

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung  
(MSZ) der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Ulf Rapp

**Genexpressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren PU.1,  
Gabp-alpha und der Proteinkinase HPK 1 im murinen  
hämatopoetischen System**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der  
Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Kristoff Jäckle  
aus Offingen

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Prof. Dr. rer.nat. Albrecht Müller

Koreferent: Prof. Dr. med. Paul-Gerhard Schlegel

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

21.07.2006

Der Promovend ist Arzt

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	copyDNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
EC-Zelle	embryonale Karzinomzelle (embryonic carcinoma cell)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EG-Zelle	embryonale Keimzelle (embryonic germ cell)
erbl.	erblich
ES-Zelle	embryonale Stammzelle (embryonic stem cell)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
GVDH	„Graft-versus-host-disease“
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s <sup>2</sup>
h	Stunde(n)
HSZ	hämatopoetische Stammzelle

---

HVGD	„Host-versus-graft-disease“
KM-Zellen	Knochenmarkzellen
kb	Kilo-Basen
NSZ	neurale Stammzelle
min	Minute(n)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit vorhergehender reverser Transkription der RNA
SCF	Stem Cell Factor
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sog.	sogenannt
TBE	Tris-Borat-EDTA
TSA	Trichostatin A
V	Volumen
ZNS	Zentralnervensystem
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
JNK	c-Jun Amino-terminal Kinase
SAPK	Stressaktivierte Proteinkinase (Stress Activated Protein Kinase)
Lin <sup>-</sup>	Lineage negative

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>WAS IST EINE STAMMZELLE ?</b>	<b>1</b>
1.1.1	EMBRYONALE STAMMZELLEN UND KEIMZELLEN	2
1.1.2	SOMATISCHE STAMMZELLEN	6
<b>1.2</b>	<b>HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN</b>	<b>8</b>
1.2.1	Grundlagen	8
1.2.2	AUFGABEN DER HSZs IM ORGANISMUS	9
1.2.3	PLASTIZITÄT VON HSZs	10
1.2.4	KLINISCHE BEDEUTUNG UND ANWENDUNG VON HSZs	12
<b>1.3</b>	<b>STEUERUNGSMECHNISMEN DURCH TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND PROTEINKINASEN IM HÄMATOPOETISCHEN SYSTEM</b>	<b>14</b>
1.3.1	GA-BINDING PROTEIN ALPHA (GABP-ALPHA)	16
1.3.2	PU.1	17
1.3.3	HÄMATOPOETISCHE PROGENITOR KINASE 1 (HPK 1)	18
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
3.1	AUFREINIGUNG VON STAMM-UND VORLÄUFERZELLEN	23
3.2	AUFREINIGUNG VON T-UND B-LYMPHOZYTEN AUS DER MILZ ADULTER MÄUSE	26
3.3	AUFREINIGUNG VON GRANULOZYTEN AUS DEM KNOCHENMARK ADULTER MÄUSE	26
3.4	VERGLEICH DES EXPRESSIONSMUSTERS DER ZU UNTERSUCHENDEN ZELLPOPULATIONEN ANHAND VON RADIOHYBRIDISIERTEN SOUTHERN BLOTS	27
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>29</b>
4.1	WEITERFÜHRENDE EXPERIMENTE	31
4.2	AUSBLICK	31
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>32</b>

<b>6. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>6.1 MATERIALIEN</b>	<b>33</b>
6.1.1 LÖSUNGEN UND MEDIEN	33
6.1.2 VERSUCHSTIERE	34
6.1.3 ANTIKÖRPER, CHEMIKALIEN UND ENZYME	34
6.1.4 OLIGONUKLEOTIDE UND GRÖßENMARKER	38
6.1.5 LABORGERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL	39
<b>6.2 METHODEN</b>	<b>40</b>
6.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	40
6.2.1.1 EXTRAKTION VON RNA AUS KNOCHENMARKSZELLEN	40
6.2.1.2 PHOTOMETRISCHE MESSUNG DES GEHALTS AN NUKLEINSÄUREN IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN	41
6.2.1.3 REVERSE TRANSKRIPTION	41
6.2.1.4 REVERSE TRANSKRIPTASE POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)	42
6.2.1.5 HERSTELLUNG VON AGAROSEGELEN	46
6.2.1.6 AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN IN AGAROSEGELEN	46
6.2.1.7 SOUTHERN BLOTTING	47
6.2.1.7.1 HERSTELLUNG RADIOAKTIV MARKIERTER SONDEN	47
6.2.1.7.2 ELEKTROELUATION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	47
6.2.1.7.3 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH "NICK TRANSLATION"	48
6.2.1.7.4 ÜBERTRAGUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS DEM AGAROSEGEL AUF NYLONMEMBRANEN	49
6.2.1.7.5 HYBRISIDIERUNG DER GEBLOTTETEN FRAGMENTE MIT MARKIERTEN SONDEN	50
6.2.1.7.6 BELICHTUNG VON FILMEN MIT MARKIERTEN FILTERN	51
<b>6.2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>51</b>
6.2.2.1 ISOLIERUNG ADULTER MURINER KNOCHENMARKSZELLEN	51
6.2.2.2 ERMITTLUNG DER LENBENDZELLZAHL MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	52
6.2.2.3 AUREINIGUNG VON HÄMATOPOETISCHEN STAMM-UND VORLÄUFERZELLEN NACH MILTENYI AUS MURINEM KNOCHENMARK	53
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>55</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Was ist eine Stammzelle ?

Der Säugerorganismus ist ein komplexes Organsystem, das aus vielen verschiedenen Zelltypen besteht. Während der Ontogenese entwickelt sich der gesamte Organismus ausgehend von der Zygote mit Hilfe verschiedener Stammzellsysteme.

Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multiliniendifferenzierung definiert. Sie teilen sich entweder symmetrisch in zwei neue Stammzellen oder asymmetrisch in eine Stamm- und eine Vorläuferzelle<sup>1</sup>. In Bezug auf das Differenzierungspotential von Stammzellen, das heißt der Möglichkeit sich in verschiedene Gewebetypen zu entwickeln, können während der Ontogenese Stammzellpopulationen mit unterschiedlich großen Differenzierungspotentialen identifiziert werden.

**Totipotente Zellen:** Von Totipotenz spricht man, wenn eine Zelle zu allen Effektorzellen eines Organismus differenzieren kann, also auch zu extraembryonalem Gewebe, das für die Entwicklung des Embryos von essentieller Bedeutung ist, wie Plazenta oder Trophoblast. Bisher ging man davon aus, dass nur die befruchtete Eizelle, die Zygote, auch extraembryonales Gewebe bilden kann. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde allerdings beschrieben, dass aus ES-Zellen in vitro befruchtungsfähige Eizellen entstehen können<sup>2</sup>. Daher können auch andere Zelltypen Totipotenz besitzen.

**Pluripotente Zellen:** Pluripotente Zellen sind in der Lage, Zellen der drei Keimblätter Mesoderm, Ektoderm und Endoderm zu generieren. Aus den Keimblättern des frühen Embryos entwickeln sich alle Zellen des Organismus. Embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isolierbar sind, können zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren und sind

somit pluripotent. Auch embryonale Karzinomazellen können nach Injektion in Blastozysten in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Ebenso haben EG-Zellen die Potenz alle Zellen eines Organismus zu bilden.

**Multipotente Zellen:** Sie können alle reifen Effektorzellen eines bestimmten Stammzellsystems bilden. So bilden hämatopoetische Stammzellen (HSZ) alle Effektorzellen des hämatopoetischen Systems. Neurale Stammzellen (NSZ) hingegen können zu den drei neuronalen Zelltypen Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen differenzieren.

**Vorläuferzellen:** Sie bilden eine Zwischenstufe von Stammzellen zu differenzierten Effektorzellen. Sie sind zur Proliferation befähigt, ohne sich jedoch unbegrenzt erneuern zu können. Außerdem können sie nur eine begrenzte Zahl von Zelltypen bilden (z.B. lymphoide oder myeloide Vorläuferzellen)<sup>3</sup>.

**Effektorzellen:** Sie besitzen kein oder nur ein beschränktes Proliferationspotential, können jedoch noch eine Phase der Reifung durchlaufen (z.B. Erythrozyten)<sup>3</sup>.

### 1.1.1 Embryonale Stammzellen und Keimzellen

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Sie ist Teil des Embryoblasten der Blastozyste. Die Blastozyste ist beim Menschen die etwa 5 Tage alte Frucht kurz vor der Implantation in die Uteruswand. Sie besteht aus dem Trophoblasten, einer äußeren Zellschicht, dem Blastocoel, einer flüssigkeitsgefüllten Blastozystenöhle und der inneren Zellmasse oder Embryoblast, einem Zellhaufen an der Innenseite des Trophoblasten<sup>4</sup>. ES-Zellen haben ein hohes Proliferationspotential und sind fähig zu allen Zellen eines Organismus zu differenzieren<sup>5</sup>. Aus zahlreichen Säugern konnten bereits ES-Zellen isoliert und in vitro kultiviert werden<sup>6</sup>.

Zur Definition von ES-Zellen wurden Kriterien vorgeschlagen, zu denen Austin Smith wesentlich beigetragen hat<sup>3</sup>.

Folgende Kriterien definieren ES-Zellen:

- sie leiten sich vom Embryoblasten ab
- sie können sich unbegrenzt symmetrisch teilen, ohne zu differenzieren (long-term self-renewal)
- sie behalten einen stabilen diploiden Karyotypen bei
- sie können differenzierte Zellen bilden, die sich von allen Keimschichten ableiten (siehe Abb.1)
- sie sind fähig, in einen sich entwickelnden Embryo zu integrieren und Chimären zu bilden
- sie können sich in die Keimbahn integrieren und damit Ei- und Samenzellen bilden
- sie sind fähig Klone zu bilden, wobei resultierende Zellen keine Eigenschaften der Ursprungszelle verlieren
- sie exprimieren den Transkriptionsfaktor Oct-4, der Gene aktiviert, die die Zelle in einem undifferenzierten Zustand halten
- die Proliferation und Differenzierung von ES-Zellen kann in vitro induziert werden
- sie befinden sich nur sehr selten im G1-Stadium der Mitose, sondern hauptsächlich in der S-Phase, um DNA für weitere Teilungen zu synthetisieren
- sie zeigen keine X-Chromosom-Inaktivierung in weiblichen Zelllinien

Die Pluripotenz von ES-Zellen kann durch verschiedene experimentelle Ansätze nachgewiesen werden<sup>7</sup>.

Die erste Methode basiert auf der Injektion von Zellen, die aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste gewonnen wurden, in eine Rezipienten-Blastozyste und den Retransfer dieser Blastozyste in den Uterus einer Amme. Resultat ist ein chimäres Tier, das in allen seinen Geweben sowohl Zellen des Donors als auch eigene Zellen beherbergt. Dies ist die gängigste und stringenteste Nachweismethode für die Pluripotenz von ES-Zellen<sup>8</sup>.

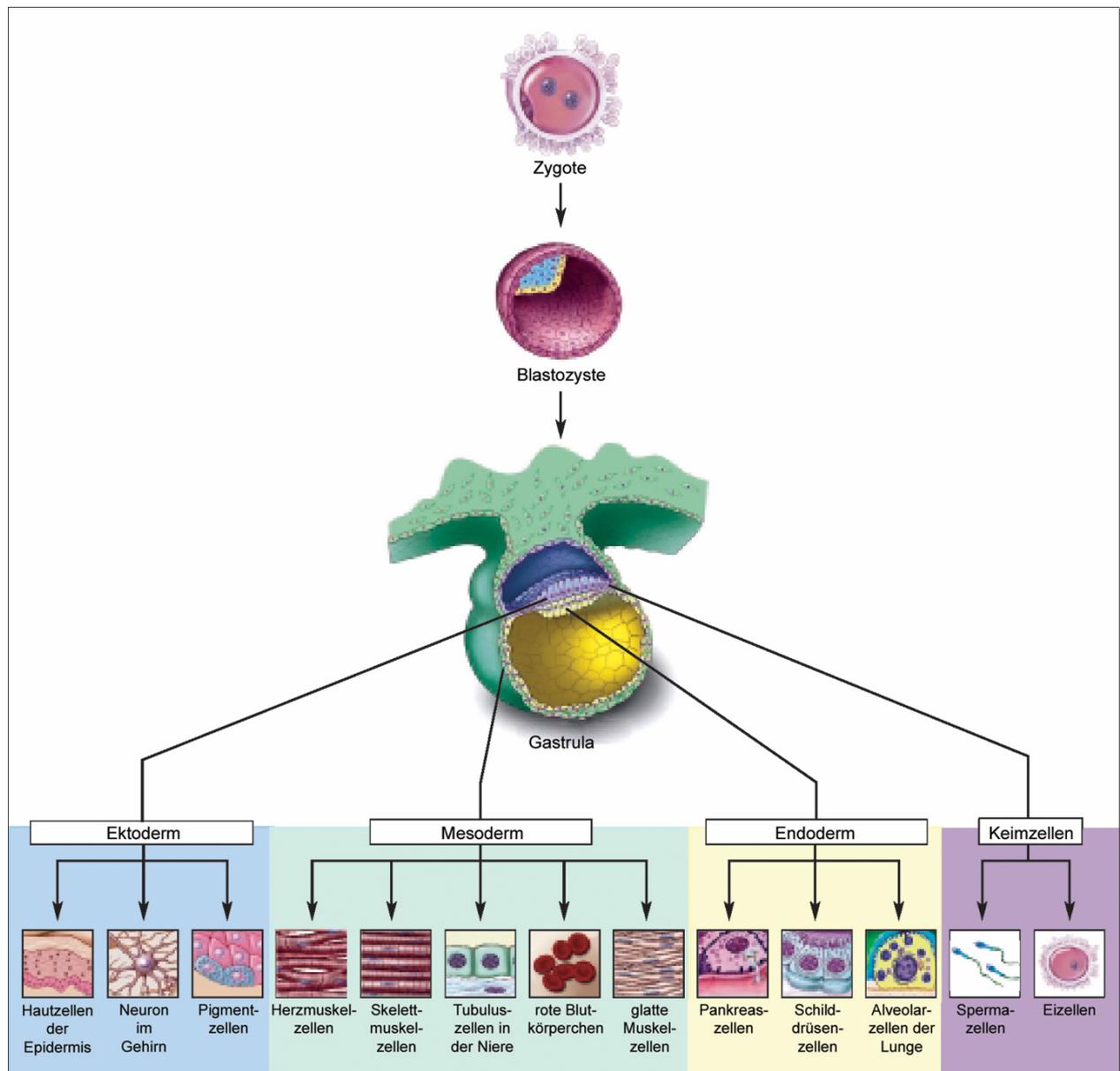
Eine andere Methode, die Pluripotenz nachzuweisen, stellt das Injizieren von ES-Zellen in immunsupprimierte oder genetisch identische Mäuse dar. In diesen Tiermodellen wird eine immunologische Abstoßung fremder Zellen unterbunden. Die injizierten ES-Zellen bilden Teratome, benigne Tumore, die undifferenzierte Zellen sowie Zellen aus allen drei Keimblättern beinhalten<sup>9</sup>.

Eine dritte Methode besteht darin, in vitro kultivierte ES-Zellen spontan oder gerichtet differenzieren zu lassen. Durch Zugabe geeigneter Wachstumsfaktoren können ES-Zellen zu Effektorzellen aller drei Keimblätter differenzieren<sup>10</sup>.

Ein Ziel der Forschung an embryonalen Stammzellen ist es, die Zellen zu spezialisierten Zelltypen zu differenzieren. Klinisch relevante Zelltypen für neuartige therapeutische Methoden sind u.a. Neuronen, Herzmuskelzellen, Blutgefäßendothelien oder insulinsezernierende Zellen. Meist wird die Differenzierung durch Änderung des Nährmediums und durch Zusatz bestimmter zelltypenspezifischer Wachstumsfaktoren induziert. Eine andere wichtige Rolle beim Differenzierungsvorgang spielen Zelloberflächenkontakte, welche ähnlich den Wachstumsfaktoren zur Aktivierung von Genen führen können, die die Differenzierung der ES-Zelle in eine bestimmte Richtung hervorrufen können<sup>3</sup>. Eine andere Möglichkeit in den Differenzierungsweg der Zelle einzugreifen stellt die Expression von Transgenen dar<sup>11,12</sup>. Kritische Faktoren dieses Verfahrens sind die Aktivierung des Gens zum richtigen Zeitpunkt des Differenzierungswegs sowie die richtige Integrationsstelle des Transgens im Genom.

Die Erforschung der Differenzierung von ES-Zellen befindet sich noch in einem sehr frühen Stadium. Dennoch konnten murine ES-Zellen in vitro bereits zu zahlreichen Zelltypen wie z.B. Neuronen oder Herzmuskelzellen differenziert werden<sup>13,14</sup>. Im Gegensatz zu ES-Zellen, die aus dem Embryoblasten der Blastozyste gewonnen werden, stammen EG-Zellen, Vorläuferzellen der späteren Keimzellen, aus der Gonadenleiste des Embryos. Aus ihnen entstehen im Normalfall die Keimzellen des Organismus, also letztendlich Eizellen bzw. Spermazellen. Wie die ES-Zellen haben die EG-Zellen pluripotente Eigenschaften. Humane ES-Zellen und humane EG-Zellen sind in vitro in der Lage, sich über einen langen Zeitraum (long-term self-renewal) selbst zu erneuern und dabei einen normalen Karyotyp beizubehalten<sup>15,16,17,18,19</sup>. Humane ES-Zellen können sich über ca. 2 Jahre hinweg bis zu 300 mal<sup>20</sup> teilen,

manche sogar bis zu 450 mal<sup>3</sup>. Für EG-Zellen wurde eine geringere Proliferationskapazität beschrieben<sup>18</sup>.



