

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Ulrich Walter

REGULATION DER PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG
HÄMATOPOETISCHER VORLÄUFERZELLEN DURCH ZYKLISCHE
NUKLEOTIDE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius – Maximilians – Universität Würzburg
vorgelegt von
Sonja Brich, geb. Heeg
aus Aschaffenburg

Würzburg, Januar 2009

Referent: Professor Dr. med. Martin Eigenthaler

Koreferent: Professor Dr. med. Markus Böck

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2009

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Stammzelle / hämatopoetische Vorläuferzelle :	
Ursprung, Entwicklung, therapeutischer Einsatz	1
1.1.1 Herkunft der Blutzellen	1
1.1.2 Das Stammzellsystem	2
1.1.3 Therapeutischer Einsatz der Stammzellen	6
1.2 Der Zellzyklus	10
1.3 Zyklische Nukleotide: Vorkommen und Wirkung	13
1.4 Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP)	15
1.5 Ziel der Arbeit	17
2. Abkürzungen und Maßeinheiten	18
3. Materialien	21
3.1 Antikörper und Antiseren	21
3.2 Kulturmedien und – zusätze	23
3.3 Chemikalien und Lösungen	23
3.4 Kits	24
3.5 Verbrauchsmaterialien	24
3.6 Geräte	25
4. Methoden	27
4.1 Die Durchflusszytometrie – Prinzip	27

4.2 Humane CD34-positive hämatopoetische Stammzellen	29
4.2.1 Präparation von adulten humanen CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen	29
4.2.2 Separation der CD34-positiven Stammzellen	30
4.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels LeucoCount Kit	32
4.2.4 Einfrieren und Auftauen CD34-positiver Stammzellen	33
4.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Technik	34
4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot	35
4.3.3 Inkubation mit spezifischen Antiseren und Proteinnachweis	38
4.4 Zellkultur	40
4.4.1 Kulturbedingungen	40
4.4.2 Stimulation CD34-positiver Progenitorzellen mit DEA/NO	40
4.4.3 Durchflusszytometrische Analyse der CD34-positiven Stammzellen	
4.5 Die Zellzyklus-Analyse	43
5. Ergebnisse	46
5.1 Biochemischer Nachweis der cGMP- und cAMP-regulierten Signalwege in humanen CD34-positive hämatopoetischen Stammzellen	46
5.1.1 Nachweis der cGMP abhängigen-Proteinkinase I β (cGMP-PK I β) in CD34-positiven Stammzellen	46
5.1.2 Nachweis des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) in CD34-positiven Stammzellen	47

5.1.3 Einfluss von cAMP und cGMP auf die VASP- Phosphorylierung in CD34-positiven Stammzellen	49
5.2 Einfluss von cGMP auf Proliferation und Differenzierung humaner CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen	53
5.2.1 Einfluss von cGMP auf die Proliferation CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen	53
5.2.1.1 Proliferation unstimulierter CD34-positiver Stammzellen	53
5.2.1.2 Proliferation CD34-positiver Stammzellen unter Stimulation mit dem cGMP-Analagon DEA/NO	53
5.2.2 Einfluss von cGMP auf den Zellzyklus CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen	55
5.2.2.1 Darstellung eines typischen Zellzyklus unstimulierter CD34-positiver Stammzellen	56
5.2.2.2 Zellzyklus CD34-positiver Stammzellen unter Stimulation mit DEA/NO	57
5.2.3 Einfluss von cGMP auf die Differenzierung CD34-positiver Stammzellen	62
5.2.3.1 Differenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen zu Granulozyten/Monozyten (CD15-positiv)	62
5.2.3.2 Differenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen zu Megakaryozyten (CD41-positiv)	63
6. Diskussion	66
6.1 VASP in CD34-positiven humanen Stammzellen	66
6.2 Funktionen von VASP für die Differenzierung von CD34-positiven Stammzellen	70
6.3 Effekte von DEA/NO auf die Proliferation humaner CD34-positiver Stammzellen	72

6.4 Effekte von DEA/NO auf die Differenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen	74
7. Zusammenfassung	78
8. Literaturverzeichnis	80

1. Einleitung

1.1 Die Stammzelle / hämatopoetische Vorläuferzelle: Ursprung, Entwicklung, Therapeutischer Einsatz

1.1.1 Herkunft der Blutzellen

Die Neubildung von Blutzellen, Hämatopoese, geht von Stamm- bzw. Vorläuferzellen aus und findet in hämatopoetischen Organen wie Knochenmark und lymphatischem Gewebe statt. Die Hämatopoese umfasst im Rahmen der Myelopoese, der Erythropoese und der Lymphopoese die Bildung aller Zellreihen: Unter Myelopoese versteht man die Bildung von obligat markgebundenen Zellreihen wie Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten. Die Erythropoese umfasst die Bildung der roten Blutkörperchen und ist beim Erwachsenen fast ausschließlich an das Knochenmark gebunden, kann jedoch auch bei extrem gesteigertem Bedarf in Leber und Milz stattfinden. Während der Lymphopoese hingegen werden Lymphozytenreihen gebildet. Diese Zellen stammen zwar von einer Knochenmarks-gebundenen Stammzelle ab, wandern jedoch frühzeitig in Thymus, Milz und Lymphknoten aus, wo sie unter dem Einfluss humoraler Faktoren in die verschiedenen Immunzellen differenzieren.

Die Hämatopoese beginnt bereits während der 3. Woche der Embryonalentwicklung im Dottersack sowie in der embryonalen Aorta, später auch in Leber und Milz und ab dem 7. Monat der Fetalentwicklung überwiegend im Knochenmark (Tavian et al. 2005, Bollerot et al. 2005). Bei Neugeborenen werden noch in fast allen Knochen Blut gebildet, beim Erwachsenen hingegen dient nur noch ca. 30 % des Knochenmarks, sogenanntes `rotes Mark`, der Hämatopoese und befindet sich v.a. im Stammskelett und in den proximalen Anteilen der langen Röhrenknochen.

1.1.2 Das Stammzellsystem

Nach ihrer Differenzierungspotenz unterscheidet man totipotente Stammzellen mit uneingeschränkter Differenzierungs- und Selbsterneuerungspotenz von pluri- und unipotenten Stammzellen. Die pluripotente Stammzelle leitet sich direkt vom embryonalen Mesenchym ab und wird auch Hämoytoblast genannt. Sie wird in allen blutbildenden Geweben gefunden und zirkuliert in kleinen Mengen auch im peripheren Blut. Morphologisch gleichen die Stammzellen den Lymphozyten. Durch differentielle Zellteilung der undeterminierten pluripotenten Stammzellen entstehen determinierte unipotente Stammzellen, die auch als Vorläufer- oder Progenitorzellen bezeichnet werden. Aus den pluripotenten Stammzellen ist eine Differenzierung in alle Zellen des myeloischen (Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten) oder lymphatischen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen und Natürliche Killerzellen) Systems möglich (Tavian et al. 2005, Blom et al. 2006). Sie sammeln sich im Knochenmark entsprechend ihrer Zelldetermination zu koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU) und können von sogenannte colony stimulating factors (CSF) aktiviert werden. Dabei ist im Rahmen der Myelopoese CFU-Eo für die Ausbildung zu eosinophilen Granulozyten, CFU-G/M für die Entwicklung zu Granulozyten oder Monozyten (Kubik 1980) verantwortlich. CFU-E/Mega determiniert die Bildung zu Erythrozyten oder Megakaryozyten.

Für diese Proliferations- und Differenzierungsprozesse sind verschiedene hämatopoetische Faktoren verantwortlich, u.a. Interleukine, colony stimulating factors (CSF), Erythropoetin und das Thrombopoetin.

Hämatopoetische Regulation

Es wurde eine Reihe von Zytokinen identifiziert, welche die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen beeinflussen:

Der Stammzellfaktor (SCF) ist für die Hämatopoese ein essentielles Zytokin, indem es den Eintritt der Zellen in den Zellzyklus beeinflusst und die Differenzierung und Proliferation der Zellen erleichtert. Dabei ist SCF alleine nicht in der Lage

Progenitorzellen in den Zellzyklus zu `schicken`; es schützt sie jedoch vor apoptotischem Zelltod. In Kombination mit anderen Zytokinen steigert SCF das Zellwachstum CD34-positiver Zellen (Hassan et al. 1996).

Thrombopoetin (TPO), das u.a. in Leber, Niere und Knochenmarkstroma gebildet wird, ist der bedeutsamste Regulator von Wachstum, Differenzierung und Reifung von Megakaryozyten (Li et al. 2005, de Sauvage et al. 1994, Kaushansky et al. 1994). Der Serum-TPO-Spiegel korreliert signifikant mit dem Schweregrad einer peripheren Thrombozytopenie. Weiter wurde eine inverse Korrelation zwischen TPO-Spiegel und Thrombozytenzahl beobachtet (Shimazaki et al. 1997). Als c-mpl-Ligand (Wendling et al. 1994) induziert TPO das Wachstum von Megakaryozyten-Vorstufen sowie deren spätere Ausdifferenzierung zu Thrombozyten über Aktivierung zahlreicher Signalkaskaden wie MAPK (Ras/mitogen-activated protein kinase), STAT 5 (signal transducers and activators of transcription 5), PI3-K (phosphatidyl-inositol 3-Kinase) und Protein C (Matsumara et al. 2002). Interleukin-3 (IL-3) ist dabei in der Lage, in vitro sowohl Proliferation als auch Differenzierung von Megakaryozyten-Vorstufen zu induzieren (Cardier et al. 1996).

Auf Grund der Komplexität der Regulation ist meist mehr als ein Wachstumsfaktor an der Regulation einer Zellreihe beteiligt:

In Kombination von TPO mit Interleukin-3 oder SCF wird ein signifikanter Anstieg der Zahl von CFU-Mega induziert (Cardier et al. 1996). Weiter hat die Kombination von Interleukin-6 (IL-6) zusammen mit IL-3 und TPO via Glycoprotein 130 einen günstigen Effekt auf die Entstehung von Megakaryozyten (Siu et al. 1999).

Auf die Differenzierung zu Granulozyten und Monozyten hat eine Kombination aus den sechs Faktoren Interleukin-3 (IL-3), Stammzellfaktor (SCF), Thrombopoetin (TPO), Interleukin-6 (IL-6), GM-CSF und G-CSF den größten Einfluss (Laluppa et al. 1997, Cook et al. 1989).

Viele Wachstumsfaktoren finden bereits klinischen Einsatz wie z.B. das Erythropoetin zur Behandlung der renalen Anämie (Eschbach et al. 1987) oder G-CSF zur Verkürzung einer Neutropenie im Rahmen einer Chemotherapie (Ravandi

F. 2006). Erythropoetin verstärkt zudem die proliferationsfördernde Aktivität von TPO auf Megakaryozyten (Cardier et al. 1996).

Identifikation humaner Stammzellen

Zur Identifikation von humanen Stammzellen wurde eine Reihe von Markern entdeckt. Das Differenzierungsantigen CD34 (cluster of differentiation) war der erste Marker, der auf allen humanen hämatopoetischen Progenitorzellen gefunden wurde (Civin et al. 1990). Es folgten weitere Charakterisierungen wie die Zugehörigkeit der Progenitorzellen zur CD59 Familie (Hill et al. 1996) und zur CD133 Klasse (Kobari et al. 2001). Wie die Maus-Stammzelle ist die humane Stammzelle Thy-1 positiv (Baum et al. 1992), Lin negativ und beide exprimieren die c-kit Rezeptor Tyrosinkinase. Dieser CD34+Tyr+Lin-(c-kit lo) Phänotyp identifiziert humane hämatopoetische Stammzellen in adultem Knochenmark, peripherem Blut, fetaler Leber, fetalem Knochenmark und Nabelschnurblut (Lagasse et al. 2001). Es ist wichtig hervorzuheben, dass die CD34-positive Zellpopulation 1 % - 6 % des Knochenmarks, dagegen die hämatopoetische Stammzellen nur circa 0,5 % repräsentieren. Folglich enthält die CD34-positive Zellpopulation, im Gegensatz zu den hämatopoetischen Stammzellen, auch nicht-hämatopoetische Stammzellen (Lagasse et al. 2001). In allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten handelt es sich um CD34-positive Progenitorzellen, die synonym zu Stammzellen oder CD34-positiven Stammzellen verwendet werden.

Granulozyten und Monozyten

Die Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und ins Blut abgegeben. Ihre Lebensdauer beträgt 2-3 Tage. Der anschließende Abbau erfolgt im mononukleären Phagozytosesystem. Die Granulozyten können die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern, wo sie vor allem der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Parasiten und Pilzen dienen. Man unterscheidet nach ihrem Färbeverhalten neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten.

Die neutrophilen Granulozyten machen ca. 60 % der Zellen im Differentialblutbild aus. Nach ihrem Reifungsgrad unterscheidet man jugendlich stabkernige von ausgereiften segmentkernigen Granulozyten. Nach Aktivierung über Antigen-Bindung wandern diese aktiv zu einem Infektionsherd aus, um dort Erreger zu identifizieren, aufzunehmen und abzutöten. Neutrophile Zellen besitzen viele Granula, die saure Hydrolasen, Plasminogenaktivatoren, Myeloperoxidase und neutrale Proteasen wie Elastase, Kollagenasen und Andere enthalten. Bei starker Phagozytoseaktivität werden auch sekundäre Granula entleert, die z.B. Lysozym enthalten, das auf gram-positive Bakterien toxisch wirkt. Bei Infektionen kommt es zu einem Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten.

Eosinophile Granulozyten haben etwa einen Anteil von 3 – 5 % der Zellen im Differentialblutbild. Sie geben toxisch Enzyme (Peroxidase, eosinophiles kationisches Protein etc.) nach außen ab (Degranulation) und können somit größere extrazelluläre Organismen wie Parasiten abtöten. Weiter wirken Eosinophile bei der allergischen Immunantwort via Lipidmediatoren (z.B. Leukotriene) mit.

Basophile Granulozyten besitzen spezifische Rezeptoren für das sog. Fc-Fragment von Immunglobulin E (IgE) und lösen somit Hypersensitivitätsreaktionen aus. Eine Aktivierung führt zur Degranulation und somit Freisetzung von pro-inflammatorischen Produkten wie Histamin, Proteasen und Proteoglykanen. Basophile Granulozyten machen nur einen geringen Anteil (< 2 %) im Differentialblutbild aus.

Monozyten sind mit einem Durchmesser von 12 – 25 µm die größten Zellen im Blut. Sie entstehen im blutbildenden roten Knochenmark und wandern über das Blut in verschiedene Organe, wo sie sich je nach Gewebe in die entsprechenden Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (z.B. Makrophagen, Alveolarmakrophagen der Lunge, Mikroglia des ZNS, Langerhans-Zellen der Haut, Kupffer-Zellen der Leber etc.) umwandeln können, aus. Im Rahmen der Phagozytose nehmen diese Zellen körperfremdes Material oder Erreger auf, töten diese ab und präsentieren sie schließlich den T-Lymphozyten als Vertreter der

spezifischen Immunabwehr als Antigen. Weiter wird durch Antigen-Bindung an das CD14 Molekül auf der Oberfläche von Makrophagen die Synthese und Freisetzung entzündungsauslösender Mediatoren wie Interleukin Ibeta, Interleukin 6 oder Tumor-Nekrose-Faktor verursacht.

