mittels Durchflusszytometrieanalyse spezifischer Oberflächenmarker erhoben.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden pro Ansatz  $1 \times 10^5$  Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen CD45 (Becton Dickinson), CD71 (Becton Dickinson), CD36 (Beckman Coulter), Bande 3 (International Blood Group Reference Laboratory IBGRL) oder Glykophorin A (Beckman Coulter) inkubiert.

Um extrudierte Kerne und tote Zellen ausschließen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) gefärbt. Die anschließende Messung wurde mit dem CytoFLEX-Durchflusszytometer (Beckman Coulter) durchgeführt.

Der Reifegrad der Zellen wurde mit Retic Count™ (Becton Dickinson) und Thiazolorange-Färbung (unter Beachtung der Herstelleranweisungen) bestimmt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem CytoFLEX-Durchflusszytometer (Beckman Coulter).

### 3.5 Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische Färbung dient der spezifischen Markierung von Membran- und Zytoskelettproteinen. In fixierten und permeabilisierten RBCs können damit Menge und Lokalisation der Proteine untersucht werden.

#### 3.5.1 Beschichtung der Objektträger

Bei roten Blutzellen handelt es sich um Suspensionszellen, die während der Färbeprozedur leicht abschwimmen. Um die Adhärenz der Zellen auf den Objektträgern und somit die Auswertbarkeit der Präparate zu erhöhen, wurden zwei Arten von Beschichtungen im Vergleich zu unbeschichteten Objektträgern ausgetestet.

Auf den Objektträgern (ThermoScientific™ Menzel-Gläser) wurde zuerst mit einem PAP-Pen (DaKo-Pen S2002) ein Ring mit einem Durchmesser von 5 mm gezogen, um ein späteres Auslaufen der Reagenzien zu verhindern. Im Anschluss wurden zwei verschiedene Beschichtungen der Objektträger angewendet oder auch zur Gänze auf die Beschichtung verzichtet.

1. Poly-L-Lysin (PLL Sigma-Aldrich®): Es wurden 50 µl auf den Objektträger pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Objektträger viermal mit Aqua destillata gewaschen und für 10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.
2. Lectin from Phaseolus Vulgaris (=Erythroagglutinin) (PHA-E(Sigma-Aldrich®)): Es wurden 35 µl auf den Objektträger pipettiert und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Objektträger viermal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

#### 3.5.2 Aufbringen der Zellen am Objektträger

Um potenzielle Schädigungen der Zellen durch das Zentrifugieren auf Objektträger überprüfen zu können, wurden die Zellen auf zwei verschiedene Arten auf

Objektträger gebracht. Es wurden entweder, wie für herkömmliche Färbungen üblich, Zytospins angefertigt, oder die Zellen auf den Objektträger sedimentiert.

Für die Anfertigung der Zytospins wurden an Tag 8: 50.000, an Tag 11: 80.000, an Tag 15: 150.000, an Tag 18: 180.000 Zellen mit PBS auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Mit 600 rpm für 3 Minuten wurden die Zellen auf den unbeschichteten Objektträger geschleudert, anschließend mit dem Pap-Pen umrandet und lufttrocknen gelassen.

Für die Sedimentation wurde an Tag 8: 50.000, an Tag 11: 80.000, an Tag 15: 150.000, an Tag 18: 180.000 Zellen mit PBS auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf den beschichteten, beziehungsweise unbeschichteten, Objektträger pipettiert und für 30 Minuten in den Brutschrank bei 37°C gegeben.

### 3.5.3 Reagenzien

- Wash Buffer (Buffer a): 150ml PBS+150mgBSA + 300mg Glucose
- Fixierung 10ml 4% PFA+30ml PBS → 1%PFA
- Permeabilisierung: 20 ml PBS+ 10mg Saponin → 0,05%Saponin
- Blocking: 27ml PBS+ 3 ml Goatserum → 10% Goatserum
- 1st AB Dilution: 20 ml wash buffer +1mg Saponin →0,005%Saponin
- 2nd AB Dilution:48ml PBS +2ml Goatserum →4%Goatserum

In jedem Schritt wurden 50µl der jeweiligen Reagenzien verwendet.

### 3.5.4 Färbungsablauf

- Ankyrin, Spektrin und Bande 3 Färbung

Nach der Sedimentation der Zellen auf die unbeschichteten oder beschichteten Objektträger, bzw. nach dem Anfertigen der Zytospins wurden die Zellen mit dem Wash Buffer 3x gewaschen (EKs nur einmal bzw. ab EPO80 d11 auch nur einmal gewaschen). Danach wurden die Zellen mit 1% PFA für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend 3x gewaschen und für 10 Minuten mit 0,05% Saponin bei RT permeabilisiert. Es folgten wieder drei Waschzyklen und daraufhin ein 30-minütiges Blocking mit 10% Goatserum bei Raumtemperatur. Danach wurden die Erst-Antikörper für Ankyrin/Spektrin/Bande 3 bzw. die Doppelfärbung

Ankyrin/Bande 3 in einer 1:200 Verdünnung aufgebracht und die Objektträger über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden wieder 3 Waschzyklen durchgeführt und anschließend der Zweit-Antikörper (Spektrin und Ankyrin → Goat Anti-Mouse; Bande 3 → Goat Anti-Rabbit; Doppelfärbung Ankyrin/Bande 3 → beide Zweit-Antikörper) in einer 1:1000 Verdünnung aufgebracht und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Daraufhin wurden wieder 3 Waschzyklen durchgeführt. Anschließend wurde eine Kernfärbung durchgeführt. Die Ankyrin- und Spektrinfärbungen wurden dazu zusätzlich mit 1 µl DAPI ((4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) lifetechnologies®) in 400 µl PBS für 1,5-2 Minuten gefärbt. Die Bande3-Färbungen wurden mit 0,5 µl PI (Propidium Iodide ThermoFischer™) in 1000 µl PBS Für 30 Minuten im Dunkeln bei RT gefärbt.

Abschließend folgten wieder 3 Waschzyklen woraufhin der Objektträger mit Mounting Medium (ProLong™ Glass Antifade Mountant invitrogen™ ThermoFischer™) und dem Deckglas (Menzel) eingedeckelt, und mit Nagellack versiegelt wurde.

*Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung Ankyrin, Spektrin, Bande3 sowie Doppelfärbungen*

	Erst-Antikörper	Zweit-Antikörper	Farbe/nm
ANKYRIN	Anti-Ankyrin erythroid/ANK antibody [S388A-10] ab212053  Spezies:Maus, Zieltierart:Ratte Mensch, Maus	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) ab150113  Spezies: Ziege  Zieltierart: Maus	Grün/Ex:495nm, Em: 519nm
SPECTRIN	Anti-alpha1 Spectrin antibody[17C7] ab11751  Spezies:Maus, Zieltierart:Maus, Ratte, Mensch	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) ab150113  Spezies:Ziege  Zieltierart: Maus	Grün/Ex:495nm, Em: 519nm
BANDE 3	Anti-Band3/AE1 antibody [EPR1426]	GAR Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor®	Blau /Ex: 402nm, Em: 421nm

	ab108414 Spezies:Hase  Zieltierart: Mensch	405) ab175652 Spezies: Ziege  Zieltierart: Hase	
--	---	--	--

- Aktinfärbung

Die ersten Schritte der Aktinfärbung entsprechen den Schritten der anderen Färbungen (siehe oben). Nach der Permeabilisierung und den darauffolgenden 3 Waschzyklen wurde jedoch auf das Blocking verzichtet und gleich mit der Aktinfärbung fortgefahren.

Hier wurden die Zellen mit 1 µl Orange Fluorescent Phalloidin Conjugate (Komponente A des CytoPainter F-actin Staining Kit) in 1000 µl Labelling Puffer (Komponente B) für 60 Minuten bei RT im Dunkeln gefärbt.

Es folgten 3 Waschzyklen und die daran anschließende Kernfärbung mit 1 µl DAPI in 400 µl PBS für 1,5-2 Minuten.

Abschließend wurden die Objektträger 3 Waschzyklen unterzogen, daraufhin mit Mounting Medium und Deckglas eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

*Tabelle 2: Färbungskit für F-Aktin Färbung*

	Färbungskit	Farbe/nm
F-Aktin	F-actin Staining Kit - Orange Fluorescence   Cytopainter (ab112126)	Rot/ Ex:550nm, Em:575nm

Die gefärbten Präparate wurden im Kühlschrank trocken und lichtgeschützt bis zur Auswertung am Nikon A1 Confocal Laser Mikroskop (ZMF, Medizinische Universität Graz) gelagert. Die Dokumentation erfolgte mittels Fotografie (siehe Ergebnisteil).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Charakterisierung der cRBCs

Die Entwicklungsstadien der cRBCs wurden mit May-Grünwald-Giemsa sowie Benzidinfärbung gefärbten Zytospins kontrolliert. An den Tagen 0, 8 und 18

erfolgte nur eine May-Grünwald-Giemsa Färbung. An den Tagen 11 und 15 wurde zusätzlich eine neutrale Benzidin-Färbung angewendet.

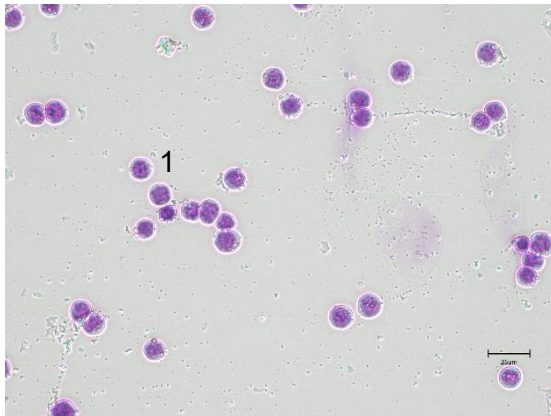


Abbildung 1 Epo 80, Tag 1, 60x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), May-Grünwald-Giemsa Färbung

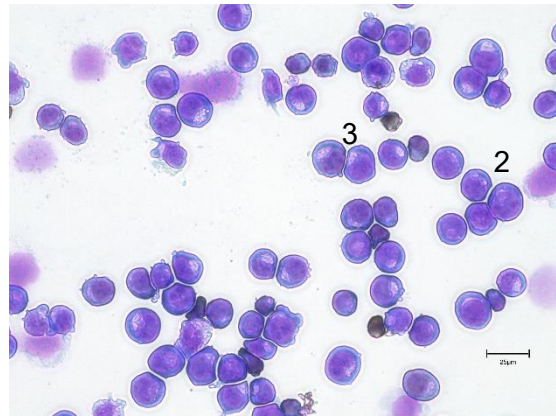


Abbildung 2: Epo 80, Tag 8, 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), May-Grünwald-Giemsa Färbung

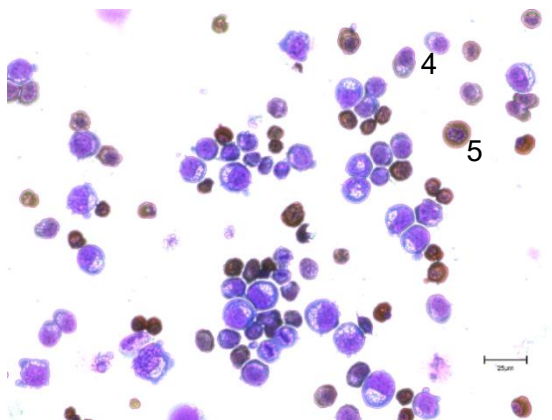


Abbildung 4 Epo 80, Tag 11, HPL-Medium, 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), Ko-Färbung aus May Grünwald-Giemsa und Benzidin-Färbung

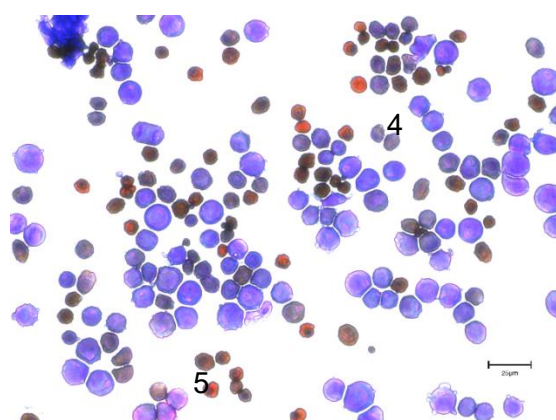


Abbildung 3 Epo 80, Tag 11, LG-Medium, 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), Ko-Färbung aus May Grünwald-Giemsa und Benzidin-Färbung

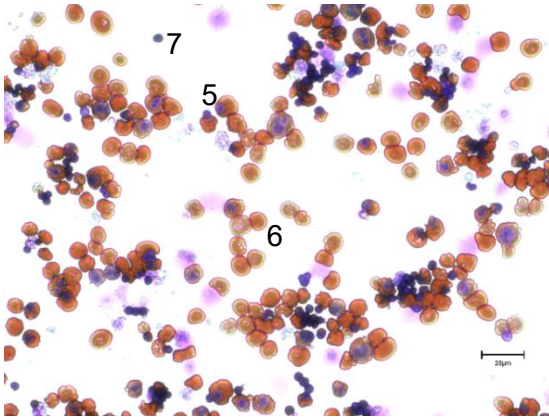


Abbildung 6 Epo 80, Tag 15, HPL-Medium, 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), Ko-Färbung aus May Grünwald-Giemsa und Benzidin-Färbung

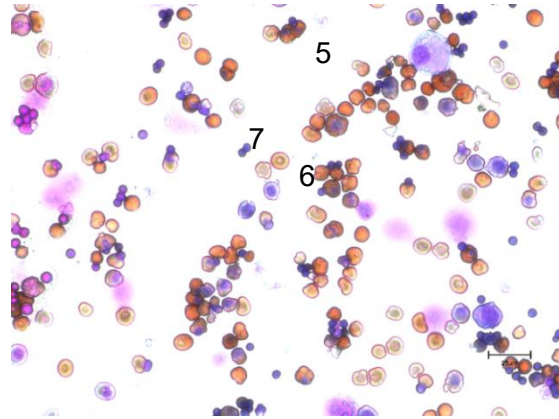


Abbildung 5 Epo 80, Tag 15, LG-Medium, 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), Ko-Färbung aus May Grünwald-Giemsa und Benzidin-Färbung

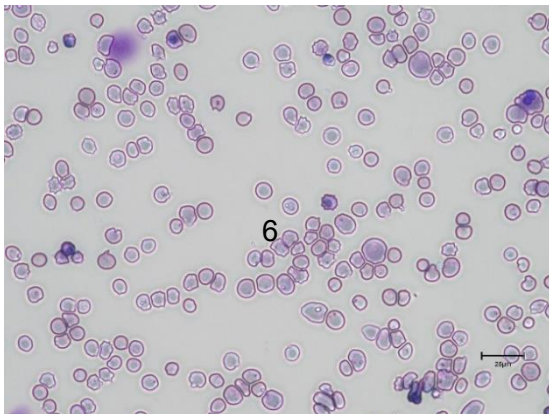


Abbildung 8 Epo 80, Tag 18, HPL-Medium, nach Filtration, 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), May Grünwald-Giemsa Färbung

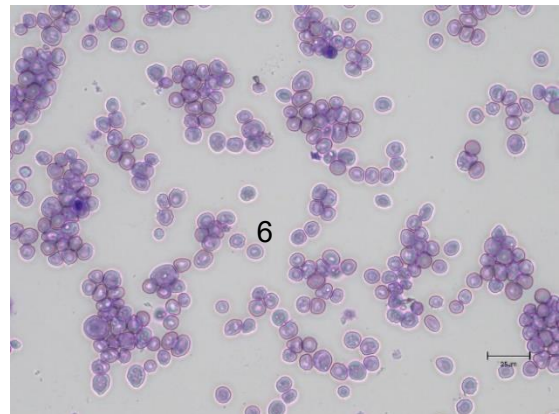


Abbildung 7 Epo 80, Tag 18, LG-Medium, nach Filtration 100x-Vergrößerung (Skalenleiste 25 µm), May Grünwald-Giemsa Färbung

In den Abbildungen 1-8 sind die Entwicklungsstadien der cRBCs zu sehen. In Abbildung 1 sind die aufgereinigten CD34+ hämatopoetischen Stammzellen [1] an Tag 0 zu sehen. In Abbildung 2 sind Proerythroblasten [2] und basophile Erythroblasten [3] zu erkennen. Wie in Abbildung 3 und 4 zu sehen ist kommen an Tag 11 polychromatische Erythroblasten [4] und vereinzelt auch orthochromatische Erythroblasten/Normoblasten [5] hinzu. Durch die Benzidin-Färbung wird die Hämoglobinexpression mit einer Orangefärbung der Zellen sichtbar.

An Tag 15 ist die Entwicklung der Zellen, wie in Abbildung 5 und 6 zu sehen ist, schon weit fortgeschritten. Hier überwiegt der Anteil an orthochromatischen Erythroblasten/Normoblasten [5], vereinzelt sind schon enukleierte Retikulozyten [6]

sowie ausgestoßene Zellkerne [7] zu erkennen. Die deutliche Orangefärbung als Zeichen des bereits fortgeschrittenen Hämoglobinanteils ist gut zu sehen.

In Abbildung 7 und 8 sind Retikulozyten [6] am Tag 18 nach Filtration mit May Grünwald Giemsa Färbung zu sehen.

Um den Reifegrad der Zellen zu bestimmen, wurde eine Brilliant-Kresylblau Färbung angewandt. In den Zellen verbliebene ribosomale Reste können so hervorgehoben werden. Der Gehalt an RNA-Resten erlaubt eine Einteilung der Zellen in die Reifungsstadien 0 (=dichtes Chromatinnetzwerk intrazellulär) bis V (=keine Chromatinreste). Zur Kontrolle wurden nRBCs und nRET gefärbt.

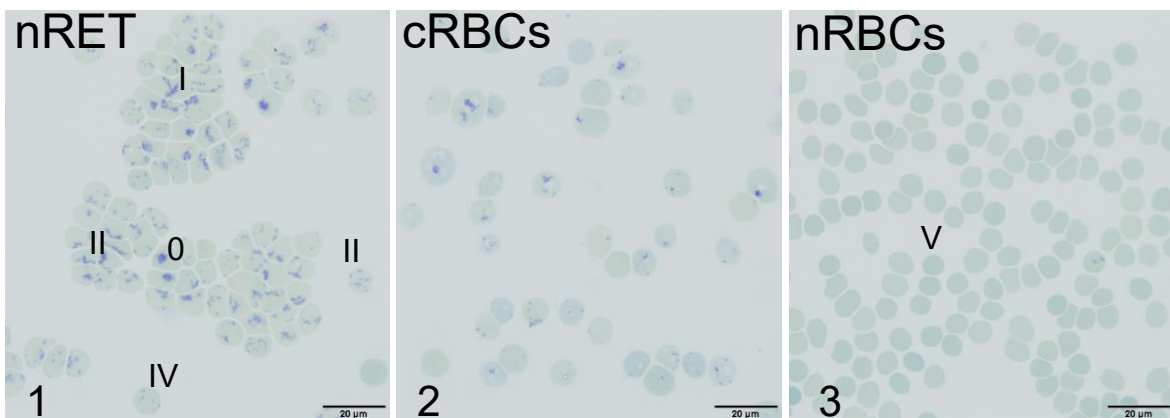


Abbildung 9: Reifegradbestimmung von nRET, cRBCs Tag 18 nach Filtration und nRBCs; 100x Vergrößerung (Skalenleiste=20 µm)

In Abbildung 9 ist die Reifegradbestimmung der Zellen abgebildet. Die nRET [1] zeigen die Reifegradtypen von 0 bis IV wobei sich die überwiegende Mehrheit der Zellen in den Stadien zwischen 0 und II befindet. Bei den nRBCs [3] sind keine ribosomalen Reste in den Zellen zu sehen. Sie entsprechen dem Reifestadium V.

Die cRBCs [2] zeigen alle Reifestadien von 0 bis V, wobei die Mehrheit der Zellen nur mehr wenige RNA-Reste beinhalten. Insgesamt liegt das Reifestadium der cRBCs zwischen nRET und nRBCs.

## 4.2 Kontrolle der Differenzierung der cRBCs

Mithilfe der Trypan Blaufärbung der Zellen, sowie anschließender Auszählung dieser in der Mallassez Zählkammer wurde das zunehmende Wachstum der beiden Zellkulturen aufgezeichnet.

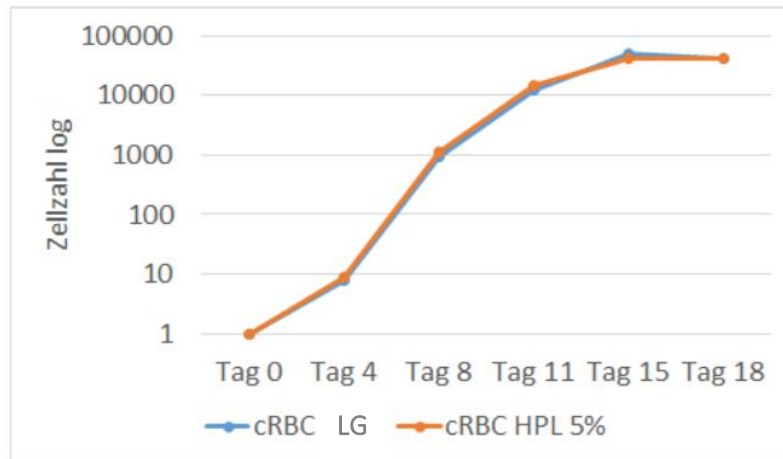


Abbildung 10: kumulative Expansion der untersuchten Kulturen

Wie in der Abbildung 10 zu erkennen ist, zeigen beide Kulturen die gleiche Proliferation über die Kulturdauer.

Mittels Differentialzählung von gefärbten Zytoproben wurden die relativen Anteile an basophilen und polychromatischen Erythroblasten sowie Retikulozyten an den verschiedenen Tagen beider Kulturen bestimmt.

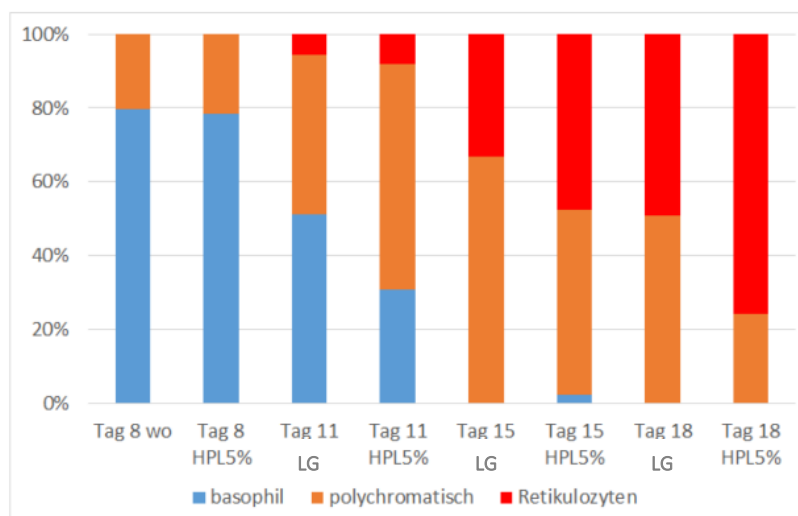


Abbildung 11: Differentialzählung der Zellen mit %-Anteilen basophiler Erythroblasten (basophil), polychromatischer Erythroblasten (polychromatisch) und Retikulozyten

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, ist bereits an Tag 11 in der Kultur HPL ein Vorsprung in der Entwicklung zu verzeichnen. Dieser Vorsprung baut sich bis zum Ende der Beobachtung an Tag 18 weiter aus.

Mit durchflusszytometrischen Analysen wurde die Ausprägung der Oberflächenmerkmale CD36, CD45, GPA, Bande 3 und CD71 der Zellen an den bestimmten Tagen gemessen.