**Abbildung 1: Entwicklung verschiedener Effektorzelltypen eines Organismus aus der Zygote.** Im Laufe der Embryonalentwicklung entwickelt sich aus der Zygote die Blastozyste. Die Zellen aus der inneren Zellmasse des Blastozysten stellen die pluripotenten Stammzellen dar. Im Stadium der Gastrulation beginnt die Auftrennung der Zellen in die drei Keimblätter. Zu diesem Zeitpunkt werden auch die Zellen der zukünftigen Keimbahn separiert. Während sich aus diesen später die Keimzellen, also Spermien und Eizelle, entwickeln, differenzieren die Zellen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm zu den jeweiligen Effektorzellen. Abbildung modifiziert nach<sup>3</sup>.

### 1.1.2 Somatische Stammzellen

Im Laufe des Lebens eines Organismus müssen kontinuierlich neue Zellen gebildet werden um abgestorbene Zellen zu ersetzen und Verletzungen zu heilen. Ein Grund für die Fähigkeit zur Regeneration ist das Vorhandensein von somatischen Stammzellen in Geweben des adulten Organismus.

Auch die somatischen Stammzellen im adulten Gewebe erfüllen zwei wichtige funktionelle Eigenschaften von Stammzellen:

- sie können sich auf lange Sicht selbst erneuern ( long-term self-renewal)
- aus ihnen können spezialisierte Zellen eines Stammzellsystems entstehen. Dabei wird meist ein Vorläuferzellstadium durchlaufen.

Somatische Stammzellen sind in ihrem Gewebe ein seltener Zelltyp. Im Knochenmark stellt nur 1 von 10.000-15.000 Zellen eine blutbildende hämatopoetische Stammzelle (HSZ) dar<sup>21</sup>.

Die Hauptfunktion von somatischen Stammzellen besteht darin, die Homöostase des Gewebes, aus dem sie stammen, aufrechtzuerhalten<sup>3</sup>.

Somatische Stammzellen konnten bereits aus zahlreichen Geweben isoliert werden. Im folgenden Abschnitt soll darauf eingegangen werden, in welchen Geweben somatische Stammzellen bisher identifiziert werden konnten:

#### **Nervensystem:**

Vor mehr als 30 Jahren konnten im Hippokampus und in Bulbus Olfactorius des postnatalen Rattenhirns sich teilende Zellen gefunden werden, aus denen Nervenzellen entstehen können<sup>22,23</sup>. Ungeachtet dieser Tatsache stand für die Wissenschaft lange Zeit fest, dass Nervenzellen, die ektodermaler Herkunft sind, im adulten Gehirn nicht teilungsfähig sind. In den letzten 5 Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass im adulten Säugerhirn Stammzellen zu finden sind, die zu allen neuralen Zelltypen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen<sup>24</sup>, differenzieren können,<sup>25,26,27,28,29,30</sup>. Dies wird als Indiz aufgefasst, dass im Nervengewebe unter bestimmten Voraussetzungen Regeneration stattfinden kann.

Bei Nagern wurden NSZ in der ventrikulären Zone<sup>31</sup> und im Bulbus Olfactorius<sup>32</sup> nachgewiesen. Beim Menschen und bei Nagern konnten sie im Hippokampus, einer Hirnregion die mit Gedächtnisfunktionen in Verbindung gebracht wird, nachgewiesen werden<sup>33,24</sup>.

### **Endothelvorläuferzellen:**

Der Vorgang neue Blutgefäße im Embryo zu bilden wird Vaskulogenese genannt. Endothelvorläuferzellen haben die Fähigkeit Endothelzellen, welche mesodermaler Herkunft sind, zu bilden<sup>3</sup>.

### **Skelettmuskel (Mesoderm):**

Im Skelettmuskelgewebe sind die Satellitenzellen für die Regeneration des Muskels verantwortlich. Die Satellitenzellen, welche zuerst im Elektronenmikroskop im Froschmuskel beschrieben wurden<sup>3</sup>, später dann auch im Säuger<sup>34</sup>, sind auf der Oberfläche der Basallamina der reifen Muskelzelle zu finden und können Muskelwachstum vermitteln<sup>35</sup>.

### **Epithelzellen in Haut und Magen-Darm-Trakt:**

60 % der differenzierten Zellen des Körpers sind Epithelien. Sie können endodermaler oder ektodermaler Herkunft sein. Epithelzellen der Haut und des Magen-Darm-Traktes unterliegen einem ständigem Umsatz und werden ständig erneuert. Im Magen-Darm-Trakt sind die Stammzellen in den Krypten zu finden, welche morphologisch Epithelinvaginationen darstellen<sup>36</sup>. In der Haut sind mehrere histologische Gebiete, in denen somatische Stammzellen zu finden sind, zu nennen. Die Basalzellschicht der Epidermis, der Haarfollikel und die glandulären Epithelzellen der Schweißdrüsen<sup>37,38</sup>

### **Pankreas und Leber:**

Beide Gewebe sind endodermaler Herkunft. Im adulten Pankreas kommen die Stammzellen in den Ausführungsgängen und in den Langerhansschen Inseln vor und sind in der Lage, alle Zellsorten des Pankreas zu generieren. Dies wird mit der Eigenschaft Nestin zu exprimieren in Verbindung gebracht<sup>39,40</sup>.

Was die Leber betrifft, so ist unklar, ob die Ovalzellen aus HSZs entstanden sind<sup>41</sup> und ob Ovalzellen überhaupt für das Auftreten neuer Hepatozyten

verantwortlich sind<sup>42,43</sup>. Ovalzellen könnten sowohl Hepatozyten<sup>44,45</sup> als auch Gallengangepithelien generieren<sup>46,47</sup>.

### **Mesenchymale Stammzellen:**

Neben den hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen sind dort auch nicht hämatopoetisch wirkende Stammzellen zu finden. Derivate dieser mesenchymalen Stammzellen sind z.B. Adipozyten, Chondrozyten oder osteogenetisch wirkende Zellen<sup>48</sup>. Neben Knochenmark konnten mesenchymale Stammzellen auch in der Leber oder im fetalen Pankreas gefunden werden (pancreas-derived mesenchymal stem cells PMSCs). MSCs sind multipotente Stammzellen<sup>49</sup>.

Ebenso wird vom Vorhandensein von adulten Stammzellen in der Zahnpulpa, Rückenmark, Kornea und Retina berichtet<sup>3</sup>.

## 1.2 Hämatopoetische Stammzellen

### 1.2.1 Grundlagen

Die Strahlensensibilität des hämatopoetischen Systems konnte schon in den 60er Jahren durch die Experimente von Till und McCulloch gezeigt werden. Eine Quelle in der ein Regenerationpotential steckt, wurde im Knochenmark vermutet<sup>50</sup>.

Schon damals war bekannt, dass das Knochenmark keine homogene Zellpopulation ist, da es die verschiedenen Reifestufen der hämatopoetischen Linien und HSZs enthält. Auch heute ist eine direkte Aufreinigung von HSZs nicht möglich, da bisher kein zytologischer Marker bekannt ist, der ausschließlich auf HSZs exprimiert wird. Entscheidendes Kriterium für die Bezeichnung als HSZ ist die Fähigkeit der Zellen zur dauerhaften Repopulation aller hämatopoetischer Linien.

Da spezifische Oberflächenmarker fehlen, können HSZs nicht isoliert, sondern lediglich stark aufgereinigt werden. Humane HSZs können in der Population von Knochenmark oder peripherem Blut am besten aufgereinigt werden. Sie exprimieren keine linienspezifischen Oberflächenmarker, sie sind jedoch

positiv für den Marker CD34 und sind gleichzeitig negativ für die Expression des Markers CD38 ( $lin^{-}$ ,  $CD34^{+}$ ,  $CD38^{-}$ )<sup>51</sup>. Desweiteren ist der Oberflächenmarker CD133 (AC133) ein Marker hämatopoetischer Stammzellen<sup>52</sup>.

Murine HSZs besitzen den Phänotyp  $lin^{-}$ ,  $c-kit^{+}$ ,  $Sca-1^{+}$ <sup>53</sup>.

Eine HSZ reicht aus um einen lethal bestrahlten Rezipienten zu retten<sup>54</sup>. Inzwischen können HSZs soweit aufgereinigt werden, dass ca. 30 liniennegative,  $c-kit^{+}$  und  $Sca-1^{+}$  Zellen eine lethal bestrahlte Maus retten. In diesem experimentellen Ansatz wurden 50 % der lethal bestrahlten Tiere durch Injektion von ca. 30 HSZs gerettet<sup>55</sup>. Durch derartige Experimente konnte die Frequenz von HSZs im Knochenmark abgeschätzt werden. Sie hat eine Größenordnung von etwa 1 Zelle/10.000-15.000 Zellen, was 0.01-0,015 % entspricht.

### 1.2.2 Aufgaben der HSZs im Organismus

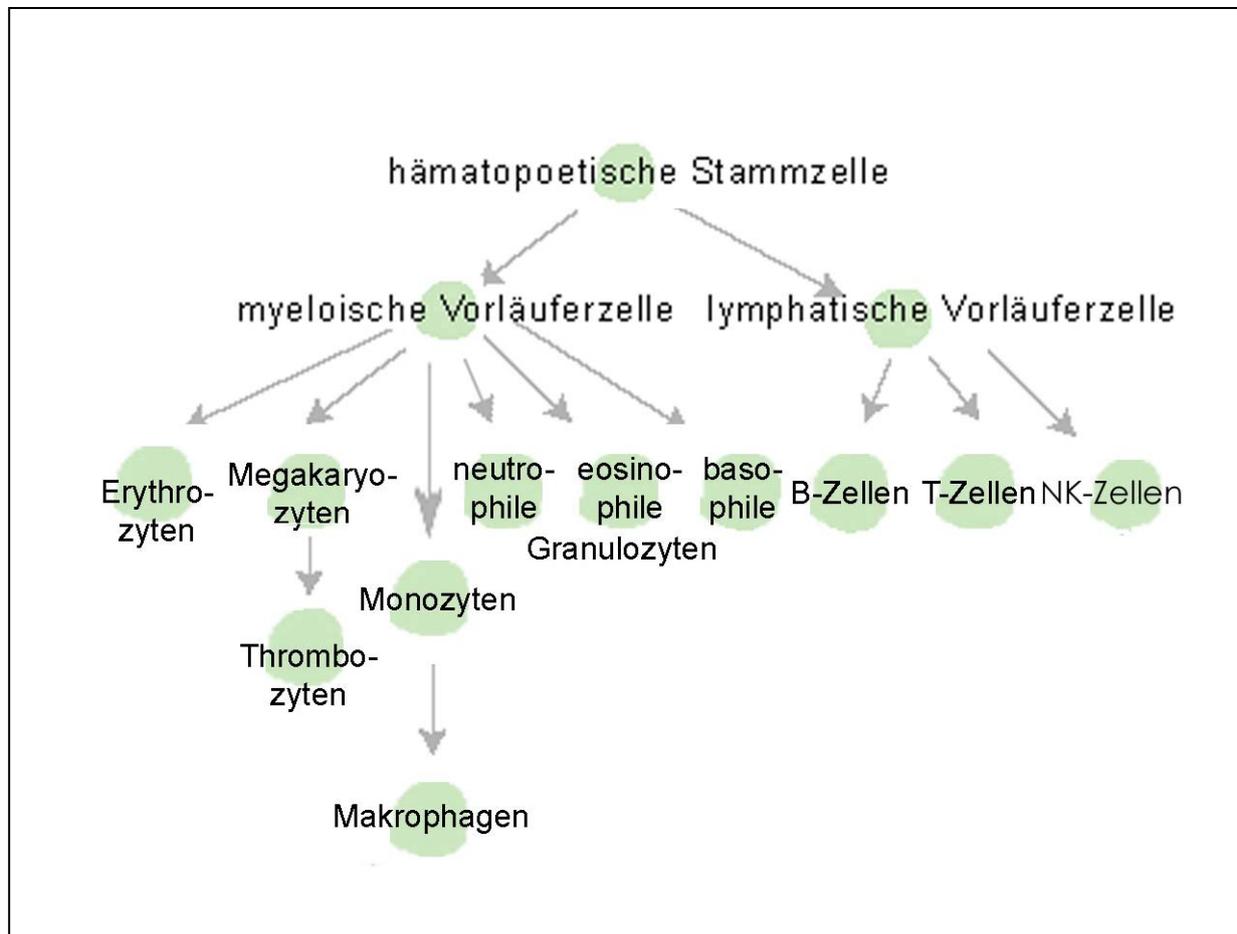
Die Aufgabe von HSZs ist es, alle Zelltypen, die im peripheren Blut physiologisch auftreten, zu bilden. Das bedeutet sowohl Zellen aus der myeloischen/erythroiden als auch lymphatischen Reihe:

Im einzelnen handelt es sich dabei um T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten, eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten (Abb.2). Humane Erythrozyten haben eine Lebensdauer von ungefähr 120 Tagen. Bei 5 Milliarden Erythrozyten/ ml Blut und einem Blutvolumen von ca. 6 Litern, entspricht das einer Neubildungsrate von ca. 2-3 Millionen Zellen/ Sekunde.

Bei der Produktion reifer zirkulierender Blutzellen teilt sich eine HSZ und deren Tochterzellen ungefähr 17 bis 19 mal, was einer Vervielfältigung auf ca. 120.000-720.000 Zellen entspricht<sup>56</sup>.

Wichtig bei diesen Vorgängen ist, dass die Homöostase des Blutsystems beibehalten wird. Sowohl eine Produktion von zu wenig Zellen (z.B. Anämie), als auch eine Produktion von zu vielen Zellen (z.B. Leukämie) stellt den Pathomechanismus von einigen Krankheiten des blutbildenden Systems dar.

Zur Sicherstellung der Homöostase des Blutsystems wirken auf die Stamm und Vorläuferzellen sowohl zellintrinsische als auch zellextrinsische Faktoren ein.



**Abbildung 2: Das hämatopoetische System.** Aus multipotenten Stammzellen entstammen die Effektorzellen des hämatopoetischen Systems. Es gibt zwei große Linien, die myeloische und die lymphatische Zelllinie. Effektorzellen aus der myeloischen Linie sind Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen/Monozyten und die verschiedenen Granulozyten. In der lymphatischen Linie die B-Zellen und die T-Zellen. Die jeweilige Entwicklung von der Stammzelle zur Effektorzelle verläuft über verschiedene Reifestufen und ist für jede Effektorzelllinie verschieden. Abbildung modifiziert nach<sup>57</sup>.

### 1.2.3 Plastizität von HSZs

Neuere Studien lassen vermuten, dass adulte Stammzellen in eine größere Zahl verschiedener Zelltypen differenzieren können als bisher angenommen. So wurde beschrieben, dass z.B. HSZs, die sich vom Mesoderm ableiten, zu Skelettmuskulatur<sup>58,59</sup>, Herzmuskulatur<sup>60,61</sup> oder Leber<sup>62,63</sup> (ebenfalls mesodermaler Herkunft) und Nervenzellen<sup>64,65</sup> (ektodermale Herkunft) differenzieren können. Umgekehrt konnten neuronale Stammzellen dazu

gebracht werden, hämatopoetische Zellen zu bilden<sup>66</sup> oder sich sogar zu mehreren Zelltypen in einem chimären Embryo zu entwickeln<sup>67</sup>.

Diese Eigenschaft wird als Plastizität adulter Stammzellen<sup>64,63</sup> beschrieben, kann aber auch als unorthodoxe Differenzierung<sup>68</sup> oder als Transdifferenzierung<sup>63,69</sup> bezeichnet werden.

In den meisten Fällen, in denen von Plastizität gesprochen wird, haben sich die Nachkommen injizierter Stammzellen ins Fremdgewebe integriert und zumindest einige Eigenschaften des Gewebes angenommen<sup>64,70,71,65,61</sup>. Andere Plastizitätsmodelle beinhalten Verletzungen von Geweben, die ein Krankheitsmodell simulieren sollen<sup>66,63,61</sup>.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich HSZs in beschädigte Skelett- und Herzmuskulatur oder in die Leber integrieren, um zur Regeneration dieser Gewebe beizutragen<sup>63,72</sup>.

Eine genetische Krankheit, die progressive Muskeldystrophie, die bei jungen Menschen zu Muskelschwäche in Herz und Skelettmuskel führt, konnte im Mausmodell simuliert werden. Diese mdx Mäuse sind genetisch veränderte Tiere, die ähnliche Muskelzelldefekte aufweisen, wie sie bei humaner Muskeldystrophie auftreten. KM-Zellen männlicher nicht-mdx Mäuse wurde in weibliche mdx-Mäuse mit chronischem Muskelschaden transplantiert. Nach 70 Tagen konnten männliche Zellen im Herz und Skelettmuskel isoliert werden<sup>72</sup>.

In einem anderen Experiment wurden tödlich bestrahlte weibliche Mäuse, die eine genetische Leberkrankheit hatten und mit Medikamenten am Leben erhalten werden konnten, mit aufgereinigten HSZs aus männlichen Mäusen, die diese Leberkrankheit nicht hatten, behandelt. Nach ein paar Monaten, eine Zeit, in der die HSZs die Leber besiedeln sollten, noch unter den leberprotektiven Medikamenten, wurde das Medikament abgesetzt. Man hat entdeckt, dass 50 transplantierte HSZs ausreichen, um eine Vielzahl transdifferenzierter Spenderleberzellen in den weiblichen Mäusen zu finden<sup>62,73</sup>.