Megakaryozyten und Thrombozyten

Megakaryozyten sind die Vorläuferzellen der Thrombozyten (Blutplättchen) und gehören mit bis zu 0,1 mm Durchmesser zu den größten Zellen des menschlichen Organismus. Die Megakaryozyten machen im Gegensatz zu anderen Zellreihen eine endomitotische Kernteilung ohne Auflösung der Kernmembran und ohne Ausbildung einer Mitosespindel durch, wobei ein polyploider Chromosomensatz entsteht. Durch Abschnürung gibt der Megakaryozyt mehrere Tausend Thrombozyten frei. Die kernlosen Blutplättchen sind mit 4,5 µm die kleinsten Blutpartikel. Die normale Zahl im Blut beträgt 150 000 – 380 000/µl. Die durchschnittliche Lebensdauer liegt zwischen 8 bis 12 Tagen; der Abbau findet in Milz und teilweise auch in der Leber statt. Die Thrombozyten spielen eine wichtige physiologische Rolle in der Blutgerinnung, in dem sie sich v.a. in den Arterien an freiliegende Kollagenfasern verletzter Blutgefäße in der ersten Phase der Thrombozytenaggregation anlagern (Adhäsion), wobei Adenosindiphosphat eine unterstützende Rolle hat. In der zweiten und irreversiblen Phase der Thrombozytenaggregation werden Prostaglandine und vasoaktive Substanzen gebildet, die zur Bildung des sog. `weißen` Thrombus führen. Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel finden heute therapeutischen Einsatz in der Hemmung der Thrombozytenaggregation.

1.1.3 Therapeutischer Einsatz der Stammzellen

Aufgrund der hohen Selbsterneuerungspotenz der Stammzellen und ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in alle Blutzelllinien finden diese heutzutage therapeutischen Einsatz. Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo vorkommen, finden sich adulte Stammzellen im Organismus nach der Geburt. Aus

diesen Zellen werden während der gesamten Lebensdauer des Organismus, zwar mit eingeschränkterem Differenzierungspotential als embryonale Stammzellen, neue spezialisierte Zellen gebildet.

Gewinnung von Stammzellen

Stammzellen können durch Knochenmarkpunktion aus dem Beckenkamm oder durch periphere Stammzellsammlung aus dem Blut gewonnen werden. Bei letzterer werden Stammzellen aus dem Venenblut der Patienten oder Spender gesammelt. Hierbei wird das Blut in einem ständigen Kreislauf von einer Armvene durch einen Zellseparator geleitet und schließlich über die andere Armvene zurückgeführt. Diesen Vorgang nennt man Leukapherese und er dient dem Sammeln spezifischer Zellen bzw. peripherer Stammzellen für eine Transplantation. Eine mögliche Alternative zur Transplantation von Stammzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut ist die Gewinnung von humanen Stammzellen aus Nabelschnurblut. Nach eingehender Präparation dieser Zellen werden sie in Zellkulturen unter der Zugabe von hämatopoetischen Faktoren zum Wachsen gebracht (Chivu et al. 2002).

Einsatz von Stammzelltransplantation (SZT) und Knochenmarktransplantation (KMT)

Blutbildende Stammzellen des Knochenmarks finden in der Behandlung von Leukämien und Lymphomen Einsatz (Yoshimura et al. 2000). Im Rahmen der Therapie von Tumorerkrankungen kann eine myeloablative Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt werden, durch deren Zytotoxizität, auch auf blutbildende Stammzellen, eine Minderung der Zellzahlen (Zytopenien) die Folge ist. Im Anschluss an diese Behandlungsform muss die Blutbildung durch KMT oder SZT aus peripherem Blut regeneriert werden. Lymphoproliferative Erkrankungen, Leukämien, solide Tumore und verschiedene Autoimmunerkrankungen werden dann mit einer autologen SZT in Form einer Eigenspende behandelt (Gratwohl 2002). Nach Transplantation der Stammzellen auf den Patienten siedeln sich diese

wieder im Knochenmark an und gehen ihrer ursprünglichen Aufgabe, der Bildung von Blutzellen, nach.

Bei der autologen SZT werden Blutstammzellen von residualen Tumorzellen gereinigt (Purging) (Civin et al. 1990). Die autologen Transplantate sind dann frei von Tumorzellen. Die Stammzellen werden während einer Chemotherapie tiefgefroren und anschließend dem Patienten zurück transfundiert. Der Vorteil der Verwendung autologer Vorläuferzellen liegt in der fehlenden Immunogenität, d.h. die transplantierten Zellen werden vom Immunsystem nicht als fremd erkannt.

Leukämien, lymphoproliferative Erkrankungen, aplastische Anämie und kongenitale Erkrankungen des Knochenmarks sind die Hauptindikationen für eine allogene Transplantation (Gratwohl 2002, Laane et al. 2006, Hagemeister 2002). Beispielsweise kann eine allogene SZT kurativ in der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms, einer Knochenmarkserkrankung der eine Differenzierungsstörung zu Grunde liegt, woraus eine ineffektive Hämatopoese resultiert, kurativ eingesetzt werden (Germinig U. 2006). Bei der allogenen Transplantation ist es wichtig, dass die HLA-Gewebsmerkmale (humane Leukozyten Antigene) der Fremdspende mit dem Empfänger übereinstimmen, da ansonsten Abstoßungsreaktionen (graft-versus-host) ausgelöst werden (Ferrara et al. 1996). Ein weiterer, jedoch umstrittener therapeutischer Nutzen für den Empfänger ist neben der Bereitstellung von gesunden humanen Stammzellen, das Vorhandensein von T-Zellen und anderen Immunzellen im Transplantat, was als graft-versus-tumor Reaktion bekannt ist (Antin et al. 1993).

Ein weiterer therapeutischer Einsatz der Stammzellen wird in der Behandlung von Lebererkrankungen wie Hepatitis C diskutiert (Lagasse et al. 2000), da das adulte Knochenmark eine potente Quelle für Hepatozyten darstellt (Alison et al. 2000, Theise, Badves et al. 2000, Theise, Nimmakayalu et al. 2000). Nicht blutbildende adulte Stammzellen aus dem Knochenmark konnten bereits Patienten nach Herzinfarkt (Schachinger et al. 2006, Li et al. 2005) oder bei Multipler Sklerose (Karussis et al. 2006) zu einer besseren Regeneration verhelfen (Pereira et al.

1995, Ferrari et al. 1998, Kopen et al. 1999). Weiter wurden Stammzellen mit Erfolg in der Therapie von Morbus Parkinson eingesetzt (Snyder et al. 2005).

1.2 Der Zellzyklus

Definition

Der Begriff Zellzyklus beinhaltet die Abfolge der zellulären Ereignisse, die eine Körperzelle durchläuft, um sich in zwei identische Tochterzellen zu teilen. Dieser Vorgang wird als Reduplikation bezeichnet.

Jede zur Mitose (Kernteilung) befähigte Zelle durchläuft einen Generationszyklus. Dieser beginnt und endet mit Abschluss einer Zellteilung. Jeder Zellzyklus gliedert sich in mehrere Abschnitte, und zwar in die Interphase und die anschließende Mitose. Die Dauer und Abfolge der jeweiligen Zyklusphasen werden im Rahmen sogenannter Kontrollpunkte überwacht (z.B. mittels Zyklinen), so dass der nächste Schritt des Zellzyklus erst nach vollständigem Abschluss der vorherigen Phase erfolgt (Viallard et al. 2001). An diesen Kontrollpunkten besteht die Möglichkeit einer Unterbrechung des Zellzyklus oder gar der Apoptose. Es existieren spezielle Zyklusproteine wie die CDKs (cycline dependent kinases) und die sogenannten Zykline. Die Zyklin-Familie besteht aus zwei Hauptklassen: `G1-Zykline` beinhalten Zyklin C, D1-3 sowie E und sind konzentrationsabhängig für den Übertritt von der G1- in die S-Phase verantwortlich. Die `G2-Zykline`, die aus Zyklin A und B bestehen, sind in der Kontrolle des G2/M- Übergangs und der Mitose involviert. Die Zykline binden und aktivieren die CDK, was zur Phosphorylierung von Tumorsuppressor-Proteinen (pRb) führt (Viallard et al. 2001). Die CDKs und ihre Partner, die D-Zykline, bilden Komplexe, deren (De-) Aktivierung unter anderem durch viele Wachstumsfaktoren und Proto-Onkogene gesteuert wird (Viallard et al. 2001).

Auf den Hintergrund der möglichen beeinflussenden Faktoren des Zellzyklus baut die Krebstherapie, da der Zellzyklus neoplastisch veränderter Zellen nicht mehr durch den Organismus reguliert werden kann. Die Zellen teilen sich autonom und unkontrolliert, da jeder der Kontrollmechanismen in Tumorzellen dereguliert werden kann (Viallard et al. 2001). Durch Bestrahlung beispielsweise werden die

Zellen in den besonders radiosensitiven Phasen der Mitose und der G1/S-Phase gestoppt und gegebenenfalls Reparaturgene aktiviert (Blakely et al. 1989).

Die Interphase

Die Interphase stellt den zeitlichen Abschnitt zwischen zwei Zellteilungen dar. Sie lässt sich in drei Stadien unterteilen, die DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und die zwei Lückenphasen (Gap-Phasen): G1-Phase, die Phase vor der DNA-Verdopplung und G2-Phase, Phase nach der DNA-Verdopplung.

Die G1-Phase, auch Präsynthesephase genannt, beginnt im Anschluss an die Zellteilung. Im Vordergrund steht ein intensives Wachstum der Zelle mit hoher Protein- und RNA-Synthese. Der DNA-Gehalt bleibt weiterhin konstant. Die G1-Phase kann in schnell proliferierenden Zellen wie Darmepithelzellen oder Tumorzellen nur 3 h dauern, während sie bei anderen Zellarten die längste Phase des Zyklus ist.

Einige Zellen werden in der G1-Phase proliferativ inaktiv. Diese Zellen befinden sich dann im G0-Stadium (Ruhepause). Von G0 ist ein Wiedereintritt in den Zellzyklus nur unter bestimmten Voraussetzungen oder gar nicht möglich. Das Nukleotid cAMP scheint Zellen zum Eintritt in das G0-Stadium, und somit zur Differenzierung zu fördern (Friedman D.L. 1976).

Die S-Phase ist die Periode des Zellzyklus, in der die Synthese (Replikation) und Verdopplung der Chromosomen im Zellkern erfolgt. Sie beträgt gewöhnlich 6-8 h. Der DNA-Gehalt der Zelle nimmt stetig zu, so dass am Ende der S-Phase ein tetraploider Chromosomensatz vorliegt. Für die Aufspulung der neu synthetisierten DNA werden vermehrt Histone produziert. Die wichtigsten Proteine für die Replikation sind die Primase, DNA-Polymerase, Replikase und die Topoisomerase I und II, die in der G1-Phase gebildet werden.

Die G2-Phase (prämitotische Ruhephase oder auch Postsynthesephase) ist mit etwa 4 h der kürzeste Abschnitt. Sie liegt zwischen Ende der Synthese-Phase und Beginn der Mitose. In G2 kommt es erneut zu RNA- und Proteinsynthese. Es

werden Proteine zur Kondensierung der Chromosomen hergestellt. Ferner findet in der G2-Phase ein Korrekturlesen und gegebenenfalls Reparatur der DNA statt.

Die Mitose-Phase (M-Phase)

Während der Mitose-Phase wird das in der S-Phase identisch reduplizierte genetische Material gleichmäßig auf zwei Tochterzellen aufgeteilt, wobei beide Zellen den gleichen diploiden Chromosomensatz enthalten. Die Chromosomen werden als fadenförmige, kondensierte Strukturen sichtbar (mitos, gr.: Faden).

Die Mitose dauert etwa 60 min und wird in vier Stadien unterteilt, und zwar in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase.

In der Prophase beginnt die Kondensierung der Chromosomen. Im Zellkern bildet sich ein Chromosomenknäuel, das Spirem aus. Das zelluläre Mikrotubulus-System bricht zusammen. Im Zytoplasma trennen sich die in der G2-Phase gebildeten Zentriolen und wandern zu entgegengesetzten Polen. Gegen Ende der Prophase beginnt sich die Kernhülle aufzulösen. Es bilden sich Mikrotubuli aus, die die beiden Zentriolenpaare miteinander verbinden und die mitotische Spindel ausmachen.

In der Metaphase sind Kernhülle und Nukleolen verschwunden. Die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. Während der Anaphase werden die Spalthälften der Chromosomen durch den Spindelapparat auseinandergezogen, so dass aus jedem Mutterchromosom zwei Tochterchromosomen hervorgehen. Die Telophase stellt das Endstadium der Mitose dar. Die Chromatiden entspiralisieren sich wieder und werden von einer Kernmembran umgeben. Die Kerne der beiden Tochterzellen gehen in die Interphase über. Die Zytokinese ist das letzte Stadium der Zellteilung. Hier wird der noch gemeinsame Zelleib genau in der Mitte zwischen den beiden Tochterkernen durchtrennt.

1.3 Zyklische Nukleotide: Vorkommen und Wirkung

Wichtige Derivate der Nucleosidtriphosphate Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) sind das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) sowie das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP). Beide Nukleotide entstehen intrazellulär unter Einwirkung spezifischer Zyklasen. Intakte Gefäßendothelzellen produzieren physiologischerweise vasodilatierende Substanzen wie EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) und Prostazyklin (PG-I₂), die für eine Plättcheninhibition verantwortlich sind (Vane et al. 1990, Schwarz et al. 2001, Woulfe et al. 2001). Diese Substanzen bewirken einen Anstieg der zellulären Konzentration der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP: EDRF, der mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (Moncada et al. 1991), und NO-freisetzende Substanzen wie Natriumnitroprussid (SNP) heben über eine direkte Aktivierung der Guanylzyklase die cGMP-Konzentration in Blutplättchen an (Ignarro 1989). PG-I₂ und andere Prostaglandine wie das in der vaskulären Therapie eingesetzte Prostaglandin E₁ (PG-E₁) erhöhen die Konzentration von cAMP, indem sie zunächst an den in der Plasmamembran integrierten Prostaglandin-Rezeptor binden und so über die α -Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins (Gs) die Adenylylzyklase aktivieren, wobei Pyrophosphat abgespalten wird. Die inhibitorische Einheit des G-Proteins (Gi) hemmt die Adenylylzyklase und senkt so den cAMP-Spiegel wieder ab.