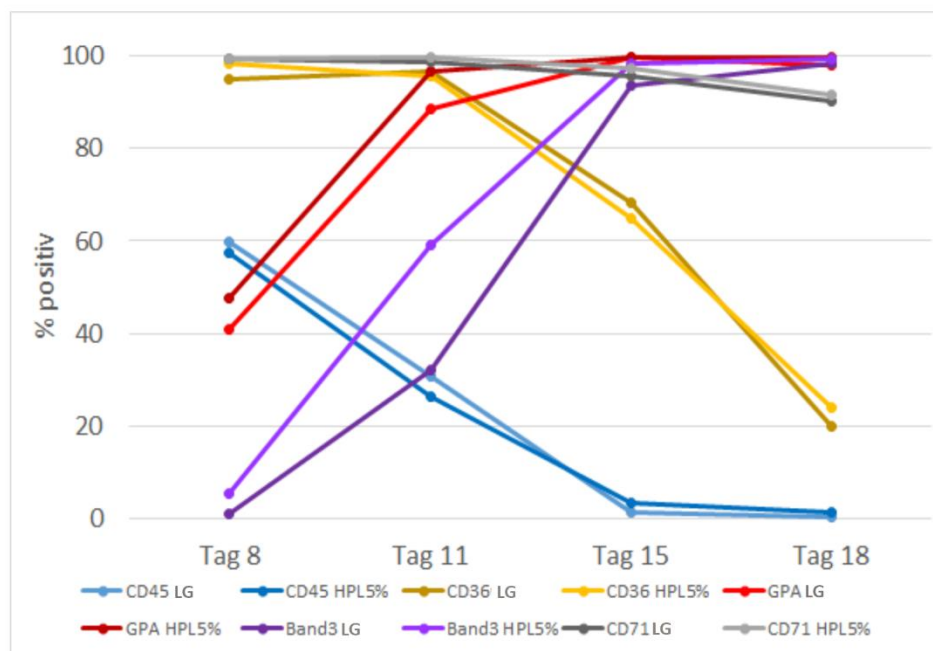


Abbildung 12: Ausprägung der Oberflächenmerkmale im Laufe der Differenzierung der beiden Vergleichskulturen. Analysiert mittels Durchflusszytometrie.

Bis auf eine vermehrte Expression von Bande 3 an Tag 11 in der Kultur HPL ist eine nahezu idente Expression der untersuchten Oberflächenmarker zu beobachten.

### 4.3 Etablierung der Färbung

Für die Etablierung der Färbung wurden zunächst eine Reihe von Versuchen gestartet um die beste Verdünnung der Antikörper sowie deren beste Kombination, die ideale Dauer der Inkubationszeit und die beste Aufbringung der Zellen auf den Objektträger zu finden. Zudem wurden Negativkontrollen durchgeführt und durch Doppelfärbungen versucht, den Färbeablauf zu optimieren.

### 4.3.1 Verdünnung der Antikörper

Zu Beginn wurde die Verdünnung des Erst- und Zweitantikörpers, sowie die beste Kombination dieser beiden Verdünnungen austitriert. Die Austestung wurde mit den Erst- und Zweitantikörpern für Spektrin durchgeführt.

Dafür wurden Tag 8 Zellen der EPO 64 Kultur verwendet. Es wurden Poly-L-Lysin beschichtete und unbeschichtete Objektträger verwendet. Die Zellen wurden entweder mittels Zentrifugation, oder durch Sedimentation auf die Objektträger gebracht.

Für die Erstantikörper wurden die Verdünnungen 1:100 und 1:200, für die Zweitantikörper die Verdünnungen 1:500 und 1:1000 ausgetestet.

Nach dem Auftragen des Erstantikörpers wurden die Objektträger über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Inkubationszeit des Zweitantikörpers betrug eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Zusätzlich wurden mit der Hoechst-Färbung die Zellkerne blau eingefärbt.

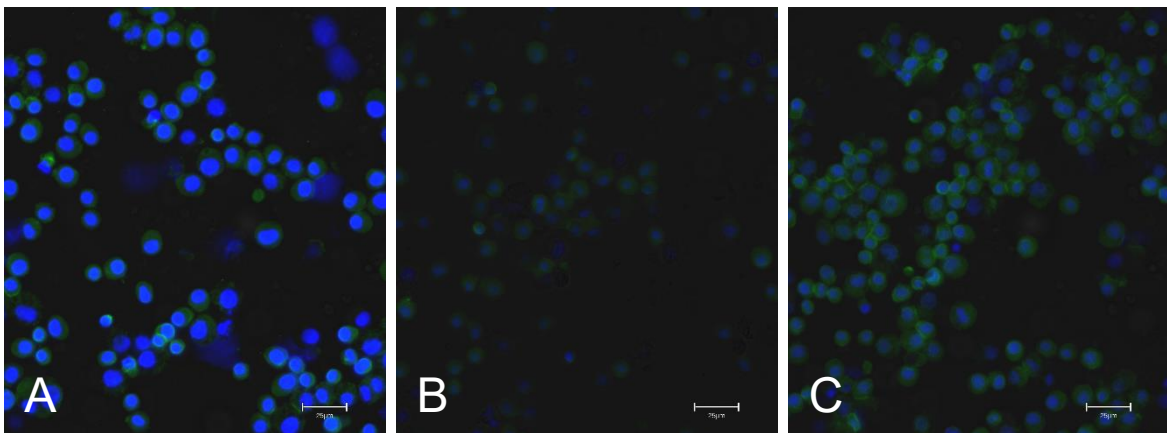


Abbildung 13 EPO 64 Zellen an Tag 8 -Zyospin auf unbeschichteten OT; links: 1:100/1:500, mitte: 1:200/1:500, re:1:200/1:1000 Verdünnung; Skalenleiste 25 µm.

In Abbildung 13 sind Zytospins auf unbeschichteten Objektträgern zu sehen. Im Bild A ist der Erstantikörper 1:100 und der Zweitantikörper 1:500 verdünnt, im Bild B ist eine Kombination aus 1:200 + 1:500 und rechts 1:200 + 1:1000 abgebildet. Links ist die Kernfärbung dominierend. In der Mitte ist die Grünfärbung nur schwach zu erkennen. Bild C zeigt die stärkste Grünfärbung.

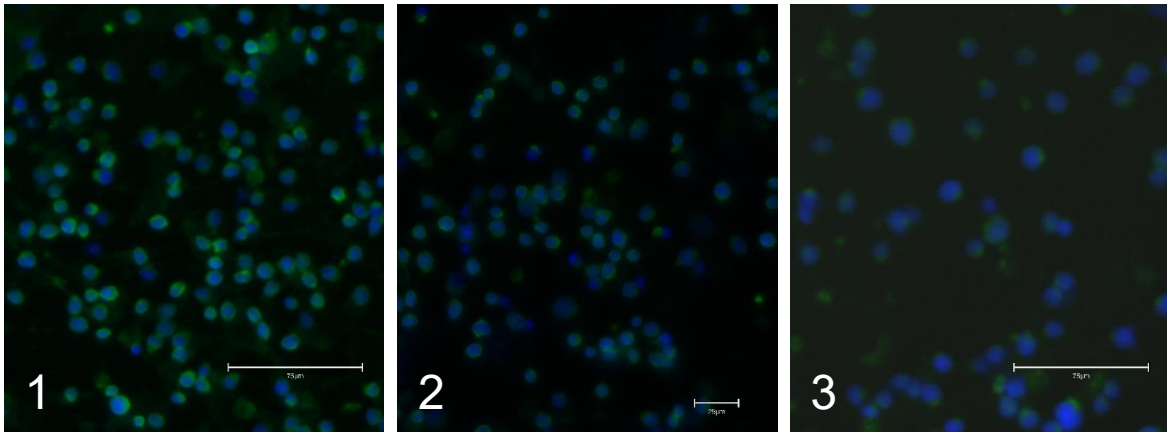


Abbildung 14 EPO 64 Zellen an Tag 8 -Sedimentation auf unbeschichtete OT; links 1:100/1:500 mitte: 1:200/1:500 rechts: 1:200/1:1000 Verdünnung; Skalenleiste Bild 1 und 3: 75 µm, Bild 2: 25 µm.

In Abbildung 14 sind sedimentierte Zellen auf unbeschichteten Objektträgern zu sehen. Im Bild 1 ist eine Verdünnungskombination des Erst- und Zweitantikörpers von 1:100 + 1:500 in der Mitte (in Bild 2) 1:200 + 1:500 und rechts (im Bild 3) 1:200 + 1:1000 abgebildet. Hier ist in der schwächsten Verdünnung, linkes Bild, eine starke Grünfärbung zu sehen. Im Bild rechts, in der stärksten Verdünnung, ist das Signal jedoch auch ausreichend gut zu sehen.

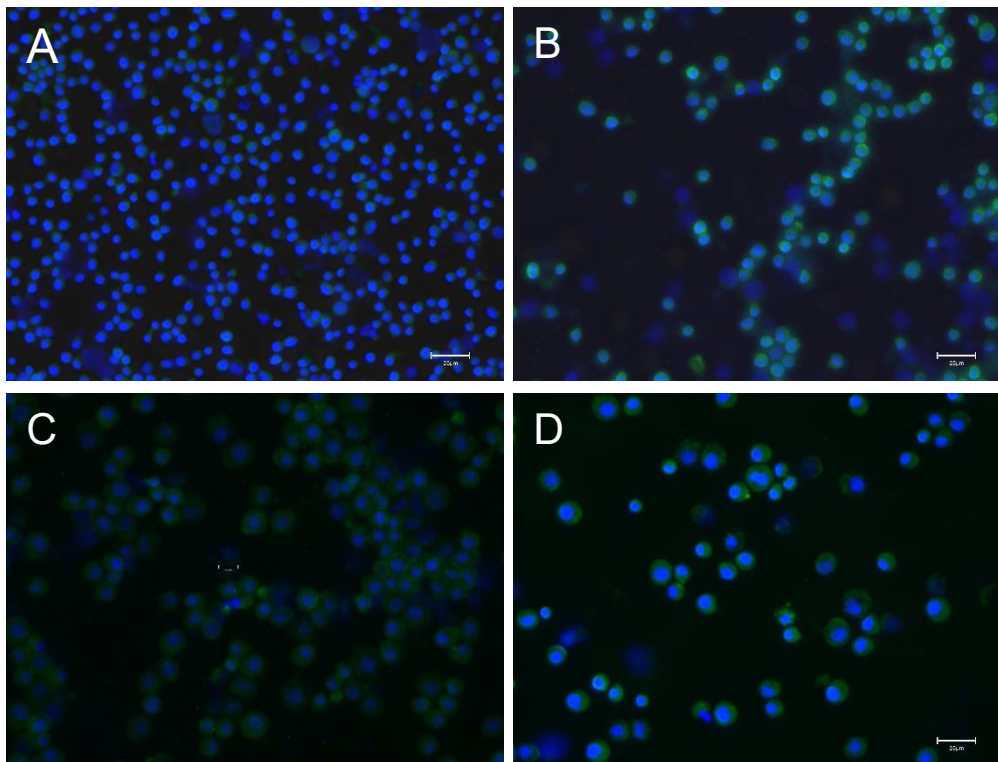


Abbildung 15 EPO 64 Zellen an Tag 8 -oben Sedimentation, unten Zytospin auf beschichtete OT; links 1:100/1:500, rechts:1:200/1:500 Verdünnung, Skalenleiste 25 µm.

In Abbildung 15 sind die Zellen auf beschichteten Objektträgern zu sehen. In den beiden oberen Bildern (Bild A und B) wurden die Zellen auf die Objektträger sedimentiert. In den beiden unteren Bildern (Bild C und D) wurden Zytospins angefertigt. Im Bild A dominiert die Kernfärbung. In Bild B ist die Grünfärbung im Vergleich etwas besser zu sehen. In Bild C ist die Grünfärbung gut zu sehen, allerdings ist in der stärkeren Verdünnung im Bild D auch ein ausreichend gutes Signal zu erkennen.

Aufgrund der besseren Praktikabilität wurde darauf geachtet eine Kombination zu finden, mit der man alle Färbungen (unabhängig von Beschichtung der OT und Art der Aufbringung der Zellen) durchführen kann. Um ressourcensparend umzugehen, wurde eine stärkere Verdünnung favorisiert, sobald sie ähnlich gute Ergebnisse liefert als eine schwächere Verdünnung.

In Zusammenschau der Bilder (Abbildungen 13, 14, 15) zeigte sich die Konzentration des Erstantikörpers mit 1:200 Verdünnung sowie die Konzentration des Zweitantikörpers mit 1:1000 als die beste Kombination.

#### 4.3.2 Austestung der Inkubationszeit

Im nächsten Schritt wurde die Inkubationszeit für den Erstantikörper ausgetestet. Verglichen wurden die Inkubationszeiten eine Stunde und über Nacht (was im Durchschnitt einer Zeit von 24 Stunden entsprach). Die Versuche wurden mit nativen Erythrozyten, welche auf unbeschichtete Objektträger sedimentiert wurden, durchgeführt.

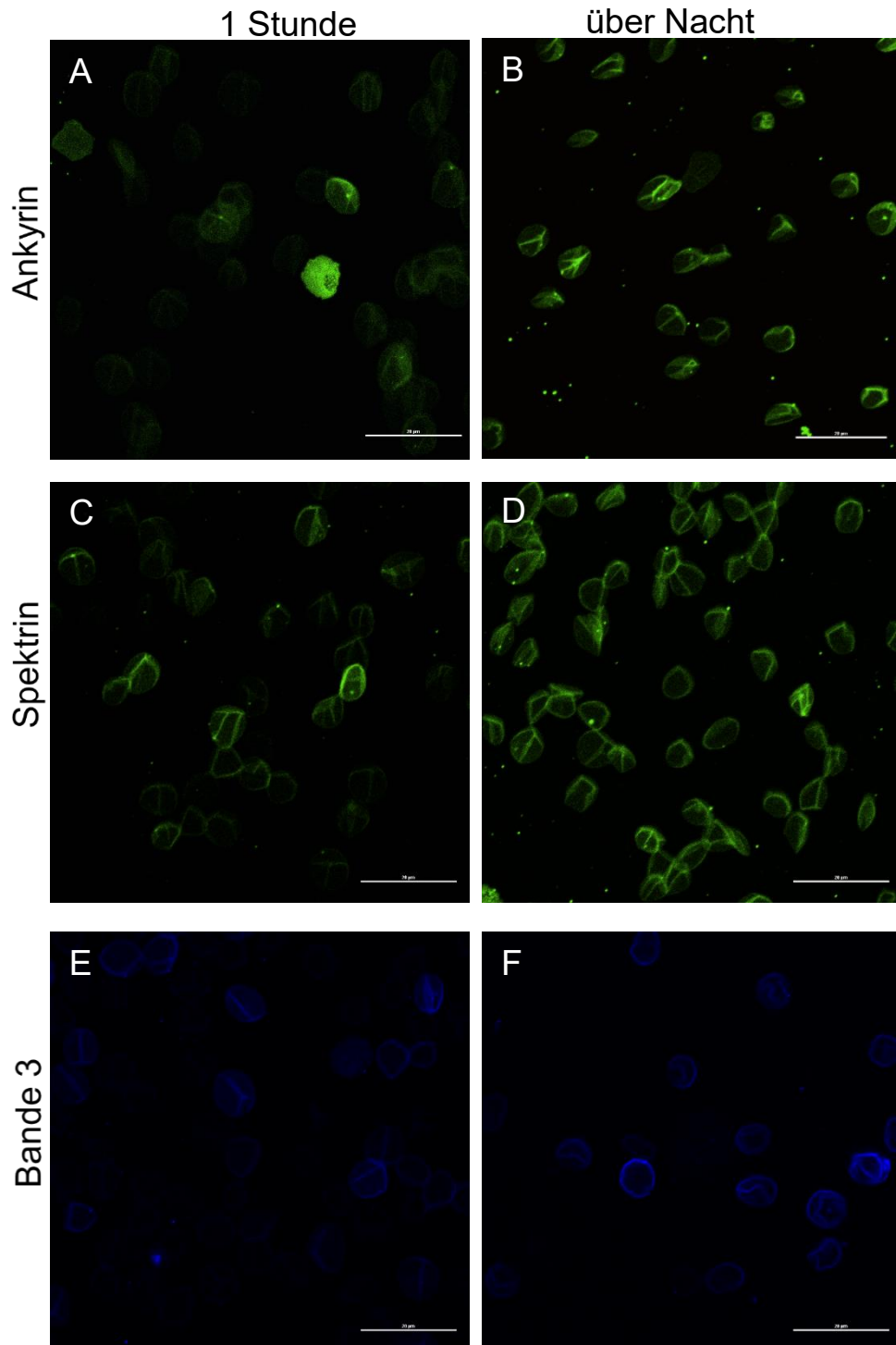


Abbildung 16 Austestung Inkubationszeiten des Erstantikörpers: Färbung von Ankyrin, Spektrin und Bande 3 untereinander; linke Spalte Inkubationszeit eine Stunde, rechte Spalte Inkubationszeit über Nacht. A: Ankyrin Erstantikörper Inkubationszeit eine Stunde, B: Ankyrin Erstantikörper Inkubationszeit über Nacht, C: Spektrin Erstantikörper Inkubationszeit eine Stunde, D: Spektrin Erstantikörper Inkubationszeit über Nacht, E: Bande 3 Erstantikörper Inkubationszeit eine Stunde, F: Bande 3 Erstantikörper Inkubationszeit über Nacht; 60x Vergrößerung; Skalenleiste 20 µm.

Wie in der Abbildung 16 zu sehen ist, zeigt sich bei den drei Färbungen ein ähnliches Bild. Bei den drei Bildern A, C und E, jeweils nach einer Inkubationszeit

des Erstantikörpers von einer Stunde, ist neben wenigen gut gefärbten Zellen der Großteil der Zellen nur schwach angefärbt.

Im Vergleich dazu sind bei den Bildern B, D und F, wo der Erstantikörper über Nacht in die Zellen eindringen konnte, die Zellen viel stärker und vor allem auch gleichmäßiger gefärbt.

Auch wenn eine Inkubationszeit von nur einer Stunde einen deutlichen Zeitvorteil verschafft, zeigten diese Versuche, dass eine Inkubationszeit über Nacht bessere Bilder liefert. Deshalb wurde bei den nachfolgenden Versuchen die Inkubationszeit über Nacht angewendet.

### 4.3.3 F-Aktin Färbung

Für die F-Aktin Färbung wurden verschiedene Inkubationszeiten des Labelling-Konjugates ausgetestet. In Vorversuchen wurden die Inkubationszeiten 15, 30, 45 und 60 Minuten ausprobiert. Es zeigte sich eine Zunahme der Färbung je länger die Inkubationszeit wurde. Deshalb wurden die längeren Inkubationszeiten 45 und 60 Minuten miteinander verglichen. Für die Versuche wurden native Erythrozyten auf unbeschichtete Objektträger sedimentiert und anschließend den Färbeschritten für die F-Aktin-Färbung unterzogen.

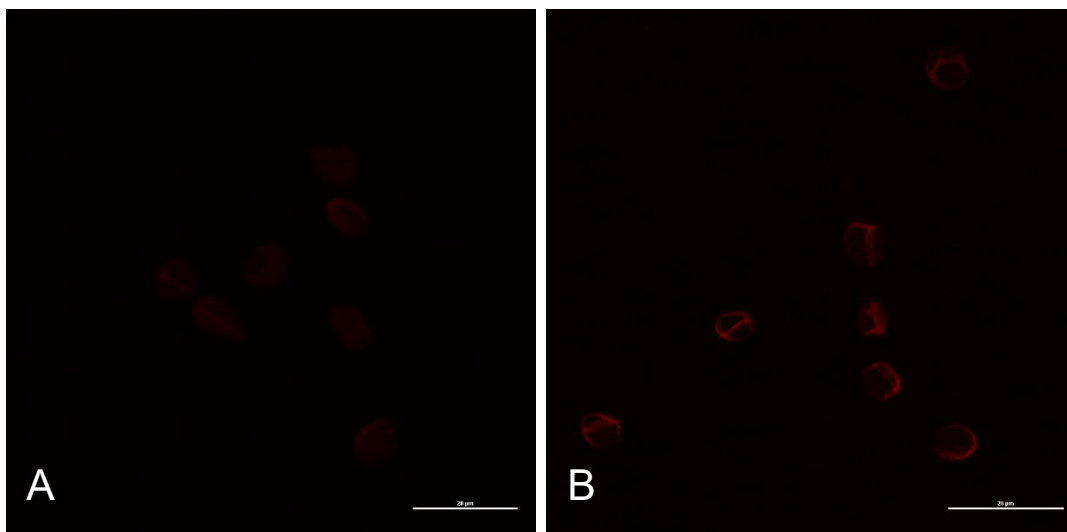


Abbildung 17 F-Aktin Färbung: links Inkubationszeit der Färbung 45 Minuten, rechts Inkubationszeit 60 Minuten; 60x Vergrößerung; Skalenleiste 20 µm.

In Abbildung 17 ist im Bild A die Inkubationszeit von 45 Minuten und im Bild B von 60 Minuten zu sehen. Wie bereits in den Vorversuchen zu beobachten war, nimmt

die Färbung proportional zur Dauer der Inkubationszeit zu. Auf dem rechten Bild ist die Färbung des F-Aktin deutlich besser zu sehen.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die weiteren F-Aktin Färbungen mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten durchgeführt.

#### 4.3.4 Vergleich von Sedimentation und Zytospin

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Methode besser geeignet ist, um die Zellen auf die Objektträger zu bringen. Hierbei wurde die Sedimentation der Zellen mit der Aufbringung mittels Zentrifugation verglichen. Für diese Versuche wurden native Erythrozyten auf unbeschichtete Objektträger gebracht.

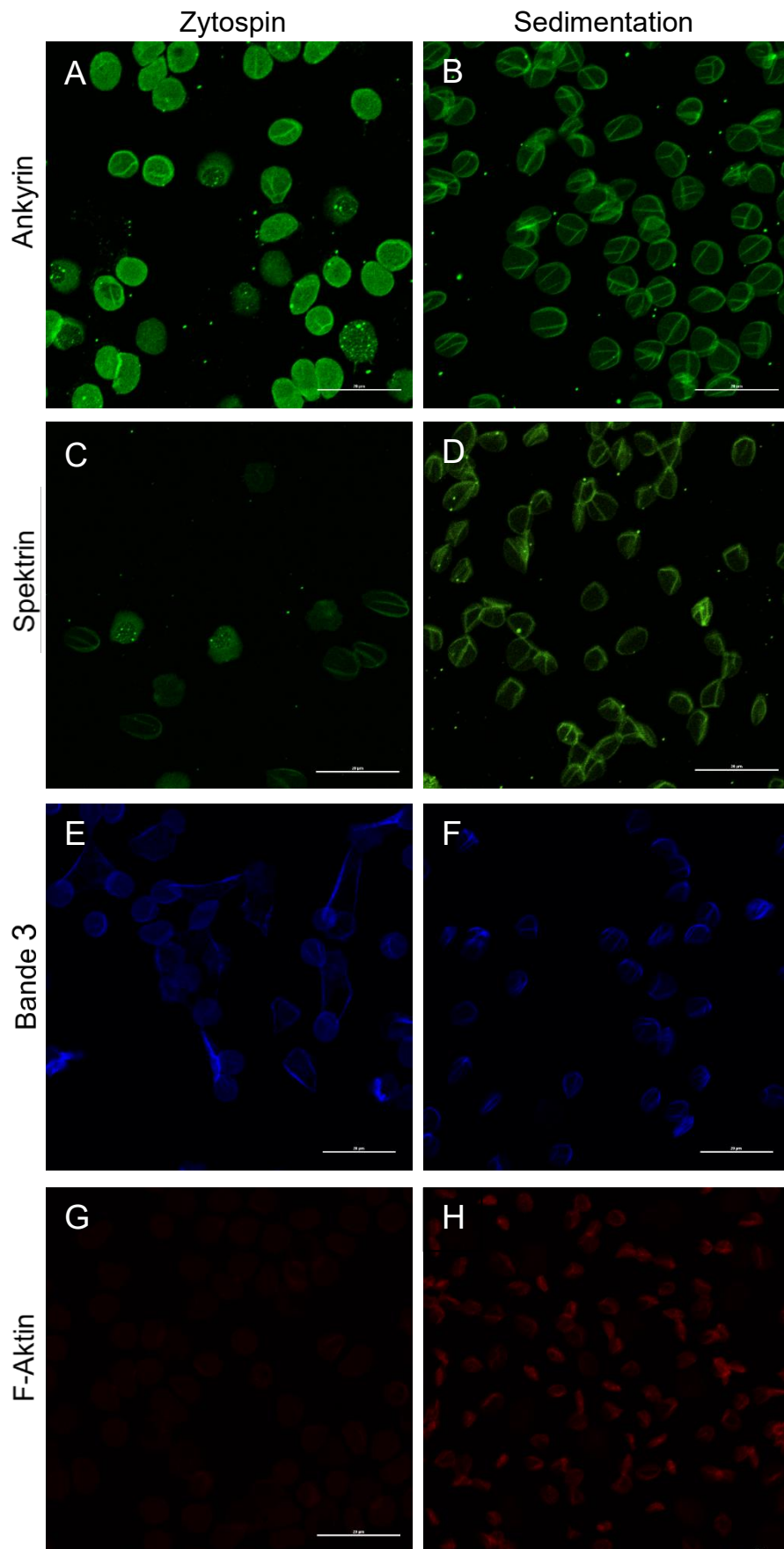


Abbildung 18 Vergleich Aufbringung mittels Zytospin und Sedimentation: Die 4 ausgetesteten Färbungen Ankyrin, Spektrin, Bande 3 und F-Aktin untereinander; linke Spalte: Aufbringung mittels Zytospin, rechte Spalte: Sedimentation der Zellen; 60x Vergrößerung; Skalenleiste 20  $\mu\text{m}$ .