Es gibt jedoch wenig Beweise dafür, ob die integrierten Fremdzellen die volle Funktionsfähigkeit der unter Normalbedingungen dort zu findenden Zellen erreichen können<sup>63</sup>. Die meisten Experimente hierzu wurden mit Zellen aus

Knochenmark <sup>64,70</sup>, <sup>63,65,74</sup> oder Hirngewebe <sup>66,67</sup> vorgenommen. Es steht fest, dass Plastizität ein normales in vivo Phänomen darstellt<sup>3</sup>.

#### 1.2.4 Klinische Bedeutung und Anwendung von HSZs

Leukämien und Lymphome, waren die ersten Krankheiten, bei deren Therapieversuchen HSZs in der Klinik zur Anwendung kamen. Da diese malignen Krankheiten Resultat einer unkontrollierten Proliferation von Leukozyten sind, werden diese Zellen mit Bestrahlung, Chemotherapie oder einer Kombination aus beiden Verfahren abgetötet. Auch die gesunden Zellen des Knochenmarks gehen dabei zugrunde und müssen durch ein Transplantat ersetzt werden. Hierzu wird Gesamtknochenmark oder aufgereinigte HSZs eines HLA-kompatiblen (**H**umanes **L**ymphozyten **A**ntigen) Spenders, die aus peripherem Blut gewonnen wurden, genutzt. Die HSZs wurden zuvor durch granulozytenstimulierenden Faktor aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert.

Viele Patienten zeigten Überlebenszeiten von Jahren oder Jahrzehnten, was ohne Stammzelltherapie nicht möglich gewesen wäre. Die Stammzelltransfusionstherapie machte z.B. die chronische myeloische Leukämie, als eine Krankheit mit äußerst schlechter Prognose zu einer potentiell heilbaren. Gleichzeitig leistete diese Therapie einen Beitrag zur weiteren Erforschung von Transplantationsproblematiken.

Da Stammzelltransplantationen mit einer hohen Mortalität (z.B. graft-versus-host-disease: GVHD) verbunden sind, ist sie nicht als erste Therapiemöglichkeit heranzuziehen. Die GVHD ist eine Transfusionskomplikation, bei der die transfundierten Spenderzellen, die auch Zellen des Immunsystems des Spenders enthalten, den neuen Organismus als fremd erkennen. Das gesunde Immunsystem versucht fremde Zellen zu eliminieren, was die transfundierten Zellen versuchen, und damit die schweren Komplikationen einer GVHD hervorrufen.

Besser verträglich für den Körper als ein Allotransplantat sind Autotransplantate. Vor der Chemotherapie können die HSZs medikamentös mobilisiert und aus dem peripheren Blut des Patienten isoliert werden. Im Anschluß an die Zerstörung der malignen Knochenmarkszellen werden diese autologen Zellen dann reinfundiert. Transplantatabstoßungsprobleme treten

hier nicht auf, da das Transplantat aus eigenen Zellen besteht. Es besteht jedoch das Risiko, dass entartete Zellen wieder in den Körper gelangen. Dieses Risiko kann verringert, jedoch nicht völlig eliminiert werden, indem man die HSZs in dem Transplantat aufreinigt.

Auch einige Autoimmunkrankheiten wie z.B. Diabetes melitus Typ 1 und Typ 1b, rheumatische Arthritis und systemischer Lupus Erythematodes, Autoimmunkrankheit mit unterschiedlicher Organmanifestation, sind Indikationen für eine HSZ-Therapie. Bei diesen Krankheiten liegt eine Fehlreaktion des körpereigenen Immunsystems auf körpereigene Gewebe vor. Man versucht durch die Therapie des Patienten mit HSZs das Immunsystem neu zu programmieren.

Neuerdings werden HSZs auch eingesetzt, um andere schwer heilbare Tumoren wie den metastasierenden Nierenkrebs zu bekämpfen<sup>75</sup>. Bei den Patienten kam es nach Transplantation von HSZs zu einer Tumor- bzw. Metastasenremission<sup>75</sup>.

Dies wird nun auch bei Tumoren der Organe Lunge, Prostata, Eierstock, Dickdarm, Speiseröhre, Leber, Pankreas und Brustdrüse getestet, die gegenüber einer regulären Therapie resistent sind<sup>76</sup>.

Für diese Therapieform werden die Zellen des Immunsystems des Empfängers medikamentös teilweise zerstört, so dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist eine durch T-Lymphozyten hervorgerufene Immunreaktion im Sinne einer GVHD bzw. HVGD auszulösen.

Plastizitätsmodelle wie sie bereits beschrieben wurden lassen ebenfalls auf zukünftige neue Therapieformen hoffen.

Ein breiter Einsatz von HSZs in verschiedenen Therapiemodellen wird bisher dadurch verhindert, dass HSZs nicht in vitro im undifferenzierten Zustand vermehrt werden können. Mit größeren Zellzahlen könnte man die Forschung an HSZs schneller vorantreiben oder Therapien mehr Menschen mit höherer Erfolgsaussicht durch höhere Zellzahlen zur Verfügung stellen. Neuere Veröffentlichungen wecken allerdings die Hoffnung, dass HSZs doch in vitro auf einfache Art und Weise vermehrt werden können<sup>77</sup>.

### 1.3 Steuerungsmechanismen durch Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen im hämatopoetischen System

Eine Zelle hat die Möglichkeit auf extrinsische und intrinsische Reize zu reagieren. Der Reiz wird von der Zelle so aufbereitet, dass der Stoffwechsel der Zelle so verändert werden kann, um optimal der Aufrechterhaltung der Zellphysiologie zu dienen. Dies erreicht eine Zelle durch Signaltransduktionskaskaden, die diesen Reizaufbereitungen entsprechen. Am Ende der Verarbeitung wird das Signal entweder auf ein bereits vorhandenes Protein übertragen oder die Zelle beginnt mit der Produktion bisher nicht oder nur wenig vorhandenen Proteinen. Die Transduktion des Signals mittels Proteinkinasen wird durch Proteinaktivierung- bzw. deaktivierung erreicht. Die Proteinkinasen phosphorylieren bzw. dephosphorylieren Proteine, was zu einer Aktivierung bzw. Deaktivierung führt. Dadurch können rasche Reaktionen der Zelle auf einen Reiz erfolgen. Die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in eine Zelle ist ein Beispiel für proteinkinasenvermittelte Signaltransduktion.

Veränderungen am Genexpressionsprofil einer Zelle können ebenfalls durch Signalketten bewirkt werden. Da die Transkription und Translation ein zeitaufwendiger Prozeß ist, ist die Veränderung der Genexpression von stabiler Art, das heißt die Effekte treten langsam auf und verschwinden langsam wieder. Beispiele hierfür sind die Wirkungen von Steroidhormonen. Eine Verbindung beider Wege ist ebenfalls bekannt, dabei fungieren Kinasen als Regulatoren von Transkriptionsfaktoren; VRK-Kinasen wirken z.B. als up-stream Regulatoren von Transkriptionsfaktoren<sup>78</sup>. Umgekehrt müssen Kinasen erst durch Transkription und Translation von der Zelle produziert werden.

Das Reizaufbereitungssystem einer Zelle besteht nicht aus einzelnen Masterregulatoren, sondern vielmehr aus einem Zusammenspiel vieler Einzelner, die in ihrer Gesamtheit die Zellfunktion und auch sich gegenseitig beeinflussen. Nicht nur die direkte Bindung der Transkriptionsfaktoren an DNA spielt dabei eine Rolle, sondern auch ihre Interaktion mit anderen Proteinen der Signalverarbeitung<sup>79</sup> und auch die physikalische Interaktion von

Transkriptionsfaktoren untereinander, wie es z.B. für das Gαp-alpha und C/EBPα nachgewiesen werden konnte. Es wurde nachgewiesen, dass die Interaktion dieser beiden Proteine den Promotor für den IgA Fc Rezeptor (CD89) der myeloischen Zelllinien aktivieren<sup>80</sup>.

Die besondere Wichtigkeit der Transkriptionsfaktoren bei der Hämatopoese, haben Experimente gezeigt, die Gene für Transkriptionsfaktoren ausschalteten, ihre Promotoren analysierten oder linienspezifische Faktoren überexprimierten<sup>79</sup>. Die veränderten Zellen reagieren beispielsweise mit der Unfähigkeit sich in bestimmte Linien zu differenzieren oder waren in ihrem Differenzierungspotential auf bestimmte Zelltypen beschränkt. Aus diesen Beobachtungen kann auf die Aufgabe der modifizierten Gene geschlossen werden. Ausgehend von in Vorläuferzellen auftretenden Proteinkomplexen werden nach und nach Zelltypenspezifische Faktoren aktiv. Diese Entwicklung resultiert in Proteinkomplexen, mit neuen Promotorbindungsaffinitäten und funktionellen Eigenschaften. Dies führt zum Abruf eines neuen Genexpressionsprogrammes und damit zu einer Zelle mit anderen Eigenschaften und Fähigkeiten.

Beispielsweise kann die Expression von Genen in Zellen vom erythroiden Typ durch MafB<sup>81</sup>, vom myeloiden Typ durch GATA-1<sup>82</sup> und von frühen myeloiden Vorläuferzellen durch C/EBP<sup>83</sup> unterdrückt werden. Gata-1, Gata-3 und vav sind beispielsweise Faktoren die sowohl in embryonalen Zellen und in der frühen hämatopoetischen Entwicklung exprimiert werden, was darauf schließen lässt, dass sie eine Rolle in der frühen Hämatopoese spielen<sup>84,85</sup>.

Ikaros ist ein Schlüsseltranskriptionsfaktor für die lymphoide Differenzierung. Er ist in heterochromatischen subnukleären Domänen lokalisiert und ist mit inaktiven Genen assoziiert<sup>86</sup>. Diese Kolo-kalisation mit inaktiven Genen wird während der Differenzierung aufgehoben. Die Mechanismen für diesen Vorgang sind unbekannt, es wird jedoch eine Interaktion mit dem Faktor Helios postuliert. Da Kompartimentierung in einer Zelle solche Interaktionen beeinflusst ist diese ebenfalls an Regulationsvorgängen beteiligt<sup>87</sup>.

Proteinkinasen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Fer und Fes, beides Proteinkinasen, regulieren die Präsenz einzelner Zelltypen im

peripheren Blut. Im Vergleich zum Wildtyp hatten knock-out-Mäuse eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten, Thromozyten und neutophilen Granulozyten im peripheren Blut. Wie Fer und Fes reguliert werden und warum in ihrer Abwesenheit die Hämatopoese dereguliert ist, ist ungeklärt<sup>88</sup>.

Die Familie der VRK-Kinasen sind weitere Beispiele für Proteinkinasen in der Hämatopoese. Bei der Entwicklung der Maus wird die Expression von Proteinen der VRK-Familie im Entwicklungsstadium 11,5-13,5, dem Beginn der definitiven Hämatopoese, signifikant erhöht<sup>78</sup>. Wie genau die VRK-Kinasen die Blutzusammensetzung regulieren ist noch nicht bekannt.

### 1.3.1 GA-binding Protein alpha (Gabp-alpha)

Gabp-alpha ist ein Transkriptionsfaktor aus der Ets-Familie. Alle Proteine der Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren haben die aus 85 Aminosäuren bestehende Ets-Domäne gemeinsam, mit der sie als Monomere an DNA binden können und dadurch einen Einfluß auf die Transkription vieler Gene haben. Die transaktivierenden und regulierenden Domänen unterscheiden sich zum Teil jedoch sehr. Dadurch können Ets-Proteine die Transkription entweder positiv oder negativ regulieren<sup>89</sup>.

Gabp-alpha bindet z.B. an den distalen Promotor von Genen, die Proteine für den Interleukin 2-Rezeptor codieren. Dabei bindet Gabp-alpha als Heterodimer zusammen mit Gabp-beta oder als Homodimer an einer palindromischen Basensequenz DSE-II-2 ( **d**ouble **s**ymmetry **e**lement), die die für Ets-Transkriptionsfakoren spezifische „ GGAA “ Basensequenz beinhaltet<sup>90</sup>.

Für das Interleukin 16 Gen konnten ebenfalls Gabp-Bindungsstellen identifiziert werden.

Aufgrund der Erkenntnis, dass Gabp-Proteine an der Regulation von Il-2 und Il-16 beteiligt sind, wurde die Induktion von Gabp-Proteinen in T-Zellen untersucht.

Die Bindung von Gabp-Proteinen an den distalen Promotor wird durch verschiedene Signalkaskaden begünstigt.

Sowohl das MAP-Kinasen-System (**mitogen activator protein**) als auch das Erk-2 und c-Raf-Signalsystem wirken dabei positiv auf die Induktion von Gabp-Faktoren in T-Lymphozyten<sup>91,92,93,94</sup>.

Ebenso spielen Co-Aktivatoren wie das CREB-binding Protein/p300 eine regulierende Rolle<sup>95</sup>.

Gabp-Proteine sind an der Expression der Il-7 Rezeptor-Alpha-Kette in T-Zellen ebenfalls von essentieller Bedeutung<sup>96</sup>.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Gabp-alpha/beta-Faktoren eine bedeutende Rolle im hämatopoetischen System spielen. Es konnte sogar in vielen Genen, die in der myeloischen bzw. lymphatischen Reihe eine Bedeutung haben eine Kompetition von Gabp-alpha/beta mit PU.1 an der Promotorbindungsstelle nachgewiesen werden.

Gabp-alpha spielt bei der Regulation von Oberflächenrezeptoren eine Rolle. Seine Expressierung wird durch verschiedene Signalkaskaden begünstigt. Spezielle Bedeutung für Stamm- und Vorläuferzellen lassen sich daraus nicht ableiten, bei deren Differenzierung in Effektorzellen scheint es aber eine Rolle zu spielen.

### 1.3.2 PU.1

PU.1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der der Ets-Familie angehört<sup>97</sup>. Er spielt eine Rolle in der Zellentwicklung in Richtung der myeloischen und lymphatischen Linien. PU.1 inhibiert die erythroide Differenzierung durch Interaktion mit Gata-1<sup>98</sup> und spielt eine kritische Rolle bei der Differenzierung in Zelllinien des thrombozytären und erytroiden Systems durch Interaktion mit dem Zink Finger Transkriptionsfaktor Gata-2<sup>99</sup>. Besonders von Bedeutung ist PU.1 bei der Entwicklung von B-Lymphozyten und Makrophagen. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass Mutationen im PU.1-Gen wesentlich schwerwiegendere Folgen für B-Lymphozyten und Makrophagen hatten als für Granulozyten und T-Lymphozyten<sup>100</sup>.

Hämatopoetische Vorläuferzellen, die aus fötaler Leber stammen, proliferieren unter Anwesenheit von Multilinienzytokinen wie Interleukin 3. Sie sind jedoch eingeschränkt in ihrer Reaktion auf linienbeschränkte Zytokine wie GM-CSF, G-CSF, M-CSF oder Interleukin 7<sup>101,102</sup>. PU.1 scheint auf direktem Wege die Transkription von Genen zu aktivieren, die Rezeptoruntereinheiten für diese linienbeschränkten Zytokine codieren<sup>101,103</sup>.

Zusätzlich zur Regulation der Reaktion auf Zytokine, lenkt PU.1 die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Makrophagen, Granulozyten und B-Lymphozyten<sup>104</sup>.

PU.1 spielt ebenso eine Rolle bei der Expression der Interleukin 7 Rezeptoruntereinheit IL-7R $\alpha$ .

Mit Hilfe von PU.1-Nullmutanten konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von PU.1 eine eingeschränkte Expression dieser Untereinheit zur Folge hat<sup>105</sup>. Durch retrovirale Transduktion von IL-7R $\alpha$  in PU.1-Nullmutanten konnte gezeigt werden, dass diese wieder die Fähigkeit erlangten, Interleukin 7-abhängig zu proliferieren<sup>101</sup>.

PU.1 ist auch in der Lage konzentrationsabhängig spezifische Differenzierungswege zu induzieren. Ebenfalls durch retrovirale Transduktion in Nullmutanten und Heterozygoten konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von PU.1 eine Entwicklung in Richtung von Makrophagen induzieren, während niedrige Konzentrationen eine Differenzierung in Richtung von B-Lymphozyten ermöglicht<sup>106</sup>.

Die Menge des Faktors PU.1 hat auch eine Bedeutung bei der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie. Eine reduzierte Expression von PU.1 kann eine AML auslösen. Ist der Faktor PU.1 ganz ausgeschaltet führt dies nicht zu einer Ausbildung einer AML. Hohe Konzentrationen von PU.1 verhindern die Entdifferenzierung von erythroiden Zellen, weshalb PU.1 auch eine Rolle bei der Entstehung von erythroiden Leukämien zugewiesen werden kann<sup>107</sup>. Der Expressionsumfang ist demnach von entscheidender Bedeutung für seine Funktion<sup>108,109</sup>.

PU.1 greift also vielschichtig in die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen ein:

Zum einen wird die Regulation der Expression von Zytokinrezeptoruntereinheiten, durch die Konzentration von PU.1 selbst sowie durch seine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

Bei der Entwicklung von myeloischen Zellen entscheidet beispielsweise das Zusammenwirken von GATA-2 und PU.1, ob aus einer Vorläuferzelle ein Makrophage oder eine Mastzelle entsteht<sup>90</sup>. Die Regulierung der Rank Gene lassen PU.1 eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Osteoklasten zukommen<sup>110</sup>.