Phosphodiesterasen bauen cGMP und cAMP wieder ab und werden von diesen in positiven oder negativen Feedback-Schleifen gehemmt oder aktiviert (Eigenthaler et al. 1994).

Die Proteinkinase A (PK-A) ist in Abwesenheit von cAMP ein tetrameres, enzymatisch inaktives Protein bestehend aus je zwei identischen Untereinheiten: die R-Untereinheiten (I α , I β , II α , II β) tragen mit unterschiedlicher Affinität je zwei Bindungsstellen für cAMP. Die Bindung von je zwei cAMP-Molekülen führt zur Freisetzung der katalytischen C-Untereinheiten (α , β , γ), die enzymatisch aktiv sind. Die Proteinkinase A vermag nun die Phosphorylierung verschiedener

Proteine bis der cAMP-Level wieder abfällt. (den Dekker, G. Gorter et al. 2002). Die freie C-Untereinheit phosphoryliert ein weites Spektrum an Proteinen im Zytoplasma und Nukleus, abhängig vom Zelltyp, dem Stadium der Differenzierung und dem hormonellen Milieu (Spaulding 1993).

Die Proteinkinase G (PK-G) ist in einer Vielzahl von Organismen wie dem einzelligen Paramecium als auch im Menschen nachweisbar (Lohmann et al. 1997, Pfeifer et al. 1999). In Säugetieren konnten bereits zwei Gene, die PK-G-I und PK-G-II kodieren, identifiziert werden, wobei in Blutplättchen die im Zytoplasma lokalisierte Form PK-G-I vorherrscht (Keilbach et al. 1992, Pfeifer et al. 1999). Die Bindung von cGMP an die regulatorische Domäne der Proteinkinase hat eine Konformationsänderung zur Folge, die eine Inhibierung der katalytischen Domäne der PK-G aufhebt und eine Substratphosphorylierung ermöglicht (Wall et al. 2003). In Thrombozyten hemmen zyklische Nukleotide die Aggregation hauptsächlich über diese Proteinkinasen (PK-A und PK-G) (Sandberg et al. 1991, Butt et al. 1992, Geiger et al. 1992, Walter et al. 1993, Waldmann et al. 1986), die ihrerseits eine Reihe von Proteinen phosphorylieren und so eine Hemmung der Plättchenfunktion bewirken.

Weitere Aufgaben der zyklischen Nukleotide liegen in der Regulation des Zellstoffwechsels, Wachstums und Differenzierung von Zellen (Spaulding 1993). Auf die Proliferation von Progenitorzellen zu neutrophilen Granulozyten und Makrophagen hat cAMP jedoch keinen modulierenden Einfluss (Cook et al. 1989). Bei dem intrazellulären Kalziumanstieg von Thrombozyten haben zyklische Nukleotide hemmende Effekte (Geiger et al. 1992, Geiger et al. 1994). In humanen Megakaryozyten erhöht cAMP die intrazelluläre Kalziumkonzentration unabhängig der PK-A (den Dekker et al. 2002).

1.4 Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP)

In Thrombozyten wurden bereits zahlreiche Substrate der PK-A und der PK-G identifiziert (Schwarz et al. 2001). Das am besten charakterisierteste Substrat ist das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) (Halbrügge et al. 1990, Waldmann et al. 1987), das Bestandteil vieler Zellen und Geweben ist (Reinhard et al. 1992, Haffner et al. 1995). VASP befindet sich zytoskelettal assoziiert in fast allen Zelltypen und ist hauptsächlich an fokalen Kontakten, Stressfasern und Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Reinhard et al. 1992). In Thrombozyten liegt VASP in sehr hoher Konzentration vor (Eigenthaler et al. 1992). Bisher sind etliche Interaktionen von VASP mit Zytoskelettproteinen wie Aktin, Vinculin, Profilin und Zyxin und auch dem Oberflächenprotein ActA des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* beschrieben worden (Reinhard, Giehl et al. 1995, Reinhard, Jouvenal et al. 1995 Reinhard et al. 1996, Chakraborty et al. 1995). VASP besitzt mindestens drei Phosphorylierungsstellen – Serin-157, Serin-239 und Threonin-278 - wobei wenigstens zwei von beiden Proteinkinasen gemeinsam, aber mit unterschiedlichen Affinitäten genutzt werden (Butt et al. 1994, Smolenski et al. 1998). Serin-157 ist das von der PK-A, und Serin-239 das von der PK-G bevorzugte Substrat. Die Phosphorylierung von Serin-157 ändert das Laufverhalten von VASP in SDS-Polyacrylamidgelen. Dadurch kommt es zur Änderung (sogenannter "Shift") seiner Molekularmasse von 46 kDa (an Ser-157 nicht-phosphoryliertes VASP, Dephospho-VASP) nach 50 kDa (an Ser-157 phosphoryliertes VASP, Phospho-VASP) (Halbrügge et al. 1989). Dieses veränderte Laufverhalten von VASP nach einer Phosphorylierung in SDS-Polyacrylamidgelen und der Einsatz spezifischer Antikörper, die das nicht-phosphorylierte VASP und das phosphoryliertes VASP erkennen, geben die Möglichkeit zur Untersuchungen der Kinetik der VASP-Phosphorylierung in humanen Stammzellen durch die Western-Blot-Technik.

In Thrombozyten korreliert die Phosphorylierung des Ser-157 mit einer Hemmung der Blutplättchen, insbesondere des Fibrinogenrezeptors (Horstrup et al. 1994).

Des weiteren verstärkt VASP eine Aktinpolymerisation und die Bündelung von Aktinfilamenten (Bachmann et al. 1999) und ist so vermutlich an der Neuorganisation des Zytoskeletts beteiligt, die zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors führt. Jedoch ist VASP zum Einen nur eines der Substrate der PK-A und der PK-G, die bei der Organisation des Zytoskeletts eine Rolle spielen; zum Anderen ist die genaue Aufgabe von VASP und dessen Phosphorylierung bei der Reorganisation des Zytoskeletts noch unklar.

1.5 Ziel der Arbeit

Humane hämatopoetische Stammzellen finden aktuell breite interdisziplinäre Anwendung für Therapie oder Therapieversuche akuter und chronischer Erkrankungen, dennoch sind viele Aspekte ihrer biochemischen Regulation noch unklar. In dieser Arbeit wird der Einfluss der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP auf die Regulation der humanen hämatopoetischen Stammzellen als Vorläufer aller Blutzellen untersucht.

Der erste Teil dieser Arbeit geht auf den biochemischen Nachweis der einzelnen Komponenten der cGMP- und cAMP-regulierten Signalwege sowie deren Aktivierbarkeit in humanen CD34-positiven Stammzellen ein. Im zweiten Abschnitt werden die Effekte von cGMP auf Proliferation (mit Zellzyklus-Analyse) sowie Differenzierung der Stammzellen untersucht.

2. Abkürzungen und Maßeinheiten

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>b</i> ovine <i>s</i> erum <i>a</i> lbumin)
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosin-3` :5` -Monophosphat
cBIMPS	<i>5,6-Dichloro-1-β-Dribofuranosylbenzimidazol-3`,5`-cyclic monophosphorothioate, SP-isomer</i>
CD	Differenzierungsantigen (<i>c</i> luster of <i>d</i> ifferentiation)
CDK	Zyclin-abhängige Kinase (<i>c</i> ycline <i>d</i> ependent <i>k</i> inase)
CFU	Kolonie-bildende Einheit (<i>c</i> olony <i>f</i> orming <i>u</i> nits)
cGMP	zyklisches Guanosin-3` :5` -Monophosphat
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor (<i>c</i> olony <i>s</i> timulating <i>f</i> actor)
DEA/NO	2-(N,N-diethylamino)-diazenolate-2-oxide
DETA/NO	1-(2-(aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino)diazen-ium-1,2-diolate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>e</i> nhanced <i>c</i> hemol <i>u</i> minescence)
EDRF	<i>e</i> ndothelium <i>d</i> erived <i>r</i> elaxing <i>f</i> actor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>E</i> zyme- <i>L</i> inked <i>I</i> mmuno <i>S</i> orbent <i>A</i> ssay
ENA	<i>D</i> rosophila <i>E</i> nabled

EPO	Erythropoetin
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
GC	Guanylatzyklase
G-CSF	Granulozyten-stimulierender Faktor
Glc	D-Glucose
GM-CSF	Granulozyten und Monozyten-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
Il-3	Interleukin 3
Il-6	Interleukin 6
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesium
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
8-pCPT-cGMP	8-(4-chlorophenylthio) cGMP
PBS	Phosphat-gepufferte Sazlösung (<i>phosphate-buffered-saline</i>)
PG-E ₁	Prostaglandin E ₁
PG-I ₂	Prostaglandin I ₂ (Prostazyklin)
PK-A	cAMP-abhängige Proteinkinase
PK-C	Proteinkinase C
PK-G	cGMP-abhängige Proteinkinase
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)

SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Natriumnitroprussid
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyldiamin
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

Maßeinheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunde
V	Volt

Dezimale Teile und Vielfache

n	nano (10 x -9)
μ	mikro (10 x -6)
m	milli (10 x -3)
k	kilo (10 x 3)

3. Materialien

3.1 Antikörper und Antiseren

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper und Antiseren.

Tab. 1: Antikörper und Antiseren

Bezeichnung	Antigen	Markierung	Spezies	Bezugsquelle	Endkonzentration / Verdünnung
16C2	Phospho-Ser-239-VASP	-	Maus	Nano Tools	1:50
5C6	Phospho-Ser-157-VASP	-	Maus	Nano Tools	1:100
M4	VASP	-	Kaninchen, polyklonal	Immuno Globe	1:1500
14A3	PK-G Iß	-	Maus	Nano Tools	1:1 in 6 % Milchpulver in TBS/Tween
Anti-CD41	CD41	-	Maus	Cymbus Biotechnologies	100 µg/ml
Anti-CD15	CD15	-	Maus	Cymbus Biotechnologies	

Ziege-anti-Maus-FITC	Maus IgG	FITC	Ziege	Sigma	1:45
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Bio-Rad	1:3000
Ziege-anti-Maus-HRP	Maus IgG	HRP	Ziege	Bio-Rad	1:3000

3.2 Kulturmedien und –zusätze

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma)

XVIVo-20-Medium (Bio Whittaker)

3.3 Chemikalien und Lösungen

Der folgende Abschnitt ist eine Aufstellung der Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien, die alle von analytischem Reinheitsgrad waren.

Sp-5,6-DCI-cBIMPS (Biolog)

Bromphenolblau (Sigma)

DEA/NO (Alexis Biochemicals)

DMSO (Sigma)

Ethanol (J.T. Baker)

ECL (Amersham)

Ficoll Paque TM Plus (Amersham Pharmacia)

human G-CSF, recombinant (Biosource International)

human GM-CSF, recombinant (Biosource International)

human Il-3 (R&D Systems)

human Il-6 (R&D Systems)

human stem cell factor, recombinant (R&D Systems)

human thrombopoetin (Biosource International)

Methanol (J.T. Baker)

Milchpulver (BioRad)

PBS Dulbecco's, ohne Kalzium, ohne Natriumbikarbonat (Life Technologies)

Prostaglandin E₁ (Sigma)

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma)

Rinderserum – BSA (Sigma)

Rotiphorese Gel 30, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Carl Roth GmbH)

SDS (Merck)

SNP (Sigma)

Temed (Sigma)

Wasser: Aqua ad iniectabilia (Pharmacia & Upjohn), Ampuwa (Fresenius)

Alle übrigen Reagenzien wurden im jeweils höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von der Firma Sigma bezogen.

3.4 Kits

BCA Protein Assay Kit (Pierce)

CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Milteny Biotec)

Cycle Test TM Plus (Becton Dickinson)

DNA Reagent Kit (Becton Dickinson)

ECL Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

LeucoCount Kit (Becton Dickinson)

PrepaCyte™-SC (Biocarta)

True Count TM (Becton Dickinson)

3.5 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier (Hartenstein GB33)

Eppendorf-Caps (Eppendorf)
 FACS-Röhrchen (Becton Dickinson)
 Gewebekulturplatten mit Abdeckplatte (Greiner)
 Macs separation columns (Milteny Biotec)
 Nitrozellulose Transfermembran: Protran, Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell)
 Pre- Separation filters mesh size 30 µm (Milteny Biotec)
 Reagenzgläser (Eppendorf)
 Röntgenfilm: Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech), Medical Film (Konica)
 Whatman-Papier (Schleicher & Schuell)

3.6. Geräte

BioCard Hood:	Baker Company, Sanford
Blot-Kammer:	BioRad
Durchflusszytometer:	FACSScan (Becton Dickinson) FACSCalibur (Becton Dickinson)
Elektrophoresekammern für Polyacrylamid-Minigele:	Mini Protean II (BioRad)
Forma Scientific CO ₂ Water Jacketed Incubator	(Thermo Life Sciences)
Geltrockner, Model:	BioRad
ELISA-Reader:	Molecular Devices, Microplate Reader: MWG-Biotech
Mikroskop:	Axiovert 25 (Zeiss)
Scanner:	Studiostar (Agfa)

Software:	CellQuest (Version 1.0, 1994, Becton Dickinson)
	NIH Image (Version 1.61)
	PhotoLook (1996, Agfa-Gevaert N.V.)
Spannungsgerät:	Power Pac 200 (BioRad)
Transferkammer für Western Blots:	Trans-Blot Cell (BioRad)
Zellzahlgerät:	Technicon H-1 System (Bayer)
Zentrifugen:	Roto Silenta/K (Hettich)
	Eppendorf Zentrifuge 5415 C (Eppendorf)
	Eppendorf Zentrifuge 5417 R (Eppendorf)
	Rotixa/K (Hettich)

4. METHODEN

4.1 Die Durchflusszytometrie – Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) bezeichnet, ist ein Verfahren zum automatisierten Zählen und Analysieren von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln innerhalb heterogener Zellgemische.

Die in Suspension befindlichen Zellen fließen bei der FACS-Analyse hintereinander durch eine dünne Messkammer (Flow Cell) und werden von der Seite mit einem Laserlicht geeigneter Wellenlänge angestrahlt, wobei Streulicht (Light Scatter) verursacht wird. Dieses wird meist an zwei Stellen gemessen, nämlich in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht) und im 90° - Winkel dazu (Seitwärtsstreulicht). Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) gibt Auskunft über die Größe der Zelle, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) Informationen über die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gibt. Die Messdaten werden grafisch in einem Punktwolkenhistogramm (Dot-Plot) dargestellt, wobei auf der x-Achse das Forward Scatter und auf der y-Achse das Side Scatter aufgetragen wird. So wird eine Auswertung der wichtigsten Zellgruppen ermöglicht, die gemäß ihrer Anordnung auf einem Dot-Plot einer Zellpopulation zugeordnet werden können.