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, sind die auf die Objektträger geschleuderten Zellen, Bild A, C, E und G (jeweils in der linken Spalte), zum Teil vergrößert, wirken etwas plump und sind vereinzelt auch aufgeplatzt. Am eindrucksvollsten ist dies in der Ankyrin (Bild A) und Bande 3 (Bild E) -Färbung zu sehen. Im Vergleich dazu sehen die sedimentierten Zellen, Bild B, D, F und H (jeweils in der rechten Spalte), intakt aus. Ihre Zellmembranen scheinen alle noch intakt zu sein. In den sedimentierten Zellen ist das spezifische Muster der Färbung eindeutiger zu erkennen.

In Zusammenschau dieser Bilder erscheinen die auf die Objektträger geschleuderten Zellen durch den Prozess deutlich mitgenommen. Sie wirken plumper und sind teilweise geplatzt. Die Sedimentation zeichnet sich als die schonendere Variante ab und wird deshalb in den nachfolgenden Färbungen angewendet.

#### 4.3.5 Austestung Doppelfärbung

Weiters wurde versucht, eine Doppelfärbung von zwei der untersuchten Marker einem Bild zu etablieren. Da die Färbungen von Ankyrin und Spektrin beide in der Farbe Grün leuchten, würde es bei einer Doppelfärbung dieser beiden zu einer Überlagerung der Färbungen mit nur bedingter Aussagekraft kommen. Aus diesem Grund wurde eine Doppelfärbung von Ankyrin und Bande 3 getestet. Für die Versuche wurden native Erythrozyten auf unbeschichtete Objektträger sedimentiert und anschließend nach dem Protokoll gefärbt. Die Erst- und Zweitantikörper der beiden Färbungen wurden vermischt und somit in jeweils einem Färbeschritt aufgetragen. Die Konzentration der Antikörper blieb gleich wie in den Vorversuchen.

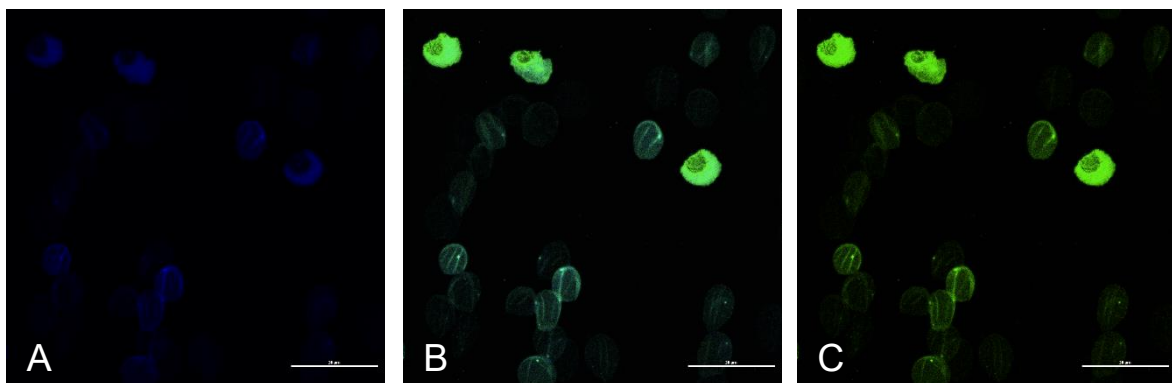


Abbildung 19 Doppelfärbung Ankyrin & Bande 3; A: Bande 3 Färbung, B: Ankyrin und Bande 3 Doppelfärbung, C: Ankyrin Färbung; 60x Vergrößerung; Skalenleiste 20 µm.

Für die mikroskopischen Bilder wurden zuerst blaue, dann grüne und anschließend beide Kanäle zugleich aufgefangen.

In der Abbildung 19 ist links im Bild A die Bande 3 Färbung in blau zu sehen. Rechts im Bild C ist die Ankyrinfärbung in grün zu sehen. In der Mitte im Bild B ist die Doppelfärbung in einem türkisenen Farbton zu erkennen.

Mit der Doppelfärbung konnte also ein Objektträger in einem Färbungsablauf sowohl für Ankyrin als auch für Bande 3 gefärbt werden.

#### 4.3.6 Negativkontrollen

Für die Negativkontrollen wurden mit jeder Färbung einmal die Erstantikörper und einmal die Zweitantikörper weggelassen.

Als Negativkontrolle wurden native Erythrozyten auf unbeschichteten Objektträger sedimentiert und anschließend die Färbeschritte durchgeführt. Für jede Färbung wurde ein Objektträger ohne Erstantikörper und ein Objektträger ohne Zweitantikörper gefärbt.

Das Ergebnis waren schwarze Bilder. Die Färbung ohne Zweitantikörper konnte nicht leuchten, weil der leuchtende Antikörper gefehlt hatte. Jene Färbungen ohne Erstantikörper waren schwarz, weil der leuchtende Zweitantikörper nirgends andocken konnte und somit gewaschen wurde.

#### 4.3.7 Beschichtung der Objektträger

Bei den ersten Färbeversuchen der Zellkultur konnte beobachtet werden, dass nach durchgeführter Färbung nur noch wenige bis gar keine Zellen auf den unbeschichteten Objektträgern zu finden waren. Da es sich bei den zu untersuchenden Zellen um Suspensionszellen handelt, wurde versucht eine Beschichtung der Objektträger zu finden, mit welcher man die Adhärenz der Zellen auf den Objektträgern erhöhen kann, um somit ein Abschwimmen der Zellen bei den vielen Färbe- und Waschschrinen zu verhindern.

Dafür wurden die zwei verschiedenen Arten der Objektträgerbeschichtung PLL und PHAE angewendet. Um eine ausführliche Evaluierung beider Beschichtungen zu

erreichen, wurden die immunzytochemischen Färbungen in dieser Arbeit mit beiden Beschichtungen durchgeführt.

#### 4.4 Ankyrinfärbung

Die Zellen wurden an den Tagen 8, 11, 15 und 18 aus der Zellkultur EPO 80 HPL und EPO 80 LG entnommen und den Färbeschritten für die Ankyrinfärbung unterzogen. Die Färbungen wurden mit PHAE und PLL beschichteten Objektträgern durchgeführt. Die folgenden Bilder wurden alle mit 60-facher Vergrößerung am Mikroskop Nikon A1 mit der Software NIS Elements angefertigt.

# PHAE

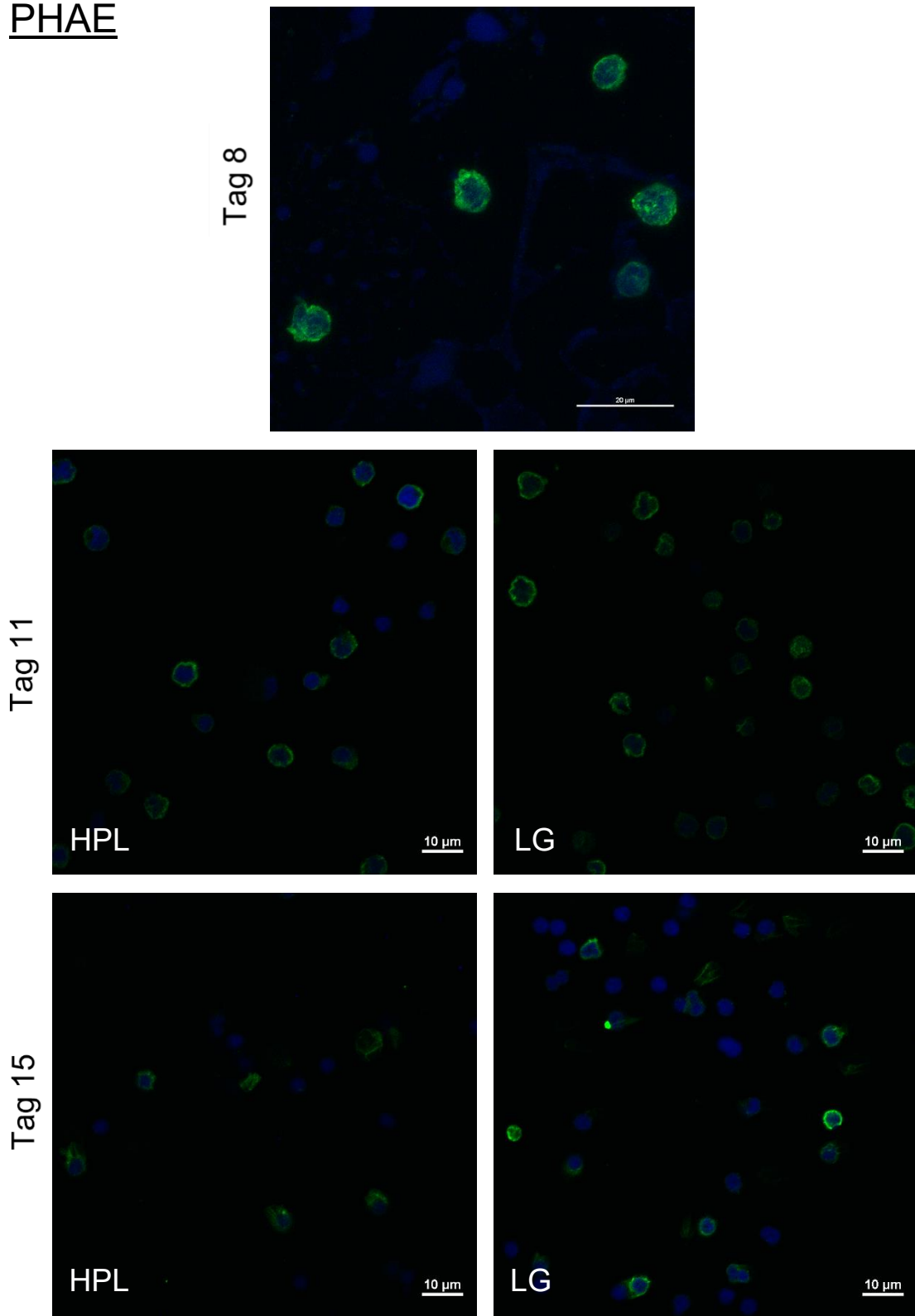


Abbildung 20 Ankyrinfärbung von PHAE-beschichteten OT an den Tagen 8, 11, 15, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20 µm; an restlichen Tagen: 10 µm

# PHAE

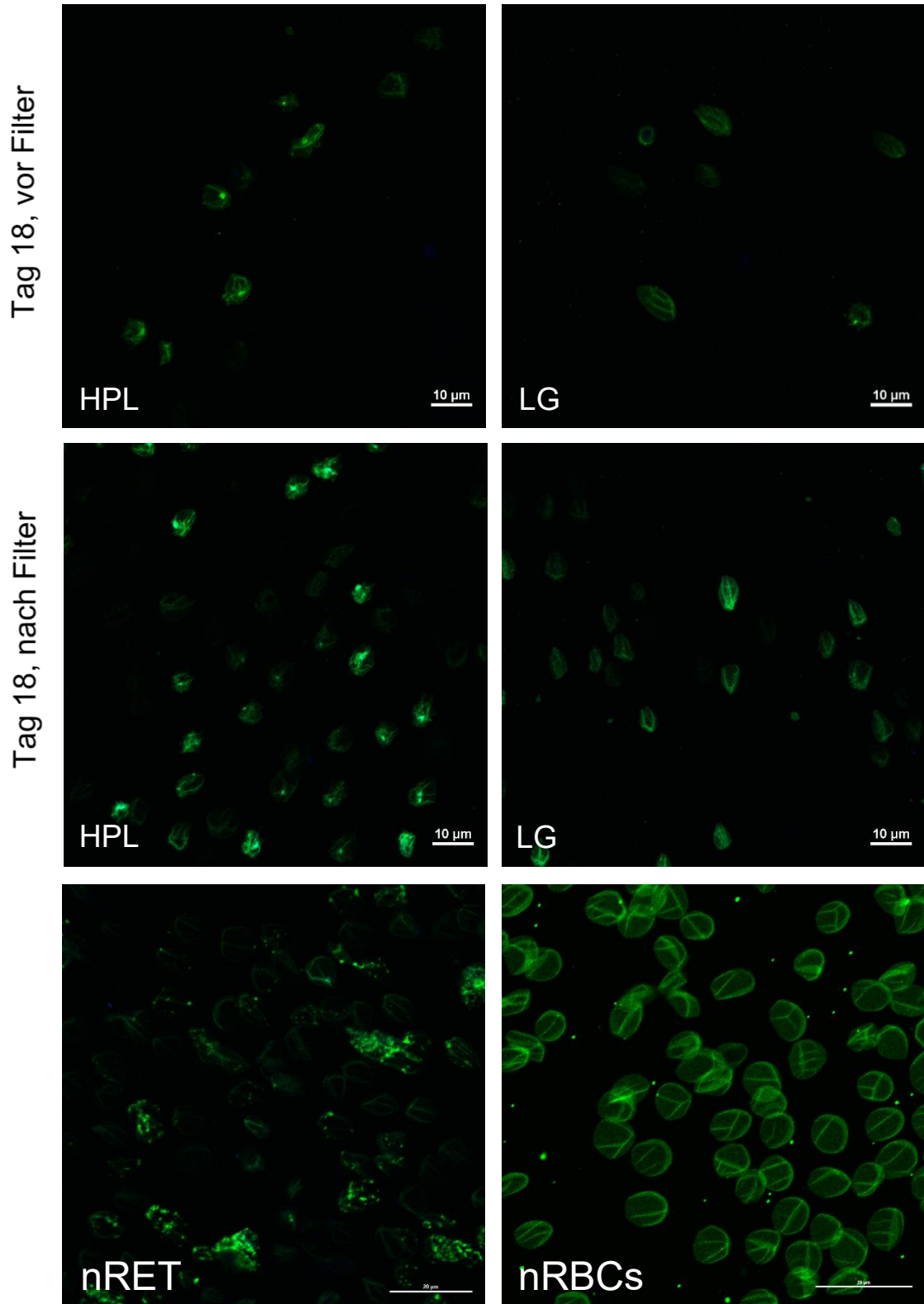


Abbildung 21 Ankyrinfärbung von PHAE-beschichteten OT am Tag 18 vor Filtration, nach Filtration und nRET, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur, Ankyrinfärbung von nRBCs auf unbeschichteten OT; Skalenleiste an den Tagen 18: 10 µm, bei nRET und nRBCs: 20 µm

Die oberen Abbildungen 20 und 21 zeigen die Bilder der Ankyrinfärbung mit der PHAE-Beschichtung. Das Vergleichsbild der nRBCs wurde auf unbeschichtetem Objektträger angefertigt. Die Färbungen an Tag 18 nach Filtration und nRET wurden mit der Doppelfärbung (Ankyrin & Bande3) erstellt.

Auf den Bildern ist die Entwicklung sowie die Verteilung des Zytoskelettproteins Ankyrin der Zellen vom Proerythroblasten bis hin zum entkernten Retikulozyten dargestellt.

Da sich die beiden Kulturen erst nach Tag 8 voneinander unterscheiden, ist an Tag 8 nur ein Bild abgebildet. Die Zellen an Tag 8 sind, was der Entwicklungsstufe der Zellen entspricht, deutlich größer als an den darauffolgenden Tagen. Stellenweise sind am Bild von Tag 8 blaue Punkte und dicke blaue Striche außerhalb von grüngefärbten Zellen zu erkennen. Hierbei handelt es sich um unspezifische Artefakte der Kernfärbung auf der Beschichtung.

In überblicksmäßiger Betrachtung der Bilder von oben nach unten ist von Tag 8 bis Tag 18 eine stetige Zunahme der Grünfärbung und damit der Expression von Ankyrin festzustellen.

In den Bildern bis einschließlich Tag 15 ist die blaue Kernfärbung zu sehen. Am Tag 8 und 11 (in der Kultur LG) ist um jeden blauen Kern noch ein grüner Saum zu erkennen. Bereits an Tag 11 (in der Kultur HPL) sowie an Tag 15 (beide Kulturen) sind kleine dicht konzentrierte blaue Kerne mit nur mehr spärlichem grünen Rand oder ganz ohne grüne Färbung zu sehen. Diese blauen Kerne ohne grüne Anteile sind vom Rest der Zelle losgelöste Zellkerne. Die Entkernung stellt in der Entwicklung der Erythrozyten einen wichtigen Schritt dar (34). Da in der HPL Kultur bereits an Tag 11 lose Kerne zu finden sind ist anzunehmen, dass die Zellen dieser Kultur in der Entwicklung schon weiter fortgeschritten sind. In beiden Kulturen sind an Tag 15 die ersten entkernten grüngefärbten Zellen zu erkennen.

Auffallend ist, dass im Sprung von Tag 15 auf Tag 18 eine Veränderung der Zellform stattgefunden hat. Während die Zellen an den Tagen von 8 bis 15 eine runde Form haben, zeigen sie sich am Tag 18 in einer länglicheren ovalen Form. Diese längliche Form dürfte durch ein Verschwimmen der Zellen bei der Fixierung entstanden sein.

Ab Tag 18 sind bereits vor Filtration keine Kerne mehr zu erkennen. Durch die Filtration der Zellen sollten spätestens nach diesem Schritt extrudierte Zellkerne entfernt worden sein. Zudem weisen die Zellen an Tag 18 einen grünfärbigen Strich auf, welcher längs durch die Zelle verläuft. Außerdem zeigen die Zellen der HPL Kultur ab Tag 18 (bereits vor Filtration) einen markanten, hell leuchtenden, grünen Punkt. Hierbei könnte es sich um eine punktförmige Anreicherung von Ankyrin nach erfolgter Enukleation handeln.

Auf dem Bild der nativen Retikulozyten sind einige Inseln mit diffus verstreuten Farbkomplexen zu sehen. Bei diesen verstreuten Farbkomplexen handelt es sich um aufgeplatzte Zellen, die dem Färbeprozess nicht standhalten konnten. Zwischen diesen Inseln sind aber auch einige scharf gefärbte Zellen, mit einem längs durch die Zelle laufenden Strich zu sehen. Wie am Referenzbild der nRBCs zu erkennen ist, entspricht dieses Muster dem typischen Färbemuster für die Ankyrinfärbung. Das Bild der nRBCs wurde mit unbeschichteten Objektträgern angefertigt. Die hier abgebildeten, fertig entwickelten nRBCs erscheinen irrtümlicherweise größer als ihre Vorläuferzellen, da bei diesem Bild ein Zoom angewendet wurde. Erythrozyten stellen als das Endprodukt der Erythropoese die kleinsten Zellen ihrer Entwicklung dar (35). In den Zellen ist das typische Muster der Ankyrinfärbung in Form von strichförmigen Anordnungen zu sehen. Bei den kleinen grünen Punkten außerhalb der Zellen handelt es sich um Artefakte der Färbung.

Die Zellen an Tag 18 (vor und nach Filter) weisen durch ihre strichförmige Anordnung der Färbung eine Ähnlichkeit mit den Referenzzellen der nRET und nRBCs auf. Die genaue Strukturierung der Färbung (wie in den Vergleichszellen der fertig entwickelten nRBCs zu sehen ist) ist in diesem Stadium jedoch noch nicht erreicht. In der weiteren Entwicklung werden demnach noch feinere Umstrukturierungen folgen.

Die auffällig hell leuchtenden Punkte an Tag 18 in der HPL Kultur sind weder in den Vergleichszellen der Kultur LG noch in den Referenzzellen nRET und nRBCs in diesem Ausmaß zu erkennen. Neben der Annahme, dass es sich um eine punktförmige Mehranlagerung von Ankyrin nach erfolgter Entkernung handelt, wäre auch ein Artefakt der Bildgebung eine mögliche Erklärung.