Weitere Interaktionen solcher Art sind wahrscheinlich und werden intensiv erforscht.

Bei der Differenzierung von Stamm-und Vorläuferzelle spielt PU.1 eine wichtige Rolle bei der Bildung von Zelltypen der lymphatischen und myeloischen Reihe. Desweiteren kann PU.1 auch als diagnostischer Marker bei der Unterscheidung zwischen lymphozytenarmen und lymphozytenreichem Morbus Hodgkin herangezogen werden<sup>111</sup>.

### 1.3.3 HÄMATOPOETISCHE PROGENITOR KINASE 1 (HPK 1)

Bei der HPK 1 handelt es sich um eine Serin/Threonin Proteinkinase, die zur Gruppe der MKKKs/MKKKKs gehört (upstream MAP-Kinasen).

Die Bezeichnung MKKKs/MKKKKs rührt daher, dass am Ende einer linearen Phosphorylierungskette der MAP-Signalkaskade das Protein MAP-Kinase steht (MAPK). In der Phosphorylierungskette wird die MAPK wiederum von einer anderen Kinase phosphoryliert, die deshalb MAPK-Kinase (MKKs) heißt. Diese wurde wiederum vorher durch eine Kinase phosphoryliert, sog. upstream Phosphorylierung, die dann entsprechend MKKKs heißen. Man stellt sich also folgende Reihe vor:

MKKKKs → MKKKs → MKKs → MAPK<sup>112</sup>

HPK 1 ist als Proteinkinase in verschiedene Signalkaskaden eingebunden, welche selbst im einzelnen sehr komplex aufgebaut sind. Sie wird vorwiegend im hämatopoetischen System exprimiert. Die humane Form wurde 1996 erstmals geklont<sup>113</sup>.

Im Folgenden sollen einige in der Literatur bekannte Erkenntnisse über Aufgaben, Funktionen und Bedeutung der HPK 1 im molekularbiologischen Kontrollsystem einer Zelle beschrieben werden.

Zellen benötigen Wege, um auf Reize ihrer äußeren Umwelt zu reagieren. Äußere Reize können beispielsweise Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Umweltstress, Apoptosefaktoren oder ein osmotischer Schock sein. Zytokine sind beispielsweise Interleukin-1, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  oder Lipopolysaccharide<sup>114</sup>.

Der JNK/SAPK Signalweg spielt z.B. bei der Beschreitung der Apoptose eine wichtige Rolle<sup>115</sup>. Eine Reihe von äußeren Stimuli, die den JNK/SAPK Signalweg induzieren, sind bekannt, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Lymphozyten Co-Rezeptoren (CD28, CD40), Zeramide, Proteinsyntheseinhibitoren, osmotischer Schock, DNA-schädigende Agentien, UV-Bestrahlung oder  $\lambda$ -Strahlung<sup>114,116-118</sup>.

HPK 1 aktiviert sowohl spezifisch die JNK1 als auch die AP-1 vermittelte Transkription. HPK 1 enthält dabei keine Bindungsdomäne für Rac1 oder Cdc42, was darauf schließen lässt, dass HPK 1 Aktivierung Rac1/Cdc42 unabhängig verläuft und damit einen neuen Aktivator für den JNK/SAPK darstellt. Nachgewiesen werden konnte HPK 1 in allen hämatopoetischen Organen sowie in niedriger Konzentration in Niere, Lunge, Brustdrüse und Dünndarm. Nicht nachweisbar war sie in anderen Geweben wie Gehirn, Herz, Leber, Muskel, Pankreas, Prostata, Hoden und Schilddrüse<sup>113</sup>.

Eine sehr wichtige Aufgabe der HPK 1 ist das Mitwirken beim gesteuerten Zelltod von T-Lymphozyten. Der sog. activation induced cell death ( AICD ) stellt eine Form der Apoptose dar und ist von größter Wichtigkeit bei der Beendigung der Immunreaktion und damit für die Homöostase des Immunsystems<sup>119</sup>.

Apoptose von T-Lymphozyten ist nicht nur an die Kaspase-Kaskade, die durch sog. Todesrezeptoren vermittelt wird, wie z.B. TNF-Rezeptor, NGF-Rezeptor (nerve growth factor, TNF 1, FAS, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). AICD konnte in 3-fach mutanten Mäusen, die FAS, TNF-1 und -2 defizitär waren und auch durch Sag ( Superantigen)-Injektion induziert werden. Es wurde beschrieben, dass der T-Zellrezeptor (TCR) CD3 sowohl AICD als auch die Aktivität von HPK 1 induziert<sup>119</sup>.

Eine Überexpression von HPK 1 führt zu einer spontanen  $\alpha$ CD3 vermittelten Apoptose in peripheren CD4-positiven T-Lymphozyten. Ebenso konnte eine Hochregulation von Fas und eine Niederregulation des die Apoptose verhindernden NF $\kappa$ B (nuclear factor) festgestellt werden. Eine Aktivierung von JNK war darüber hinaus an der HPK 1 vermittelten Apoptose beteiligt<sup>119</sup>.

Eine Verbindung der HPK 1 mit der Signaltransduktion des B-Zellrezeptors ist ebenfalls in der Literatur beschrieben. Diese Verbindung wird durch den B-Zell Adaptor der die SRC Homologie 2 Domäne enthält (Bash oder Blnk oder SLP-65)<sup>120</sup>

Ein ähnlicher Zusammenhang konnte für die SLP-76 Adaptorfamilie und die Crk Adaptorfamilie hergestellt werden. Zu dieser Familie gehören SLP-76, Blnk, und Clnk<sup>121, 122, 123, 124</sup> bzw. Crk und CrkL<sup>125</sup>.

Es konnte aber nicht nur eine Verbindung zwischen HPK 1 und Zelltod bzw. Rezeptortransduktion, sondern auch zu Proliferation und Differenzierung hergestellt werden.

Antisense Oligonukleotide zu HPK 1 deaktivieren Erythropoetin (EPO) abhängiges Zellwachstum und Epo-abhängige erythroide Differenzierung.

Der HPK 1-JNK/SAPK Signalweg ist also eingebunden in Epo-induziertem Zellwachstum und Differenzierung<sup>126</sup>.

Die HPK 1 hat vielfältige Aufgaben im hämatopoetischen System. Zum einen spielt sie eine Rolle beim Eingehen der gezielten Apoptose, zum anderen bei der Signaltransduktion des B-Zellrezeptors und bei der Differenzierung und Proliferation von Erythrozyten.

## 2 Zielsetzung der Doktorarbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene murine Zellpopulationen aus Knochenmark und Milz zu isolieren und diese auf Expression der Transkriptionsfaktoren PU.1 und Gabp-alpha sowie der Proteinkinase HPK 1 zu untersuchen.

Es wurden liniennegative Vorläuferzellen der Population c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup> und c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup>, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten sowie Gesamtknochenmark analysiert.

Darüberhinaus wurden murine embryonale Stammzellen sowie murine neurale Stammzellen in die Experimente integriert, um ein breiteres Spektrum an Stammzellpopulationen betrachten zu können.

Aus dem aufgereinigten Zellmaterial wurde RNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und durch RT-PCR die Expression der entsprechenden Gene untersucht.

Ziel der Arbeit war es, Unterschiede in der Expression der drei zu untersuchenden Gene in den verschiedenen Zellpopulationen festzustellen, um so Hinweise auf die Funktion der Gene bei der Differenzierung von Blutzellen zu erhalten.

Einen Einblick in das embryonale und neuronale Stammzellsystem in Bezug auf die Exprimierung der oben genannten Proteine sollte uns die Mitanalyse von Zellen aus diesen Systemen geben.

### 3 Ergebnisse

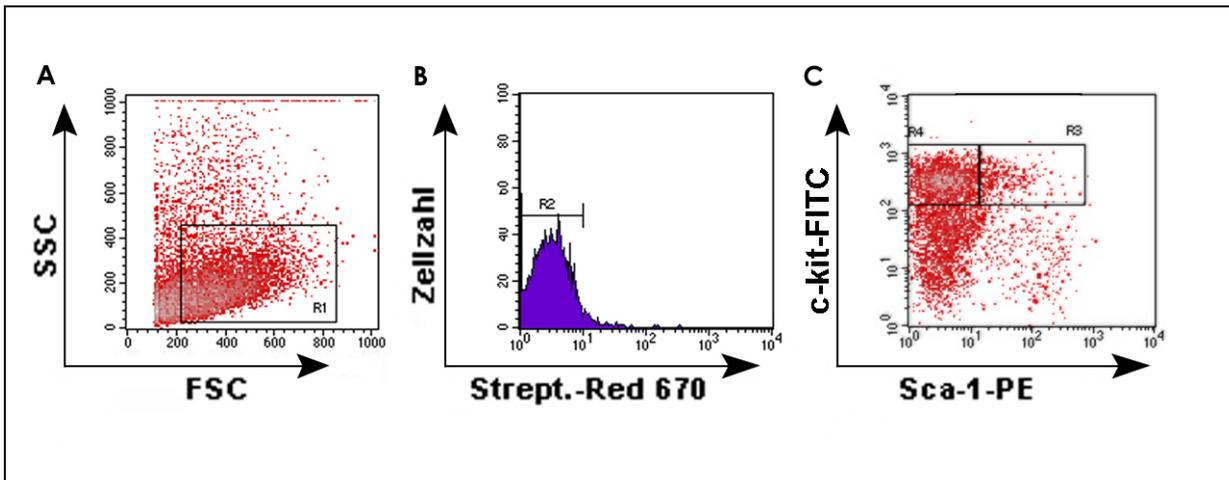
#### 3.1 Aufreinigung von Stamm und Vorläuferzellen

Aus den Röhrenknochen Femur und Tibia von C57BL/6 Mäusen wurden Knochenmarkszellen isoliert. Nach Aufreinigung der mononukleären Zellen wurden die Zellen durch eine Linien-Depletion mittels MACS-Sort isoliert. Die aus der Aufreinigung durch MACS resultierende liniennegative Einzelzellsuspension wurde anschließend noch einmal durchflußzytometrisch auf linienpositive Kontaminationen geprüft.

Da die Linienantikörper aus der Ratte stammten und die Microbeads zur lineage depletion gegen Ratte gerichtet Ziegenantikörper waren, konnten verbliebene linienpositive mit Microbeads besetzte Zellen durch einen biotinylierten Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper markiert werden. Nach Fluoreszenzmarkierung durch einen Streptavidin-FITC markierten Antikörper konnten diese Zellen von der weiteren Zelltrennung in c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>-</sup> und c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> HSZs ausgeschlossen werden.

Ca. 1% der Zellen im Knochenmark trugen keine Linienmarker.

Ca. 63% der lin<sup>-</sup> Zellen waren c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>-</sup> und ca. 2% der lin<sup>-</sup> Zellen waren c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>.



**Abbildung 3:** Isolierung von  $lin^{-}$ ,  $c-kit^{+}$ ,  $Sca-1^{-}$  und  $lin^{-}$ ,  $c-kit^{+}$ ,  $Sca-1^{+}$ - Knochenmarkszellen. **A)** Dargestellt ist das Vorwärts/Seitwärts (FSC/SSC) Streulichtdiagramm einer FACS-Analyse von unfraktionierten mononukleären murinen Knochenmarkszellen. **B)** Es ist das Fluoreszenzverteilungsdiagramm von  $lin^{-}$ -Zellen nach Inkubation mit biotinyliertem Kaninchen-anti Ziege Antikörper zu sehen, die durch Red670-Streptavidin markiert wurden. Auf über 98% der Zellen konnten keine linienspezifischen Oberflächenantigene nachgewiesen werden (R2). **C)** Dargestellt sind die Ergebnisse einer FACS-Analyse bezüglich der Expression von  $c-kit$  und  $Sca-1$  auf liniennegativen Knochenmarkszellen. Ca. 63% der  $lin^{-}$  Zellen sind  $c-kit^{+}$ ,  $Sca-1^{-}$ -Zellen (R4) und ca. 2% der  $lin^{-}$  Zellen sind  $c-kit^{+}$ ,  $Sca-1^{+}$ -Zellen (R3).

### 3.2 Aufreinigung von T-und B-Lymphozyten aus der Milz adulter Mäuse

Zunächst wurde aus C57BL/6 Labormäusen die Milz entnommen und mit einem dafür geeigneten Mörser zerdrückt, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Zur Zellvereinzellung und um bindegewebige Reste abzutrennen wurde die Zellsuspension durch ein Einzelzellsieb gedrückt. Alle Schritte wurden in eisgekühltem PBS/0,3 % BSA durchgeführt.

Im Anschluß wurden die Erythrozyten mittels Lyse entfernt und die Zahl der mononukleären Zellen bestimmt.

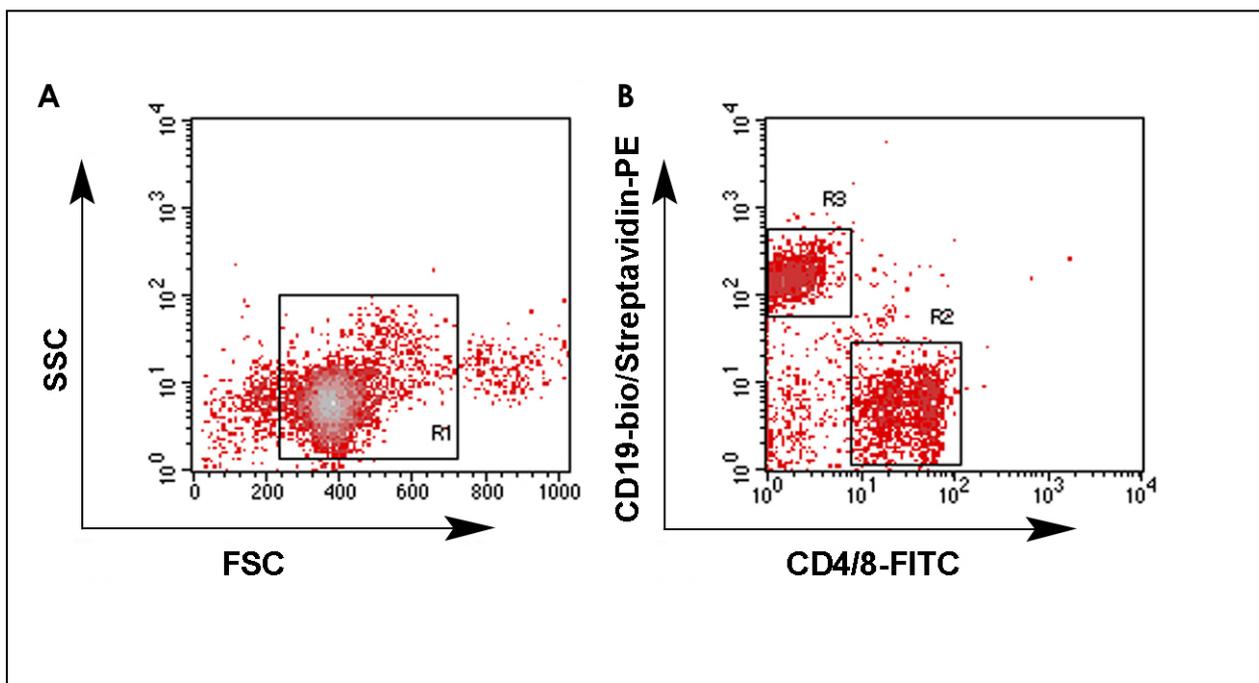
Die so erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Danach wurden die Zellen für 5-10 min mit hitzeinaktiviertem Mausserum inkubiert und gewaschen.

Daraufhin wurden die Zellen mit FITC-gelabelten Antikörpern gegen T-Lymphozytenspezifische Oberflächenantigene ( CD4,CD8 ) inkubiert.

Ebenso wurden die Zellen mit einem biotinylierten Antikörpern gegen B-Lymphozytenspezifische Oberflächenantigene (CD19) inkubiert. Eine Fluoreszenzmarkierung erfolgte über die Bindung von PE-gekoppeltem Streptavidin.

Anschließend wurden die Zellen durch FACS-Analyse getrennt, so dass eine hochreine Zellsuspension von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen sowie CD19<sup>+</sup> Zellen resultierte.

Ca. 25% der durchschnittlich 10<sup>8</sup> mononukleären Milzzellen/Maus sind CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Ca. 45% der Milzzellen sind CD19<sup>+</sup>.



*Abbildung 4: Isolierung von CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. A)* Dargestellt ist das Vorwärts/Seitwärts (FSC/SSC) Streulichtdiagramm einer FACS-Analyse von unfraktionierten mononukleären murinen Milzzellen. *B)* Dargestellt sind die Ergebnisse der FACS-Analyse auf Expression von CD4 und CD8 Oberflächenantigenen auf murinen Milzzellen (R2). Ebenso ist die FACS-Analyse auf Expression von CD19 Oberflächenantigenen auf murinen Milzzellen zu sehen (R3).