Außer dieser rein morphologischen Eigenschaften ist die Durchflusszytometrie in der Lage, Fluoreszenzsignale mit Hilfe spezifischer Detektoren in bestimmten Wellenlängen zu erkennen und deren Intensität zu messen.

Ausgangspunkt dafür ist die Möglichkeit, ein zu untersuchendes Molekül spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Dies ist unter Einsatz hochspezifischer Antikörper und fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper durchführbar. Mit dieser Methode können so unter anderem Oberflächenantigene wie CD15 und CD41, die für die Erkennung von Granulozyten/Monozyten sowie von Megakaryozyten notwendig sind, nachgewiesen werden.

Die Messergebnisse können ebenfalls wieder grafisch in einer Dot-Plot Grafik dargestellt werden. Mittels Gaten (Schleusen) werden bestimmte Parameterbereiche, deren Inhalte für die betreffende Messung nicht von Interesse sind, ausgeschlossen und die zu untersuchenden Zellen und Zellmerkmale definiert. Dabei wird ein Analysenfenster eng um die betreffende Zellpopulation gelegt, um andere Zellen oder Zellreste auszuschließen. Jede Messung wird nach Erfassung einer bestimmten Anzahl von Ereignissen beendet. Die Berechnung der Zellkonzentrationen erfolgt über die Anzahl von erfassten Referenzpartikeln (beads).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest.

4.2 Humane CD34-positive hämatopoetische Stammzellen

4.2.1 Präparation von adulten humanen CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen

Für die Arbeit mit Stammzellen ist es erforderlich, diese aus dem zu untersuchenden Material zu isolieren. Das hämatopoetische System ist eines der am Besten charakterisiertesten Systeme in Bezug auf die Isolation der Stammzellen.

CD34-positive Vorläuferzellen wurden aus Leukapheresematerial von Tumorpatienten ohne hämatologische Erkrankungen sowie aus Leukapheresematerial oder peripherem Blut Gesunder isoliert. Das Material wurde freundlicherweise vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg zu Verfügung gestellt. Die Isolation hämatopoetischer Zellen beruhte auf der positiven Selektion CD34-exprimierender Zellen durch eine indirekte magnetische Auftrennung mit Hilfe von an MicroBeads gekoppelten Antikörpern (Milteny Biotec).

Die Isolierung der Stammzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Isolierung CD34-positiver Stammzellen aus humanem peripherem Blut

PBS/BSA/EDTA: Dulbecco`s PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} - frei)

0,5 % BSA (0,5 g/100 ml)

2 mM EDTA

Präparation des peripheren Blutes

300 ml peripheres Blut, behandelt mit ACD-Puffer (74,8 mM Natrium Citrat, 38,1 mM Citric acid, 136 mM Glucose, pH 5,0), wurde mit 300 ml PrepaCyte™-SC (Biocarta) vermischt und in jeweils 50 ml Röhren 30 min auf dem Schüttler geschüttelt. Danach wurden die Röhren für 30 min aufrecht aufgestellt, damit

sich Agglutination und Präzipitationsreaktionen ausbilden konnten. Der entstandene Überstand mit unpräzipitierten Zellen wurde vorsichtig ohne Zerstörung der darunterliegenden roten Zellschicht mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Zellen wurden mit PBS/BSA/EDTA bei 300 g für 20 min (1.450 rpm in Hettich Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in einem Endvolumen von 300 µl pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot entnommen und mittels eines automatisierten Zählgerätes die genaue Anzahl ermittelt.

Isolierung CD34-positiver Progenitorzellen aus Leukapheresematerial

PBS/BSA/EDTA: Dulbecco`s PBS (Ca²⁺ - und Mg²⁺ - frei)
0,5 % BSA (0,5 g/100 ml)
2 mM EDTA

Präparation des Leukapheresematerials

Leukapheresematerial wurde durch einen 30 µm Nylon-Filter gefiltert, um Zellkonglomerate zu entfernen, danach zu gleichen Teilen mit PBS/BSA/EDTA verdünnt und bei 300 g für 10 min bei 20 °C (1.450 rpm in Hettich Zentrifuge) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Resuspensionspuffer resuspendiert, die Zellzahl mit einem Zellzählgerät bestimmt und die Zellzahl auf eine Endkonzentration von 300 µl pro 10⁸ Zellen eingestellt.

4.2.2 Separation der CD34-positiven Stammzellen

Die verwendeten MicroBeads enthalten metallische Partikel und erlauben somit eine Auftrennung im Magnetfeld. Um unspezifische oder Fc-Rezeptor vermittelte Bindungen der CD34 MicroBeads an unerwünschte Zellen zu vermeiden, wurden 100 µl Reagenz humanen IgG`s (FcR-Blocklösung) pro 10⁸ Gesamtzellen der Zellsuspension zugefügt und gut vermischt. Zu der darauffolgenden Auftrennung

wurden 100 µl Reagenz von CD34 MicroBeads pro 10^8 Gesamtzellen zugegeben, erneut gut vermischt und für 30 min bei 6-12 °C inkubiert. Das aufzutrennende Endvolumen betrug 500 µl pro 10^8 Gesamtzellen. Zum Waschen wurden die Zellen mit 12 ml PBS/BSA/EDTA für 10 min bei 240 g bei RT (1.500 rpm, Hettich Zentrifuge) zentrifugiert und nachfolgend der Überstand mit einer Vakuumpumpe vollständig entfernt. Das Zellpellet resuspendierte man mit PBS/BSA/EDTA zu einem Endvolumen von 500 µl pro 10^8 Gesamtzellen.

Eine positive Selectionssäule (MACS Separation Columns) wurde mittels Säulenadaptor in dem magnetischen Feld des MACS Separators befestigt und mit 500 µl PBS/BSA/EDTA befeuchtet (der Puffer sollte Raumtemperatur haben). Die zu trennenden Zellen wurden, um Zellkonglomerate zu entfernen, durch ein ebenfalls mit PBS/BSA/EDTA befeuchtetes 30 µm Nylonnetz gefiltert. Jeweils 1,5 ml Zellsuspension wurden nun auf die Säule aufgetragen und passierten diese, wobei die mit Hilfe der MicroBeads magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten wurden. Danach wurde diese dreimal mit je 500 µl PBS/BSA/EDTA gespült, um nicht markierte Zellen auszuwaschen und anschließend vom MACS Separator aus dem magnetischen Feld genommen und auf ein passendes Röhrchen gesetzt. Es wurden zweimal je 500 µl Puffer auf die Säule gegeben, um so die magnetisch zurückgehaltenen Zellen zu gewinnen. Der Magnet-Trennungsschritt wurde, um eine möglichst reine Auftrennung zu erhalten, wiederholt. Die ausgewaschene Zellsuspension wurde auf eine neue befeuchtete positive Selectionssäule aufgetragen, wobei diesmal mehr als 1,5 ml der Suspension pro Säule verwendet werden konnten. Abschließend wurde dreimal mit 500 µl PBS/BSA/EDTA gewaschen und die noch in der Säule verbliebenen Zellen mit 500 µl Puffer in ein Röhrchen ausgewaschen. Die gesammelten Zellen standen nun für weitere Versuche oder Zellkultivierung zu Verfügung.

Die Stammzellen wurden mit LeucoCount Kit, wie in 4.2.3 beschrieben, gezählt. Die durchschnittliche Reinheit der CD34-positiven Zellpopulation betrug mehr als 95 %.

4.2.3 Zählung der Zellen mittels LeucoCount Kit

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde ein kleines Aliquot mit dem LeucoCount Kit der Firma Becton Dickinson gezählt:

30 µl Stammzellsuspension wurden mit 120 µl Dulbecco`s PBS im Verhältnis 1:5 verdünnt, um die Zellen homogen zu verteilen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden in ein TrueCount Röhrchen (Mikropartikel enthaltend, die als interne Referenz für die genaue Bestimmung der absoluten Anzahl der Zellen verwendet wurden) gegeben. In jedes Röhrchen wurde 400 µl LeucoCount Reagenz, eine standardisierte grün fluoreszierende Propidiumjodid-Lösung, die selektiv zelluläre DNA färbt, hinzugegeben. Die Röhrchen wurden mit einer Plastikkappe verschlossen, vorsichtig auf dem Vortexmischer gemischt und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Messung am Durchflusszytometer

Die Zellen wurden durchflusszytometrisch mit schneller Flussgeschwindigkeit am FACSCalibur der Firma Becton Dickinson mit folgender Instrumenteneinstellung analysiert: Forward Scatter (FSC) E00 V, Side Scatter (SSC) 284 V. Der Fluorescence Channel (FL-1) lag bei 525 V, der Fluorescence Channel (FL-2) lag bei 440 V. FSC wurde auf lineare Verstärkung gesetzt, die anderen Detektoren auf logarithmische Verstärkung.

TrueCount Röhrchen enthalten Mikropartikel, die als Referenz für die genaue Bestimmung der Stammzellzahl verwendet werden. Diese Partikel werden am FACSCalibur in einem Fenster R1 detektiert bis 10000 Ereignisse erreicht sind. Die gesuchten Zellen werden in einem Fenster R2 gezählt. Die absolute Stammzellzahl erhält man durch Division der Anzahl der erfassten Stammzellereignisse durch die Anzahl der erfassten Mikropartikelereignisse und Multiplikation mit der Mikropartikelkonzentration. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und dem totalen Volumen der Zellsuspension kann so die absolute

Zellzahl ermittelt werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest.

4.2.4 Einfrieren und Auftauen CD34-positiver Stammzellen

Einfrieremedium: 1 ml DMSO

4 ml FCS

5 ml PBS/BSA/EDTA

Zur langfristigen Lagerung der Stammzellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Gewaschene Stammzellen wurden in PBS/BSA/EDTA resuspendiert und auf eine Endkonzentration von 500.000/ml aufgefüllt. FCS und DMSO wurden im Verhältnis 4:1 gemischt, danach 1:1 zu der Stammzellsuspension zugegeben und vermischt. Anschließend wurde je 1,5 ml des Gemisches (375.000 Zellen) in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -70 °C eingefroren. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung in flüssigem Stickstoff platziert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C . Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde in ein mit 2 ml FCS befülltes 15 ml Röhrchen pipettiert. Um DMSO zu verdünnen, wurden 5 ml Zellkulturmedium, wie in 4.4.1 beschrieben, zugefügt und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen zu gewünschter Konzentration mit Medium resuspendiert und sorgfältig vermischt.

4.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Technik

4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Präparation von Stammzellen zur Proteinbestimmung

PBS/Glc/EDTA: Dulbecco`s PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} - frei)

5,5 mM D-Glucose

1 mM EDTA

Isolierte CD34-positive Stammzellsuspension wurde für 10 min bei 240 g und RT (1.500 rpm, Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 500 μl PBS/Glc/EDTA gewaschen. Das Zellpellet wurde in Resuspensionspuffer resuspendiert und die Zellzahl auf eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

30 μl der Stammzellsuspension wurde mit 30 μl 0,2 N Natronlauge gemischt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und dann bis zur Probenbestimmung bei -20 °C aufbewahrt.

Proteinbestimmung nach Lowry

BCA-Reagenz A: Natrium Carbonat, Natrium Bicarbonat, Bicinchoninische Säure, Natrium Tartrat in 0,2 N Natrium Hydroxid

BCA-Reagenz B: 4 % Kupfersulfat

Die Proteinbestimmung der Lowry-Proben wurde nach Anleitung des BCA Protein Assay Kits der Firma Pierce durchgeführt.

Grundlage der BCA-Protein Reaktion ist die Biuret-Reaktion (Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Medium) und die nachfolgende hoch sensitive kolorimetrische Detektion der Cu^{1+} - Kationen mit Hilfe des BCA-Reagenz. Dieser wasserlösliche Komplex weist eine starke Absorption bei 562 nm

auf, die linear zu der steigenden Proteinkonzentration von 20 µg/ml bis 2.000 µg/ml ist.

Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe des Rinderserumalbuminstandards von 2.000 µg/ml bis 100 mg/ml und eine Probe destillierten Wassers vorbereitet. Anschließend wurde die Lowry-Probe unverdünnt, in den Verhältnissen 1:3 und 1:9 zu dreifacher Bestimmung präpariert. Die BSA-Standardproben und die Lowry-Proben wurden in je 200 µl BCA-Lösung (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) aufgenommen und in eine 96 well-Platte überführt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer mit dem Programm *soft max* bei einer Wellenlänge von 550 nm. Anschließend konnte der Proteingehalt der Proben für die SDS-PAGE anhand der Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt werden.

4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot

Probenaufbereitung der Proteine für den Nachweis mittels Western-Blot-Technik

PBS/Glc/EDTA: Dulbecco's PBS (Ca²⁺ - und Mg²⁺ - frei)

5,5 mM D-Glucose

1 mM EDTA

SDS-Stopplösung: Trizma-Base, pH 6,7	200
Glycerin	15 %
SDS	6 %
Bromphenolblau	0,03 %
2-Mercaptoethanol	10 % ⇒ erst kurz vor Gebrauch zugeben

Für Western-Blot-Proben wurde die isolierte Stammzellsuspension für 10 min bei 240 g und RT (1.500 rpm, Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 500 µl PBS/Glc/EDTA gewaschen. Das

Zellpellet wurde in Resuspensionspuffer resuspendiert und die Zellzahl auf eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Nach Stimulation wurden die Proben mit 100 μ l SDS-Stopplösung gemischt und sofort für 5 min bei 95 $^{\circ}$ C gekocht. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 $^{\circ}$ C gelagert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelen. Bei diesem Gelsystem werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

Als Sammelgel diente ein 3 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung:

Aqua destillata	2,77 ml
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	375 μ l
0,5 M Trizma-Base, pH 6,7	470 μ l
10 % SDS	37,5 μ l
TEMED	1,87 μ l
10 % APS	75 μ l

Als Trenngel wurde in allen Fällen ein 9 %iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet, welches sich wie folgt zusammensetzte:

Aqua destillata	4,2 ml
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	2,25 ml
3 M Trizma-Base, pH 8,9	0,94 ml
10 % SDS	75 μ l
TEMED	3,75 μ l
10 % APS	75 μ l

Es wurden ausschließlich Gele von 1,5 mm Dicke gegossen. Nach Polymerisation der Gele wurden diese in eine Elektrophoresekammer für Minigele eingestellt und diese mit Elektrophoresepuffer befüllt. Vor dem Auftragen auf das Acrylamidgel wurden die Proben für 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt. Jede Geltasche wurde mit dem gleichen Volumen befüllt, wobei pro Geltasche 15-20 µg Gesamtprotein aufgetragen werden konnten.

Die Elektrophorese wurde mit einer Maximalspannung von 80 Volt begonnen, um so eine Fokussierung der Proteine im Sammelgel zu erreichen. Nach Übertritt der Proteine in das Trenngel wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht.