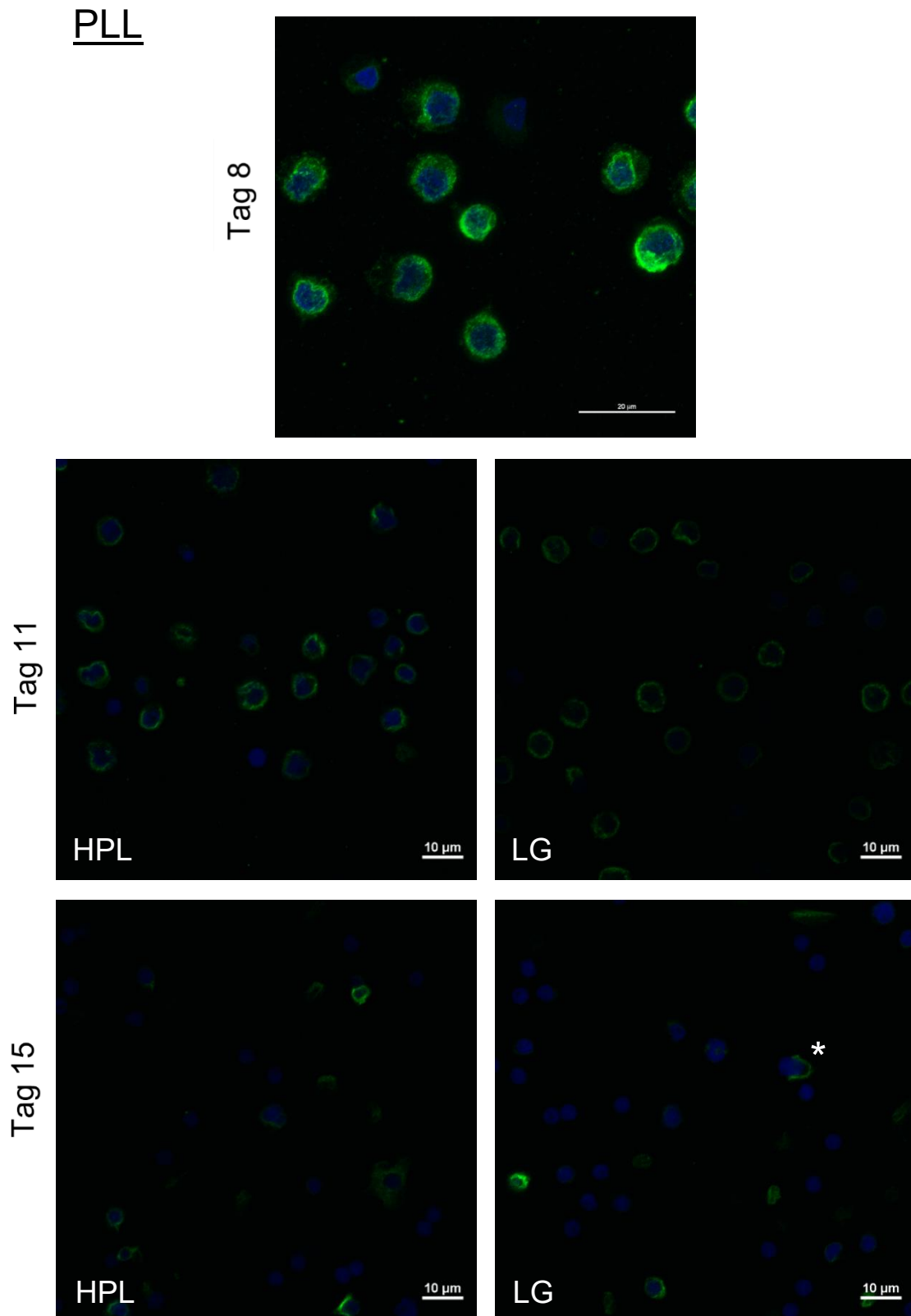
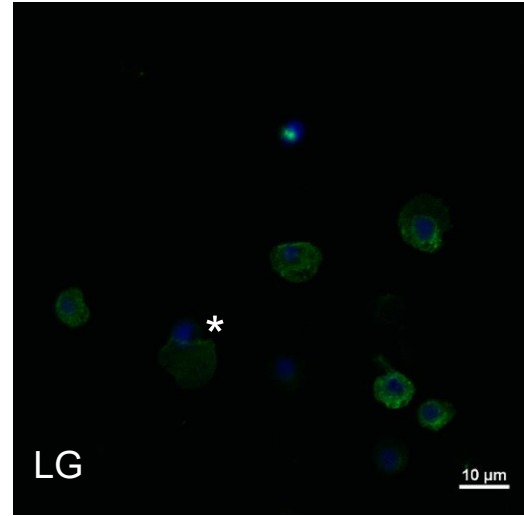
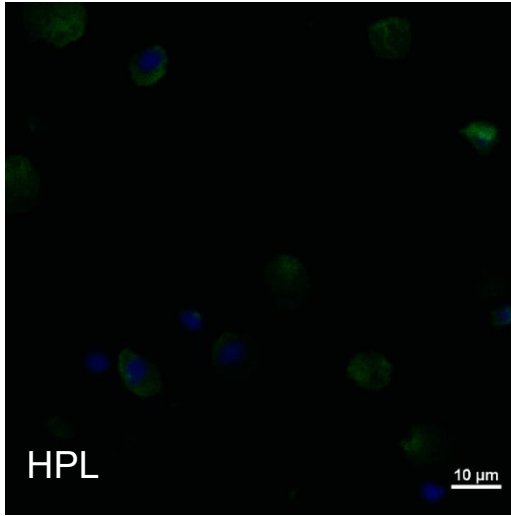


Abbildung 22 Ankyrinfärbung von PLL-beschichteten OT an den Tagen 8, 11 und 15; links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20  $\mu\text{m}$ , an den restlichen Tagen: 10  $\mu\text{m}$

PLL

Tag 18, vor Filter



Tag 18, nach Filter

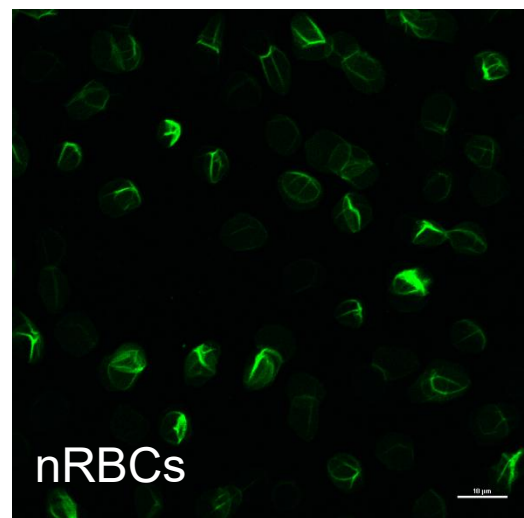
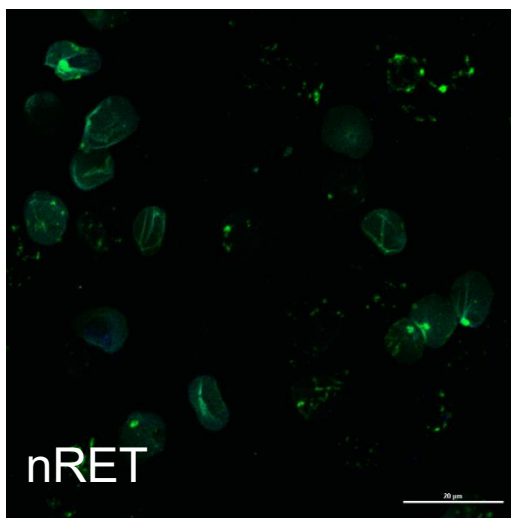
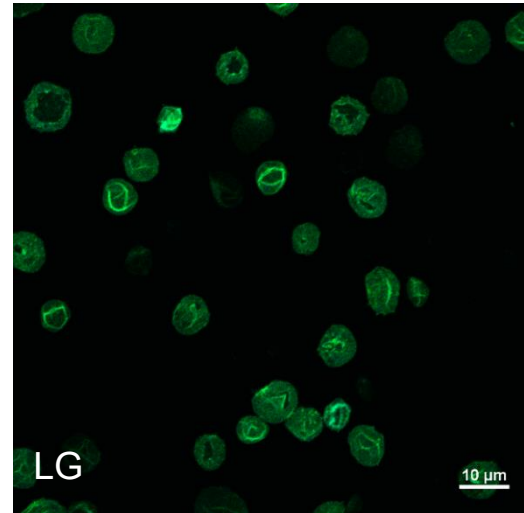
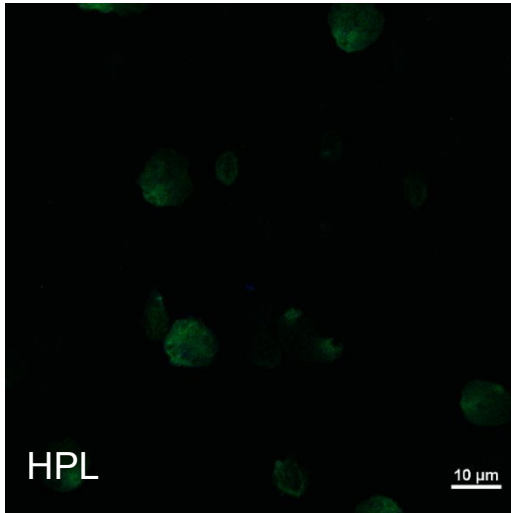


Abbildung 23 Ankyrinfärbung von PLL-beschichteten OT am Tag 18 vor Filtration, nach Filtration, nRET und nRBCs; links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an den Tagen 18 und nRBCs: 10 µm, bei nRET: 20 µm.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Ankyrinfärbung der beiden Zellkulturen HPL und LG auf PLL beschichteten Objektträgern an den Tagen 8, 11, 15 und 18. In der Abbildung 23 ist zudem ganz unten die Färbung nativer Retikulozyten sowie nativer Erythrozyten zu sehen. Die Färbung an Tag 18 nach Filtration und nRET wurde mit der Doppelfärbung (Ankyrin & Bande3) angefertigt.

Im Vergleich zu den nachfolgenden Stadien sind an Tag 8 die größten Zellen zu sehen. Dies entspricht dem Entwicklungsstadium der Zellen zu diesem Zeitpunkt. Die blaue Kernfärbung beschränkt sich bei diesem Bild auf Zellen, die ebenfalls grün gefärbte Strukturen beinhalten.

Die Zunahme der grünen Färbung ist, im Vergleich zu den Zellen auf PHAE Beschichtung, im Verlauf weniger gut zu erkennen. Wenn man die Zellen an Tag 18 nach Filtration betrachtet, erkennt man, dass es insgesamt zu einer Zunahme der grünen Färbung und somit zu einer vermehrten Expression von Ankyrin gekommen ist.

Auch bei dieser Beschichtung sind an den Tagen 8 und 11 die blau gefärbten Zellkerne grün umhüllt, lediglich in der HPL-Kultur vom Tag 11 sind vereinzelte blaue Kerne ohne grünen Saum zu erkennen. Bei den blauen Kernen ohne grünen Saum könnte es sich um bereits ausgestoßene Zellkerne handeln. Diese - im Vergleich zur Kultur LG desselben Tages - frühe Entkernung könnte für eine schnellere Entwicklung der Zellen in der HPL Kultur sprechen. Ab Tag 15 sind in beiden Kulturen dicht konzentrierte separierte Zellkerne zu erkennen.

Im Vergleich zur PHAE Beschichtung sind hier bis zum Tag 18 vor Filtration noch blaue Zellkerne zu sehen. Weiters behalten die Zellen bei der PLL Beschichtung bis zum Tag 18 eine runde Form. Dies deutet auf eine bessere Haftung der Zellen sowie der ausgestoßenen Zellkerne auf der PLL Beschichtung hin.

An Tag 15 und 18, jeweils in der LG Kultur, wurde eine Zelle direkt bei der Entkernung aufgenommen (markiert mit weißem Stern\*).

Im Bild Tag 18 nach Filter weisen die Zellen der Kultur HPL eine gleichmäßige Färbung auf. In der Kultur LG desselben Tages (nach Filter) sind in vielen Zellen Löcher zu sehen, die wie ausgestanzt wirken. In anderen Zellen sind hier Verdichtungen der Färbung zu sehen, die sich teilweise als dreieckige Anordnung

oder vereinzelt als Striche in den Zellen präsentieren. Diese Löcher sind vermutlich durch die Ausstoßung des Zellkerns entstanden. Die dreieckige bis hin zur strichförmigen Anordnung könnte einer Umordnung, die als Reparatur dieses Loches dient, geschuldet sein.

Das Bild der nRET zeigt Zellen mit streifenförmigen Mehranlagerungen der grünen Färbung. Einige Zellen weisen auch ein ausgestanztes Loch auf, wobei die Löcher weniger eindrucksvoll erscheinen als am Tag 18 nach Filter in der Kultur LG. Neben diesen Zellen sind auch einige diffus verstreute Farbkomplexe zu erkennen, die aufgrund ihrer einheitlichen Anordnung von zerstörten Zellen stammen müssen. Wie schon in der PHAE-Beschichteten Färbung zu sehen war, ist auch hier in manchen Zellen ein markanter grün leuchtender Punkt zu erkennen. Neben einer punktförmigen Mehranlagerung des Ankyrins nach erfolgter Entkernung, könnte es sich hierbei auch um ein Artefakt der Bildgebung handeln.

Im Vergleich dazu ist in der Färbung der nRBCs das charakteristische strichförmige Muster der Ankyrinfärbung zu erkennen.

Beide Kulturen zeigen an Tag 18 nach Filtration ähnliche Zellen wie in der Färbung der nRET zu sehen sind. Die Zellen der HPL Kultur weisen wie die nRET nur kleine Löcher auf. Demgegenüber haben die Zellen der LG Kultur eindrucksvolle große Ausstanzungen. Die Tatsache, dass die nRBCs hingegen keine Löcher aufweisen, lässt die Vermutung zu, dass die Zellen der HPL Kultur in ihrer Entwicklung schon weiter sind als ihr Pendant. Verglichen mit den Färbungen der nRBCs sieht man in beiden Kulturen, dass hier noch weitere Entwicklungsschritte mit dementsprechenden Umsortierungen notwendig sein müssen, um das gleiche typische Muster der nRBCs zu erreichen.

#### 4.5 Spektrinfärbung

In den nachfolgenden Bildern ist die Spektrinfärbung der Zellen aus den Kulturen Epo 80 HPL und LG zu sehen. Dafür wurden Zellen an den Tagen 8, 11, 15 und 18 aus der Kultur entnommen und den Färbeschritten für die Spektrinfärbung unterzogen. Die Färbungen wurden mit PHAE- und PLL-beschichteten Objektträgern durchgeführt. Die folgenden Bilder wurden alle mit 60-facher Vergrößerung aufgenommen.

# PHAE

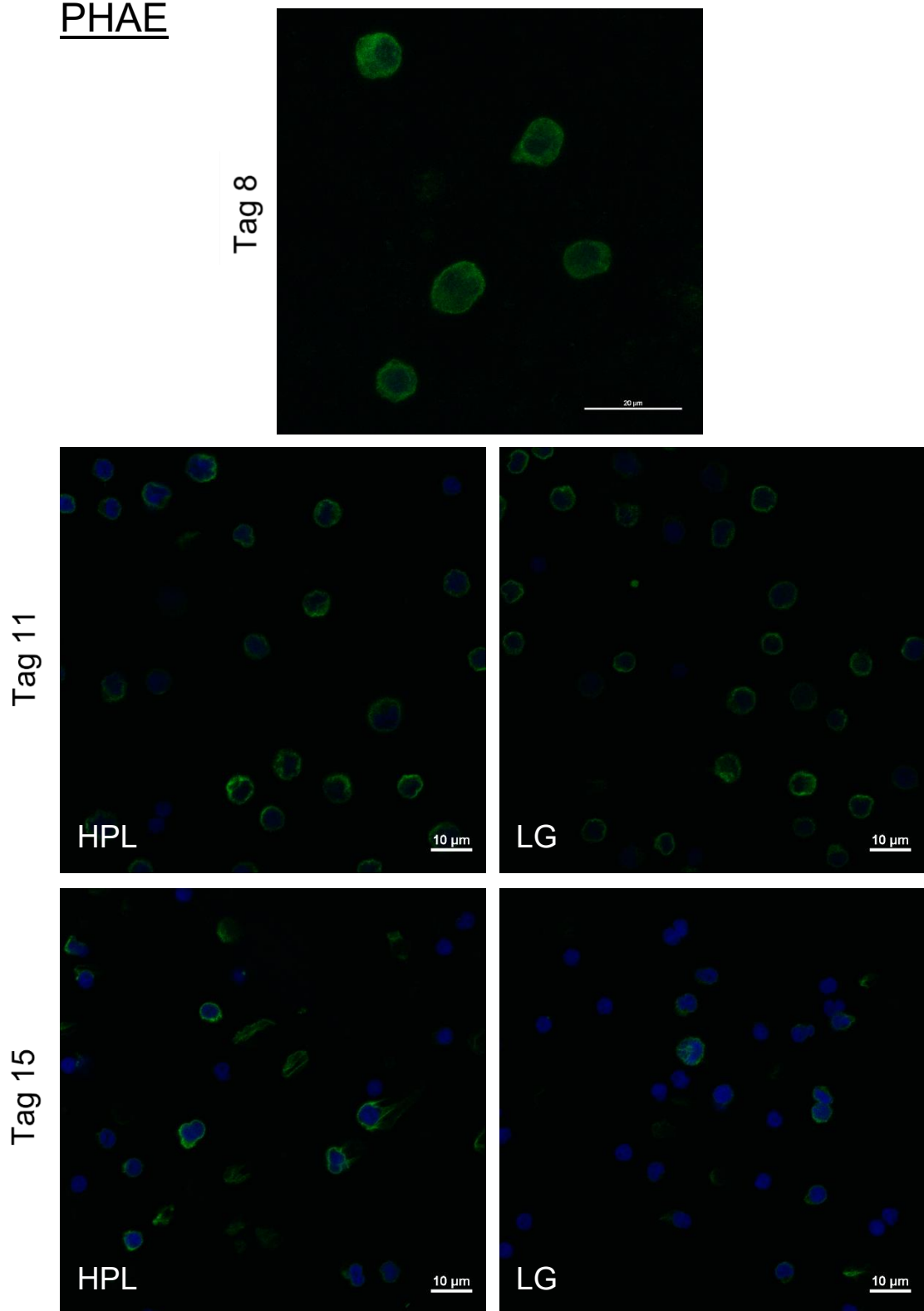


Abbildung 24 Spektrinfärbung von PHAE-beschichteten OT an den Tagen 8, 11 und 15, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20 µm, an restlichen Tagen: 10 µm

## PHAE

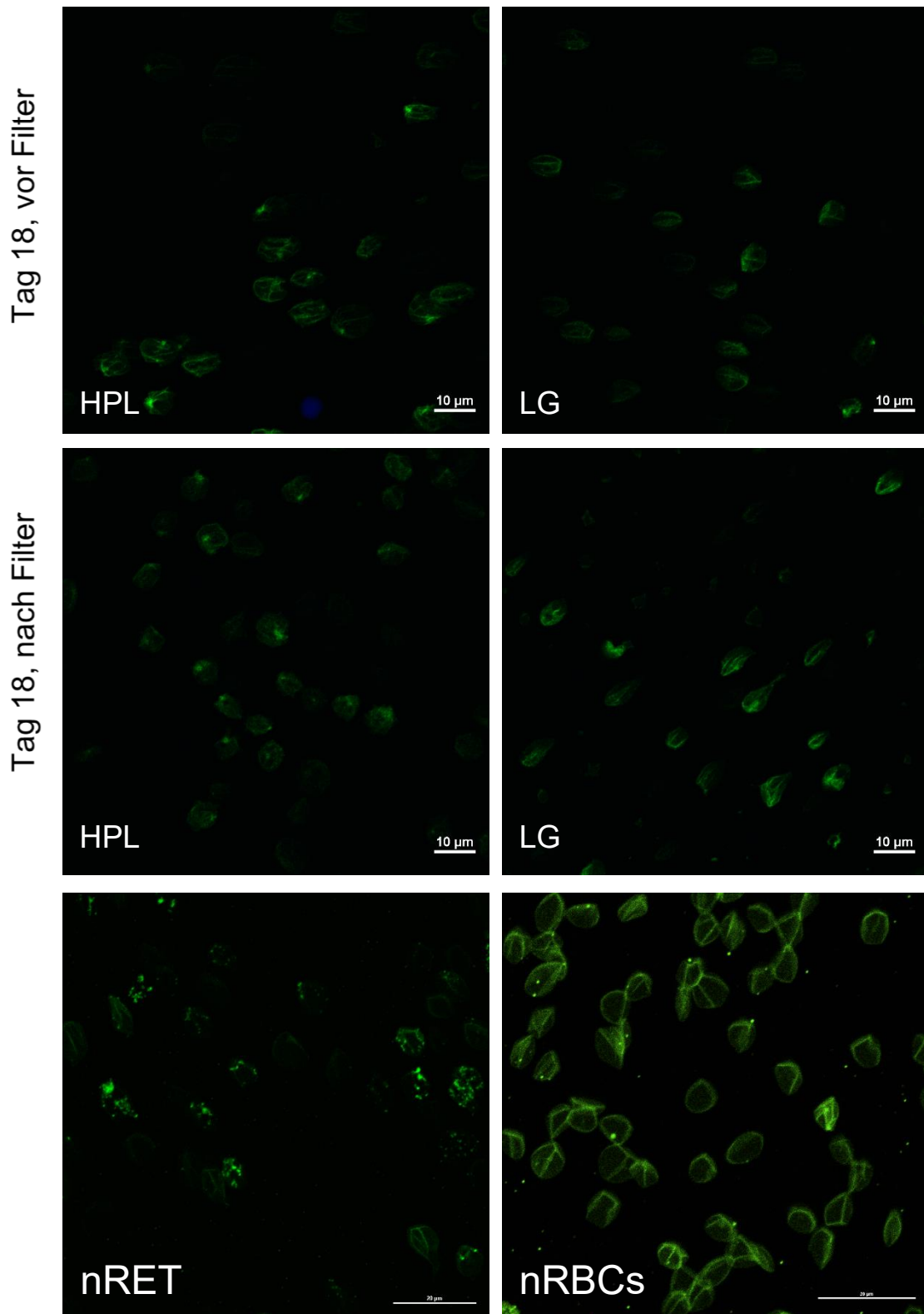


Abbildung 25 Spektrinfärbung von PHAE-beschichteten OT am Tag 18 vor Filtration, nach Filtration und nRET, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur, Spektrinfärbung von nRBCs auf unbeschichteten OT; Skalenleiste an den Tagen 18: 10 µm, bei nRET und nRBCs: 20 µm

In den beiden Abbildungen 24 und 25 ist die Entwicklung und Anordnung des Zytoskelettproteins Spektrin an den Analysetagen der beiden Zellkulturen mit PHAE beschichteten Objektträgern abgebildet. Als Vergleichsbilder sind in der Abbildung 25 die Spektrinfärbungen von nRET und nRBC angeführt. Die Färbung der nRBCs wurde auf unbeschichteten Objektträgern durchgeführt.

Da sich die Kulturen HPL und LG erst nach dem achten Tag in ihrem Kulturmedium unterscheiden, ist hier an Tag 8 nur ein Bild zu sehen. An Tag 8 ist keine Kernfärbung in blau zu sehen, man erkennt aber trotzdem den Zellkern an dem dunklen Fleck in jeder einzelnen Zelle. Die Zellen am Tag 8 sind wieder deutlich größer als in den darauffolgenden Stadien, was ihrem Entwicklungsstatus entspricht.

Die Intensität der Färbung wird von Tag 8 bis Tag 18 stärker. Ausnahme ist der Tag 15 in der Kultur LG, da hier nur wenige für Spektrin positive, grün leuchtende Zellen zu sehen sind.

An Tag 15 sind in beiden Kulturen viele blaugefärbte Kerne mit nur geringem Randsaum oder gar ohne grünen Randsaum zu sehen. Bei den separierten dicht konzentrierten blauen Punkten handelt es sich um bereits ausgestoßene Zellkerne. In der Kultur HPL, sind in der Mitte des Bildes bereits entkernte Zellen mit charakteristischem Aussehen und Form späterer Stadien zu erkennen. Da am selben Tag in der Kultur LG keine solche Zellen zu finden sind, könnte dies für einen Entwicklungsvorsprung der Zellen in der HPL Kultur sprechen.

Bis auf eine Ausnahme in der HPL Kultur sind ab Tag 18 vor Filtration keine Kerne mehr zu sehen.

Die Form der Zellen hat sich im Sprung von Tag 15 auf Tag 18 verändert. Während die Zellen vor Tag 15 eine runde Anordnung der grünen Färbung um die Zellkerne aufweisen, sieht man, dass die bereits entkernten Zellen an Tag 15 in der HPL Kultur eine längliche Form haben. Diese längliche Form der grün gefärbten Spektrinanordnung ist auch am Tag 18 in beiden Kulturen sowie bei der Färbung der nRET zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass diese längliche Form durch ein Verschwimmen der Zellen bei der Fixierung entstanden ist. Die entkernten Zellen scheinen anfälliger für eine solche Verzerrung zu sein. Das tropfenförmige

Erscheinungsbild der Zellen an Tag 18 nach Filter in der Kultur LG veranschaulicht dieses Verschwimmen der Zellen.

Ab Tag 18 zeigt sich in beiden Kulturen ein charakteristisches segmentiertes Muster in den Zellen. Neben längs und quer verlaufenden strichförmigen Anordnungen zeigen die Zellen der HPL Kultur zusätzlich eine markante Akkumulation, sichtbar als grün leuchtenden Punkt.