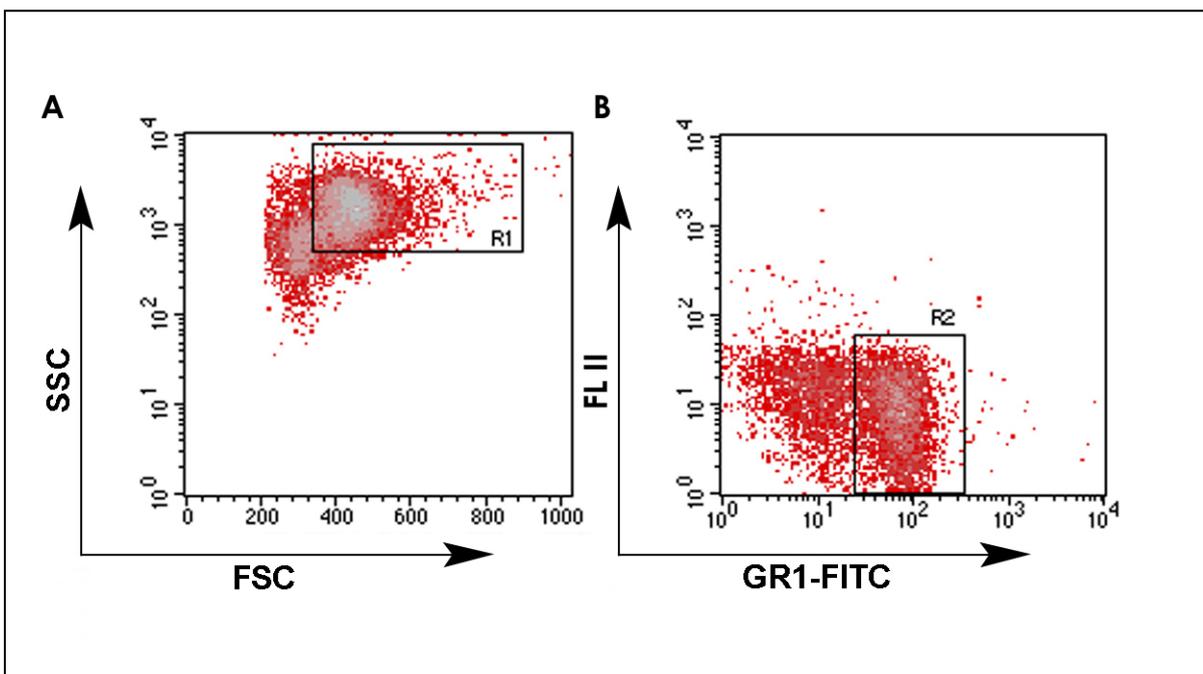
### 3.3 Aufreinigung von Granulozyten aus dem Knochenmark adulter Mäuse

Aus den knochenmarkreichen Röhrenknochen der Hinterbeine (Tibia, Femur) adulter C57BL/6 Labormäuse wurde das Knochenmark isoliert.

Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen und für 5-10 min mit hitzeinaktiviertem Mausserum inkubiert und anschließend gewaschen. Daraufhin wurde in FACS-Puffer ein FITC-gelabelten Antikörper gegen das Granulozytenoberflächenantigen Gr-1 zugegeben.

Die Zellsuspension wurde durch Zellseparation (FACS) getrennt, so dass eine hochreine Zellsuspension aus Granulozyten resultierte.

Ca. 55% der ca.  $30^7$  Knochenmarkszellen/Maus sind Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten.



**Abbildung 6: Isolation von Granulozyten.** **A)** Dargestellt ist das Vorwärts/Seitwärts (FSC/SSC) Streulichtdiagramm einer FACS-Analyse von unfraktionierten mononukleären murinen Knochenmarkszellen. **B)** Dargestellt sind die Ergebnisse der FACS-Analyse auf Expression von Gr-1 Oberflächenantigenen muriner Knochenmarkszellen (R2).

### 3.4 Vergleich des Expressionsmusters der zu untersuchenden Zellpopulationen anhand radiohybridisierter Southern Blots

Nach Isolation der zu untersuchenden Zelllinien, stellten wir aus diesen cDNA-Proben durch reverse Transkription aus zuvor isolierter RNA her. Die cDNA wurde mittels PCR-Analyse auf die Expression von HPK 1, PU.1 und Gabp-alpha untersucht.

Von Populationen, bei denen eine suffiziente Zellzahl (ca.  $10^7$  Zellen/Maus) pro Arbeitsgang isoliert werden konnte, wurde eine zweite bzw. dritte völlig neu isolierte Probe analysiert. Es handelte sich dabei um neue Labormäuse und neu durchgeführte Isolierungsschritte. Diese waren embryonale Stammzellen (ESC), neuronale Stammzellen (NSC), Gesamtknochenmark (BM), T-Zellen und B-Zellen.

Die Zellzahl der Lineage-negativen Zellen war zu niedrig, um einen ähnlichen Aufbau zu gewährleisten.

Granulozyten benötigten eine eigenständige FACS-Färbung und eine separate FACS-Analyse.

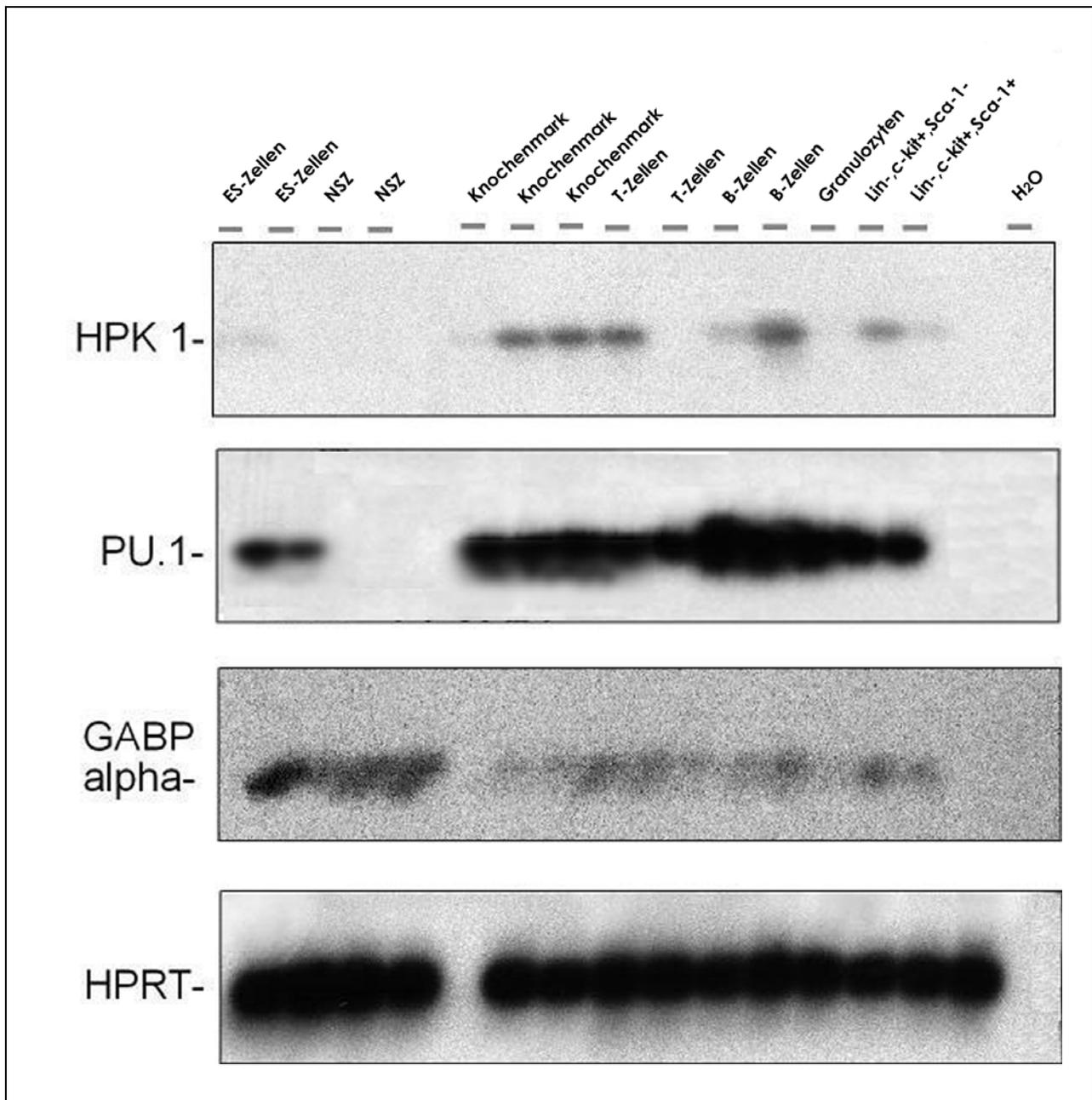
Wir fanden, dass Gabp-alpha in allen Zellen des hämatopoetischen Systems in ES-Zellen und NSZs exprimiert wird.

Auch PU.1 wurde in allen Zellen des Blutsystems detektiert, außerdem konnte das Transkript in ES-Zellen nachgewiesen werden.

HPK 1 konnten wir in Lineage-negativen Zellen in T- und B-Zellen, Gesamtknochenmark und in geringer Konzentration in embryonalen Stammzellen finden. In neuronalen Stammzellen und in Granulozyten konnte HPK 1 nicht nachgewiesen werden.

Proben ohne zugefügte cDNA ( $H_2O$ ) dienten als Kontaminationskontrolle.

HPRT-Transkripte dienten zum Abgleich der eingesetzten cDNA-Mengen, diese erscheinen in allen Proben ähnlich intensiv was für ausreichenden Abgleich spricht.



**Abbildung 7: Expressionsanalyse von HPK 1, PU.1 und GABP-alpha in verschiedenen Zellpopulationen.** Zu sehen sind die Autoradiogramme der Southern Blots von HPK 1, PU.1 und GABP-alpha. Auf die Expression der o.g. Gene wurden embryonale Stammzellen, neuronale Stammzellen, Gesamtknochenmark, T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und zwei Populationen von Lineage-negativen Zellen (c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup> und c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>) untersucht. Die HPRT-PCR diente als Abgleich der einzusetzen den cDNA-Mengen. H<sub>2</sub>O-Proben dienten als Kontaminationskontrolle.

Es handelt sich um einen repräsentativen Blot zur übersichtlichen Gegenüberstellung vorher durchgeführter Experimente mit demselben Ergebnis.

## 4 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Gene zeigen Unterschiede in der Expression in den analysierten Zellpopulationen.

HPK 1 wird in Vorläuferzellen und in differenzierten Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert, was im Einklang mit der Literatur steht. HPK 1 ist demnach nicht nur ein Differenzierungsregulator, sondern nimmt auch regulatorische Aufgaben in reifen Zellen ein, z.B. in T- und B-Lymphozyten. Die unterschiedliche Expression von HPK 1 in den unabhängig voneinander isolierten T-Lymphozytenpopulationen könnte mehrere Gründe haben.

Unterschiede im Aktivierungszustand der T-Lymphozytenproben könnten zur Veränderung der HPK 1-Expression geführt haben.

In Granulozyten und neuralen Stammzellen konnte HPK 1 nicht nachgewiesen werden, sie ist damit entsprechend der Literatur auf das hämatopoetische System beschränkt.

Die geringe Signalintensität bei ES-Zellen könnte damit erklärt werden, dass einzelne Zellen in der ES-Zellpopulation erste Schritte zur Differenzierung zu hämatopoetischen Zellen eingeleitet haben. Da HPK 1 auch in hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird, könnte dieses Gen als eines der ersten bei der Differenzierung zu Blutzellen aktiviert werden.

Gabp-alpha ist außerhalb des hämatopoetischen Systems auch in embryonalen Stammzellen und in neuralen Stammzellen exprimiert, was Funktionen von Gabp-alpha in diesen Stammzellsystemen nahelegt.

Dies würde für eine grundlegende Funktion von Gabp-alpha sprechen, also eine die nicht auf das hämatopoetische System beschränkt ist.

Die Signale bei ES-Zellen und NSZs könnten auch durch verunreinigte Proben hervorgerufen worden sein.

Im hämatopoetischen System hat Gabp-alpha die Hauptaufgabe die Expressierung von Oberflächenrezeptoren zu regulieren, z.B. IL-2-Rezeptor. Eine

ähnliche Aufgabe lässt sich auch in anderen Zellsystemen vermuten, da Bestandteile des IL-2-Rezeptors auch in anderen Zelltypen exprimiert werden<sup>127</sup>.

PU.1 wurde nicht in NSZs nachgewiesen, was darauf schließen läßt, dass PU.1 in diesem Zelltyp keine Aufgaben wahrnimmt. PU.1 ist an der Regulation von linienspezifischen Zytokinen beteiligt, z.B. IL-7.

Viele molekulare Zusammenhänge in diesem komplexen Differenzierungssystem sind ungeklärt und sollten für besseres Verständnis der Zusammenhänge intensiv erforscht werden.

Die Gesamtheit aller exprimierten Gene einer Zelle stellt deren molekularen Fingerabdruck dar. Molekulare Fingerabdrücke sind ein wichtiges Modell in der heutigen Molekularbiologie geworden um Zellsysteme zu charakterisieren. Wesentlich ist dabei, dass nicht nur eine geringe Zahl an Genen betrachtet wird um einen Zelltyp einzigartig zu charakterisieren.

Ein wertvolles Hilfsmittel dabei sind beispielsweise Genchips. Mit diesen können mehrere tausend Gentranskripte zugleich nachgewiesen werden. Sie werden in Zukunft eine immer größere Rolle bei der Charakterisierung von Zellsystemen spielen. Mit Hilfe solcher Genchipanalysen könnten Datenbanken entstehen, welche einen umfassenden Vergleich von verschiedenen Zellpopulationen zulassen. Dadurch könnten die Gene identifiziert werden, die für bestimmte Differenzierungsschritte entscheidend sind.

Eine solche Datenbank wurde von der Arbeitsgruppe um IR.Lemischka und Natalia B. Ivanova im Department of Molecular Biology in Princeton erstellt<sup>128</sup>. Darin wurden diejenigen Gene beschrieben, die in den Stammzelltypen, ES-Zellen, NSZs und HSZs, vorhanden sind. Gene, die in allen drei Stammzelltypen aber nicht in Effektorzellen exprimiert werden, könnten grundlegende

Funktionen bei der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes von Stammzellen erfüllen.

In dieser Datenbank, welche unter:

[www.sciencemag.org/cgi/content/full/1073823/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1073823/DC1)

zu finden ist, waren die in dieser Arbeit untersuchten Gene allerdings nicht enthalten. Jedoch wäre ein Vergleich der Ergebnisse zu den betreffenden Genen von großem Interesse.

#### 4.1 Weiterführende Experimente

Eine Überexprimierung der untersuchten Gene in definierten hämatopoetischen Zellpopulationen könnte ein Ansatz sein, die Rolle dieser Gene weiter zu untersuchen. Eine Überexprimierung könnte eine verstärkte Differenzierung der Zellen in eine bestimmte Linie bewirken und so Aufschluß über die Funktion des Gens geben.

Außerdem wäre interessant, die Gene in neuronalen Stammzellen bzw. in embryonalen Stammzellen überzuexprimieren um ihre Funktion in diesen nicht hämatopoetischen Kompartimenten untersuchen zu können.

#### 4.2 Ausblick

Transkriptionsfaktoren sind für die Funktion einer Zelle mitverantwortlich, indem sie Gene anschalten, die für ihre spezifische Zellfunktionen wichtig sind.

Vertiefte Kenntnisse über die Wirkung von Transkriptionsfaktoren könnte eine Steuerung von Zellfunktionen erlauben. Grundlage hierfür wäre, dass die Regulierung von Transkriptionsfaktoren gezielt möglich wäre. Mit der gezielten Manipulation des Genexpressionsmusters von Zellen könnten völlig neue Therapieformen entwickelt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Identität von verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen wird durch zellspezifisches Genexpressionsmuster bestimmt<sup>128</sup>.

Ähnlich einem Fingerabdruck ist eine Zelle durch ihr Expressionsprofil charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren PU.1 und Gabp-alpha und der Proteinkinase HPK 1 im murinen hämatopoetischen System mittels RT-PCR-Analysen betrachtet.

Neben Gesamtknochenmark, hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, ES-Zellen und NSZs wurden sowohl differenzierte Zellen des myeloischen Systems als auch des lymphatischen Systems analysiert.

Die untersuchten Transkriptionsfaktoren PU.1 und Gabp-alpha konnten dabei ubiquitär in den untersuchten hämatopoetischen Zellpopulationen nachgewiesen werden. In NSCs konnte Gabp-alpha, jedoch nicht PU.1 nachgewiesen werden.

HPK 1 wurde im Einklang mit früheren Ergebnissen in Gesamtknochenmark in T- und B-Zellen in hämatopoetischen Vorläuferzellen und zu geringem Umfang in embryonalen Stammzellen gefunden.