Elektrophoresepuffer: Trizma-Base	50 mM
Glycin	191 mM
SDS	0,1 %

Transfer auf Nitrozellulose-Filter

Transferpuffer: Trizma-Base	25 mM
Glycin	193 mM
Methanol	20 %

Nach der Elektrophorese wurde ein Nitrozellulose-Filter auf das Trenngel gelegt, beide zusammen luftblasenfrei zwischen Whatman-Filterpapier und Kunststoff-Vliese in Plastikgitter geklemmt und in eine mit auf 4 °C vorgekühltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer gegeben. Dabei wurde die Membran zum positiven Pol der Kammer hin ausgerichtet, da die im Gel enthaltenen Proteine durch das SDS negativ geladen waren. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulose erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1 A für 1 h.

Anfärben der Proteine auf Nitrozellulose-Filtern

Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen und die Positionen des Molekulargewichts-Standards zu markieren, wurden die Nitrozellulose-Filter nach

erfolgtem Transfer mit 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure kurz angefärbt. Durch Schwenken in deionisiertem Wasser wurde der Hintergrund entfärbt, danach zur Dokumentation eine Fotokopie angefertigt und zum Schluss die Proteine in TBS-Tween vollends entfärbt.

Waschpuffer, TBS-Tween: PBS/TBS	400 ml (10 %)
Tween-20	0,2 ml (0,05 %)

Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation der Nitrozellulose in 6 % Milchpulverlösung während 45-60 min abgesättigt.

Blockmedium: 6 % Milchpulver in Waschpuffer

4.3.3 Inkubation mit spezifischen Antisera und Proteinnachweis

Inkubation mit spezifischen Antisera

Die geblockte Nitrozellulose wurde für mindestens 1 h bei RT mit Primärantikörpern in 3 % Milchpulver unter Schwenken inkubiert. Die Konzentrationen der Antisera sind Tab. 3.1 zu entnehmen. Überschüssige Antikörper wurden daran anschließend in drei Waschschritten für jeweils 5 min mit Waschpuffer entfernt.

Nachweis der Proteine durch Chemolumineszenz

Der Nachweis des gebundenen Primärantikörpers erfolgte durch eine Chemolumineszenz-Reaktion. Dabei wurden die Blots mit einem in Blockmedium verdünnten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 45 min bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen a 12 min wurde die Nitrozellulose für 1 min mit ECL inkubiert, nach Abtropfen der Lösung in Overhead-Folie verpackt und sofort für einige Sekunden bis Minuten auf einem Röntgen-Film exponiert und somit detektiert. Zur Analyse wurden die entwickelten Filme mit dem Programm

PhotoLook eingescannt und der Schwärzungsgrad der Banden mit dem Programm NIH Image analysiert.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Kulturbedingungen

Das Zellkulturmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Substanz	Stocklösung	Endkonzentration
XVIVO-20 Medium		
Il-3	1,5 µg/ml	1,5 ng/ml
SCF	100 µg/ml	50 ng/ml
Il-6	20 µg/ml	10 ng/ml
GM-CSF	8 µg/ml	4 ng/ml
TPO	50 µg/ml	25 ng/ml
G-CSF	6 µg/ml	1,5 ng/ml
Penicillin Streptomycin-Lösung		1:100

Die CD34-positiven Zellen wurden in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und gemäß der Zellzahl zu einer Endkonzentration von 1×10^4 Zellen/ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Je 1 ml des Zell-Mediumgemisches wurde in acht innere (oder zentrale) Schalen einer sogenannten `24-well`-Platte ausgesät. Die restlichen äußeren Schalen wurden mit sterilem Wasser befüllt, um ein Verdampfen der inneren Schalen zu minimieren. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

An Tag 6 wurde je 1 ml frisches Kulturmedium, Wachstumsfaktoren und Antibiotika enthaltend, zu den Zellschalen zugegeben.

4.4.2 Stimulation CD34-positiver Progenitorzellen mit DEA/NO

DEA/NO setzt NO mit einer Halbwertszeit von 2 min frei. DEA/NO-Lösung wurde kurz vor Gebrauch frisch zubereitet, indem DEA/NO-Pulver in destilliertem Wasser

gelöst wurde. Um die Freisetzung bis zur Stimulation der CD34-positiven Progenitorzellen zu verzögern, wurde die DEA/NO-Lösung auf Eis gekühlt.

Zur Analyse des Einflusses von DEA/NO auf die Proliferation und Differenzierung CD34-positiver Zellen wurden diese unter sterilen Bedingungen in folgenden Konzentrationen täglich stimuliert und für neun bis zwölf Tage kultiviert, wobei jeweils vier Schalen mit derselben Konzentration stimuliert wurden:

- 1) 0,1 μM DEA/NO, tägliche Stimulation
- 2) 0,5 μM DEA/NO, tägliche Stimulation
- 3) 1 μM DEA/NO, tägliche Stimulation
- 4) 5 μM DEA/NO, tägliche Stimulation
- 5) 10 μM DEA/NO, tägliche Stimulation

Als Negativ-Kontrolle erfolgte eine tägliche Stimulation mit Aqua destillata.

Die Ernte der Zellen erfolgte nach neun und nach zwölf Tagen.

4.4.3 Durchflusszytometrische Analyse der CD34-positiven Stammzellen

PBS/Glc/BSA: Dulbecco's PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} - frei)

0,5 % BSA (0,1 g/20 ml)

5,5 mM D-Glucose

Nach Ernte der kultivierten und stimulierten Stammzellen, wurden diese für 10 min bei 240 g (1.500 rpm, Hettich Zentrifuge) bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zellpellet in 170 μl PBS/Glc/BSA resuspendiert. Dann wurden 10 μl des Primärantikörpers (100 mg/ml Maus anti-CD41 oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Maus anti-CD15) zu jeweils 50 μl Stammzellsuspension zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Für jeden Versuch wurde zusätzlich eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper durchgeführt. Für die Sekundärantikörperfärbung wurden die Zellen für 2 min bei 2.700 g bei RT (5.000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5417R) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl PBS/Glc/BSA resuspendiert, 3 μl des Fluoreszenz-markierten Antikörpers FITC-anti-Maus zugegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert.

Vor der Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 300 ml PBS/Glc/BSA aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Messung am Durchflusszytometer

Die CD34-positiven Zellen wurden durchflusszytometrisch mit langsamer Flussgeschwindigkeit am FACSCalibur der Firma Becton Dickinson mit folgender Instrumenteneinstellung analysiert: Forward Scatter (FSC) E00 V, Side Scatter (SSC) 350 V. Der Fluorescence Channel (FL-1) lag bei 600 V. Alle drei Photodetektoren wurden auf logarithmische Verstärkung eingestellt.

In der FSC-SSC-Einstellung wurden die Stammzellen durch Setzen entsprechender Regionen (=Gates) identifiziert. Für jede Messung wurden 10.000 Zellen analysiert. Nachfolgend diente die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der gemessenen Ereignisse der statistischen Weiterbearbeitung.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest. In Form von Histogrammen wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen.

4.5 Die Zellzyklus-Analyse

Prinzip

Die Untersuchung des zellulären DNA-Gehalts ist eine Methode, die Informationen sowohl für die Zellzyklus-Analyse, als auch für die Festlegung eines DNA-Indexes für diploide und aneuploide Zellen in Krebsstudien liefert. Die meisten normalen ruhenden Zellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz, während proliferierende Zellen in unterschiedlichen Stufen von Ploidie existieren. Während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G₀, G₁, S, G₂, und M) enthält der Zellkern eine unterschiedliche Menge an DNA, die charakteristisch für den Grad der Proliferation ist. Zellen eines einheitlichen Zellkollektivs sind somit auf Grund ihres unterschiedlichen DNA-Gehaltes den verschiedenen Phasen eines Zellzyklus zuzuordnen. In der G₀-Phase (Ruhephase) und der G₁-Phase (Präsynthesephase) liegt der Chromosomensatz diploid (= 2n) vor (n= einfacher bzw. haploider Chromosomensatz). In der S-Phase (Synthesephase), während die Replikation der DNA statt findet, nimmt der DNA-Gehalt stetig zu; am Ende der S-Phase enthält die Zelle schließlich einen tetraploiden Chromosomensatz (2n < Chromosomensatz < 4n). In der Mitose-Phase wird das replizierte Genmaterial auf zwei Tochterzellen, welche den gleichen diploiden Chromosomensatz enthalten, verteilt.

Die nukleäre DNA kann mittels spezieller fluoreszierender Farbstoffe (z.B. Propidiumjodid) angefärbt und so mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Da die entstehende Fluoreszenz proportional zu dem DNA-Gehalt einer Zelle ist, ist es somit möglich, durchflusszytometrisch den Zellzyklus-Status einer Zelle zu ermitteln.

Diese Methode wird auch zur Feststellung von Aneuploidie (Veränderungen des Chromosomensatzes) z.B. in Tumorzellen verwendet.

Präparation der Stammzellen

Kultivierte Stammzellen wurden an Tag 4 mittels einer Pipette geerntet und in 15 ml Rörchen überführt und für 5 min bei 300 g und RT (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert. Den Überstand saugte man mittels einer Wasserstrahlpumpe ab, wobei 50 µl Überstand im Rörchen belassen wurde, um das Zellpellet nicht zu zerstören. Man fügte 1 ml der Pufferlösung hinzu und resuspendierte die Zellen durch sorgfältiges Mischen bei niedriger Geschwindigkeit. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Pufferlösung überführte man anschließend je 5×10^5 Zellen in ein Eppendorf-Rörchen. Die Zellsuspension wurde bei 400 g für 5 min bei RT (2.000 rpm Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert und der Überstand durch Dekantieren abgegossen.

Isolation und Färbung der Zellnuclei

Die Isolation und Färbung der zu untersuchenden Zellkerne erfolgte nach Anleitung von CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit, Becton Dickinson.

Zur Auflösung der Zellmembranlipide und Eliminierung des Zellzytoskeletts wurden 250 µl Trypsin-Puffer zu jeder Probe zugegeben und durch Antippen der Rörchen vorsichtig vermischt. Die Lösung ließ man 10 min bei RT reagieren. Um die Reaktion zu beenden und um RNA zu verdauen, fügte man 200 µl Trypsin Inhibitor und Rnase-Puffer hinzu, mischte die Proben durch Antippen erneut durch und inkubierte die Proben für 10 min bei RT. Zur Färbung der DNA wurden 200 µl kalte Propidiumjodid-haltige Lösung zu jedem Eppendorf-Rörchen zugegeben, die stöchiometrisch an die sauberen, isolierten Zellkerne bindet. Nach Mischen der Proben durch vorsichtiges Antippen wurden diese für 10 min im Dunkeln auf Eis oder im Kühlschrank bei 2 °C bis 8 °C inkubiert. Die Proben wurden durch einen 50 µm Nylonfilter in ein 12x75 Rörchen überführt, verschlossen und bis zur Messung im Durchflusszytometer im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt.

Messung am Durchflusszytometer

Propidiumjodid gefärbte Nuclei emittieren Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge zwischen 580 nm und 650 nm. Ein mit einem 585/42 Filter ausgestatteter FACSScan Fluoreszenz-Detektor wurde für die Analyse von emittiertem Licht gefärbter Zellen zwischen 564 nm und 606 nm verwendet.

Bekannte DNA aus PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) wurde als Referenz zur Ermittlung des Gehalts an DNA-Aberrationen verwendet.

Für optimale Ergebnisse und zur Verifizierung der Messung mit FACSCalibur wurde der DNA QC Particles Kit von Becton Dickinson verwendet. Dies ist eine Methode zur Einstellung der Spannung des Photomultiplier-Röhrchens und zur Überprüfung der Linearität des Durchflusszytometers.

Die Messung und Auswertung der Daten erfolgten mit dem Programm CellQuest. Die Darstellung des Verlaufs der Zellzyklus-Analyse erfolgte in Form von DNA-Histogrammen.

5. Ergebnisse

5.1 Biochemischer Nachweis der cGMP- und cAMP-regulierten Signalwege in humanen CD34-positive hämatopoetischen Stammzellen

In diesem Teil wurde untersucht, ob die aus anderen Zellen bekannten Bestandteile der Signalwege der zyklischen Nukleotide einschließlich des Effektorproteins VASP auch in CD34-positiven Stammzellen nachweisbar sind und ob eine *in vivo* Aktivierung des Signalweges mit konsekutiver Phosphorylierung von VASP möglich ist.

5.1.1 Nachweis der cGMP-abhängigen-Proteinkinase I β (cGMP-PK I β) in CD34-positiven Stammzellen

Zunächst konnte mit Hilfe der Western-Blot Technik, wie in 4.3.2 beschrieben, in CD34-positiven Stammzellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 14A3 gegen cGMP-PK I β die cGMP-Proteinkinase biochemisch nachgewiesen werden.

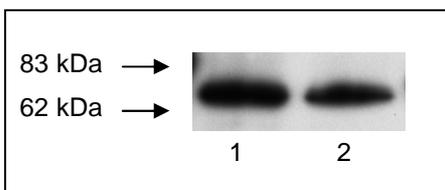


Abb. 1: Western-Blot-Analyse CD34-positiver Stammzellen, gefärbt mit dem monoklonalen anti-cGMP-PK I β - Antikörper 14A3. Spur 1: 5 ng gereinigte cGMP-PK I β als Positiv-Kontrolle. Spur 2: CD34-positive Stammzellen.

5.1.2 Nachweis des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) in CD34-positiven Stammzellen

Für den Nachweis von VASP standen drei unterschiedliche Antikörper zur Verfügung: (M4, 16C2 und 5C6), die - neben dem veränderten Laufverhalten von VASP in SDS-Polyacrylamidgelen nach einer Phosphorylierung - auch zur Untersuchung des Phosphorylierungszustandes dienen.

Der polyklonale Antikörper **Anti-VASP-M4** erkennt VASP unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand. Eine VASP-Phosphorylierung am Serin-157 kann man an einem Molekulargewichts-Shift im SDS-Polyacrylamidgel von 46 kDa (entspricht nicht phosphoryliert) nach 50 kDa (entspricht phosphoryliert) erkennen (Halbrügge et al. 1989).

Der monoklonale Antikörper **Anti-Phospho-VASP-16C2** erkennt spezifisch die Phosphorylierung am Serin-239, die keinen Shift des Molekulargewichts bewirkt. Er erkennt das Dephospho-Protein nicht. Eine doppelte Phosphorylierung am Serin-157 und am Serin-239 lässt sich jedoch an der Molekulargewichtsänderung und den entstehenden Doppelbanden erkennen.

Der Antikörper **Anti-Phospho-VASP-5C6** erkennt spezifisch die Phosphorylierung am Serin-157, es zeigt sich daher immer nur eine Bande bei 50 kDa. Auch dieser Antikörper erkennt das nicht-phosphorylierte Protein nicht.

Die im Folgenden aufgeführten Western-Blot-Analysen zeigen die Ergebnisse der unterschiedlichen VASP-Antikörper in unstimulierten CD34-positiven Stammzellen.