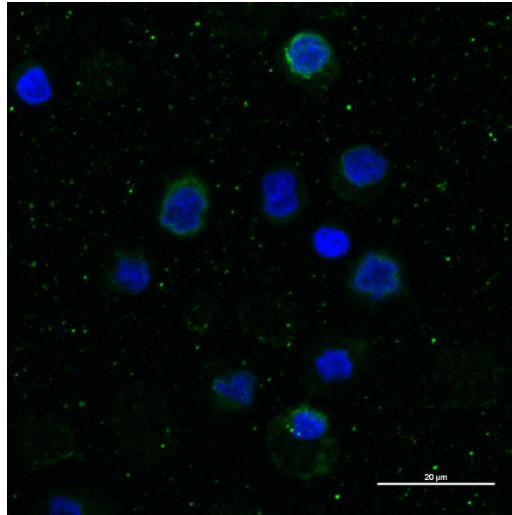
Die hier gezeigten Bilder von nativen Retikulozyten zeigen diffus angeordnete grüne Farbpunkte, die etwa die Form von Zellen erahnen lassen. Hierbei wird es sich um aufgeplatzte Zellen handeln, deren Zytoskelett im Zuge des Färbeprozesses zerstört wurde. Diese Färbung scheint nicht optimal funktioniert zu haben. Dennoch sind einzelne intakte Zellen mit typischem Muster der Spektrinfärbung zu erkennen.

Als Referenz der Spektrinfärbung von RBCs ist hier die Färbung von nRBCs auf unbeschichteten OT abgebildet. Da bei diesem Bild ein Zoom verwendet wurde, erscheinen die fertig entwickelten RBCs fälschlicherweise größer als ihre Vorläuferstadien. In den abgebildeten Zellen zeigt sich das charakteristische Muster der Spektrinfärbung in Form von längs und quer durch die Zelle laufenden strichförmigen Anordnungen. Die einzelnen kleinen grünen Punkte, die diffus über das ganze Bild verstreut sind, sind als Artefakte der Färbung zu deuten.

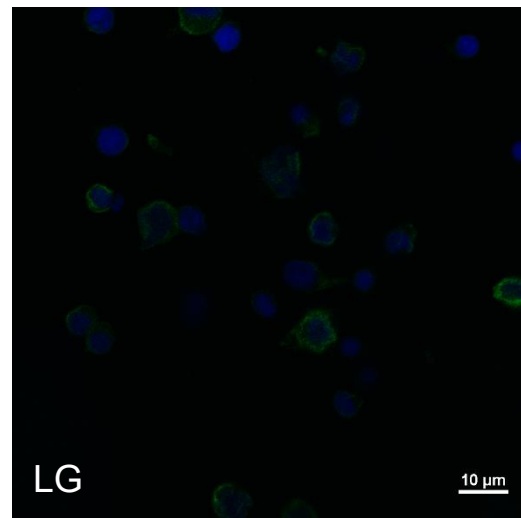
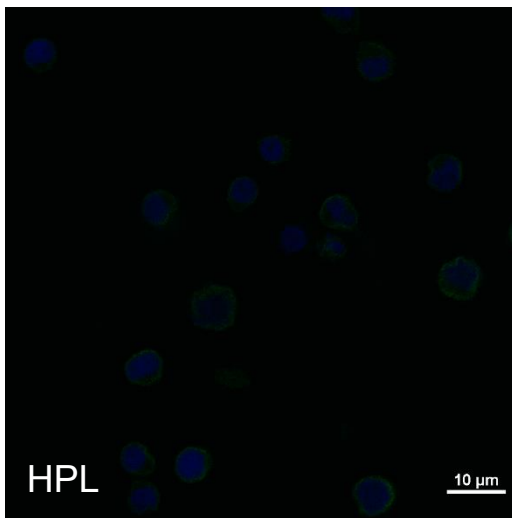
Die Zellen an Tag 18 zeigen in beiden Kulturen, verglichen mit den Referenzbildern der nRET und nRBCs Färbung, ein ähnliches Muster. Die noch etwas diffuse Anordnung der grünen Färbung an Tag 18 wird sich in weiteren Entwicklungsschritten noch zu dem genauen Muster verdeutlichen. Die markante punktförmige Ansammlung der Färbung ist nur in der HPL Kultur zu sehen. Hierbei könnte es sich um eine punktförmige Ansammlung des Spektrins nach erfolgter E nukleation handeln. Da jedoch weder in der gleichtägigen Vergleichskultur LG noch in den PLL Beschichteten Färbungen (siehe unten) eine solche Akkumulation zu sehen ist, wird es sich um ein Artefakt der Bildgebung handeln.

PLL

Tag 8



Tag 11



Tag 15

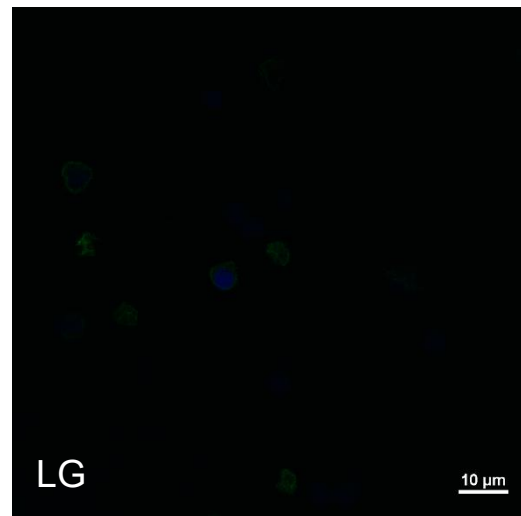
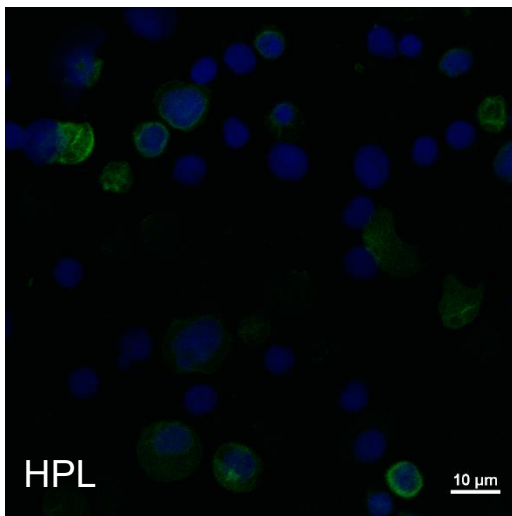


Abbildung 26 Spektrofärbung von PLL-beschichteten OT an den Tagen 8, 11 und 15, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20  $\mu\text{m}$ , an restlichen Tagen: 10  $\mu\text{m}$

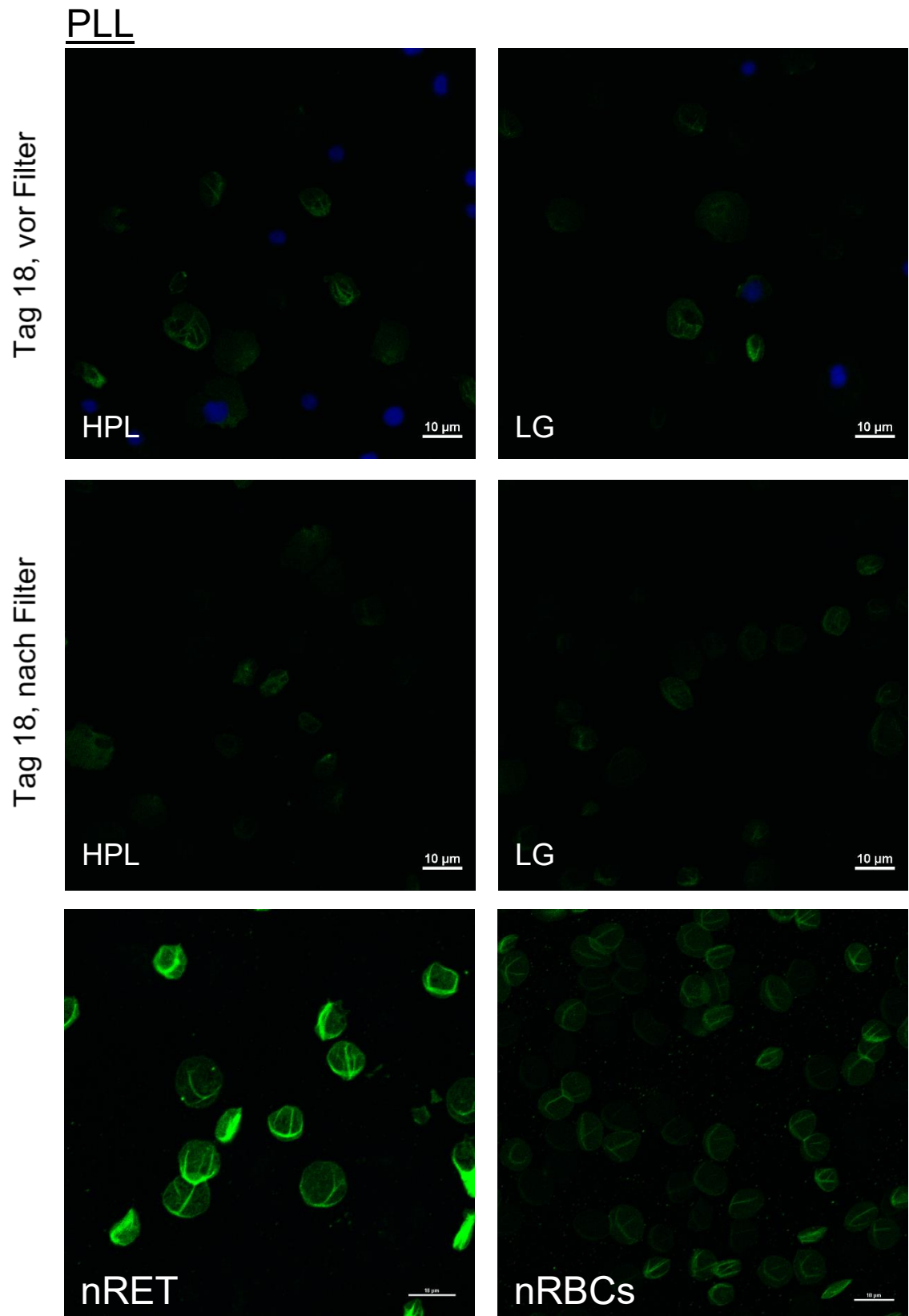


Abbildung 27 Spektrinfärbung von PLL-beschichteten OT an Tag 18 vor Filtration, nach Filtration, nRET und nRBCs, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste: 10 μm

In den Abbildungen 26 und 27 ist die Spektrinfärbung der beiden Kulturen HPL und LG auf PLL beschichteten Objektträgern an den Tagen 8, 11, 15 und 18 zu sehen. In der Abbildung 27 ist zudem die Spektrinfärbung von nativen Retikulozyten und nativen Erythrozyten abgebildet.

Da es sich auch hier bis Tag 8 um dieselben Kulturbedingungen handelt, ist wieder nur ein Bild angeführt. Im Vergleich zu den anderen Tagen sind die Zellen von Tag 8 am größten, was ihrem Differenzierungsstadium entspricht. Die blaue Kernfärbung sticht besonders hervor. Die Artefakte im Bildhintergrund sind durch eine unspezifische Anfärbung der Beschichtung entstanden.

Von Tag 8 bis Tag 18 vor Filter ist in beiden Kulturen eine Zunahme der Intensität des grüngefärbten Spektrins zu sehen. Eine Ausnahme stellt Tag 15 in der Kultur LG dar, weil hier nur eine schwache Grünfärbung an vereinzelten Stellen zu verzeichnen ist. An Tag 18 nach Filter ist das Spektrin- Signal schwächer zu erkennen als am Tag vor Filtration, was an der Qualität der Aufnahme und nicht an der Physiologie der Zelle liegen dürfte.

An Tag 15 in der HPL Kultur sind bereits vereinzelt Zellen mit charakteristischem Aussehen von RBCs zu erkennen (kein Zellkern und typisches segmentiertes Färbemuster). Im Vergleich dazu sind diese typischen Muster in der Kultur LG desselben Tages noch nicht zu erkennen. Dies könnte für eine schnellere Entwicklung der Zellen in der HPL Kultur sprechen.

Die blaue Kernfärbung ist in diesen mit PLL beschichteten Aufnahmen wieder bis Tag 18 vor Filtration eindeutig zu erkennen.

Im Vergleich zur PHAE Beschichtung bleiben die Zellen hier von Tag 8 bis 18 mehr in ihrer ursprünglichen rundlichen Form. Ebenso sind an Tag 18 vor Filtration bei der PLL Beschichtung viele separierte Zellkerne zu sehen. Dies könnte auf eine bessere Haftung der Zellen sowie der ausgestoßenen Zellkerne auf der PLL Beschichtung hindeuten.

An Tag 18 vor Filtration sind in beiden Kulturen charakteristische Muster in den Zellen zu sehen. In der LG Kultur erscheint zudem eine Zelle mit ausgestanztem Muster, welches vermutlich durch die Ausstoßung des Zellkerns entstanden ist.

Auch am Tag 18 nach Filter sind in der HPL Kultur 2 Zellen mit einem Loch zu sehen, welches womöglich durch die Entkernung entstanden ist.

Im Bild nRET erscheinen die Zellen deshalb größer, weil das Bild mit 2,392-fachem Zoom aufgenommen wurde. Tendenziell sind nRET aufgrund ihres geringeren Reifegrades aber auch noch etwas größer als nRBCs. Zu sehen sind hier runde Zellen mit typischen strichförmigen Anordnungen der grünen Spektrinfärbung.

Die als Referenz für reife RBCs hier gezeigten nRBCs weisen das typische Spektrin-Muster in Form von schmalen und deutlich verlaufenden strichförmigen Formationen auf.

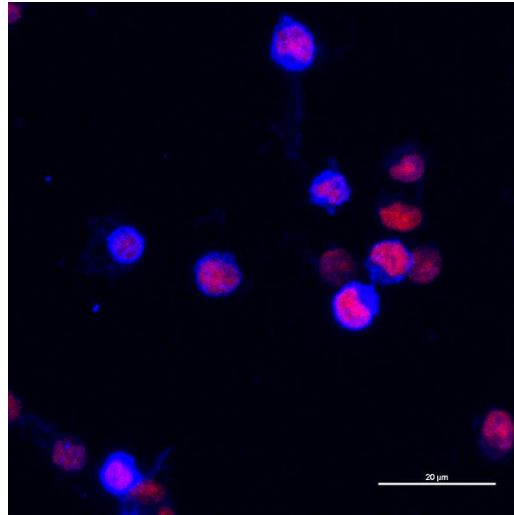
Im Vergleich der Bilder von Tag 18 vor und nach Filtration mit den Referenzbildern nRET und nRBCs sind in den Zellen schon die Ansätze der charakteristischen Spektrinfärbung von Erythrozyten zu erkennen. Die Zellen an Tag 18 weisen teilweise noch Strukturen der Färbung auf, die bei den nRET und bei den fertig entwickelten nRBCs nicht mehr zu erkennen sind, wie eben die Löcher, die vermutlich durch die Entkernung entstanden sind. Dies deutet darauf hin, dass diese Umstrukturierungen erst in weiterer Folge stattfinden.

#### 4.6 Bande 3-Färbung

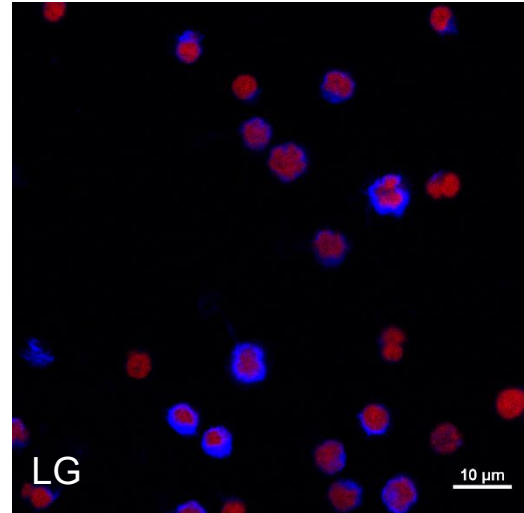
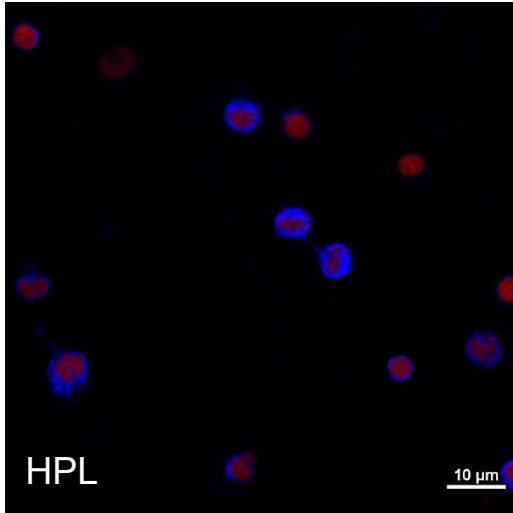
Für die Bande 3 Färbungen wurden die Zellen ebenfalls an den Tagen 8, 11, 15 und 18 aus der Zellkultur EPO 80 entnommen und anschließend den Färbeschritten der Bande 3 Färbung unterzogen. Da Bande 3 mit einem blauen Sekundärantikörper detektiert wurde, wurden hier die Zellkerne mit der roten Kernfärbung PI (Propidium Iodide) sichtbar gemacht. Die nachfolgenden Bilder wurden alle mit 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Ab Tag 15 ist die Färbung nur noch sehr schwach zu erkennen, deshalb wurde bei allen Bildern mit einem Bildbearbeitungsprogramm die Helligkeit und der Kontrast nach oben korrigiert. Alle nun folgenden Bilder wurden exakt gleich bearbeitet.

PHAE

Tag 8



Tag 11



Tag 15

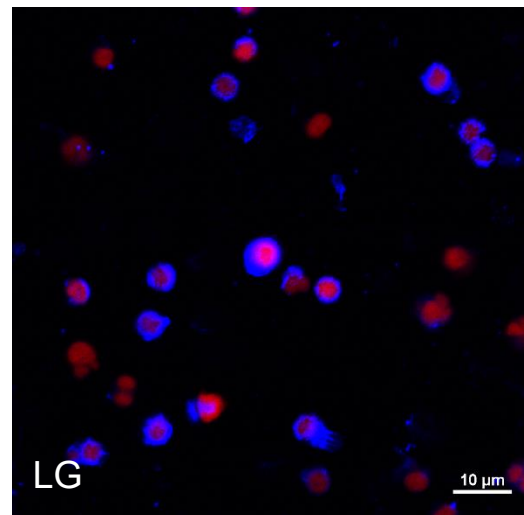
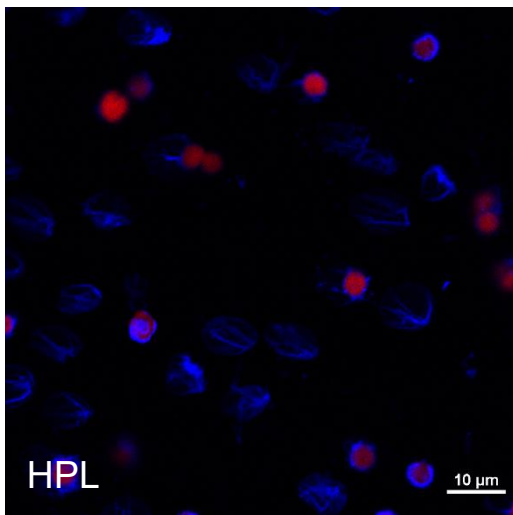


Abbildung 28 Bande 3-Färbung von PHAE-beschichteten OT an den Tagen 8, 11, 15, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20  $\mu\text{m}$ , an restlichen Tagen: 10  $\mu\text{m}$

## PHAE

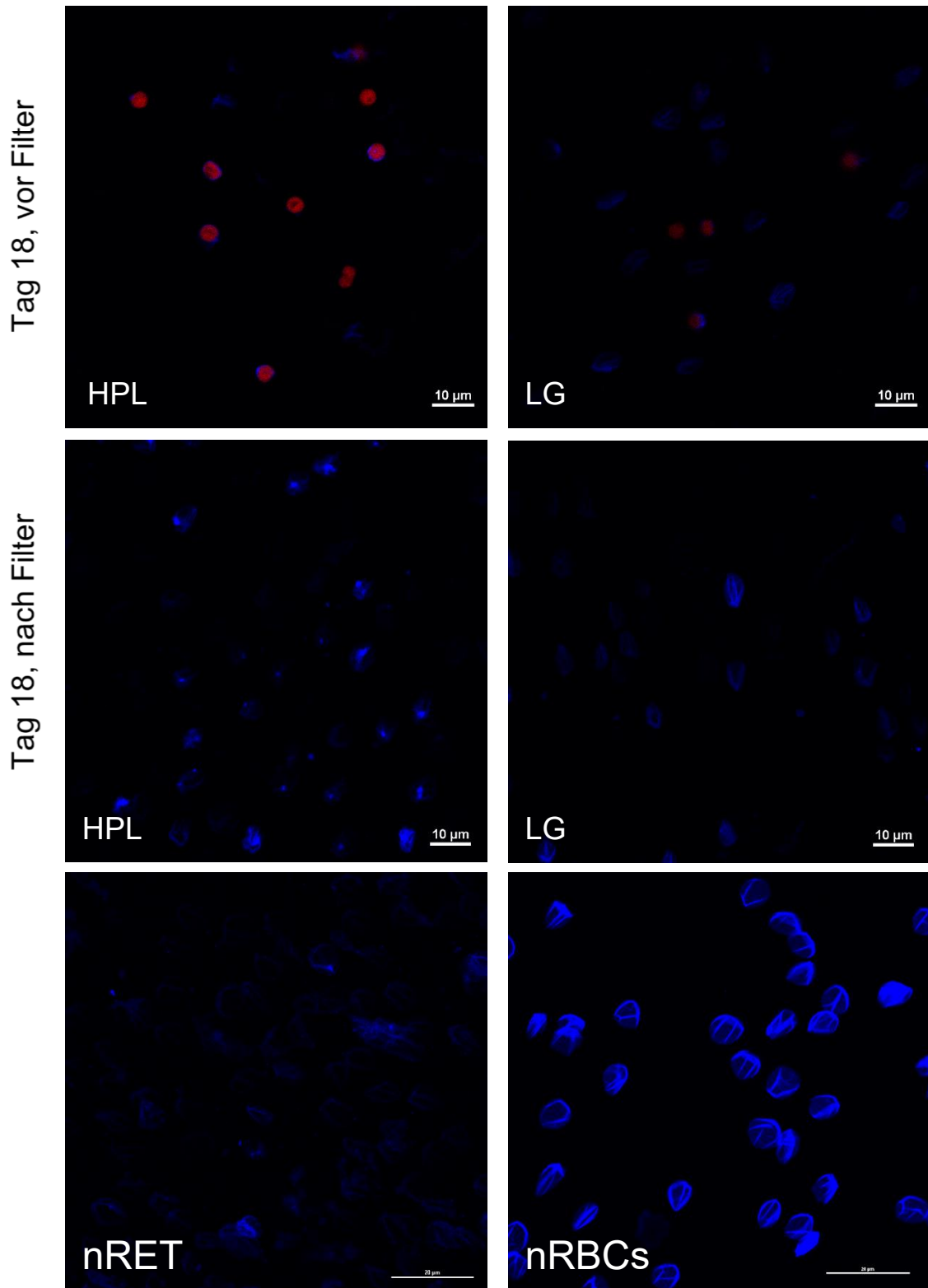


Abbildung 29 Bande 3-Färbung von PHAE-beschichteten OT am Tag 18 vor und nach Filtration, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur, Referenzbild von nRET auf PHAE-beschichteten OT und nRBCs auf unbeschichteten OT; Skalenleiste nRET und nRBCS: 20 µm, an Tag 18 vor und nach Filter: 10 µm

In den oberen Abbildungen 28 und 29 ist die Bande 3 Färbung der Zellen auf PHAE beschichteten Objektträgern an den jeweils angegebenen Tagen der beiden Kulturen sowie von nRET zu sehen. Das Vergleichsbild der nRBCs wurde auf unbeschichtetem Objektträger angefertigt.