Tiefere Einblicke in Veränderung des Expressionsprofils während der Differenzierung von unreifen Vorläuferzellen zu reifen Effektorzellen würden die Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der Differenzierung erweitern. Diese Erkenntnisse sind die Voraussetzung um in den Differenzierungsvorgang regulativ einzugreifen.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Lösungen und Medien

#### Allgemeine Lösungen

##### - **TB**

- Zusammensetzung
- **H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **0,89 M Tris-Borat**
- **0,025 M EDTA**
- Lagerung: Raumtemperatur

##### - **PBS**

- Zusammensetzung
- **H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **50 mM NaCl**
- **2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**
- **8 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**
- **2,7 mM KCl**
- pH: 7,4
- Lagerung: Raumtemperatur

##### - **BSA**

- 10% Stocklösung
- Hersteller: Böhlinger Mannheim
- Lagerung: 4°C

##### - **PBS/0,3% BSA**

- Zusammensetzung
- **PBS**
- **0,3 % BSA von 15% Stocklg.**

#### Zellaufschlüsse

##### - **Geys-Solution<sup>1</sup>**

- Zusammensetzung
- **1l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **NH<sub>4</sub>Cl**, 35g → 3,5%
- **KCl**, 1,85g → 0,185%
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12 H<sub>2</sub>O**, 1,5g → 0,15%
- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**, 0,12g → 0,012%
- **Glucose**, 5g → 0,5%
- **Phenolrot**, 50mg → 0,005%
- autoklaviert

##### - **10% SDS**

- Zusammensetzung
- **H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **SDS**
- Lagerung: Raumtemperatur

##### - **SSC (20×)**

- Zusammensetzung
- **H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **3 M NaCl**
- **0,3 M Na-Citrat**
- Lagerung: Raumtemperatur

##### - **Ladepuffer PCR**

- Zusammensetzung
- **25ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **25ml Glycerol 100%**
- **100 µl EDTA 0,1 M**
- **0,03g Bromphenolblau**

##### - **FCS**

- hitzeinaktiviertes, steril filtriertes
- Kälberserum

##### - **Geys-Solution<sup>2</sup>**

- Zusammensetzung
- **100ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**
- **MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O**, 0,42g → 0,42%
- **MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O**, 0,14g → 0,14%
- **CaCl<sub>2</sub>x2 H<sub>2</sub>O**, 0,23g → 0,23%
- autoklaviert

**- Geys-Solution<sup>3</sup>**

- Zusammensetzung

- **100ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**- **NaHCO<sub>3</sub>**, 2,2g → 2,2%

- autoklaviert

**- Geys-Solution**

- Zusammensetzung

- **H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>**, 560ml- **Geys-Solution<sup>1</sup> (siehe oben)**, 160ml → 20%- **Geys-Solution<sup>2</sup> (siehe oben)**, 40ml → 5%- **Geys-Solution<sup>3</sup> (siehe oben)**, 40ml → 5%

- Lagerung: 4°C

### 6.1.2 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden entsprechend den geltenden Tierschutzvorschriften in der Versuchstieranlage des Instituts für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung gehalten. Das Alter und das Geschlecht der Tiere spielte bei der Auswahl keine Rolle. Folgende Mauslinie wurde verwendet:

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
<b>C57Bl/6</b>	Charles River Laboratories	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Donor der Gewebe/Zellen für RNA</li> </ul>

### 6.1.3 Antikörper, Chemikalien, und Enzyme

PE-gelabelte Antikörper

**-Anti-Sca-1**

Hersteller: Pharmingen

Quelle: Ratte

Klon: D7

Lagerung: 4°C

## Fitc-gelabelte Antikörper

### **-Anti-c-kit**

Hersteller: eigene laborinterne Herstellung  
Lagerung: 4°C

### **-Anti-CD-8**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: 53-6.72  
Lagerung: 4°C

### **-Anti CD-4**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: Gk1.5  
Lagerung: 4°C

### **-Anti-GR 1**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: RB6-8C5  
Lagerung: 4°C

## Biotinilierte Antikörper

### **-Anti-CD-19**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: 1D3  
Lagerung: 4°C

### **-Rabbit-anti-goat IgG**

Hersteller: Jackson Immuno Research  
Laboratories Inc.  
Lagerung: 4°C

## Microbeads

### **Goat-Anti-Rat-Microbeads IgG**

Hersteller: Miltenyi Biotec  
Lagerung: 4°C

## Lineagecocktailantikörper

### **-Anti-Mac-1**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: M1/70  
Lagerung: 4°C

### **-Ter119**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Lagerung: 4°C

**-Anti-CD8**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: 53-6.72  
Lagerung : 4°C

**-Anti-B220**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: RA3-6B2  
Lagerung: 4°C

**-Anti-GR1**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: RB6-8C5  
Lagerung : 4°C

**-Anti-CD4**

Hersteller: Pharmingen  
Quelle: Ratte  
Klon: Gk1.5  
Lagerung : 4°C

## Chemiekalien

**-β-Mercaptoethanol**

Hersteller: Merck  
Lagerung: 4°C

**-Chloroform-Phenol**

Hersteller: Applichem  
Lagerung: 4°C

**-Isopropanol**

Hersteller: Applichem

**- Dextransulfat**

Hersteller: Amersham Pharmacia Biot.  
AG  
Lagerung: RT

**-Trichostatin A (TSA)**

Stocklösung 500 µM in 100% Ethanol  
Hersteller: SIGMA  
Lagerung: -20°C

**-NaOH**

Hersteller: Applichem

**- Ethanol**

Hersteller: Applichem

**- Ficoll**

Hersteller: Sigma  
Lagerung: RT

**-Agrose NEEO (Ultra-Qualität)**

Hersteller: Roth  
Lagerung: RT

**-Red 670 Streptavidin**

Hersteller: Gibco  
Lagerung: 4°C

## RNA Isloierung

**- peqGOLD RNAPure**

Hersteller: peqLab  
Lagerung: 4°C

## Polymerase Kettenreaktion

**- SuperTaq-Polymerase**

Konzentration: 5000 U/ml  
Hersteller: HT Biotechnology Ltd.  
Lagerung: -20°C

**- SuperTaq-Puffer (10×)**

Hersteller: HT Biotechnology Ltd.  
Lagerung: -20°C

**-dNTPs**

Konzentration: 10 mM  
Hersteller: Life Technologie  
Lagerung: -20°C

## Reverse Transkription

**-Omniscript™ Reverse Transkriptase kit**

Inhalt:  
Omniscript Reverse Transkriptase  
Buffer RT, 10x  
dNTP Mix, 5mM  
Rnase-free water  
Hersteller: Qiagen  
Lagerung: -20°C

**- Hexamer Primer**

Hersteller: MWG- Biotech AG  
Lagerung: -20°C  
Gemisch aus einzelsträngigen Hexameren mit statistisch verteilter Sequenzfolge

## Southern Blotting

**-Denaturierungspuffer**

-Zusammensetzung  
-H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
-1,5 mM NaCl  
-0,5 mM NaOH  
- Lagerung: Raumtemperatur

**-Transferpuffer**

-Zusammensetzung  
-H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
-20×SSC  
- pH: 7,0  
-Lagerung: Raumtemperatur

**- Denhardt's**

-Zusammensetzung  
-Ficoll  
-BSA  
-Polyvinyl pyrrolidone  
-Lagerung: 4°C

**-Waschpuffer II**

-Zusammensetzung  
-H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
-0,2×SSC  
-0,1%SDS  
Lagerung: Raumtemperatur

**- Prähybridisierungspuffer**

-Zusammensetzung  
-H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
-3×SSC  
-0,1%SDS  
-10×Denhardt's  
- 50 mg/ml Lachssperma DNA

**- Hybridisierungspuffer**

-Zusammensetzung  
-Prähybridisierungspuffer  
-10% Dextransulfat

#### 6.1.4 Oligonukleotide und Marker

Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG Biotech AG bezogen. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Folgende Oligonukleotide wurden im Verlauf der Arbeit eingesetzt:

<i>Name</i>		<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Gen oder Lokalisation/ Verwendung</i>	<i>GR</i>
HPRT	Sense	CAC AGG ACT AGA ACA CCT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase RT-PCR	249
	Antisense	GCT GGT GAA AAG GAC CTC T		
HPK1	Sense	TGG AGG AAT TAG GGA CGA TG	Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 RT-PCR	504
	Antisense	AGC AGA CCC AGG ATG CTA		
GABP- $\alpha$	Sense	AAT TGA GAT CGA CGG GAC TG	GA-repeat-binding-protein- alpha RT-PCR	286
	Antisense	TGG CTC CAT TCC TTG GTA AG		
PU.1	Sense	ACA CCA TGT CCA CAA CAA CG	Transkriptionsfaktor PU.1 RT-PCR	304
	Antisense	CTC CAA GCC ATC AGC TTC TC		

**GR:** Länge der amplifizierten DNA (bp)

Als Fragmentgrößen-Marker wurde verwendet:

- *ptz* Hinf I verdaut: 1202 bp, 517 bp, 396 bp, 349 bp, 201 bp, 75 bp, 65 bp, 44 bp
- *psm* Hind III verdaut: 3440 bp, 2610 bp, 1723 bp, 1169 bp, 801 bp, 564 bp, 524 bp, 447 bp, 219 bp, 145 bp

Marker wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 6.1.5 Laborgeräte, Verbrauchsmaterial

### Allgemeine Geräte

- **Thermocycler T3**  
Hersteller: Biometra
- **Zentrifuge Minifuge RF**  
Hersteller: Heraeus
- **Ultraviolet Crosslinker**  
Hersteller: Amersham Life Sciences
- **Fluorescence Activated Cell Sorter**  
Hersteller: Becton Dickinson
- **Negativ Sorter**  
Hersteller: nach Miltenyi
- **BioPhotometer**  
Hersteller: Eppendorf
- **Zentrifuge 5417C**  
Hersteller: Eppendorf
- **Mikroskop Televal 31**  
Hersteller: Zeiss
- **UV-Leuchttisch**  
Hersteller: A.Hartenstein
- **Zentrifuge Rotina 46 R**  
Hersteller: Hettich

### Southern Blotting

- **Nylon-Membran Nytron N**  
Hersteller: S & S und Hybaid
- **Röntgenfilm Biomax MR-1**  
Hersteller: Kodak

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.2.1.1 Extraktion von RNA aus Gesamtknochenmark

Mit Hilfe von „peqGOLD RNAPure“ erfolgte die Isolation von gesamt RNA aus Knochenmarkszellen. RNAPure enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat, welches die Zellen lysiert und RNAsen hemmt, in einphasiger Lösung. Es handelt sich dabei um eine Einschritts-Flüssigkeitsphasen-Separation.

Nach folgendem Protokoll wurde verfahren:

-Zentrifugation der Zellkultur in 15ml Zellkulturröhrchen, für 7 min. bei 200g und 4°C

-Absaugen des Überstandes und Zugabe von 700 µl peqGOLD RNAPure

-Vortexen und 70 µl Chloroform dazugeben

Vortexen und Inkubation für 5 min auf Eis zum Aufschluß der Zellen und Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren

-Zentrifugation bei 20000g für 5 min, bei 4°C

-Überführung des Überstands in ein neues, RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß

Reinigung und Konzentrierung der Nukleinsäurelösung wurde durch zweimalige Ethanolwaschung erreicht.

Alle Protokollpunkte erfolgten unter Eiskühlung:

-Zugabe von 500 µl Isopropanol (RNase-frei) und 1 µl Glykogen (20 µg/ml)

-Vortexen und 15 min bei -80°C

-Zentrifugation bei 20000g für 10 min bei 4°C

-Abnehmen des Überstandes, Zugabe von 500 µl 70%Ethanol/30%DEPC-H<sub>2</sub>O

-Zentrifugation bei 20000g für 10 min bei -5°C und einmalige Wiederholung des Waschvorganges mit Ethanol

-Aufnahme in 20 µl DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O

### 6.2.1.2 Photometrische Bestimmung des Gehalts an Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen

Durch Spektrophotometrie läßt sich die Konzentration der Nukleinsäurelösung durch Absorption der Lösung bei 260nm bestimmen. Die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration ist linear und nach folgender Formel zu berechnen:

$$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 33 \mu\text{g/ml} \quad \text{bei einzelsträngiger RNA}$$

### 6.2.1.3 Reverse Transkription

Da RNA aufgrund ihrer Instabilität für weitere labortechnische Maßnahmen ungeeignet ist, wird die RNA in DNA umgeschrieben, welche ausreichend stabil ist. Mit Hilfe des retroviralen Enzyms *Reverse Transkriptase (RT)* wurden RNase-frei isolierte mRNAs in komplementäre DNA-Kopien transkribiert. Dabei katalysiert die Reverse Transkriptase die Synthese einzelsträngiger DNA-Ketten und nutzt dabei die mRNAs als Vorlage.

Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

1. Inkubation der RNA-Lösung für 3 min bei 70°C
2. Inkubation der RNA-Lösung für 5 min auf Eis
3. Inkubation des reversen Transkriptionsansatzes für 1 h bei 37°C:

1 µg	RNA
4 µl	RT-Puffer (Gibco 5×first strand buffer)
1 µl	dNTPs (RNase-frei, 10 mM)
0,5 µl	reverse Transkriptase (5 U/µl, MLV)
0,5 µl	Hex-Primer (0,2 µg/µl)
2 µl	DDT
add.	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
20 µl	

Die resultierende cDNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

#### 6.2.1.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction [RT-PCR])

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction) handelt es sich um einen Reaktionsansatz, mit dessen Hilfe kurze DNA-Stücke exponentiell vermehrt werden können. Bekannte Randsequenzen des zu untersuchenden Gens sind Voraussetzung um ein spezifisches, komplementäres anlagern der Primer zu ermöglichen.

Folgenden Tatsachen sind essentiell für die Polymerasekettenreaktion:

- Die komplementären Basen eines doppelsträngiges DNA-Stück dissoziieren durch Erwärmen auf über 90 °C.
- Die DNA-Polymerase kann einen unvollständigen Doppelstrang mit freiem 3`OH Ende in 5`Richtung synthetisieren, wenn ihr die nötigen Salze und Nucleotide zur Verfügung stehen.
- Es existiert eine Grenztemperatur bei der die Primer nur an die komplementären Sequenzbereiche binden können und so freie 3`OH Enden für die Polymerase liefern.
- Die DNA-Polymerase verliert durch wiederholtes Erwärmen auf über 90 °C ihre Funktionsfähigkeit nicht. Die Enzyme wurden ursprünglich aus thermophilen Bakterien (*Thermophilus aquaticus*) gewonnen, inzwischen sind modifizierte rekombinante Enzyme mit effizienterer Syntheserate erhältlich.

Der gesamte Prozess besteht aus der zyklischen Abfolge von drei Arbeitsschritten:

- Zunächst wird die DNA durch Erhitzen denaturiert.
- Nach Abkühlung lagert sich der komplementärer Primer an die einzelsträngige DNA an.
- Die Polymerase synthetisiert vom Primer ab den komplementären DNA-Strang.
- Die Lösung wird erhitzt (über 90°C) und der Prozeß startet erneut.

Die exakte Auswahl und Anlagerung der Primer an den DNA-Strang bestimmt die Spezifität des der Methode. 20 Primernukleotide reichen aus um spezifisch einen Abschnitt im Genom zu vervielfältigen.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

### **HPRT-RT-PCR**

Ein typischer Reaktionsansatz enthält:

1 µl	RT-cDNA
5 µl	PCR Puffer (10x)
250 µM	je dNTP
100 ng	Senseprimer
100 ng	Antisenseprimer
0,05 U	Taq Polymerase
mit H <sub>2</sub> O auf 50 µl auffüllen	

Verwendete Primer: - HPRT-sense-Primer  
- HPRT-antisense-Primer

Zyklus:

5	min	94 °C	} 36 Zyklen
40	sec	94 °C	
40	sec	57 °C	
90	sec	72 °C	
10	min	72 °C	
Pause		4 °C	

Die Primersequenzen entstammen der Literatur, die Bedingungen der PCR wurden in unserem Labor etabliert.

**HPK1-RT-PCR**

Ein typischer Reaktionsansatz enthält:

1 $\mu$ l	RT-cDNA
5 $\mu$ l	PCR Puffer (10x)
375 $\mu$ M	je dNTP
150 ng	Senseprimer
150 ng	Antisenseprimer
0,1 U	Taq Polymerase
mit H <sub>2</sub> O auf 50 $\mu$ l auffüllen	

Verwendete Primer: - HPK1-sense-Primer  
- HPK1-antisense-Primer

Zyklus:

5 min	94 °C	} 45 Zyklen
30 sec	94 °C	
60 sec	62 °C	
60 sec	72 °C	
10 min	72 °C	
Pause	4 °C	

Die Primersequenzen entstammen der Literatur, die Bedingungen der PCR wurden von mir etabliert.

**GABP- $\alpha$ -RT-PCR**

Ein typischer Reaktionsansatz enthält:

1 $\mu$ l	RT-cDNA
5 $\mu$ l	PCR Puffer (10x)
500 $\mu$ M	je dNTP
100 ng	Senseprimer
100 ng	Antisenseprimer
0,05 U	Taq Polymerase
mit H <sub>2</sub> O auf 50 $\mu$ l auffüllen	

Verwendete Primer: - GABP- $\alpha$ -sense-Primer  
 - GABP- $\alpha$ -antisense-Primer

Zyklus:

5	min	94 °C	
40	sec	94 °C	] 35 Zyklen
40	sec	60 °C	
60	sec	72 °C	
10	min	72 °C	
	Pause	4 °C	

Die Primersequenzen entstammen der Literatur, die Bedingungen der PCR wurden von mir etabliert.

### **PU.1-RT-PCR**

Ein typischer Reaktionsansatz enthält:

1 $\mu$ l	RT-cDNA
5 $\mu$ l	PCR Puffer (10x)
500 $\mu$ M	je dNTP
100 ng	Senseprimer
100 ng	Antisenseprimer
0,05 U	Taq Polymerase
mit H <sub>2</sub> O auf 50 $\mu$ l auffüllen	

Verwendete Primer: - PU.1-sense-Primer  
 - PU.1-antisense-Primer

Zyklus:

5	min	95 °C	
40	sec	94 °C	] 35 Zyklen
40	sec	60 °C	
60	sec	72 °C	
10	min	72 °C	
	Pause	4 °C	

Die Primersequenzen entstammen der Literatur, die Bedingungen der PCR wurden von mir etabliert.