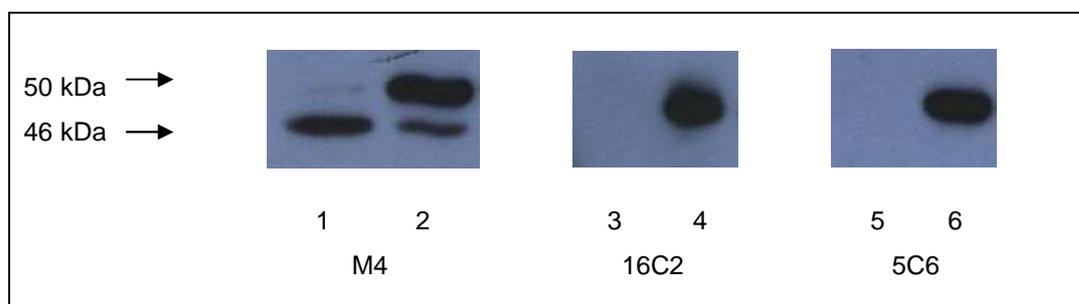


Abb. 2: Western-Blot-Analysen unstimulierter CD34-positiver Stammzellen.

Spuren 1 und 2: Färbung mit dem Antikörper M4. Spur 1: CD34-positive Stammzellen, Spur 2: humane Thrombozyten stimuliert mit 10 μ M PG-E₁ als Positiv-Kontrolle.

Spuren 3 und 4: Färbung mit dem Antikörper 16C2. Spur 3: CD34-positive Stammzellen, Spur 4: humane Thrombozyten stimuliert mit 10 μ M PG-E₁ als Positiv-Kontrolle.

Spuren 5 und 6: Färbung mit dem Antikörper 5C6. Spur 5: CD34-positive Stammzellen, Spur 6: humane Thrombozyten stimuliert mit 10 μ M PG-E₁ als Positiv-Kontrolle.

In nicht-stimulierten CD34-positiven Stammzellen kann nicht-phosphoryliertes VASP mit Hilfe des Anti-VASP-M4-Antikörpers in Form einer 46 kDa Bande nachgewiesen werden.

Eine Phosphorylierung kann in unstimulierten CD34-positiven Zellen mit den Antikörpern M4, 16C2 und 5C6 nicht nachgewiesen werden. Entsprechend zeigt sich mit dem Antikörper M4 nur die 46 kDa Bande, mit den Antikörpern 16C2 und 5C6 keine Bande.

Somit liegt in unstimulierten Stammzellen („basal“) VASP nahezu vollständig in der nicht-phosphorylierten Form vor.

5.1.3 Einfluss von cAMP und cGMP auf die VASP-Phosphorylierung in CD34-positiven Stammzellen

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, besitzt VASP drei Phosphorylierungsstellen (Serin-157, Serin-239 und Threonin-278), die mit unterschiedlichen Affinitäten von Proteinkinasen genutzt werden: Serin-157 ist das von der PK-A, und Serin-239 das von der PK-G bevorzugte Substrat (Butt et al. 1994, Smolenski et al. 1998).

Mit cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen wurde versucht, in vitro den Nachweis einer VASP-Phosphorylierung in Stammzellen zu führen. Von den cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen wurden Konzentrationen eingesetzt, welche in Experimenten bei humanen Thrombozyten einen maximalen Effekt auf die VASP-Phosphorylierung gezeigt hatten.

PG-E₁ bewirkt nach Bindung an seinen Rezeptor über ein stimulatorisches G-Protein eine Aktivierung der Adenylylzyklase, welche den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht. Die verwendete Konzentration für die Stimulation mit dem PG-E₁ betrug 10 µM.

Das bisher noch nicht untersuchte Sp-5,6-DCI-cBIMPS (im Folgenden cBIMPS) ist ein membrangängiges und sehr stabiles cAMP-Analogon mit hoher Selektivität für die cAMP-abhängige PK-A. Die Zellen wurden mit den Konzentrationen von 2 mM und 10 mM stimuliert.

Natriumnitroprussid (SNP) ist ein anorganischer NO-Donor, welcher einen Anstieg von cGMP bewirkt. Die Konzentration für die Stimulation für das SNP betrug 100 µM. Es wurden für jede Substanz zwei verschiedene Zeitpunkte untersucht (30 und 60 Sekunden für cBIMPS, 10 und 30 Sekunden für PG-E₁ und SNP).

Dabei ergeben sich mit den unterschiedlichen Antikörpern folgende Bandenmuster:

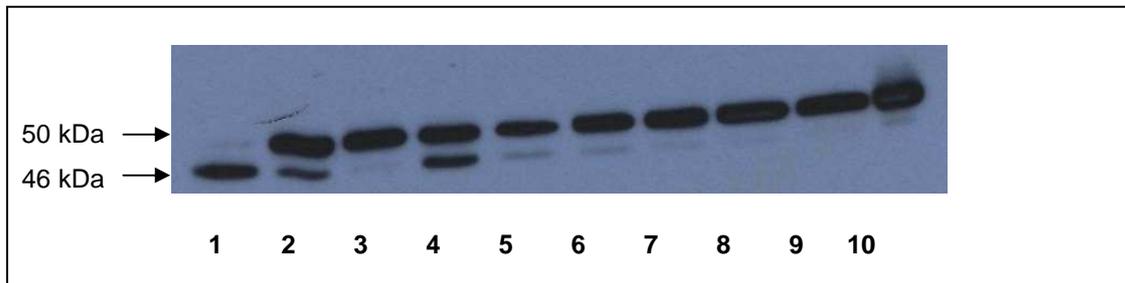


Abb. 3: Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper Anti-VASP M4.

Spur 1: unstimulierte CD34-positive Stammzellen. Spur 2 und 3: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 10 mM cBIMPS für 30 bzw. 60 Sekunden. Spur 4 und 5: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 2 mM cBIMPS für 30 bzw. 60 Sekunden. Spur 6 und 7: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 100 μ M SNP für 10 bzw. 60 Sekunden. Spur 8 und 9: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 10 μ M PG-E₁ für 10 bzw. 30 Sekunden. Spur 10: Stimulation von humanen Thrombozyten mit 10 μ M PG-E₁ als Positiv-Kontrolle.

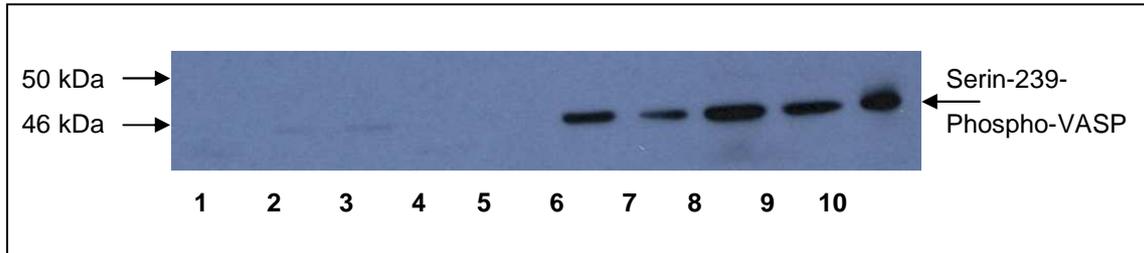


Abb. 4: Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper Anti-phospho-VASP 16C2.

Spur 1: unstimulierte CD34-positive Stammzellen. Spur 2 und 3: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 10 mM cBIMPS für 30 bzw. 60 Sekunden. Spur 4 und 5: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 2 mM cBIMPS für 30 bzw. 60 Sekunden. Spur 6 und 7: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 100 μ M SNP für 10 bzw. 60 Sekunden. Spur 8 und 9: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 10 μ M PG-E₁ für 10 bzw. 30 Sekunden. Spur 10: Stimulation von humanen Thrombozyten mit 10 μ M PG-E₁ als Positiv-Kontrolle.

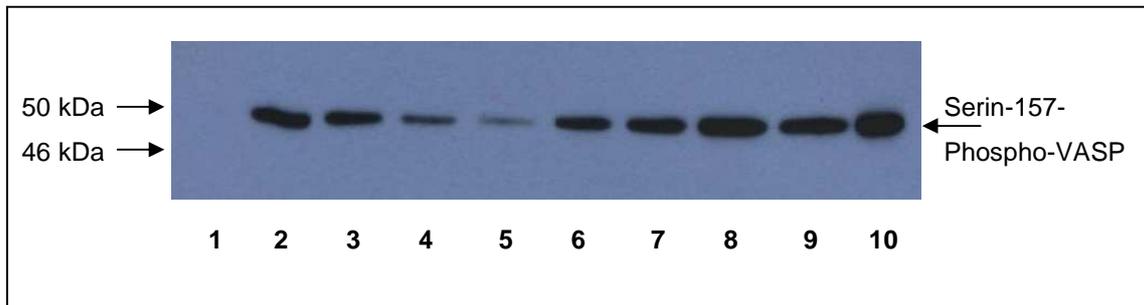


Abb. 5: Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper Anti-phospho-VASP 5C6.

Spur 1: unstimulierte CD34-positive Stammzellen. Spur 2 und 3: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 10 mM cBIMPS für 30 bzw. 60 Sekunden. Spur 4 und 5: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 2 mM cBIMPS für 30 bzw. 60 Sekunden. Spur 6 und 7: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 100 μ M SNP für 10 bzw. 60 Sekunden. Spur 8 und 9: Stimulation von CD34-positiven Stammzellen mit 10 μ M PG-E₁ für 10 bzw. 30 Sekunden. Spur 10: Stimulation von humanen Thrombozyten mit 10 μ M PG-E₁ als Positiv-Kontrolle.

Bei Stimulation mit dem cAMP-Analogen cBIMPS kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung an Serin-157, erkennbar an der 50 kDa-Bande im M4-Blot und im 5C6-Blot. Die Phosphorylierung an Serin-239 ist bei cBIMPS konzentrationsabhängig deutlich geringer als an Serin-157 bzw. bei 2 mM nicht mehr nachweisbar. Dies kann erklärt werden durch die hohe Spezifität für die PK-A, welche bevorzugt das Serin-157 phosphoryliert.

Bei einer Stimulation mit 10 μ M PG-E₁ kommt es ebenfalls zu einer starken Phosphorylierung an Serin-157. Im Unterschied zum cBIMPS kommt es bei der Stimulation mit 10 μ M PG-E₁ aber auch zu einer starken Phosphorylierung am Serin-239, erkennbar an der Bande im 16C2-Blot. Die hier eingesetzte Konzentration liegt wahrscheinlich im submaximalen Dosisbereich, so dass auch das durch die G-Kinase weniger bevorzugte Serin-157 vollständig phosphoryliert wird. Dieser Effekt ist aus den Thrombozyten bekannt (siehe Spur 10 in den 3 Western-Blot-Abbildung).

Bei Stimulierung mit 100 μ M des cGMP-erhöhenden NO-Donors SNP kommt es zu einer präferentiellen Phosphorylierung an Serin-239 (Banden im 16C2-Blot), aber auch zu einer zusätzlichen Phosphorylierung an Serin-157 (50 kDa-Bande im M4-Blot und im 5C6-Blot). Die Doppelbande im 16C2-Blot lässt sich wieder dadurch erklären, dass sowohl einfach-phosphoryliertes VASP (nur Serin-239, kein Molekulargewichts-Shift) als auch doppelt-phosphoryliertes VASP (Serin-239 und Serin-157, mit Molekulargewichts-Shift) vorliegen.

Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Erkenntnisse:

- a) In den isolierten CD34-positiven Stammzellen lassen sich PK-G (direkt und indirekt), PK-A (indirekt) sowie VASP (direkt) nachweisen.**
- b) VASP liegt in den nicht-stimulierten CD34-positiven Stammzellen in nicht-phosphoryliertem Zustand vor.**
- c) VASP-Phosphorylierung kann durch die aus anderen Zellsystemen bekannten Signalkaskaden der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP auch im Zellkultursystem von CD34-positiven Stammzellen *in vitro* ausgelöst werden.**
- d) Mit den zu Verfügung stehenden Methoden und Antikörpern sind diese Signalwege einer funktionellen Analyse zugänglich.**

5.2 Einfluss von cGMP auf Proliferation und Differenzierung humaner CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss eines NO-Donors (DEA/NO) auf die Proliferation und Differenzierung von humanen CD34-positiven Stammzellen zu Granulozyten/Monozyten und Megakaryozyten untersucht.

DEA/NO setzt NO frei und stimuliert somit in Zellen die PK-G, die wiederum VASP und andere Substrate phosphoryliert.

5.2.1 Einfluss von cGMP auf die Proliferation CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen

CD34-positive Stammzellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aus peripherem Blut oder Leukapheresematerial isoliert. Diese Zellen wurden anschließend in mit Wachstumsfaktoren versehenem Nährmedium (Zusammensetzung in 4.4.1 beschrieben) kultiviert. An Tag 1 wurden jeweils 10.000 isolierte CD34-positive Stammzellen pro Schale ausgesät, nach 9 bzw. nach 12 Tagen die jeweils bis dahin gewachsenen Stammzellen abgeerntet und durchflusszytometrisch bezüglich Proliferation und Differenzierung analysiert.

5.2.1.1 Proliferation unstimulierter CD34-positiver Stammzellen

Nach 9 Tagen Zellkultivierung fand sich in allen durchgeführten Experimenten ein durchschnittlich ca. 30-facher Anstieg der Zellzahl. An Tag 12 stieg die Zellzahl durchschnittlich weiter auf ein ca. 60-faches der Ausgangszellzahl an.

5.2.1.2 Proliferation CD34-positiver Stammzellen unter Stimulation mit dem cGMP-Analogon DEA/NO

Die Stammzellen wurden 9 bis 12 Tage lang täglich mit verschiedenen Konzentrationen des NO-Donors DEA/NO (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) stimuliert.

Die unstimuliert gewachsenen Stammzellen wurden für jedes einzelne der folgenden Stimulations-Experimente als 100 %-Ausgangswert gesetzt. Die Proliferation der CD34-positiven Stammzellen unter der Zugabe verschiedener Konzentrationen von DEA/NO wurde als relative Veränderung zu der Zahl der unstimulierten CD34-positiven Zellen dargestellt. Dabei wurden Mittelwert und Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten berechnet.