Da die beiden Kulturen HPL und LG am Tag 8 noch ident sind, ist auch bei dieser Färbung an Tag 8 nur ein Bild angeführt. Entsprechend ihrem Entwicklungsstadium sind hier die größten Zellen zu sehen. Die blaue Bande 3 Färbung zeigt sich um die rot gefärbten Zellkerne. Bei den blauen Fäden und Punkten, die außerhalb der Zellen zu sehen sind, handelt es sich um Artefakte der Färbung.

An Tag 11 sind in beiden Kulturen neben Zellen mit breiten, blau gefärbten Anteilen, auch dicht konzentrierte kleine rote Punkte mit enganliegendem, schmalen blauen Randsaum oder ganz ohne blaue Anteile zu sehen. Bei diesen dicht konzentrierten Zellkernen wird es sich um Pyrenozysten handeln. Pyrenozysten sind ausgestoßene Zellkerne mit schmalen Rand aus Membran und Zytoplasma (5). Dieser schmale Rand legt sich dicht an den konzentrierten Zellkern und ist hier an Tag 11 in beiden Kulturen vereinzelt vorzufinden.

Weiters sind in der Kultur LG drei hantelförmige Zellkerne zu sehen. Da zu diesem Zeitpunkt noch teilungsfähige Zellen in der Kultur sind, besteht die Möglichkeit, dass auf diesem Bild ein solches Ereignis der Zellteilung aufgenommen wurde. Einer dieser hantelförmigen Zellkerne ist von einem breiten blauen Rand umhüllt, was für ein früheres noch teilungsfähiges Stadium spricht. Bei den anderen beiden hantelförmigen Zellkernen ist kaum oder nur wenig blauer Rand zu sehen. Folglich wird es sich um jeweils zwei zufällig übereinandergelegte, ausgestoßene Zellkerne handeln.

Am Tag 15 sind in der HPL Kultur auffällig viele entkernte Zellen zu sehen. Diese entkernten Zellen zeigen eine längliche Form und weisen eine strichförmige Anordnung der blauen Färbung auf. In der LG Kultur ist nur eine entkernte Zelle zu sehen. Bis auf deutlich kompaktere Zellkerne weisen die Zellen hier ein ähnliches Bild wie die Zellen an Tag 11 auf. In beiden Kulturen sind ausgestoßene Zellkerne zu sehen. Da in der HPL Kultur der Großteil der Zellen bereits entkernt ist, ist ein Entwicklungsvorsprung der Zellen in dieser Kultur anzunehmen.

An Tag 18 vor Filtration ist in beiden Kulturen die Bande 3 Färbung trotz Nachbearbeitung nur schwach zu erkennen. In der HPL Kultur sticht die Kernfärbung deutlich hervor. Hier sind viele Pyrenozyten, sprich dicht konzentrierte Zellkerne mit einem schmalen blauen Randsaum zu sehen. Entkernte Zellen sind hier nur vereinzelt zu erahnen. In der Kultur LG ist sowohl die Bande 3- als auch die Kernfärbung nur schwach ausgeprägt. Trotz der schwachen Färbung sind viele entkernte Zellen mit einer länglichen Form zu finden.

Nach Filtration sind in beiden Kulturen keine Zellkerne mehr auszumachen. In der HPL Kultur sind viele punktförmige Anordnungen der blauen Färbung zu sehen. Der Großteil dieser hell leuchtenden Punkte hat einen Hof aus weiteren blauen Strukturen um sich. Teilweise sind auch nur alleinstehende blaue Punkte sichtbar. Diese punktförmigen Anordnungen sind in diesem Ausmaß in keinem weiteren Vergleichsbild zu sehen. Hierbei muss es sich um ein Artefakt der Bildgebung handeln, durch welches die genaue Anordnung der Bande 3 Färbung nicht mehr nachzuvollziehen ist.

In der Kultur LG sind längliche Zellen mit strichförmigem Muster der Bande 3 Färbung zu erkennen.

Im Vergleichsbild der nRET sind stellenweise diffuse Blaufärbungen mit unklaren Grenzen auszumachen. Wahrscheinlich sind durch den Färbeprozess einige Zellen zerplatzt, wodurch das Bande 3 Protein über den gesamten Objektträger verschleppt wurde. Neben den kaputten Zellen sind einige scharf gefärbte, intakte Zellen festzustellen. Auch diese Zellen zeigen eine längliche Form. Die längliche Form der Zellen, wie sie speziell auf den PHAE beschichteten Objektträgern zu sehen ist, dürfte auf ein Verschwimmen der Zellen beim Fixierungsprozess zurückzuführen sein. Die entkernten Zellen scheinen empfänglicher für diese Verfälschung der Zellform.

Das Bild der nRBCs dient als Referenz der Bande 3 Färbung für RBCs. Diese Färbung wurde auf unbeschichtetem Objektträger angefertigt. Durch Heranzoomen erscheinen die hier abgebildeten Erythrozyten fälschlicherweise größer als ihre Vorläuferzellen. Die abgebildeten Zellen zeigen hier die typische strichförmige Anordnung der Bande 3 Färbung.

Aufgrund der schwachen Färbung an Tag 18 vor Filter, sowie der artifiziellen punktförmigen Mehranlagerung der blauen Färbung an Tag 18 nach Filter sind Vergleiche der Zellen der HPL Kultur mit den Zellen der nRET und nRBCs Färbung nur schwer möglich. Bemerkenswerterweise zeigen die bereits entkernten Zellen an Tag 15 schon eine große Ähnlichkeit mit den Vergleichszellen der nRET und nRBCs. Dies lässt daraufhin deuten, dass es bei den nachfolgenden Färbungen der HPL Kultur an Tag 18 (vor und nach Filter) Probleme gegeben hat.

Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen der Kultur LG an Tag 18, durch ihre typische strichförmige Anordnung ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den Vergleichszellen der nRET und nRBCs Färbung.

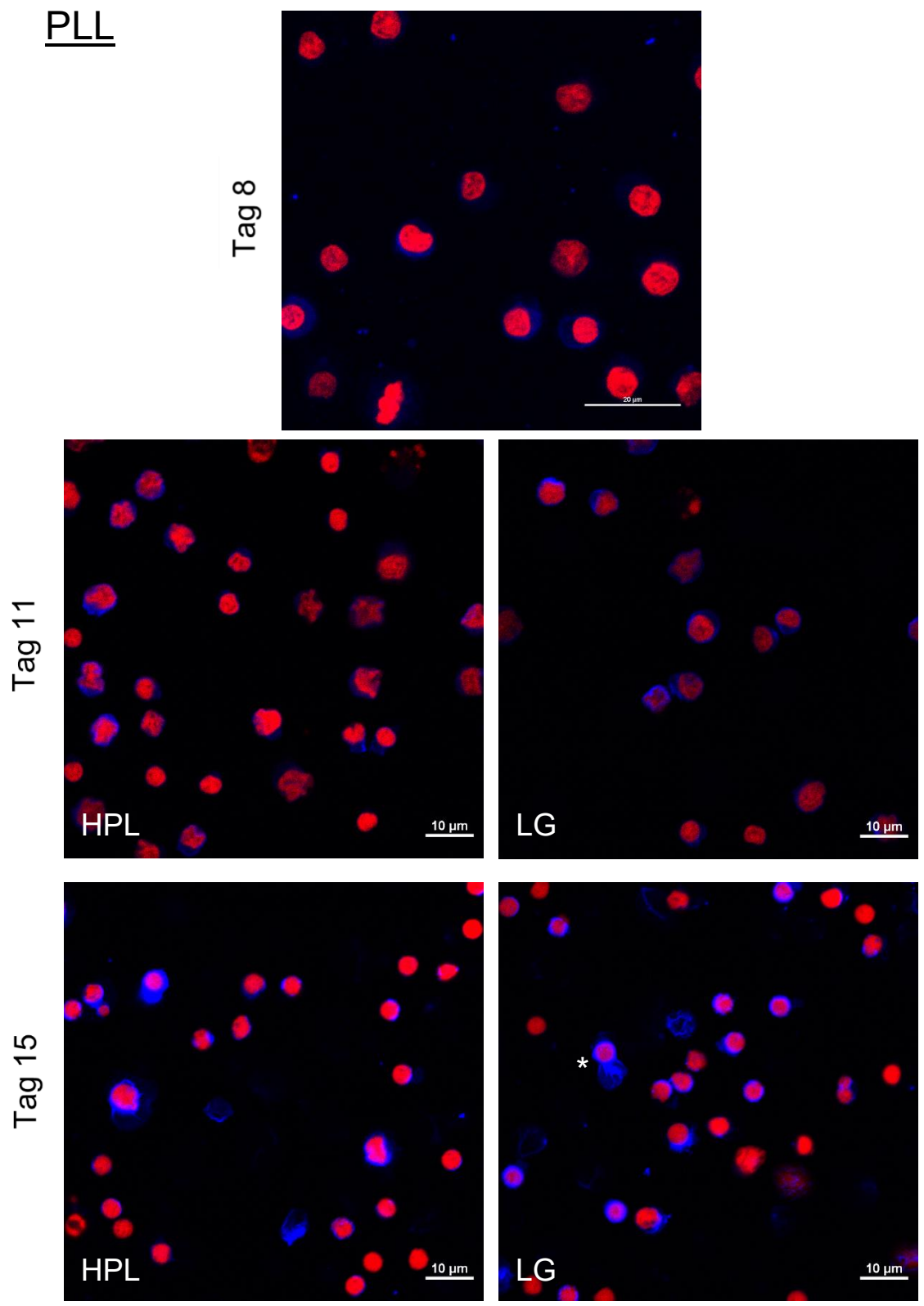


Abbildung 30 Bande 3-Färbung von PLL-beschichteten OT an den Tagen 8, 11, 15, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20  $\mu\text{m}$ ; an restlichen Tagen: 10  $\mu\text{m}$

## PLL

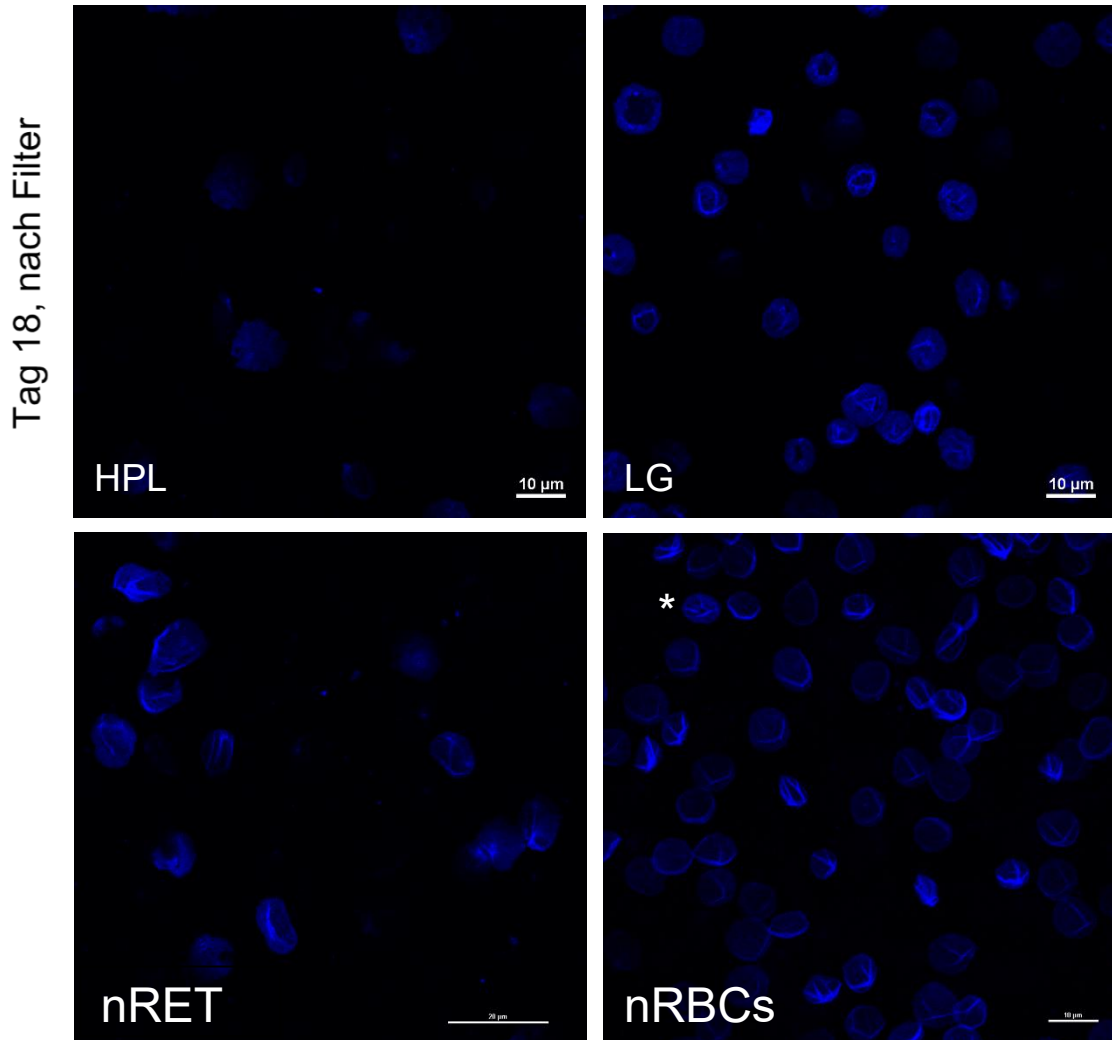


Abbildung 31 Bande 3-Färbung von PLL-beschichteten OT am Tag 18 nach Filtration, nRET und nRBCs, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste nRET: 20 µm; an den restlichen Tagen: 10 µm

In der Abbildung 30 und 31 sind die Bande 3 Färbungen der Zellen auf PLL-beschichteten Objektträgern an den jeweils angegebenen Tagen der beiden Zellkulturen zu sehen. Die unteren beiden Bilder der Abbildung 31 wurden von nativen Retikulozyten sowie von nativen Erythrozyten angefertigt.

Bereits im groben Überblick über die beiden Abbildung 30 und 31 fällt auf, dass die rote Zellkernfärbung an den Tagen 8 bis 15 in beiden Kulturen sehr dominant zum

Vorschein kommt. Im Vergleich zu den PHAE-beschichteten Färbungen (siehe oben) ist hier bei der PLL Beschichtung die Zellkernfärbung viel intensiver.

An Tag 8 ist, da die beiden Zellkulturen noch die idente Zusammensetzung haben, wieder nur ein Foto abgebildet. Ihrer Entwicklungsstufe entsprechend sind die Zellen hier noch deutlich größer als an den darauffolgenden Tagen.

Durch die starke Kernfärbung und die Nachbearbeitung sind die blauen Anteile, die sich um jeden einzelnen Zellkern befinden, bei einigen Zellen nur schwer zu erkennen. Bei den kleinen, hell leuchtenden Punkten außerhalb der Zellen handelt es sich um unspezifische Anlagerung der Färbung auf der Beschichtung.

An Tag 11 ist in beiden Kulturen eine Zunahme der blauen Färbung zu beobachten. Die Zellkerne der Kultur HPL erscheinen dichter konzentriert. Auch hier ist durch eine Überlagerung der starken Kernfärbung bei manchen Zellen der blaue Randsaum nur schwer zu erkennen. In der Kultur LG hingegen ist um jeden Zellkern die blaue Färbung klar ersichtlich. Die dichte Konzentrierung der Zellkerne in der HPL Kultur könnte als Entwicklungsvorsprung dieser Zellen gewertet werden. Da aber bereits an Tag 8 einzelne Zellkerne ein ähnliches dicht konzentriertes Bild zeigen, ist dieser Umstand eher auf eine Überlagerung der intensiven Kernfärbung zurückzuführen. Folglich ist anzunehmen, dass die Färbung der LG Kultur an diesem Tag besser funktioniert hat.

An Tag 15 sind in beiden Kulturen nahezu alle Zellkerne zu kleineren, runden und kompakten Gebilden konzentriert. Um diese dicht konzentrierten Zellkerne ist, besonders in der Kultur LG, ein schmaler, dicht anliegender blauer Rand zu sehen. Hierbei wird es sich um ausgestoßene Pyrenozysten handeln. Im Vergleich zu Tag 11 ist in beiden Kulturen eine deutliche Zunahme der blauen Färbung zu verzeichnen.

In der Kultur HPL sind zwei bereits entkernte Zellen zu sehen. In der Kultur LG wurde eine Zelle direkt bei der Entkernung aufgenommen (markiert mit weißem Stern\*). Hier wandert der Zellkern mit samt schmalen blauen Randsaum an das seitliche Ende der Zelle. Von dort aus wird er in weiterer Folge ausgestoßen werden. In der Mitte des Bildes ist eine Zelle nach erfolgter Eukleation zu sehen. Sie weist ein lochartiges Konstrukt der blauen Färbung auf.

Bei der Färbung an Tag 18 vor Filtration ist ein Fehler unterlaufen. Da auf den Bildern beider Kulturen nur die rote Kernfärbung zu sehen war, werden diese Bilder hier nicht dargestellt.

An Tag 18 nach Filtration sind erwartungsgemäß keine Zellkerne mehr zu sehen. In der LG Kultur ist die blaue Färbung viel deutlicher zu erkennen. Viele dieser Zellen zeigen ein großes Loch, das wie ausgestanzt wirkt. Diese Löcher könnten durch die Ausstoßung des Zellkerns entstanden sein. Weitere Zellen zeigen eine dreieckige Anordnung der blauen Färbung, die auf eine Umordnung der Membranbestandteile als Reparatur der ausgestanzten Löcher hindeuten könnten. In manchen Zellen ist auch eine strichförmige Anordnung der blauen Färbung zu sehen. In der HPL Kultur sind wenige runde Zellen mit gleichmäßig über die Zelle verteilten blauen Anteilen auszumachen. Zwei dieser Zellen weisen seitlich eine kleine, runde Verdichtung der Färbung auf, die vermutlich ebenso durch den Entkernungsprozess entstanden ist. Da es sich hierbei um kleinere Löcher als in der Vergleichskultur LG handelt, ist ein weiter fortgeschrittener Umbauprozess anzunehmen.

Das Bild der nRET ist als Referenz für die Bande 3 Färbung von Retikulozyten abgebildet. Hier sind Zellen mit strichförmiger Anordnung der blauen Färbung zu sehen. Diese Zellen weisen eine große Ähnlichkeit mit den Zellen von Tag 18 der Kultur LG auf. Einige Zellen weisen hier ebenso eine lochartige Anordnung der Färbung auf. Allerdings ist diese Anordnung viel diskreter als an Tag 18, was darauf hindeutet, dass der Umbaumechanismus hier bereits fortgeschritten ist.

Das hier gezeigte Bild der nRBCs dient als Referenz für die Bande 3 Färbung von RBCs. Hier ist das typische strichförmige Muster der Färbung zu erkennen. Dieses Muster zeigt sich als längs und quer verlaufende Anordnungen, die sich in den meisten Zellen auch kreuzen. Auch bei dieser Färbung ist eine Zelle mit einem kleinen Loch zu sehen (Mit \* markiert). Hierbei könnte es sich um einen jungen Erythrozyten handeln, bei dem dieser Umbauprozess nach erfolgter Entkernung noch nicht abgeschlossen ist.

Die Bilder beider Kulturen an Tag 18 zeigen Zellen, die große Ähnlichkeit mit den Zellen der nRET Färbung aufweisen. Obwohl die Löcher in den Zellen der HPL Kultur viel diskreter wirken, zeigen einige Zellen der Kultur LG das typische strichförmige Muster der nRBCs Färbung. Es ist anzumerken, dass in der Färbung

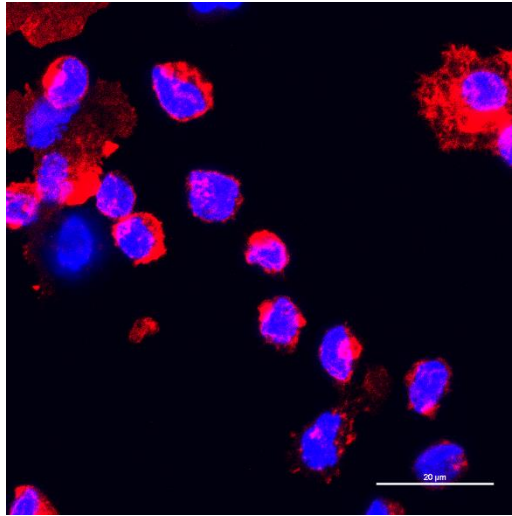
der HPL Kultur deutlich weniger Zellen abgebildet sind. Diese Umstände erschweren es eine Aussage über einen möglichen Entwicklungsvorsprung einer der beiden Kulturen zu treffen.

#### 4.7 Aktinfärbung

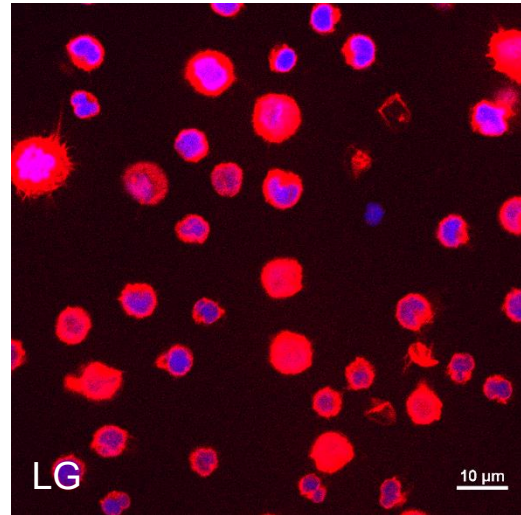
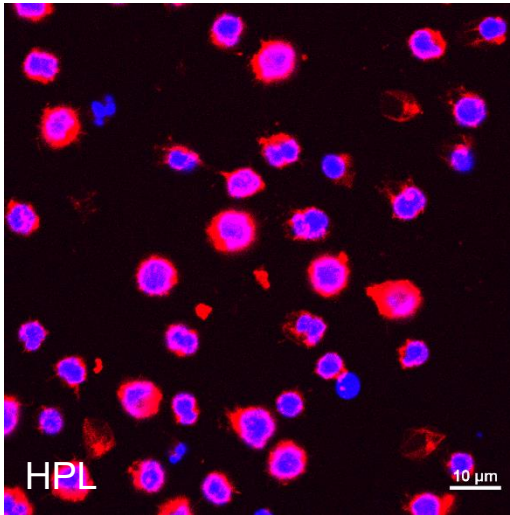
Für die Aktinfärbung wurden die Zellen ebenfalls an den Tagen 8, 11, 15 und 18 aus den Zellkulturen EPO 80 HPL und EPO 80 LG entnommen und den Färbeschritten der Aktinfärbung unterzogen. Die Färbungen wurden mit PHAE- und PLL- beschichteten Objektträgern durchgeführt. Die folgenden Bilder wurden alle mit 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Da es an den späteren Tagen zu einem Ausbleichen der Färbung gekommen ist sind die Strukturen der Aktinfärbung nur schwer zu erkennen. Deshalb wurde mit einem Bildbearbeitungsprogramm der Kontrast und die Helligkeit nach oben korrigiert.