### 6.2.1.5 Herstellung von Agarosegelen

6 g Agarose wurden mit 400 ml 1xTBE-Puffer bei 100°C in der Mikrowelle gelöst. Es resultierte ein 1,5% iges Agarosegel. Anschließend wurden 20µl einer 0,5% Ethidiumbromidlösung dazugegeben. Nach kurzem Schütteln zur Durchmischung wurde das Gel in die vorgesehenen Kammern gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit TBE Laufpuffer überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/10 vol/vol 10X Ladepuffer (1xTBE, 50%(w/v) Glycerin, 1mM EDTA, 0,6‰ (w/v) Bromphenolblau, 0,6‰ (w/v) Xylencyanol) resuspendiert und danach mit 5-8 V/cm elektrophoretisch getrennt.

### 6.2.1.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gele

20µl der PCR-Ansätze wurden nach resuspendieren von ca. 2µl Ladepuffer auf das Gel aufgetragen.

Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte je nach erwarteter Größe in einem Spannungsfeld von ca. 5-8 V/cm für ca. 30-40 min. Die Fluoreszenz des zugesetzten Ethidiumbromids bei 590 nm ermöglichte eine Beobachtung der entsprechend ihrer Größe exponentiell aufgetrennten Fragmente im UV-Licht. Dies ist durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA-Doppelhelix möglich.

Durch gleichzeitiges Auftragen von Fragmentgrößenmarkern bekannter Anzahl an bps konnte die Größe des jeweiligen Fragments eingeschätzt werden.

Die Größenmarker sind 6.1.4 zu entnehmen.

### 6.2.1.7 Southern Blotting

Um die aufgetrennten PCR Produkte nachzuweisen, die nur in kleinen Mengen in der Probe vorhanden waren, wurden diese auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend auf dieser mit radioaktiven Sonden inkubiert und nachgewiesen.

Die Arbeiten der Gliederungspunkte 6.2.1.7.1, 6.2.1.7.2, 6.2.1.7.3, 6.2.1.7.5 und 6.2.1.7.6 wurden von speziell dafür geschulten medizinisch technischen Assistenten durchgeführt, da mit radioaktiven Stoffen gearbeitet wurde.

Die Methodik im einzelnen wurde aus der Arbeit vorangehender Diplomanden unseres Labors übernommen.

#### 6.2.1.7.1 Herstellung radioaktiv markierter Sonden<sup>129</sup>

Für die spezifische Hybridisierung von auf Filter übertragenen DNA-Fragmenten mussten zunächst die gesuchten Fragmente isoliert und radioaktiv markiert werden. Hierzu wurden sie im Anschluss an die PCR und die Auftrennung über ein Agarose-Gel aus letzterem ausgeschnitten, durch eine anliegende Spannung herausgelöst und anschließend einzelne Basen des Fragmentes im Rahmen einer „Nick Translation“ gegen radioaktiv markierte Basen ausgetauscht.

#### 6.2.1.7.2 Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen<sup>129</sup>

Die gewünschten DNA-Fragmente, die durch eine PCR entstanden sind, wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Auftrennen wurden die im UV-Licht gut sichtbaren Banden des gewünschten Fragmentes mit einem Skalpell möglichst fein herausgeschnitten, der Gelstreifen in einen Dialyseschlauch überführt und letzterer luftblasenfrei mit

2 ml TBE gefüllt und verschlossen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes von ca. 8 V/cm im TBE-Bad wanderten die DNA-Fragmente aus dem Gel an die Wand des Dialyseschlauches. Abschließend wird die Polarisierung des elektrischen Feldes zur Ablösung der DNA von der Membran für ca. 30-60 Sekunden umgekehrt, die Flüssigkeit aus dem Dialyseschlauch entnommen, das Innere mit ca. 1 ml TBE gespült. Zu der resultierenden Lösung von DNA-Fragmenten wurde die doppelte Menge 100%iger Ethanol (-20°C) sowie 10 Vol% 3M Natriumacetat zugegeben. Durch kräftiges Schütteln und Inkubation für 15 min bei -80 °C wurden die Fragmente gefällt. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe in 75 %igem Ethanol bevor die DNA in einem möglichst geringem Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen wurde.

#### 6.2.1.7.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „NickTranslation“<sup>129</sup>

Grundlage: In *E. coli* besitzt die Polymerase I die Fähigkeit von einem Einzelstrangbruch aus eine DNA-Strang abzubauen und mit neuem Material (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) wieder aufzufüllen. Diese Fähigkeit, des *in vitro*-Einbaus radioaktiv makierter Nucleotide in DNA-Stränge macht man sich bei der Radioaktiv-Makierung von DNA-Fragmenten zu eigen.

Zur radiaktiven Markierung der DNA-Fragmente wurden 40 ng DNA mit einem Enzymgemisch aus DNase I und DNA-Polymerase I versetzt und in Anwesenheit von dATP, dGTP, dTTP, und [<sup>32</sup>P]-dCTP (β-Strahler) für 45 min bei 15°C inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aufgrund der Spaltung der inneren Phosphodiesterbindungen durch DNase I (Endonuklease) Einzelstrangabschnitte, deren Komplementärstränge anschließend von der DNA-Polymerase I unter Verwendung der freien – und zu einem Viertel [<sup>32</sup>P]-markierten Nucleotide synthetisiert wurden.

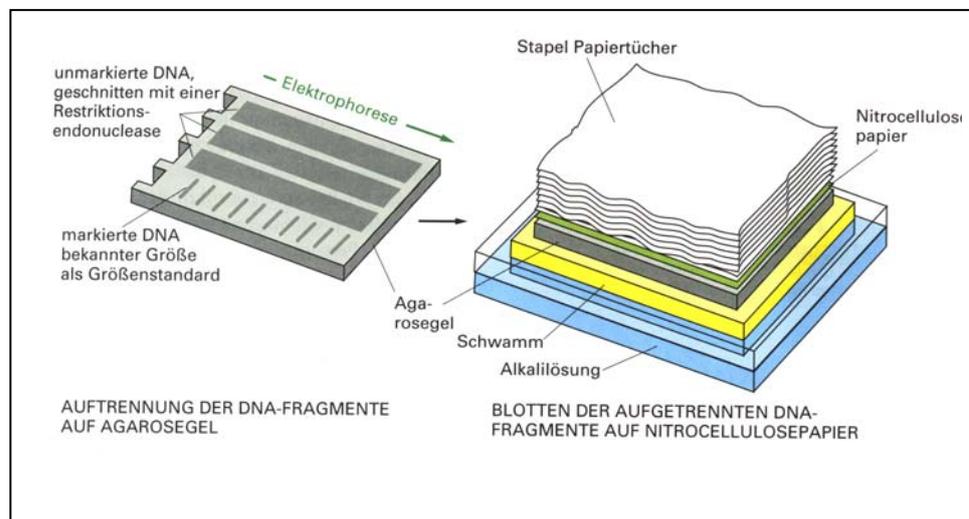
Um die so markierten Sonden von den aktiven Enzymen und freien Nucleotiden des Reaktionsansatzes zu befreien, wurde die Lösung anschließend über Sephadex G50-Säulen aufgetrennt. Hierzu wurde eine

Insulinspritze mit Glaswolle und Sephadex G50 luftblasenfrei gefüllt, bei 400 g 2 min zentrifugiert und die Reaktionslösung auf die Oberfläche der Säule gegeben. Bei der folgenden erneuten Zentrifugation (400 g, 2 min) wanderten die vergleichsweise großen DNA-Fragmente schnell durch die Gelmatrix und ließen sich anschließend in der sich unter der Säule absetzenden Flüssigkeit auffangen, während kleinere Moleküle wie freie Nukleotide oder Enzyme in die Innenräume der matrixbildenden Strukturen eindringen konnten und so zurückgehalten wurden (Molekularsieb-Prinzip).

#### 6.2.1.7.4 Übertragung von Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel auf Nylonmembranen

Nach der Auftrennung des Gels wurde dasselbe in Denaturierungspuffer gelegt, um die chemische Konsistenz des Gels zu verändern, um die folgende Extraktion der DNA-Fragmente zu erleichtern. Diese erfolgte im Rahmen eines Halbtrocken-

Blots. Das Gel liegt dabei auf einer Glasplatte, auf der sich transferpuffer getränktes



*Abbildung 8<sup>129</sup>*: **Aufbau eines Halbtrocken-Blot**

Filterpapier befindet. Die Nylonmembran wird luftblasenfrei auf der Rückseite des Gels positioniert und mit einer Filterpapierlage überdeckt (siehe Abb.8). Um den Kontakt zwischen Gel und Nylonmembran zu verstärken wurde die oben liegende Filterpapierlage einem geringen Gewicht ausgesetzt

(ca.500g). Der Transferpuffer wurde durch Kapillarkräfte langsam durch das Gel, die Nylonmembran und den oberen Filter hindurch gesogen. Die DNA-Fragmente wurden dabei mitgerissen und blieben an der Nylonmembran hängen. Dieser Vorgang erfolgte meist über Nacht. Die DNA-beschichtete Nylonmembran wurde anschließend zweimal für ca. 5 min in 2x SSC geschwenkt und zum Crosslinking der Nukleinsäuren mit der Membran in 60 sec mit 1200 mJ/cm<sup>2</sup> im UV-Licht belichtet.

#### 6.2.1.7.5 Hybridisierung der geblotteten Fragmente mit markierten Sonden<sup>129</sup>

Zur Hybridisierung der auf die Nylonmembranen geblotteten Fragmente wurden die Membranen zunächst für wenige Minuten nacheinander in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 6x SSC gewaschen, anschließend in Gruppen von maximal acht Membranen zusammengerollt und in ein gläsernes Hybridisierungsrohr gesteckt. Um ein festes Aneinanderheften oder gar Übertreten von DNA-Fragmenten bei den Membranen zu verhindern, wurden sie durch Trennlagen von Nylonflies, welches zuvor ebenfalls in 6x SSC gebadet worden waren, separiert. Nach Zugabe von 20 ml Prähybridisierungspuffer rotierten die Filter in den verschlossenen Hybridisierungsrohren bei 65°C für 1 h im Wärmeschrank, um durch die im Puffer enthaltene Lachssperma-DNA unspezifische DNA-Bindungsstellen auf den Membranen zu maskieren.

Zur Denaturierung partieller Doppelstränge wurden die radioaktiv markierten DNA-Sonden für 5 min bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer aus dem Hybridisierungsrohr entfernt und durch Hybridisierungspuffer ersetzt, dem die radioaktiv markierte Sonde zugesetzt worden war. Es folgte zur spezifischen Hybridisierung der geblotteten DNA-Fragmente die Inkubation der Membranen unter Rotation bei 65°C über Nacht. Abschließend wurden die Membranen zweimal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II gewaschen (jeweils 20 min), auf Filterpapier gelegt und mit Zellophanfolie umhüllt.

#### 6.2.1.7.6 Belichtung von Filmen mit markierten Filtern<sup>129</sup>

Zur Belichtung der Filme wurden die Membranen mit der geblotteten Seite auf einen Kodak Biomax MR-1-Röntgenfilm gelegt und in einer Metallkassette eingeschlossen. Je nach Stärke der radioaktiven Strahlung, die zuvor mit einem Geigerzähler abgeschätzt wurde, wurden die Kassetten für wenige Stunden bis zu einer Woche bei Raumtemperatur oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank inkubiert.

Die Entwicklung der belichteten Filme erfolgte in einem Kodak M35 XOmat Prozessor.

### 6.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 6.2.2.1 Isolierung adulter muriner Knochenmarkzellen

Das Versuchstier wurde durch Gnickbruch getötet und mit 70% Alkohol desinfiziert. Femora und Tibiae wurden freipräpariert und danach an den Gelenkenden eröffnet und das Knochenmark mit ca. 10 ml PBS unter sterilen Bedingungen ausgespült. Anschließend wurde das in der PBS gelöste Knochenmark auf Eis resuspendiert um eine Eizellsuspension zu erhalten. Danach wurde für 7 min bei 200 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde in 5-10 ml Gey-Solution resuspendiert und ca. 6 min auf Eis stehen gelassen um die ebenfalls im Knochenmark befindlichen aber für die weiteren Arbeitsschritte unbrauchbaren Erythrozyten zu lysieren. Danach wurde die Zellsuspension mit 1,5 ml 10%igem BSA unterschichtet und für 7 min. bei 200g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet in PBS/0,3% BSA resuspendiert und durch ein Nylonnetz gefiltert um einzelnene Zellen zu erhalten .

Anschließend wurde die Lebendzellzahl durch eine Neubauer-Zählkammer (siehe unten) ermittelt.

### 6.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

10  $\mu\text{l}$  der Suspension wurden entnommen und mit 10  $\mu\text{l}$  Trypanblau-Lösung vermischt. 10  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches wurden auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die heller gefärbten Zellen entsprachen lebenden Zellen, da diese in der Lage waren den o.g. Farbstoff aktiv aus dem Zytoplasma zu entfernen. Tiefblau erscheinendes Material entsprach toten Zellen bzw. Zellschrott. Ein großes Quadrat der Neubauer-Kammer wurde ausgezählt.

Die Zellkonzentration der Ausgangslösung lässt sich wie folgt berechnen:

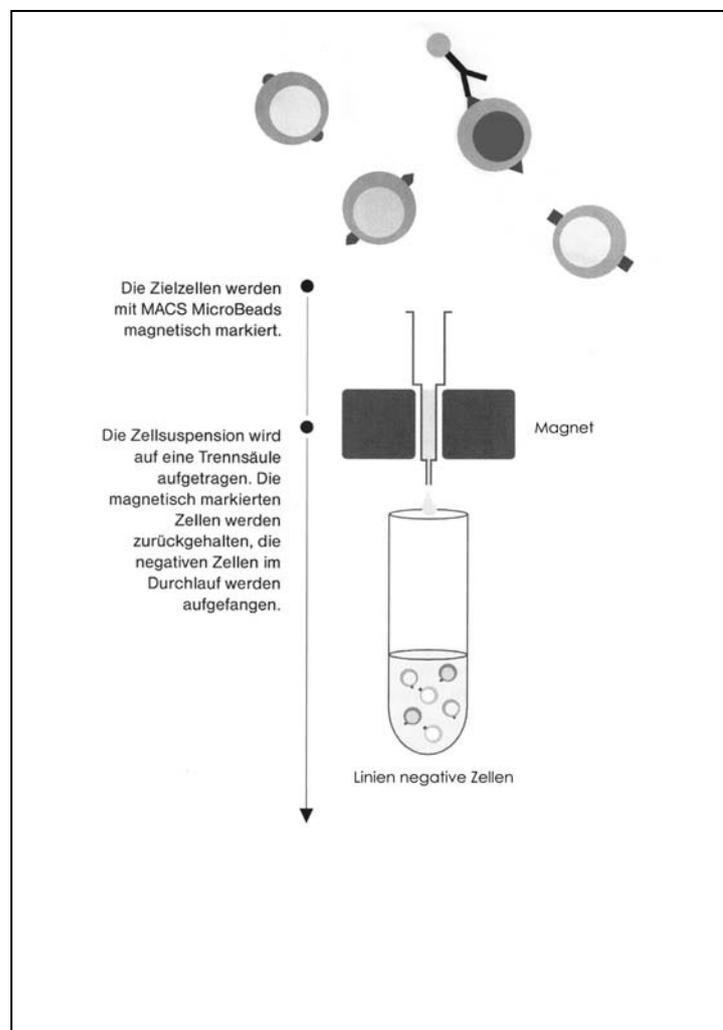
Lebende Zellen = Anzahl heller Zellen pro Großquadrat  $\times 10 \times 2/\mu\text{l}$

Andere Verdünnungen sind selbstverständlich entsprechend zu berechnen.

### 6.2.2.3 Aufreinigung von hämatopoetischen Stammzellen nach Miltenyi aus murinem Knochenmark

Das Knochenmark adulter Tiere ist ein Gemisch aus Effektorzellen, unreifen Vorläuferzellen und Stammzellen. Effektorzellen exprimieren spezifische Oberflächenantigene, welche auf Stamm- und Vorläuferzellen nicht gefunden werden können. Durch Negativselektion für die spezifischen Oberflächenantigenen der Effektorzellen kann eine Aufreinigung der Stamm- und Vorläuferzellen erfolgen. Als Puffer und Waschlösung

wurde auf 4°C gekühlter MACS-Puffer verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten eisgekühlt. Aus den hinteren Extremitäten einer Versuchsmaus wurde aus Tibiae und Femora Knochenmarkszellen gewonnen (→ Kapitel 6.2.2.1). Nach der KM-Gewinnung wurden die Zellen 5-10 min mit verdünntem hitzeinaktiviertem Mausserum inkubiert und gewaschen. Die KM-Zellen wurden nun 15-20 min mit einer optimalen



*Abbildung 9<sup>129</sup>*: **Aufbau der Lineage Depletion nach Miltenyi.** Mit sog. Microbeads werden lin<sup>+</sup>-Zellen durch einen starken Magneten herausgefiltert.

Verdünnung von Linien-Antikörpern inkubiert, welche gegen Effektorzelloberflächenantigene gerichtet waren. 2 Waschungen schlossen sich an. Anschließend wurde 15-20 min bei 4°C im Kühlschrank mit kolliodalen super-paramagnetischen Microbeads, die an Ziege anti.Ratte Ig(H+L) F(ab')<sub>2</sub> Antikörperfragmente gekoppelt waren, inkubiert und nochmals 2 mal gewaschen.