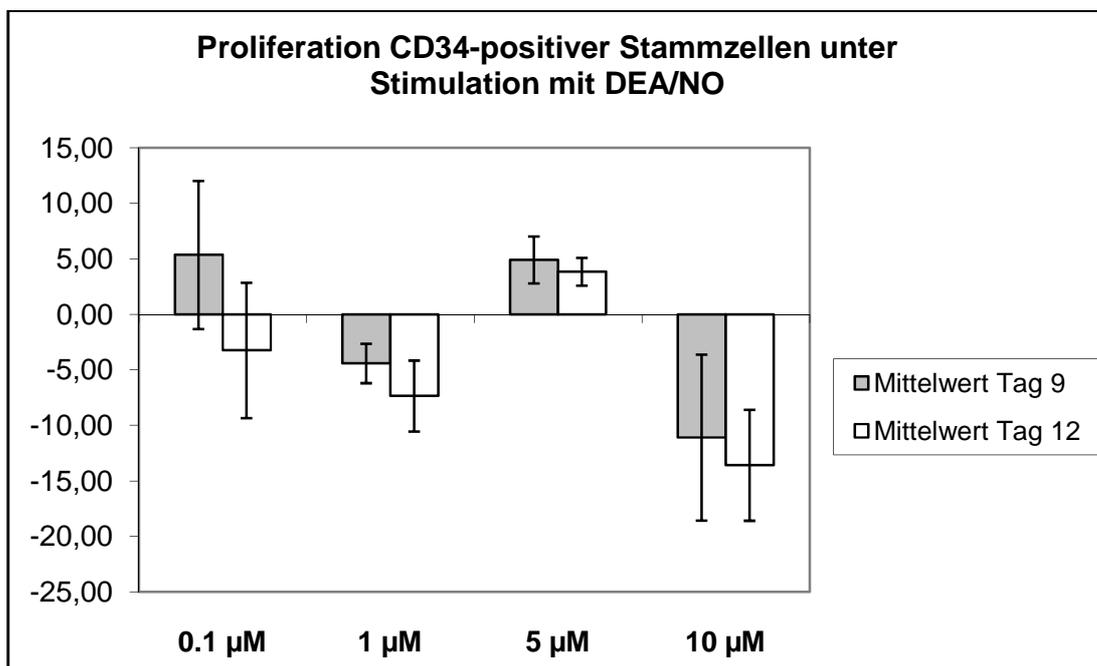


Abb. 6: Effekt von DEA/NO auf die Proliferation CD34-positiver Stammzellen an Tag 9 und Tag 12. Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. X-Achse: steigende Konzentration von DEA/NO (μM). Y-Achse: Relative Proliferationsrate bezogen auf unstimulierte CD34-positive Stammzellen. Graue Balken: Analyse an Tag 9, jeweils mit Standardfehler. Weiße Balken: Analyse an Tag 12, jeweils mit Standardfehler.

DEA/NO hat einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die CD34-positiven Zellen. Während die Konzentration von 0,1 μM keine signifikante Änderung des Wachstumsverhaltens ergibt, hemmt die Konzentration von 1 μM DEA/NO signifikant die Proliferation an Tag 9 und Tag 12 ($p=0,03$ bzw. $p=0,04$). Dagegen fördert die höhere Konzentration von 5 μM DEA/NO signifikant das Wachstum der

hämatopoetischen Zellen an beiden Tagen ($p=0,04$ bzw. $p=0,01$). Nach Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ DEA/NO kommt es zu einer signifikanten Wachstumshemmung an beiden Tagen ($p=0,04$ bzw. $p=0,03$).

Der Stickstoffmonoxid-Donor DEA/NO hat zusammenfassend folgende Einflüsse auf das Proliferationsverhalten humaner CD34-positiver Stammzellen:

- a) **Eine Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ DEA/NO hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stammzellen.**
- b) **Eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ DEA/NO hat einen hemmenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stammzellen.**
- c) **Dagegen beeinflusst die höhere Konzentration von $5 \mu\text{M}$ DEA/NO das Zellwachstum positiv.**
- d) **Die Konzentration von $10 \mu\text{M}$ DEA/NO hemmt die Proliferation stark, was möglicherweise durch einen toxischen Effekt von NO zu erklären ist.**

5.2.2 Einfluss des cGMP-Analogons DEA/NO auf den Zellzyklus CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen

Bisher wurde der Einfluss von DEA/NO auf das Proliferationsverhalten von CD34-positiven Stammzellen beschrieben. In diesem Abschnitt wird die Wirkung des NO-Donors auf den Zellzyklus der Stammzellen untersucht. Dafür wurden die Stammzellen aus Leukapheresematerial oder peripherem Blut (siehe Methodenteil) isoliert und wie in 4.4.1 dargestellt unter sterilen Bedingungen in einer `24-well`-Platte kultiviert. Dabei wurden die Zellen täglich mit DEA/NO in den Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$ stimuliert.

An Tag 4, also 72 h nach Aussaat der Zellen und täglicher Stimulation mit DEA/NO, wurden diese geerntet und wie in 4.5 beschrieben zur Zellzyklus-Analyse vorbereitet. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert

und die Verteilung der Zellen in die jeweiligen Phasen des Zellzyklus grafisch dargestellt.

5.2.2.1 Darstellung eines typischen Zellzyklus unstimulierter CD34-positiver Stammzellen

Auf Grund des Zyklus-abhängigen unterschiedlichen DNA-Gehaltes einer Zelle lassen sich folgende Untergruppen unterteilen:

1. G0- und G1-Phase: diploider Chromosomensatz ($x=2n$)
2. S-Phase: Chromosomensatz liegt zwischen diploidem und tetraploidem Chromosomensatz ($2n < x < 4n$)
3. G2- und Mitose-Phase: tetraploider Chromosomensatz ($x=4n$)

Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch das typische Verteilungsmuster der CD34-positiven Zellen in den unterschiedlichen Zyklusphasen:

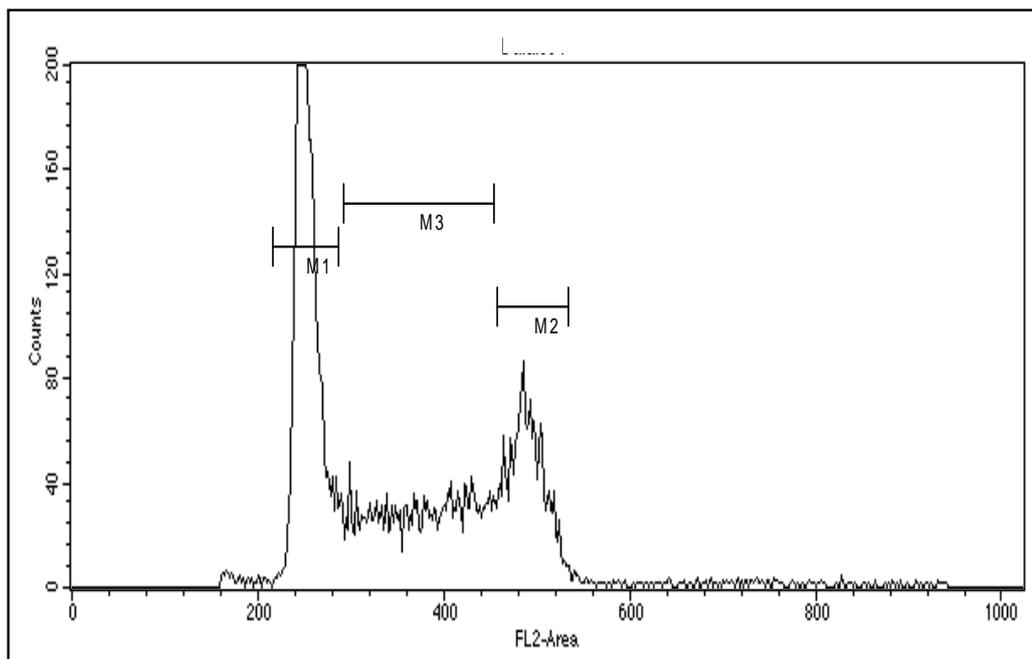


Abb. 7: FACS-Analyse von CD34-positiven Stammzellen: Typisches Verteilungsmuster der Interphase: M1= G0/G1-Phase, M2 = G2/M-Phase und M3 = S-Phase. Abbildung eines Histogrammplots: X-Achse: Fluoreszenzintensität (FL2-Area, entspricht dem relativen DNA-Gehalt), Y-Achse: gezählte Zellen (counts).

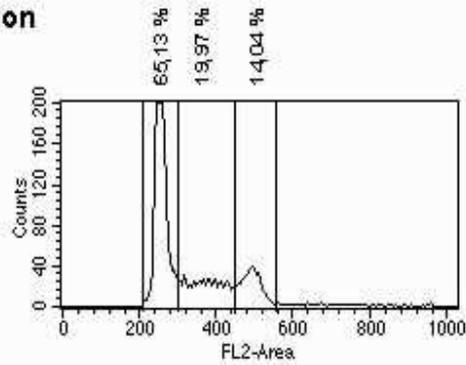
5.2.2.2 Zellzyklus CD34-positiver Stammzellen unter Stimulation mit DEA/NO

Um den Einfluss von DEA/NO auf den Zellzyklus CD34-positiver Zellen zu untersuchen, wurden diese nach der Aussaat täglich mit 1 μM oder 5 μM DEA/NO stimuliert. Nach 72 h wurden die bis dahin gewachsenen Stammzellen abgeerntet, zur Zellzyklus-Analyse präpariert und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Experiment der Verteilung CD34-positiver Stammzellen in die einzelnen Zellzyklusphasen nach täglicher Stimulation mit 1 oder 5 μM DEA/NO.

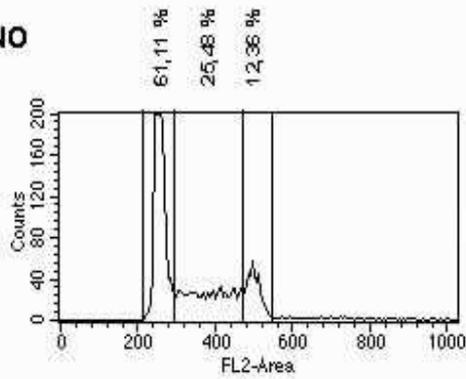
A)

No stimulation



B)

1 μ M DEA/NO



C)

5 μ M DEA/NO

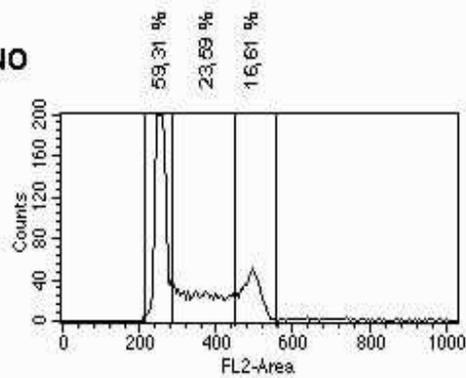


Abb. 8: Repräsentative Darstellung des Zellzyklus CD34-positiver Zellen ohne Stimulation (A), nach Stimulation mit 1 μ M DEA/NO (B) und 5 μ M DEA/NO (C) für 72 Stunden. X-Achse: Fluoreszenzintensität (FL2-Area, entspricht dem relativen DNA-Gehalt), Y-Achse: gezählte Zellen (counts).

Die folgenden Grafiken, Mittelwert von drei Experimenten, verdeutlichen die Verteilung der Stammzellen in den unterschiedlichen Zyklusphasen unter Stimulation mit 1 bzw. 5 μM DEA/NO in relativer Veränderung zu unstimulierten Stammzellen. Die unstimuliert gewachsenen Stammzellen wurden für jedes einzelne folgende Stimulations-Experiment als 100 %-Ausgangswert gesetzt. Die Veränderung der Zellzyklusphasen der CD34-positiven Stammzellen unter der Zugabe verschiedener Konzentrationen von DEA/NO wurde als relative Veränderung zu den Phasen der unstimulierten CD34-positiven Zellen dargestellt. Dabei wurden Mittelwert und Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten berechnet.

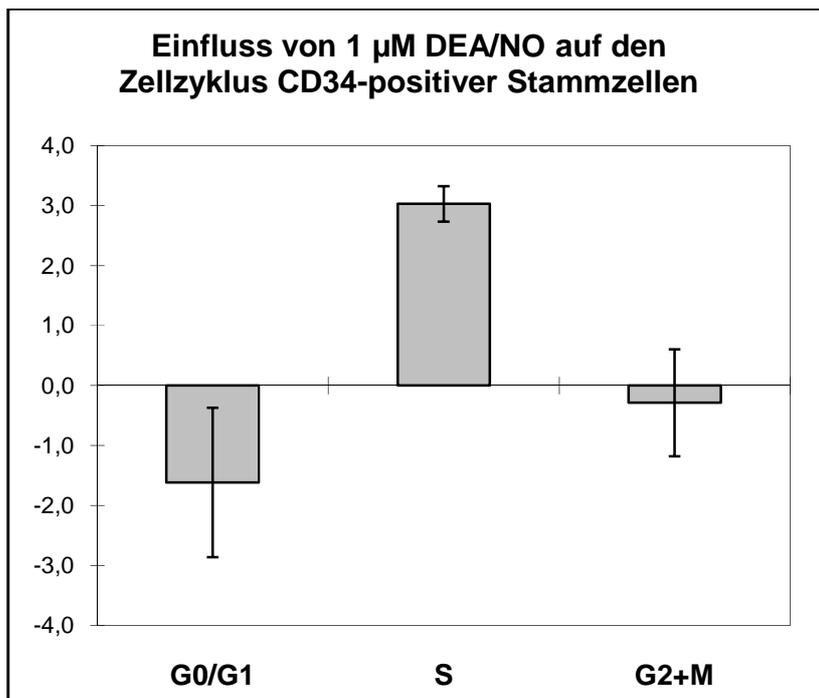


Abb. 9: Einfluss von 1 μM DEA/NO auf den Zellzyklus CD34-positiver Stammzellen. X-Achse: Darstellung der Zellzyklusstadien: G0/G1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase (Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente); Y-Achse: Relative Änderungen der Zellzyklusphasen bezogen auf unstimulierte CD34-positive Stammzellen, jeweils mit Standardfehler.

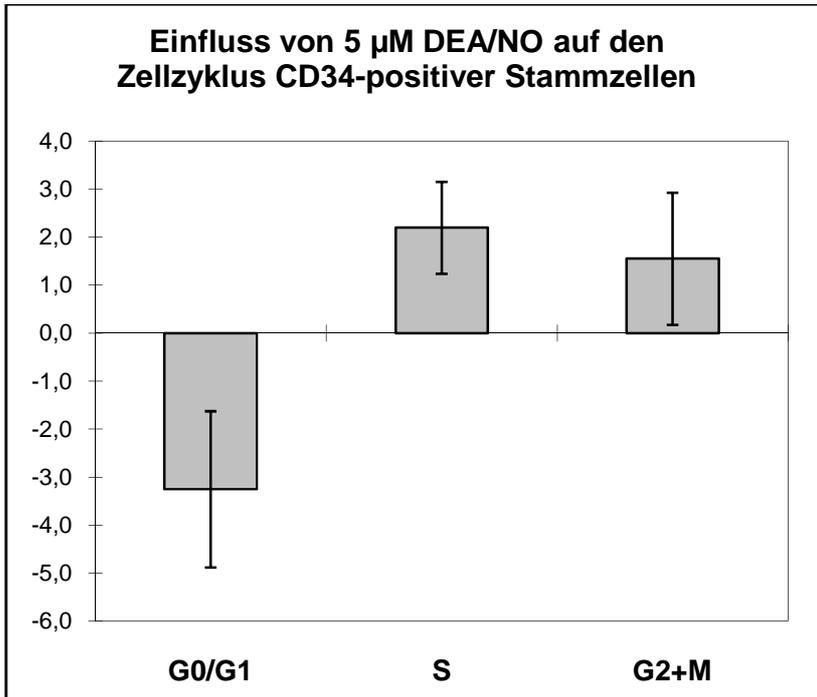


Abb. 10: Einfluss von 5 µM DEA/NO auf den Zellzyklus CD34-positiver Stammzellen. X-Achse: Darstellung der Zellzyklusstadien: G0/G1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase (Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente); Y-Achse: Relative Änderungen der Zellzyklusphasen bezogen auf unstimulierte CD34-positive Stammzellen, jeweils mit Standardfehler.