# PHAE

Tag 8



Tag 11



Tag 15

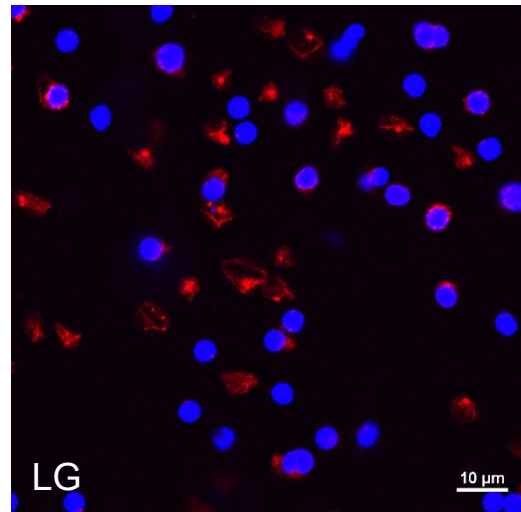
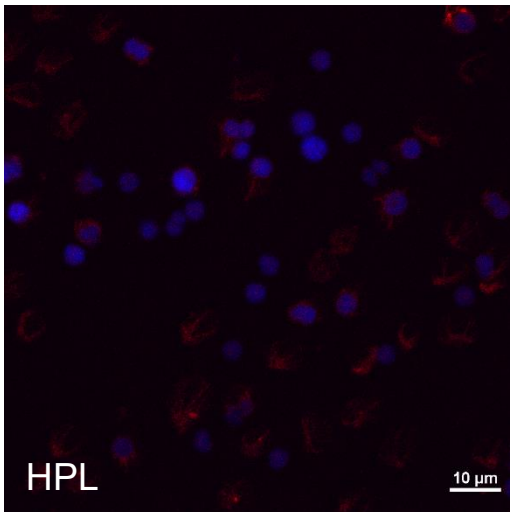


Abbildung 32 Aktinfärbung von PHAE-beschichteten OT an den Tagen 8, 11, 15, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20  $\mu\text{m}$ ; an den restlichen Tagen: 10  $\mu\text{m}$

# PHAE

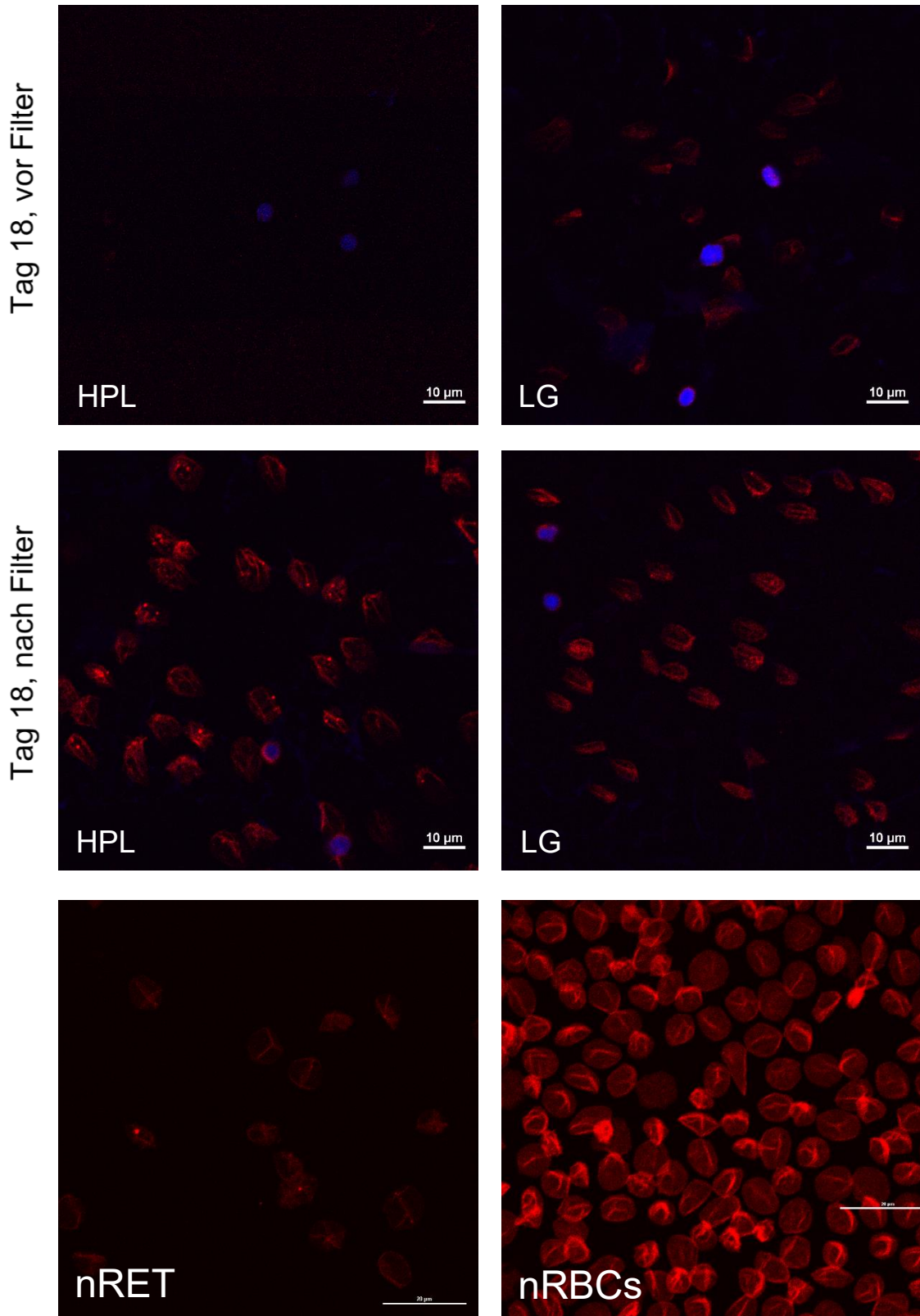


Abbildung 33 Aktinfärbung von PHAE-beschichteten OT m Tag 18 vor Filtration, nach Filtration und nRET, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an den Tagen 18: 10 µm, bei nRET und nRBCs: 20 µm

Die oberen Abbildungen 32 und 33 zeigen die Aktinfärbung an den angegebenen Kulturtagen mit PHAE beschichteten Objektträgern. In der unteren Abbildung 33 ist zum Vergleich die Färbung von nRET und nRBCs dargestellt. Die Färbung der nRBCs wurde auf unbeschichteten Objektträgern durchgeführt.

Die Bilder an Tag 8 und Tag 11 leuchten aufgrund der Nachbearbeitung sehr intensiv. Auch ohne Nachkorrektur wären die rotgefärbten Strukturen in den Bildern dieser Kulturtage gut erkennbar. Um einen validen Verlauf der Entwicklung und Umstrukturierung des Zytoskelettproteins Aktin in den Zellen zu erlangen, wurden jedoch alle Bilder exakt gleich bearbeitet.

Da die beiden Kulturen an Tag 8 noch ident sind, ist auch bei dieser Färbung an Tag 8 nur ein Bild dargestellt. Dem Entwicklungsstadium der Zellen entsprechend sind hier die größten Zellen zu sehen. Um große blaugefärbte Zellkerne sind die Aktin positiven Zellbestandteile in rot zu sehen. Durch den Färbevorgang sind in diesem Bild einige Zellen zerstört worden, was an den versprungenen und teilweise klumpig erscheinenden, roten Anteilen zu erkennen ist. Im Vergleich dazu ist die Zelle im Bild rechts oben, mit dem gleichmäßigen roten Muster um den Zellkern, jedoch intakt und zeigt das fadenförmige Verteilungsmuster des Aktins in diesem frühen Entwicklungsstadium.

An Tag 11 ist um die blauen Zellkerne ein gleichmäßiger roter Saum zu erkennen. Die Zellkerne erscheinen kleiner und kompakter als an Tag 8. In beiden Kulturen sind bereits entkernte Zellen auszumachen. Diese weisen ein strichförmiges Muster der roten Färbung auf, wobei in jeder entkernten Zelle eine punktförmige Ansammlung der roten Färbung zu sehen ist. Bei diesen punktförmigen Ansammlungen des F-Aktins in den entkernten Zellen könnte es sich um ein Überbleibsel des Contractile Actomyosin Ring (CAR) handeln. Der CAR bildet sich in der im Entkernungsprozess befindlichen Zelle. Über diesen Ring wird durch Kontraktion der Aktin- und Myosinfasern der Kern vom Rest der Zelle separiert (5,36).

An Tag 15 sind in beiden Kulturen ungefähr gleich viele entkernte Zellen zu sehen. Im Vergleich zu Tag 11 hat die Intensität und die Breite der roten Aktinfärbung um die Zellkerne abgenommen. In beiden Kulturen sind viele blau gefärbte Zellkerne ohne rote Anteile zu erkennen. Hierbei handelt es sich um von den Zellen losgelöste

Zellkerne. Die entkernten Zellen zeigen eine strichförmige Anordnung sowie eine punktförmige Ansammlung der Aktinfärbung. Die Färbung der LG Kultur erscheint durch die Nachbearbeitung insgesamt heller, dadurch sind auch die punktförmigen Anordnungen besser zu erkennen.

An Tag 18 vor Filtration hat die Aktinfärbung der HPL Kultur nicht funktioniert. Hier sind nur drei blau gefärbte Zellkerne zu sehen. In der Färbung der LG Kultur hingegen sind viele entkernte Zellen mit charakteristischem streifenförmigem Muster zu erkennen. In einigen Zellen ist auch eine punktförmige Ansammlung der Aktinfärbung ersichtlich. Im Vergleich zu den Färbungen der vorherigen Tage wird diese punktförmige Ansammlung kleiner, was auf eine Rückbildung des CAR hindeuten könnte.

Nach Filtration sind in beiden Färbungen, neben vielen entkernten Zellen, auch zwei Zellen mit Zellkern zu sehen. Die entkernten Zellen zeigen wieder das typische strichförmige Muster der Aktinfärbung. In beiden Kulturen sind auch hier punktförmige Ansammlungen der Färbung in den Zellen zu sehen, wobei diese in der HPL Kultur deutlicher zu sehen sind. Obwohl diese deutlich sichtbaren punktförmigen Anordnungen auf einen schnelleren Abbau der punktförmigen Strukturen in den LG Kulturen hindeuten könnten, sind sie eher darauf zurückzuführen, dass die Färbung der HPL Kultur besser funktioniert hat und durch die zusätzliche Nachbearbeitung sich die Strukturen noch deutlich besser hervorheben konnten.

Wie schon in den vorherigen Färbungen der anderen Marker auf PHAE beschichteten Objektträgern zu sehen war, ist auch bei dieser Färbung eine längliche Form der Zellen nach Entkernung zu verzeichnen. Diese verzerrte Zellform ist hierbei ebenfalls auf ein Verschwimmen der Zellen bei der Fixierung zurückzuführen.

In der Färbung der nRET ist eine noch exaktere strichförmige Anordnung der Aktinfärbung als an den Färbungen an Tag 18 zu erkennen. Auch hier ist in einigen Zellen eine punktförmige Ansammlung der roten Färbung zu sehen.

Die Färbung der nRBCs dient als Referenz der Aktinfärbung von RBCs. In dieser Färbung ist das charakteristische strichförmige Farbmuster der Aktinfärbung zu sehen.

Vergleicht man die beiden Kulturen miteinander, so ist mit Ausnahme der Färbung der HPL Kultur vor Filtration, bei beiden Kulturen eine ähnliche Entwicklung und Umstrukturierung der Aktinfärbung zu verzeichnen. Die punktförmigen Anordnungen in den Zellen sind, je nachdem welche Färbung besser funktioniert hat, entweder besser in der LG Kultur oder besser in der HPL Kultur zu sehen. Die strichförmige Anordnung in den Zellen an Tag 18 beider Kulturen ist noch nicht so exakt aufgebaut wie es in der Färbung der nRET zu sehen ist. Dies deutet darauf hin, dass die genaue Umstrukturierung noch in späterer Folge stattfinden und somit das typische Muster, wie in der Färbung der nRBCs zu sehen ist, entstehen wird.

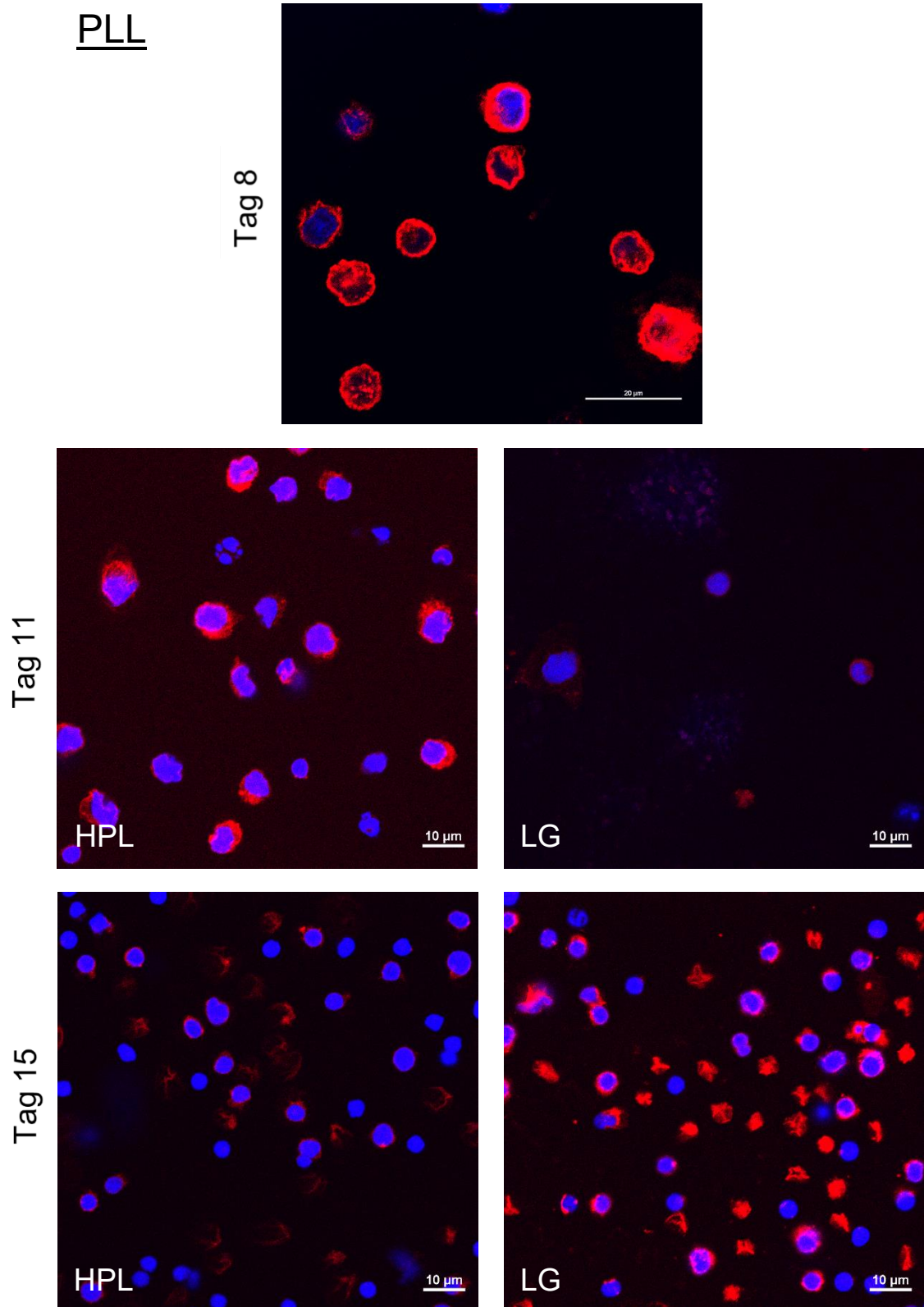
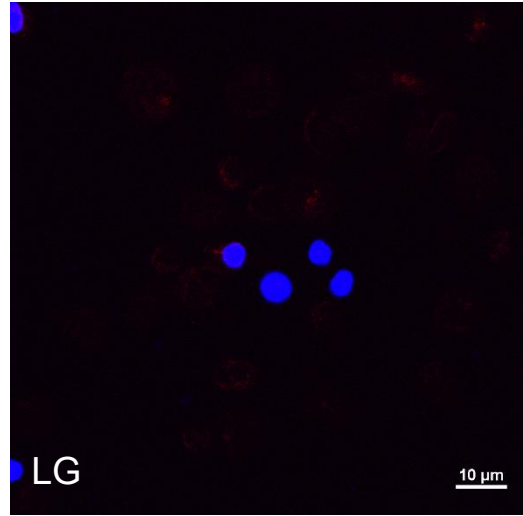
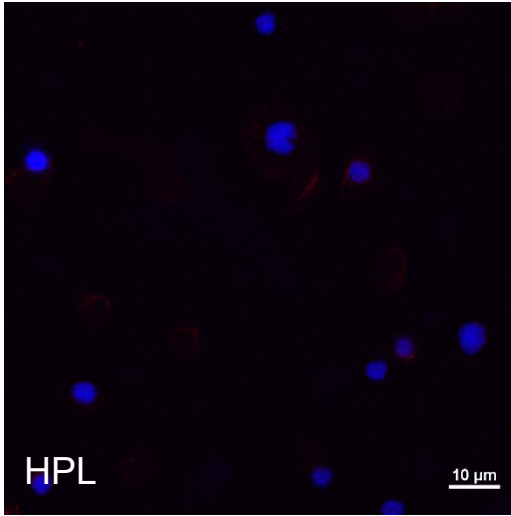


Abbildung 34 Aktinfärbung von PLL- beschichteten OT an den Tagen 8, 11, 15; links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste an Tag 8: 20  $\mu\text{m}$ ; an restlichen Tagen: 10  $\mu\text{m}$

PLL

Tag 18, vor Filter



Tag 18, nach Filter

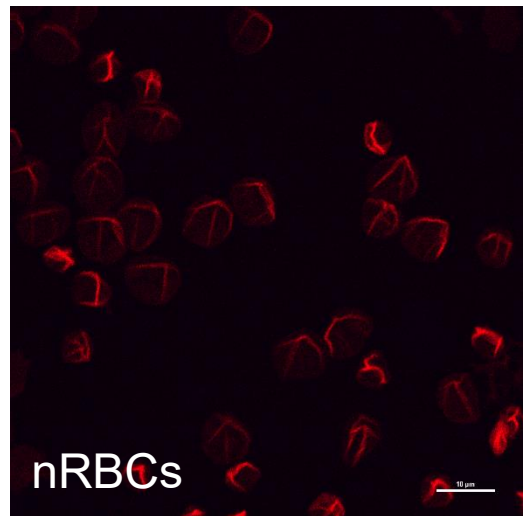
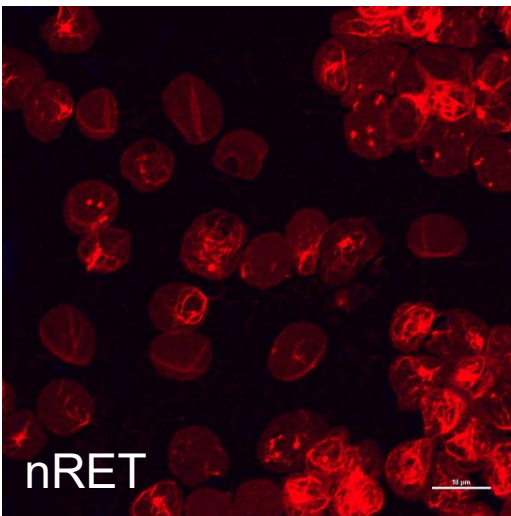
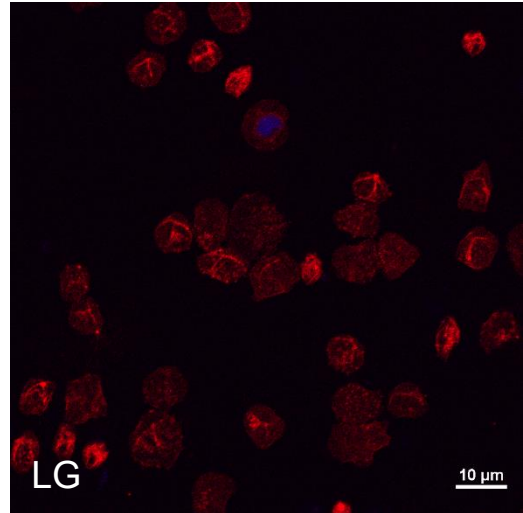
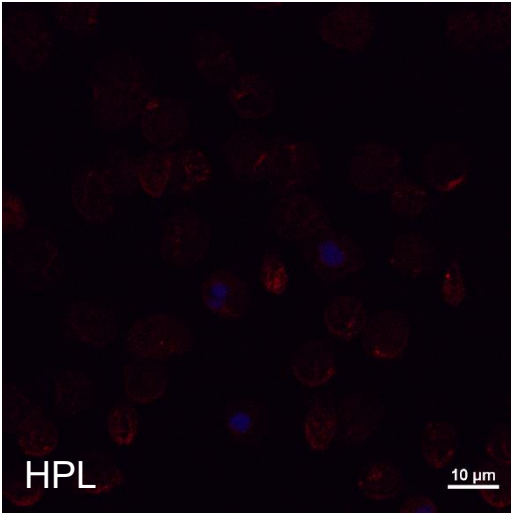


Abbildung 35 Aktinfärbung von PLL-beschichteten OT am Tag 18 vor Filtration, nach Filtration und nRET, links HPL-Kultur, rechts LG-Kultur; Skalenleiste: 10 μm

In der Abbildung 34 und 35 ist die Aktinfärbung der beiden Zellkulturen HPL und LG sowie die Färbung von nRET auf PLL beschichteten Objektträgern abgebildet. Die Färbung der nRBCs wurde auf unbeschichteten OT durchgeführt.

Aufgrund der identen Zusammensetzung der beiden Kulturen wird hier an Tag 8 wieder nur ein Bild gezeigt. Im Gegensatz zur PHAE Beschichtung sind an Tag 8 die Aktin positiven Strukturen deutlich um die blauen Zellkerne angeordnet. Entsprechend ihrer frühen Entwicklungsstufe sind an Tag 8 die größten Zellen zu sehen.

An Tag 11 sind in der Kultur LG einige zerplatzte Zellen zu sehen, die den Färbeprozess nicht standhalten konnten. Neben diesen Zellen sind wenige intakte Zellen mit schmalem rotem Rand zu erkennen. Zudem ist eine Ansammlung der roten Färbung ohne blaue Anteile sichtbar. Hierbei könnte es sich um eine bereits entkernte Zelle handeln. In Anbetracht des Zustands der Nachbarzellen ist ein Artefakt der Färbung durch eine zerstörte Zelle jedoch eher anzunehmen.

In der HPL Kultur ist die Aktinfärbung um die blauen Zellkerne deutlich zu erkennen. Verglichen mit Tag 8 ist eine Abnahme der Breite sowie der Intensität der roten Färbung zu verzeichnen. In diesem Bild fällt auf, dass sich die Aktin positiven Strukturen seitlich am blaugefärbten Zellkern vermehrt zeigen. Hierbei könnte es sich um die beginnende Ansammlung des Aktins zur Bildung des CAR handeln (36).

An Tag 15 sind in beiden Kulturen viele entkernte Zellen zu sehen. Die entkernten Zellen weisen neben einer strichförmigen Anordnung auch eine punktförmige Mehransammlung der Aktinfärbung auf. Bei der punktförmigen Ansammlung kann es sich, wie bei der PHAE Beschichtung bereits beschrieben wurde, um ein Überbleibsel des CAR handeln. Insgesamt hat die Färbung der Kultur LG an Tag 15 besser funktioniert. Zudem kommt durch die zusätzliche Nachbearbeitung die Färbung in den entkernten Zellen noch heller zum Vorschein, wodurch die genaue Anordnung des Aktins verschleiert wird. Bei den blauen Kernen ohne rotgefärbte Strukturen, welche in beiden Kulturen zu erkennen sind, handelt es sich um ausgestoßene Zellkerne.

Erwähnenswert ist, dass die Aktinfärbung an Tag 18 vor Filtration in beiden Kulturen nicht funktioniert. Trotz Nachbearbeitung ist die genaue Anordnung des Aktinmusters nicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte allerdings an Tag 18

nach Filtration durch die Nachbearbeitung die Aktinfärbung sichtbar gemacht werden.

Die entkernten Zellen beider Kulturen präsentieren sich mit einer strichförmigen Anordnung der Aktinfärbung. Auch hier sind in einigen Zellen die punktförmigen Mehranlagerungen zu sehen. Im Vergleich der beiden Kulturen zueinander hat die Färbung der LG Kultur besser funktioniert und kommt mit Hilfe der Nachbearbeitung somit noch besser zum Vorschein.