Nach der Füllung der Trennsäule mit MACs-Puffer (PBS) wurde diese in den Separationsmagneten gespannt. Sowohl um die Zellen zu trennen und zu waschen wurde eine G23 Kanüle zur Regulation der Durchflussgeschwindigkeit verwendet. Die Zellsuspension ließ man nun mit Waschpuffer durch die Trennsäule laufen. Linienpositive Zellen blieben nun aufgrund magnetischer Kräfte durch die Microbeads beschichteten Oberflächen an der Säule hängen, die liniennegativen Zellen wanderten durch die Säule hindurch, diese waren frei von Microbeads (siehe Abb.9). Danach wurde die Säule gegen die Laufrichtung mit 5 ml Puffer gespült. Die gespülte Zellsuspension wurde nochmals auf der Säule aufgetrennt. FACS-Analysen zeigten, dass beide resultierenden Zellfraktionen in ihrer Reinheit vergleichbar waren. Beide Fraktionen wurden daraufhin vereinigt.

Es folgten weitere Aufreinigungsverfahren durch FACS-Analyse, welche dem Ergebnisteil unter 4 zu entnehmen sind.

Zu den eingesetzten Antikörpermengen kann keine allgemeingültige Aussage gemacht werden, da jeder neue Antikörper für sich neu getestet werden muß um in optimaler Verdünnung eingesetzt werden zu können.

cDNA-Proben von embryonalen Stammzellen und neuronalen Stammzellen wurden mir von Labormitarbeitern zur Verfügung gestellt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110:1001-1020
2. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003;300:1251-1256
3. [www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm](http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm).
4. Sadler TW. *Medizinische Embryologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1998
5. Sukoyan MA, Vatin SY, Golubitsa AN, Zhelezova AI, Semenova LA, Serov OL. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*. 1993;36:148-158
6. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6126-6131
7. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:7634-7638
8. Beddington RS, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*. 1989;105:733-737
9. Rosenthal MD, Wishnow RM, Sato GH. In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1970;44:1001-1014
10. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*. 2002;12:432-438
11. Call LM, Moore CS, Stetten G, Gearhart JD. A cre-lox recombination system for the targeted integration of circular yeast artificial chromosomes into embryonic stem cells. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1745-1751
12. Wiles MV, Vauti F, Otte J, Fuchtbauer EM, Ruiz P, Fuchtbauer A, Arnold HH, Lehrach H, Metz T, von Melchner H, Wurst W. Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2000;24:13-14
13. Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Guglieri M, Comi GP. Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives on the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders. *Curr Gene Ther*. 2003;3:247-272
14. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 2002;110:385-397
15. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000;227:271-278
16. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000;18:399-404
17. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13726-13731
18. Shambloott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, Cheng L, Gearhart JD. Human embryonic germ cell derivatives express a broad

range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:113-118

19. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282:1145-1147

20. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19:193-204

21. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100:157-168

22. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124:319-335

23. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol.* 1969;136:269-293

24. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11879-11883

25. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 1996;10:3129-3140

26. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997;276:66-71

27. Momma S, Johansson CB, Frisen J. Get to know your stem cells. *Curr Opin Neurobiol.* 2000;10:45-49

28. Shihabuddin LS, Palmer TD, Gage FH. The search for neural progenitor cells: prospects for the therapy of neurodegenerative disease. *Mol Med Today.* 1999;5:474-480

29. Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9:135-141

30. Weiss S, van der Kooy D. CNS stem cells: where's the biology (a.k.a. beef)? *J Neurobiol.* 1998;36:307-314

31. Morshead CM, van der Kooy D. A new 'spin' on neural stem cells? *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11:59-65

32. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 1994;264:1145-1148

33. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313-1317

34. Schultz E. Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. *Am J Anat.* 1976;147:49-70

35. Schultz E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol.* 1996;175:84-94

36. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science.* 2000;287:1431-1433

37. Ghazizadeh S, Taichman LB. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *Embo J.* 2001;20:1215-1222

38. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 2000;102:451-461

39. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001;292:1389-1394

40. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from

adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001;50:521-533

41. Crosby HA, Strain AJ. Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived? *Gut*. 2001;48:153-154

42. Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res*. 1990;50:3811-3815

43. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. *Am J Pathol*. 1993;142:1331-1333

44. Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol*. 1993;143:1606-1620

45. Lazaro CA, Rhim JA, Yamada Y, Fausto N. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res*. 1998;58:5514-5522

46. Germain L, Noel M, Gourdeau H, Marceau N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res*. 1988;48:368-378

47. Sirica AE, Mathis GA, Sano N, Elmore LW. Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology*. 1990;58:44-64

48. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J*. 2003;4:92-96

49. Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*. 2003;141:342-349

50. McCulloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med*. 2005;11:1026-1028

51. Hess DA, Karanu FN, Levac K, Gallacher L, Bhatia M. Coculture and transplant of purified CD34(+)Lin(-) and CD34(-)Lin(-) cells reveals functional interaction between repopulating hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2003;17:1613-1625

52. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:141-151

53. Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med*. 1992;175:175-184

54. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242-245

55. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241:58-62

56. MacKey MC. Cell kinetic status of haematopoietic stem cells. *Cell Prolif*. 2001;34:71-83

57.

[http://www.fhcrc.org/education/courses/cancer\\_course/basic/molecular/differentiation.html](http://www.fhcrc.org/education/courses/cancer_course/basic/molecular/differentiation.html).

58. Labastie MC, Cortes F, Romeo PH, Dulac C, Peault B. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood*. 1998;92:3624-3635

59. Orlic D, Girard LJ, Anderson SM, Pyle LC, Yoder MC, Broxmeyer HE, Bodine DM. Identification of human and mouse hematopoietic stem cell populations expressing high levels of mRNA encoding retrovirus receptors. *Blood*. 1998;91:3247-3254

60. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000;192:1273-1280
61. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705
62. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 2000;406:257
63. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6:1229-1234
64. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-1779
65. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290:1779-1782
66. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999;283:534-537
67. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000;288:1660-1663
68. Bianco P, Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res*. 1999;251:257-263
69. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*. 2001;7:393-395
70. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528-1530
71. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-436
72. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoger H, Elbe-Burger A, Wachtler F. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)*. 1999;199:391-396
73. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation*. 1998;97:1108-1110
74. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284:1168-1170
75. Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2000;343:750-758
76. Joshi SS, Tarantolo SR, Kuszynski CA, Kessinger A. Antitumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4351-4358
77. Kuci S, Wessels JT, Buhning HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Loffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D, Handgretinger R. Identification of a novel class

of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood*. 2003;101:869-876

78. Vega FM, Gonzalo P, Gaspar ML, Lazo PA. Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Lett*. 2003;544:176-180

79. Sieweke MH, Graf T. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:545-551

80. Shimokawa T, Ra C. C/EBPalpha functionally and physically interacts with GABP to activate the human myeloid IgA Fc receptor (Fc alphaR, CD89) gene promoter. *Blood*. 2005;106:2534-2542

81. Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell*. 1996;85:49-60

82. Kulesa H, Frampton J, Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev*. 1995;9:1250-1262

83. Nerlov C, McNagny KM, Doderlein G, Kowenz-Leutz E, Graf T. Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev*. 1998;12:2413-2423

84. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*. 1993;13:473-486

85. Zhang R, Tsai FY, Orkin SH. Hematopoietic development of *vav*<sup>-/-</sup> mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12755-12759

86. Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merckenschlager M, Fisher AG. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*. 1997;91:845-854

87. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev*. 1998;12:782-796

88. Senis YA, Craig AW, Greer PA. Fps/Fes and Fer protein-tyrosinekinases play redundant roles in regulating hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2003;31:673-681

89. Blumenthal SG, Aichele G, Wirth T, Czernilofsky AP, Nordheim A, Dittmer J. Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J Biol Chem*. 1999;274:12910-12916

90. Avots A, Hoffmeyer A, Flory E, Cimanis A, Rapp UR, Serfling E. GABP factors bind to a distal interleukin 2 (IL-2) enhancer and contribute to c-Raf-mediated increase in IL-2 induction. *Mol Cell Biol*. 1997;17:4381-4389

91. Izquierdo M, Leervers SJ, Marshall CJ, Cantrell D. p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal-regulated kinase 2 in T lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;178:1199-1208

92. Owaki H, Varma R, Gillis B, Bruder JT, Rapp UR, Davis LS, Geppert TD. Raf-1 is required for T cell IL2 production. *Embo J*. 1993;12:4367-4373

93. Siegel JN, June CH, Yamada H, Rapp UR, Samelson LE. Rapid activation of C-Raf-1 after stimulation of the T-cell receptor or the muscarinic receptor type 1 in resting T cells. *J Immunol*. 1993;151:4116-4127

94. Whitehurst CE, Boulton TG, Cobb MH, Geppert TD. Extracellular signal-regulated kinases in T cells. Anti-CD3 and 4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate-induced phosphorylation and activation. *J Immunol*. 1992;148:3230-3237

95. Bannert N, Avots A, Baier M, Serfling E, Kurth R. GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of

the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1541-1546

96. Xue HH, Bollenbacher J, Rovella V, Tripuraneni R, Du YB, Liu CY, Williams A, McCoy JP, Leonard WJ. GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells. *Nat Immunol*. 2004;5:1036-1044

97. Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, Smith ED, Lancki DW, Gurish MF, Friend DS, Stevens RL, Anastasi J, Singh H. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity*. 2002;17:665-676

98. Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultchi AI. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *Embo J*. 2005

99. Kitajima K, Tanaka M, Zheng J, Yen H, Sato A, Sugiyama D, Umehara H, Sakai E, Nakano T. Redirecting differentiation of hematopoietic progenitors by a transcription factor GATA-2. *Blood*. 2005

100. Anderson KL, Smith KA, Pio F, Torbett BE, Maki RA. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood*. 1998;92:1576-1585

101. DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*. 2002;16:297-309

102. Scott EW, Fisher RC, Olson MC, Kehrl EW, Simon MC, Singh H. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*. 1997;6:437-447

103. Singh H, DeKoter RP, Walsh JC. PU.1, a shared transcriptional regulator of lymphoid and myeloid cell fates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:13-20

104. Galson DL, Hensold JO, Bishop TR, Schalling M, D'Andrea AD, Jones C, Auron PE, Housman DE. Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol Cell Biol*. 1993;13:2929-2941

105. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000;288:1439-1441

106. Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2005;33:395-402

107. Atar O, Levi BZ. PU.1 silencing leads to terminal differentiation of erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:1288-1292

108. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, Tenen DG. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004;36:624-630

109. Koschmieder S, Rosenbauer F, Steidl U, Owens BM, Tenen DG. Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol*. 2005;81:368-377

110. Kwon OH, Lee CK, Lee YI, Paik SG, Lee HJ. The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:437-446

111. Marafioti T, Mancini C, Ascani S, Sabattini E, Zinzani PL, Pozzobon M, Pulford K, Falini B, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Mason DY, Pileri SA. Leukocyte-specific phosphoprotein-1 and PU.1: two useful markers for distinguishing T-cell-rich B-cell lymphoma from lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *Haematologica*. 2004;89:957-964

112. Schlesinger TK, Fanger GR, Yujiri T, Johnson GL. The TAO of MEKK. *Front Biosci*. 1998;3:D1181-1186

113. Hu MC, Qiu WR, Wang X, Meyer CF, Tan TH. Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. *Genes Dev.* 1996;10:2251-2264
114. Chen YR, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996;271:631-634
115. Chen YR, Meyer CF, Ahmed B, Yao Z, Tan TH. Caspase-mediated cleavage and functional changes of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1). *Oncogene.* 1999;18:7370-7377
116. Sakata N, Patel HR, Terada N, Aruffo A, Johnson GL, Gelfand EW. Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J Biol Chem.* 1995;270:30823-30828
117. Westwick JK, Bielawska AE, Dbaiibo G, Hannun YA, Brenner DA. Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995;270:22689-22692
118. Saleem A, Datta R, Yuan ZM, Kharbanda S, Kufe D. Involvement of stress-activated protein kinase in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Cell Growth Differ.* 1995;6:1651-1658
119. Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Jha MK, Schimpl A, Avots A, Serfling E. Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes. *Blood.* 2002;100:954-960
120. Tsuji S, Okamoto M, Yamada K, Okamoto N, Goitsuka R, Arnold R, Kiefer F, Kitamura D. B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Exp Med.* 2001;194:529-539
121. Cao MY, Davidson D, Yu J, Latour S, Veillette A. Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells. *J Exp Med.* 1999;190:1527-1534
122. Goitsuka R, Kanazashi H, Sasanuma H, Fujimura Y, Hidaka Y, Tatsuno A, Ra C, Hayashi K, Kitamura D. A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation. *Int Immunol.* 2000;12:573-580
123. Wienands J, Schweikert J, Wollscheid B, Jumaa H, Nielsen PJ, Reth M. SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med.* 1998;188:791-795
124. Yu J, Riou C, Davidson D, Minhas R, Robson JD, Julius M, Arnold R, Kiefer F, Veillette A. Synergistic regulation of immunoreceptor signaling by SLP-76-related adaptor Clnk and serine/threonine protein kinase HPK-1. *Mol Cell Biol.* 2001;21:6102-6112
125. Boomer JS, Tan TH. Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. *J Cell Biochem.* 2005;95:34-44
126. Nagata Y, Kiefer F, Watanabe T, Todokoro K. Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 by erythropoietin. *Blood.* 1999;93:3347-3354
127. Ozawa A, Tada H, Tamai R, Uehara A, Watanabe K, Yamaguchi T, Shimauchi H, Takada H, Sugawara S. Expression of IL-2 receptor beta and gamma chains by human gingival fibroblasts and up-regulation of adhesion to neutrophils in response to IL-2. *J Leukoc Biol.* 2003;74:352-359
128. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science.* 2002;298:601-604
129. Kirsten J. Analyse des Entwicklungspotenzials hämatopoetischer Stammzellen- und Vorläuferzellen nach Modifikation des Acetylierungs- und

---

Methylierungsmusters. Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ).  
2002;Diplomarbeit

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die diese Arbeit unterstützt haben.

Zu allererst bei Herrn Professor Dr. Albrecht Müller, da er mir die Möglichkeit und die Unterstützung gegeben hat eine medizinische Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und mir die dabei nötige Flexibilität, was Laborarbeitszeiten betrifft, zugestanden hat.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Paul-Gerhard Schlegel für seine spontane Übernahme der Koreferenz dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt weiter:

Carolin Schmittwolf, für die Einarbeitung in Labortechniken und die ständige Unterstützung in theoretischen und technischen Fragestellungen, die immer sehr weitergeholfen haben.

Friedrich Harder, für die motivierenden Erklärungen, dass Forschung nunmal oft mit Frustration verbunden ist.

Nicole Kirchhof und Suzana Petrovic für eine lustige Laborzeit.

Michael Dürr für Unterstützung in Zeiten, in denen gar nichts mehr funktionierte und nicht zu vergessen für die Hilfestellungen bei der schriftlichen Ausfertigung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich unseren unermüdlichen Helferinnen, Bettina Mühl und Angela Merkel, für die täglichen Laborarbeit und unseren Tierpfleger/innen für die Pflege der verwendeten Versuchstiere.

Selbstverständlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeiter/innen des MSZ, mit denen ich während meiner Arbeitszeit im Institut in Kontakt kam und die mich in vielen Fragen, vor allem computertechnischen Problemen, unterstützten.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Würzburg, Dezember 2005

Kristoff Jäckle

## **Curriculum Vitae**

Jäckle, Kristoff  
geboren am 15.03.1978 in Günzburg

ledig

**Familie:** Vater:       Kriminalbeamter  
          Mutter:       Industriekauffrau  
          Schwester:  Arzthelferin/Hotelfachfrau

### **Schulbildung**

Grundschule Offingen 1984-1988  
Dossenberger- Gymnasium Günzburg 1988-1997  
11.Jahrgangsstufe an der Tongue River High School in Dayton, Wyoming, U.S.A  
**Abitur 1997**

### **Zivildienst**

beim **Bayrischen Roten Kreuz** Günzburg in der Abteilung Rettungsdienst  
Dienstzeit vom 01.09.1997 bis 30.09.1998  
Ausbildungsabschluß zum Rettungssanitäter

### **Studium**

Humanmedizinstudium ab SS 1999  
Physikum nach dem 4. Semester WS 2000/2001  
1. Staatsexamen nach dem 6.Semester WS 2001/2002  
2. Staatsexamen nach dem 10.Semester WS 2003/2004  
3. Staatsexamen nach dem 13.Semester November 2005

### **Famulaturen**

September 2001: **HNO-Heilkunde** Privatpraxis, Naoussa, Griechenland  
August 2002:   **Visceralchirurgie**, Inselspital Bern, Schweiz  
September 2002: **Orthopädische Gemeinschaftspraxis** in Günzburg  
Februar 2003:  **Hämatologie**, Universitätsklinik Würzburg  
März 2003:     **Innere Medizin**, Krankenhaus Oettingen in Bayern

### **Praktisches Jahr**

Oktober/November 2004: **Nephrologie**, Gold Coast Hospital, University of Queensland, Australia  
Dez./Jan. 2004/2005:   **Kardiologie**, Universitätsklinik Würzburg  
Februar-Juni 2005:    **Chirurgie**, Kantonspital Glarus, Schweiz  
Juni-September 2005: **Orthopädie**, Schulthess-Klinik Zürich, Schweiz

**Seit Juni 2006 Assistenzarzt in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Kempten**

-----  
Kristoff Jäckle