In einer Gesamtschau behalten die entkernten Zellen bei der PLL-Beschichtung im Vergleich zur PHAE-Beschichtung ihre runde Zellform.

Im Bild der nRET ist eine exakte strichförmige Anordnung der Färbung zu sehen. Auch hier sind in den Zellen punktförmige Anordnungen der Färbung zu erkennen. Stellenweise kleben die Zellen dicht aneinander, wodurch es zu einer Überlagerung der roten Färbung kommt. Da bei diesem Bild ein Zoom angewendet wurde, erscheinen die Zellen etwas größer.

Die Färbung der nRBCs dient wiederum als Vergleich für die Aktinfärbung von RBCs. Die hier dargestellten Zellen zeigen mit einem exakt verlaufenden strichförmigen Muster das typische Bild der Aktinfärbung von RBCs.

Zusammenfassend gilt festzuhalten, dass aufgrund des abwechselnden Ausbleichungsgrad der Färbung an den einzelnen Tagen Vergleiche der beiden Kulturen nur schwer zu treffen sind. An Tag 15 sind in beiden Kulturen ungefähr gleich viele entkernte Zellen zu sehen, was für eine gleichmäßig ablaufende Entwicklung der beiden Kulturen spricht. Das Endergebnis an Tag 18 nach Filtration ist, auch wenn es in der LG Kultur aufgrund schwächeren Ausbleichens besser zu sehen ist, in beiden Kulturen gleich. Hier zeigen sich die entkernten Zellen mit einer strichförmigen Anordnung und teils auch punktförmiger Ansammlung. Verglichen mit den Referenzfärbungen der nRET und nRBCs ist klar ersichtlich, dass noch weitere Umstrukturierungen folgen müssen, um die exakten Anordnungen des Aktins zu erreichen.

## 5. Diskussion

Bluttransfusionen spielen in der modernen Medizin eine bedeutende Rolle (1,2). Die künstliche Herstellung von roten Blutzellen für Bluttransfusionen könnte Engpässe in der Versorgung verhindern sowie helfen einen weiteren Schritt Richtung personalisierte Medizin zu machen (4,5). Um künstlich erzeugte rote Blutzellen transfundieren zu können, müssen diese in Form und Funktion dem Original entsprechen (1). Durch die Optimierung bestehender Kultursysteme, sowie der Erforschung neuer Nährmedien wird versucht, Zellen zu erzeugen, die den hohen Qualitätsansprüchen für eine Transfusion genügen (1,2). So konnte *Bernecker et al.* in ihrer Arbeit zeigen, dass der Zusatz von Lipiden im Kulturmedium zu einer erhöhten mechanischen Stabilität der *ex vivo* produzierten Zellen führt (6). Wesentlich für die mechanische Stabilität und die Verformungseigenschaften der Erythrozyten ist ihr Membranzytoskelett (7,8). Das Zytoskelett der Zellen steht mit der Membran in Verbindung und kann so die notwendige Verformbarkeit für die Funktion und das Überleben der roten Blutzellen im Blutkreislauf sicherstellen (8).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es Unterschiede im Membranzytoskelett von *ex vivo* in unterschiedlichen Medien generierten und nativen roten Blutzellen gibt. Die zwei Erythropoesekulturmodelle (LG und HPL) unterscheiden sich hauptsächlich im Lipidgehalt. Dem Nährmedium der HPL Kultur wurde, ab Tag 8 der Zellkultur, 5 % humanes Plättchenlysate hinzugefügt, das LG Medium hält die Zellen in einem eher lipidarmen Medium. Für die Untersuchungen wurden Spektrin, Ankyrin, Bande 3 und Aktin als Hauptvertreter des erythroiden Membranzytoskeletts ausgewählt. Für diese Membran- und Zytoskelettproteine wurden fluoreszenzbasierte immunzytochemische Färbemethoden etabliert und mittels entsprechender Bildgebung ausgewertet. Somit konnten die *ex-vivo* in zwei verschiedenen Kulturmedien generierten roten Blutzellen visuell miteinander, sowie mit nativen Retikulozyten und Erythrozyten verglichen werden.

Zu Beginn wurden die Erythrozyten mittels Zytospin auf die Objektträger geschleudert. Speziell für die weniger robusten Vorstufen zeigte sich die Sedimentation der Zellen auf den Objektträgern als die schonendere und somit vorteilhaftere Methode. Um ein Fortschwemmen der Zellen durch die vielen Färbeschritte zu verhindern, wurden zwei Beschichtungen (PLL und PHAE)

durchgeführt. Generell haben beide Beschichtungen funktioniert, PHAE zeigte jedoch teilweise Artefakte, wie verwaschene und verzerrte Bilder, wodurch final die PLL Beschichtung zu favorisieren ist. Die Kombination aus einer 1:200 Verdünnung des Erstantikörpers sowie eine 1:1000 Verdünnung des Zweitantikörpers, sowie eine Inkubationszeit über Nacht lieferten die besten Ergebnisse. Für Aktin etablierten sich 60 Minuten. Um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern, ist jegliche Lichtexposition der Färbung zu vermeiden. Dies gilt für den gesamten Färbevorgang sowie für die Lagerung und auch die Auswertung am Mikroskop. Eine unverzügliche Auswertung der Färbung ist zu empfehlen.

Die Ankyrinfärbung der ex vivo generierten Zellen zeigte eine stetige Zunahme der grünen Färbung, sprich eine vermehrte Expression von Ankyrin, von Tag 8 bis 18. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen von *Hu Jingping*, welcher in seiner Arbeit eine kontinuierliche Steigerung des Expressionsniveaus von Ankyrin in der Entwicklung vom Proerythroblasten hin zum Retikulozyten feststellen konnte (35). Die gleiche Beobachtung konnte *Ke Chen* auch in der Erythropoese von Mäusen feststellen (37). In den HPL Kulturen beider Beschichtungen sind jeweils an Tag 11 bereits die ersten losgelösten Zellkerne ohne grün gefärbte Anteile zu erkennen. Während der E nukleation wird Ankyrin im sich vom Zellkern trennenden Retikulozyten zurückgehalten, sprich der Zellkern wird ohne Ankyrinanteile vom Rest der Zelle separiert (34). Dadurch, dass in den Vergleichstagen der Kultur LG keine derartig separierten Zellkerne zu erkennen sind, wird der bereits vorher in der „Kontrolle der Differenzierung“ beschriebene Entwicklungsvorsprung der HPL Kultur auch in dieser Färbung visualisiert. Vergleicht man die Zellen beider Kulturen an ihren Endtagen 18 mit den nativen Retikulozyten und Erythrozyten, so sind teilweise Zellen mit großer Ähnlichkeit zu sehen. Hier sei angemerkt, dass die Entwicklung des Erythrozyten in der Stufe des Retikulozyten noch nicht beendet ist. Die finalen Entwicklungsschritte können erst in der Blutzirkulation stattfinden, da neben intrinsischen Faktoren auch extrinsische Prozesse wie Interaktion mit Leber und Milz oder die Scherkräfte in der Blutzirkulation erforderlich sind (5). Auffallend ist in der LG Kultur der PLL beschichteten Färbung, dass ein Großteil der Zellen große Löcher aufweist, die im Zuge der Entkernung entstanden sein müssen. Der Umstand, dass solche Löcher weder in den Vergleichszellen der nRET noch in der HPL Kultur zu sehen sind, könnte auf einen fortgeschrittenen

Reparaturmechanismus in den HPL Zellen hindeuten und den Entwicklungsvorsprung der HPL Kultur unterstreichen.

Die Spektrinfärbung zeigt von Tag 8 bis 18 eine Zunahme der Spektrin Expression. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *Hu Jingping*, der in seiner Arbeit auch eine stetige Zunahme des Zytoskelettproteins Spektrin in der Entwicklung vom Proerythroblasten zum Retikulozyten beschreibt (35). Untersuchungen der Erythropoese von Mäusezellen kamen zum selben Ergebnis (37,38). Die beschleunigte Entwicklung der HPL Kultur wird auch in dieser Färbung sichtbar, mit vollständiger Entkernung in der HPL Kultur an Tag 15 im Gegensatz zur LG Kultur. Spektrin wird, gleich wie Ankyrin, im Zuge der Entkernung im Retikulozyten zurückgehalten (5,34,39). Das bestätigt sich auch in dieser Arbeit durch das Vorliegen von einzelnen ausgestoßenen blauen Zellkernen ohne grünen Randsaum an den späteren Kulturtagen. Das Spektringerüst der Zellen beider Kulturen ist an Tag 18 gleich entwickelt. Auch verglichen mit den nativen Zellen sind bereits sehr große Ähnlichkeiten zu sehen. Dennoch ist die Entwicklung der roten Blutzellen an Tag 18 noch nicht vollständig beendet und sind noch weitere Entwicklungsschritte hin zum bikonkaven Erythrozyten erforderlich (5).

Die Bande 3 Färbungen nach Kulturtag 15 mussten in Helligkeit und Kontrast bearbeitet werden, da sie nur schwache Signale zeigten. Um Vergleiche anstellen zu können, wurden alle Bilder (Tag 8 bis Tag 18 inklusive der nativen Vergleichsbilder) exakt gleich bearbeitet. Wie *Hu Jingping* in seiner Arbeit beschreibt, kommt es in der Entwicklung vom Proerythroblasten hin zum Retikulozyten zu einem stetigen Anstieg von Bande 3 (35). Auch in den Versuchen mit Mäusezellen war ein steter Anstieg von Bande 3 im Zuge der Erythropoese zu beobachten (37). In den durchgeführten Färbungen ist eine Zunahme der blauen Bande 3 Färbung von Tag 8 bis Tag 15 zu erkennen. Die Färbungen an Tag 18 hingegen sind nur durch die Nachbearbeitung sichtbar gemacht worden. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Einerseits wird im Zuge der Enukleation der Kern umgeben von Plasmamembran aus der Zelle geschleust, welche ebenfalls Bande 3 Proteine enthält. So verliert die Zelle im Zuge der Entkernung auch einen signifikanten Anteil an Bande 3 Proteinen (34). Dieser Verlust an Bande 3 könnte den Umstand, dass an Tag 18 ein deutlich schwächeres Bande 3 Signal zu sehen war, erklären. Andererseits spricht die Tatsache, dass in der HPL Kultur die Bande

3 Färbung mit PHAE Beschichtung an Tag 15 auch ohne Nachbearbeitung bestens zu erkennen war, gegen diese Erklärung. Dies deutet eher auf technische Probleme (AK-Verdünnung, Färbevorgang, Bildgebung) bei einigen Bande 3 Färbungen an Tag 18 hin. Auch hier ist ein Entwicklungsvorsprung der HPL Kultur zu beobachten. In beiden Kulturen ist final das typische Muster der Bande 3 Färbung nativer roter Blutzellen zu erkennen. Auffällig sind auch hier in der LG Kultur an Tag 18 zum Teil große Löcher, die weder in der HPL Kultur noch in nativen Zellen zu sehen sind, was wieder auf einen langsameren Umbaumechanismus der LG Zellen hinweisen könnte.

In den ersten Tagen war die rote Aktinfärbung auch ohne Nachbearbeitung gut sichtbar. Nach Tag 11 war jedoch ohne Nachbearbeitung nur mehr die Kernfärbung zu erkennen, da die Aktinfärbung sehr stark bei Lichtexposition ausbleicht. Um Vergleiche in der Entwicklung der Zellen anstellen zu können, wurde Kontrast und Helligkeit aller Bilder exakt gleich bearbeitet. *Hu Jingping* beschreibt in seiner Arbeit, dass Aktin in der Entwicklung vom frühen Proerythroblasten hin zum Retikulozyten abnimmt (35). Ebenso konnte *Ke Chen* diese Beobachtung auch in der Erythropoese von Mäusen feststellen (37). Das deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass die Färbungen späterer Tage weniger starke Aktin Expression zeigen. Die Abnahme beruht unter anderem auch auf dem Umstand, dass ein Teil des Aktins im Zuge der E nukleation mit dem Kern ausgestoßen wird (34). Sichtbar als schmaler rot gefärbter Rand um einige ausgestoßene Zellkerne. Auf den ersten Blick etwas widersprüchlich dazu beschreibt *Griffiths*, dass die Konzentration des Aktins unmittelbar nach der E nukleation in den Zellen erhöht ist (40). Diese Beobachtung konnte aber auch in dieser Arbeit an Tag 15 gemacht werden. Hier zeigen sich in frisch entkernten Zellen Aktin Akkumulationen, mögliche Reste des kontraktiven Aktin-Myosin Rings, welcher für die Ausstoßung des Zellkerns essenziell ist (5,36). Auch *Wickrema* beschreibt eine Akkumulation von Aktin zwischen dem austretenden Zellkern und dem entstehenden Retikulozyt (41). Diese Beobachtung wurde von *Koury* auch in der Erythropoese von Mauszellen gemacht (42).

Final zeigen beide Kulturmodelle ein ähnliches Muster wie die nativen Vergleichszellen.

Im Ergebnis ist festzuhalten, dass die Ankyrin- sowie die Spektrinfärbungen gut funktioniert haben. Im Gegensatz dazu mussten die Bande 3 Färbung sowie die Aktinfärbung nachbearbeitet werden. Nach den Erkenntnissen dieser Färbungen sollte die zu bevorzugende Beschichtung der Objektträger die PLL Beschichtung sein. Bei der Durchführung der Aktinfärbungen sollte, wie zuvor beschrieben, jegliche Lichtexposition vermieden werden. Die Färbungen der Zellen aller vier untersuchten Marker zeigten große Ähnlichkeiten mit den nativen Vergleichszellen, wobei die Übereinstimmung mit den nativen Retikulozyten deutlich größer ist. Im Vergleich zu den nativen Erythrozyten wird klar, dass noch weitere Entwicklungsschritte notwendig sind, um die finale Form zu erreichen. So brauchen Retikulozyten 1 bis 2 Tage bis sie im Blutkreislauf zu voll funktionsfähigen, bikonkaven Erythrozyten heranreifen (5,39,43). Im Zuge dieser Entwicklung verlieren die Zellen bis zu 20 % ihres Zellvolumens (5,40) und ihrer Zellmembran (44). Dies geschieht zum einen über Verluste von überschüssigen Membranen und intrazellulären Resten, zum anderen über die Aktivierung von Ionentransportern, die den Wasserhaushalt der Zelle kontrollieren (5). Wie *Griffiths* beschreibt, ist die Reifung des Retikulozyten in eine frühe Phase, die im Knochenmark abläuft, und eine späte Phase, die in der Blutzirkulation erfolgt, geteilt. In dieser zweiten Phase werden große Plasmamembranvesikel internalisiert und mit Autophagosomen verschmolzen. In weiterer Folge wird deren Inhalt mechanisch entfernt, was laut *Griffiths* am wahrscheinlichsten während der Passage durch die Milz geschieht (40). Neben den Makrophagen in der roten Pulpa der Milz spielen noch weitere Faktoren wie Interaktionen mit anderen Blutbestandteilen, Endothelzellen, Makrophagen in der Leber und auch die Scherkräfte in der Blutzirkulation eine Rolle in der Entwicklung der Retikulozyten (5). Das Fehlen dieser Interaktionsfaktoren in der Kultur scheint das Aussetzen der letzten Entwicklungsschritte zu bedingen.

Im Vergleich der beiden untersuchten Kulturen HPL und LG zueinander, konnten in allen Färbungen, ausgenommen der Aktinfärbung, Entwicklungsfortschritte in der HPL Kultur gefunden werden. Speziell die Entwicklungsfortschritte der HPL Kultur in der Ankyrinfärbung und Bande 3 Färbung am Tag 18 sind eindrucksvoll. Die, wie schon vorher beschriebene, größere mechanische Stabilität der Zellen der Lipid supplementierten Kultur HPL könnte auf diesen, im Vergleich zur LG Kultur, früheren Membranumbau nach erfolgter Eukleation zurückzuführen sein.

Aus den generierten Ergebnissen könnte man ableiten, dass die Zellen der HPL Kultur für Forschungszwecke bereits transfundiert werden könnten, weil die Zellen in den von uns untersuchten Markern in unseren Versuchen eine sehr hohe Übereinstimmung mit den nativen Retikulozyten aufweisen. Außerdem konnten *Giarratana et al.* in ihrer Arbeit bereits die erfolgreiche Transfusion von ex vivo generierten Blutzellen mit selbem Ursprung (CD34+ HSC) durchführen (32).

Mithilfe der etablierten Färbung konnten neue Einblicke in die Entwicklung der untersuchten Marker in ex vivo generierten Proerythroblasten hin zu Retikulozyten abgebildet werden. In weiterer Folge könnten diese Färbungen für den Vergleich ex vivo generierter Zellen mit anderem Ursprung (wie zum Beispiel iPSZ oder embryonale Stammzellen) verwendet werden.

Zukünftig sollte man die Auswahl der untersuchten Proteine erweitern. So wäre zum Beispiel das Membranprotein Glykophorin A ein weiterer interessanter Marker. Dieses Protein scheint zum einen an der Reifung der Retikulozyten beteiligt zu sein. Zum anderen trägt es durch seine Interaktion mit dem darunter liegenden Zytoskelett wesentlich zur Membransteifigkeit bei (15). Auch die Untersuchung weiterer Zytoskelettproteine wie Adducin, Protein 4.1R oder Protein 4.2R könnten helfen, das Bild der Entwicklung des Membranzytoskeletts weiter zu vervollständigen.

## Literaturverzeichnis

1. Shah S, Huang X, Cheng L. Concise Review: Stem Cell-Based Approaches to Red Blood Cell Production for Transfusion. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(3):346–55.
2. Zeuner A, Martelli F, Vaglio S, Federici G, Whitsett C, Migliaccio AR. Concise review: Stem cell-derived erythrocytes as upcoming players in blood transfusion. *Stem Cells.* 2012;30(8):1587–96.
3. Xie XY, Li YH, Pei XT. From stem cells to red blood cells: How far away from the clinical application? *Sci China Life Sci.* 2014;57(6):581–5.
4. Douay L. Why industrial production of red blood cells from stem cells is essential for tomorrow's blood transfusion. *Regen Med.* 2018;13(6):627–32.
5. Ovchynnikova E, Aglialaro F, von Lindern M, van den Akker E. The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Front Physiol.* 2018;9(JUL).
6. Bernecker C, Köfeler H, Pabst G, Trötz Müller M, Kolb D, Strohmayer K, et al. Cholesterol Deficiency Causes Impaired Osmotic Stability of Cultured Red Blood Cells. *Front Physiol.* 2019;10(December):1–14.
7. Li H, Yang J, Chu TT, Naidu R, Lu L, Chandramohanadas R, et al. Cytoskeleton Remodeling Induces Membrane Stiffness and Stability Changes of Maturing Reticulocytes. *Biophys J.* 2018;114(8):2014–23.
8. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R. Squeezing for life - Properties of red blood cell deformability. *Front Physiol.* 2018;9(JUN):1–22.
9. Lüllmann-Rauch R, Asan E. 12.2 Blutbildung. In: Taschenlehrbuch Histologie. 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 345–57.
10. Walzog B, Fandrey J. 7 Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, editors. Physiologie. 9th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 274–81.
11. Hallbach J. Hämatologie und Blutgruppenserologie. In: Klinische Chemie und Hämatologie. 4th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 382–90.
12. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: Evolving perspectives. *Br J Haematol.* 2016;173(2):206–18.
13. Hartmann M, Pabst M-A, Dohr G. Blut und Blutbildung. In: Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie. 5th ed. Wien: Facultas Verlags- und Buchhandels AG; 2011. p. 63–5.
14. Dengler J, Dreger P. Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, editors. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p. 17–34.
15. Klei TRL, Meinderts SM, van den Berg TK, van Bruggen R. From the cradle to the grave: The role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis. *Front Immunol.* 2017;8(FEB).

16. Ulfig N. Herz-Kreislauf-System und Blut. In: Kurzlehrbuch Histologie. 4th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015. p. 92–4.
17. Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and death signalling in mature red cells: From basic science to transfusion practice. *Blood Transfus.* 2010;8(SUPPL. 3):39–47.
18. Lüllmann-Rauch R, Asan E. 12.1 Blut. In: Taschenlehrbuch Histologie. 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 329–45.
19. Hoth M, Wischmeyer E. 6.3 Blutbestandteile. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al., editors. *Duale Reihe Physiologie*. 4th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2021. p. 174–89.
20. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L, Fens MHAM, Schiffelers RM, Bartels M, et al. Red blood cells: Chasing interactions. *Front Physiol.* 2019;10(JUL):1–17.
21. Scheeren T, Hergert SM, Nöldge-Schomburg G. Kreislaufphysiologische Grundlagen. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, editors. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p. 35–43.
22. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood.* 2008;112(10):3939–48.
23. Lux SE. Anatomy of the red cell membrane skeleton: Unanswered questions. *Blood.* 2016;127(2):187–99.
24. Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;18(17):2274–83.
25. Arakawa T, Kobayashi-Yurugi T, Alguel Y, Iwanari H, Hatae H, Iwata M, et al. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. *Science (80- )*. 2015;350(6261):680–4.
26. Bosman GJCGM, Willekens FLA, Werre JM. Erythrocyte aging: A more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005. 2005;1–8.
27. Narla M, Narla A, Leung LL, Tirnauer JS. Red blood cell membrane. Structure, organization, and dynamics. *TW Post, P Rutgeerts, S Grover (Eds), UptoDate.* 2019;1–31.
28. Mankelov TJ, Satchwell TJ, Burton NM. Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells, Mol Dis.* 2012;49(1):1–10.
29. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol.* 2008;141(3):367–75.
30. Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(February):47–52.
31. Minetti G, Achilli C, Perotti C, Ciana A. Continuous change in membrane and membrane-skeleton organization during development from proerythroblast to senescent red blood cell. *Front Physiol.* 2018;9(MAR):1–

- 10.
32. Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY, et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood*. 2011;118(19):5071–9.
  33. Betz J, Dorn I, Kouzel IU, Bauwens A, Meisen I, Kemper B, et al. Shiga toxin of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* directly injures developing human erythrocytes. *Cell Microbiol*. 2016;18(10):1339–48.
  34. Bell AJ, Satchwell TJ, Heesom KJ, Hawley BR, Kupzig S, Hazell M, et al. Protein Distribution during Human Erythroblast Enucleation In Vitro. Wilber AC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 2;8(4):e60300. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0060300>
  35. Hu J, Liu J, Xue F, Halverson G, Reid M, Guo A, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2013;121(16):3246–53.
  36. Konstantinidis DG, Pushkaran S, Johnson JF, Cancelas JA, Manganaris S, Harris CE, et al. Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood*. 2012;119(25):6118–27.
  37. Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(41):17413–8.
  38. Hanspal M, Hanspal JS, Kalraiya R, Liu SC, Sahr KE, Howard D, et al. Asynchronous synthesis of membrane skeletal proteins during terminal maturation of murine erythroblasts. *Blood* [Internet]. 1992;80(2):530–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V80.2.530.530>
  39. Stevens-hernandez CJ, Bruce LJ. Reticulocyte Maturation. *Anesthesiology*. 1970;32(5):485–485.
  40. Griffiths RE, Kupzig S, Cogan N, Mankelov TJ, Betin VMS, Trakarnsanga K, et al. Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis. *Blood*. 2012;119(26):6296–306.
  41. Wickrema A, Dai C -H, Krantz SB, Koury ST. Changes in cytoskeletal proteins and their mRNAs during maturation of human erythroid progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1994;160(3):417–26.
  42. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol*. 1989;109(6 1):3005–13.
  43. Chasis JA, Prenant M, Leung A, Mohandas N. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* [Internet]. 1989;74(3):1112–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V74.3.1112.1112>
  44. Stevens-Hernandez CJ, Flatt JF, Kupzig S, Bruce LJ. Reticulocyte

Maturation and Variant Red Blood Cells. Front Physiol. 2022;13(March).