Bei beiden Konzentrationen zeigt sich, bezogen auf unstimulierte Stammzellen, eine vermehrte Anzahl von Zellen, die sich in der S-Phase befinden.

Dagegen nimmt die Anzahl an Zellen, die sich in den Ruhephasen G0 und G1 befinden, bei beiden Konzentrationen von DEA/NO ab, bei 5 µM aber deutlicher als bei 1 µM DEA/NO. Dazu passend finden sich bei einer Stimulation mit 5 µM DEA/NO deutlich mehr Zellen in der prämitotischen G2-Phase und in der Mitose, im Gegensatz zu mit 1 µM DEA/NO stimulierten Zellen, die eine nahezu gleiche Anzahl an Zellen wie unstimulierte Stammzellen zeigen.

Zusammenfassend ergeben sich aus der Zellzyklus-Analyse folgende Ergebnisse:

- a) DEA/NO steigert in beiden Konzentrationen (1 μM und 5 μM) den Anteil an Stammzellen, die sich in der Synthese-Phase befinden.**
- b) Nur DEA/NO in der Konzentration von 5 μM steigert den Anteil an Stammzellen, die sich in der prämitotischen Ruhephase und in der Mitose (G2/M-Phase) befinden.**
- c) DEA/NO verringert in beiden Konzentrationen (1 μM und 5 μM) den Anteil an Stammzellen, die sich in der Ruhephase (G0/G1-Phase) befinden.**

5.2.3 Einfluss des NO-Donors DEA/NO auf die Differenzierung CD34-positiver Stammzellen

Nachdem ein Proliferationsverhalten CD34-positiver Stammzellen unter Zellkulturbedingungen und unter Stimulation mit dem NO-Donor DEA/NO sowie dessen positiver Einfluss auf Synthese-Phase und Mitose im Zellzyklus der Stammzellen nachgewiesen werden konnten, sollte im nächsten Schritt die Differenzierung unter DEA/NO-Stimulation untersucht werden.

Nach Isolation und Kultivierung der CD34-positiven Stammzellen, wie im Methoden-Teil beschrieben, wurden diese an Tag 9 und Tag 12 geerntet und mit gegen die Oberflächenmerkmale CD15 und CD41 spezifischen Antikörpern inkubiert. Das Antigen CD15 dient dabei zur Identifizierung von Granulozyten/Monozyten, das Antigen CD41 von Megakaryozyten. Daran anschließend folgten die Markierung mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper und die durchflusszytometrische Analyse am FACS-Gerät.

5.2.3.1 Differenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen zu Granulozyten/Monozyten (CD15-positiv)

Als Referenzwert für das Differenzierungsverhalten unter DEA/NO-Stimulation wurde die Differenzierung unstimulierter Stammzellen zu CD15-positiven Zellen, das heißt ohne Zugabe von DEA/NO, verwendet.

Die unstimuliert differenzierenden Stammzellen wurden für jedes einzelne der folgenden Stimulations-Experimente als 100 %-Ausgangswert gesetzt. Die Differenzierung der CD34-positiven Stammzellen zu Granulozyten/Monozyten unter der Zugabe verschiedener Konzentrationen von DEA/NO (1 μ M, 5 μ M) wird als relative Veränderung zu der Zahl der unstimulierten CD34-positiven Zellen dargestellt. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

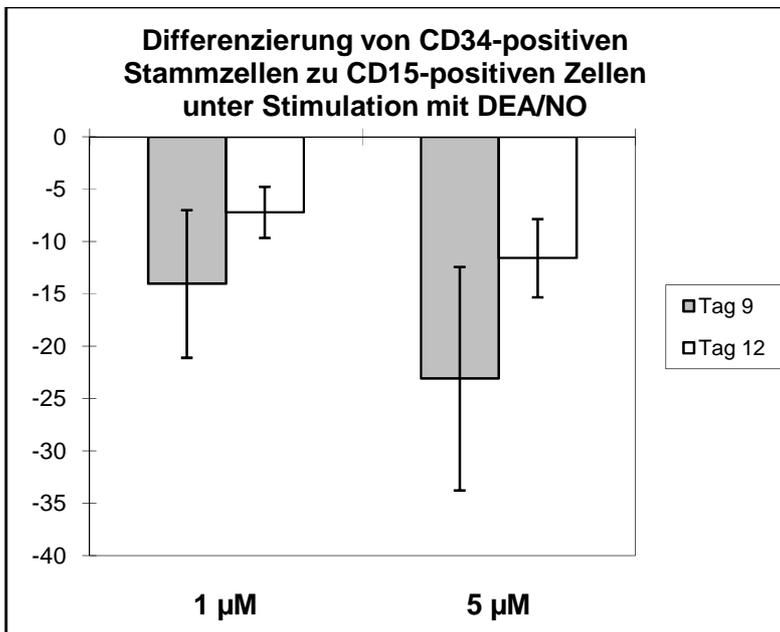


Abb. 11: Effekt zweier DEA/NO-Konzentrationen auf die Zelldifferenzierung CD34-positiver Stammzellen zu CD15-positiven Granulozyten bzw. Monozyten im Vergleich zur unstimulierten Zellpopulation. Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler sind dargestellt. X-Achse: steigende Konzentration von DEA/NO (μM), Y-Achse: Relative CD15-Differenzierung zu Granulozyten/Monozyten bezogen auf unstimulierte CD34-positive Stammzellen; graue Balken Tag 9, weiße Balken Tag 12.

Es zeigt sich unter DEA/NO eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zelldifferenzierung von CD34-positiven Stammzellen zu CD15-positiven Granulozyten /Monozyten.

5.2.3.2 Differenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen zu Megakaryozyten (CD41-positiv)

Als Referenzwert für das Differenzierungsverhalten von mit DEA/NO-stimulierten Zellen wurde die Differenzierung unstimulierter Stammzellen zu CD41-positiven Zellen, das heißt ohne Zugabe von DEA/NO, verwendet.

Die unstimuliert differenzierenden Stammzellen wurden für jedes einzelne folgende Stimulations-Experimenten als 100 %-Ausgangswert gesetzt. Die Differenzierung der CD34-positiven Stammzellen zu Megakaryozyten unter der Zugabe verschiedener Konzentrationen von DEA/NO (1 μ M, 5 μ M) wird als relative Veränderung zu der Zahl der unstimulierten CD34-positiven Zellen dargestellt. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden aus 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

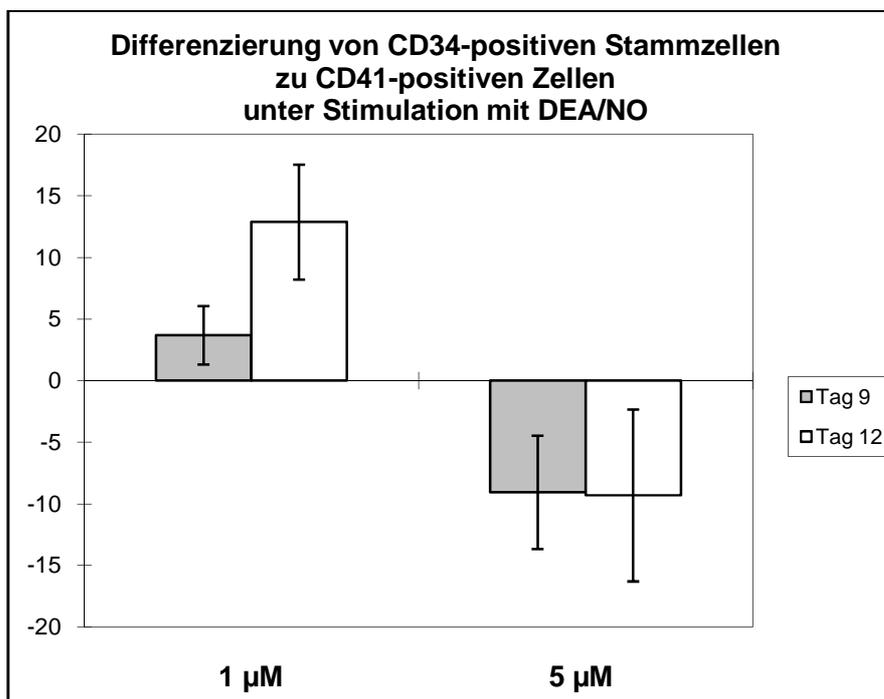


Abb. 12: Effekt zweier DEA/NO-Konzentrationen auf die Zelldifferenzierung CD34-positiver Stammzellen zu CD41-positiven Megakaryozyten im Vergleich zur unstimulierten Zellpopulation. Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler sind dargestellt. X-Achse: steigende Konzentration von DEA/NO (μ M), Y-Achse: Relative CD41-Differenzierung zu Megakaryozyten bezogen auf unstimulierte CD34-positive Stammzellen; graue Balken Tag 9, weiße Balken Tag 12.

Nach Stimulation der Progenitorzellen mit der Konzentration von 1 μ M DEA/NO kann an Tag 9 eine deutliche und an Tag 12 eine signifikante ($p=0,01$) Steigerung der Differenzierung der CD34-positiven Zellen zu Megakaryozyten beobachtet

werden. Nach Stimulation mit der höheren Dosis von 5 μM DEA/NO hingegen wird die Zelldifferenzierung zu Megakaryozyten an beiden Tagen signifikant ($p= 0,03$ bzw. $p=0,05$) reduziert.

Zusammenfassend ergeben sich aus den Daten folgende Ergebnisse:

- a) DEA/NO inhibiert konzentrationsabhängig die Zelldifferenzierung von CD34-positiven Stammzellen zu CD15-positiven Granulozyten und Monozyten.**
- b) DEA/NO hat einen konzentrationsabhängigen dualen Effekt auf die Differenzierung CD34-positiver Progenitorzellen zu CD41-positiven Megakaryozyten:**
 - 1. DEA/NO steigert in der Konzentration von 1 μM die Zelldifferenzierung zu CD41-positiven Megakaryozyten.**
 - 2. DEA/NO hemmt in der Konzentration von 5 μM die Differenzierung zu CD41-positiven Zellen.**

6. Diskussion

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich in mehreren Teilprojekten die Eigenschaften und Funktion des Signalproteins VASP in CD34-positiven Stammzellen (gesunder Spender oder Patienten ohne hämatologische Grunderkrankung) sowie den Einfluss zyklischer Nukleotide auf Proliferation und Differenzierung dieser Zellen untersucht.

Die wesentlichen Erkenntnisse meiner Arbeit sind:

- a) **In CD34-positiven Stammzellen lassen sich PK-G (direkt und indirekt), PK-A (indirekt) sowie VASP (direkt) nachweisen. Dabei liegt VASP in präparierten nicht-stimulierten CD34-positiven Stammzelle in nicht-phosphoryliertem Zustand vor.**
- b) **VASP-Phosphorylierung kann durch die aus anderen Zellsystemen bekannten Signalkaskaden der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP auch im Zellkultursystem von CD34-positiven Stammzellen *in vitro* ausgelöst werden. Mit den zu Verfügung stehenden Methoden und Antikörpern sind diese Signalwege nachweisbar.**
- c) **DEA/NO hat einen dualen, konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferation und die Differenzierung humaner hämatopoetischer Stammzellen sowie auf deren Zellzyklus.**

6.1 VASP in CD34-positiven humanen Stammzellen

VASP, ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, ist in fast allen Zelltypen exprimiert. Wie bereits in der Einleitung unter 1.4 beschrieben, besitzt es drei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen (Serin-157, Serin-239 und Threonin-278), die mit unterschiedlichen Kinetiken durch die PK-A und die PK-G phosphoryliert werden (Butt et al. 1994). Eine Aktivierung der PK-A führt dabei bevorzugt zu einer Phosphorylierung von VASP an Serin-157, die Aktivierung der PK-G dagegen an

Serin-239 (Butt et al. 1994). Für den Nachweis von VASP in CD34-positiven humanen Stammzellen stehen die Antikörper M4, 16C2 und 5C6 zu Verfügung, die auch zur Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von VASP dienen (ausführliche Beschreibung siehe 5.1.2). Dabei erkennt der polyklonale Antikörper **Anti-VASP-M4** VASP unabhängig seines Phosphorylierungszustandes. Eine VASP-Phosphorylierung am Serin-157 kann hier an einer Änderung des Laufverhaltens (=Shift) im SDS-Polyacrylamidgel von 46 kDa (=nicht phosphoryliert) nach 50 kDa (=phosphoryliert) detektiert werden (Halbrügge et al. 1989). Der monoklonale AK **Anti-Phospho-VASP-16C2** erkennt spezifisch eine Phosphorylierung an Ser-239, jedoch nicht das Dephospho-Protein. Die Phosphorylierung von VASP an der Position Serin-157 wird durch den Antikörper **Anti-Phospho-VASP-5C6** identifiziert, was sich in einer 50 kDa-Bande zeigt. Auch dieser Antikörper kann das nicht-phosphorylierte Protein nicht nachweisen.

VASP und Mena (mammalian Enabled) gehören zu der Prolin-reichen Ena/VASP Protein-Familie, die das Zellmembran-Protein, die Signaltransduktionswege und das Aktin-Zytoskelett miteinander verbindet. Die Gene, die VASP bei Mensch und Maus kodieren, wurden bereits isoliert und zu großen Teilen sequenziert, wobei das VASP-Gen aus 13 Exons besteht. Die Aminosäure-Sequenz von Maus und Mensch stimmen zu 89 % überein. Das humane VASP kann Chromosom 19q13.2-q13.3 zugeteilt werden. Prominente 5`CpG Inseln, die viele SP1-Stellen enthalten, lassen auf eine `housekeeping`- Funktion von VASP schließen (Zimmer et al. 1996). Gambaryan et al. (2001) stellten die Verteilung von VASP und Mena in den verschiedenen Geweben und Zelltypen dar. Dabei werden die größten Mengen an VASP in Thrombozyten, aber auch in Magen, Milz, Lunge und Gefäßen beobachtet. Mena dagegen wird reichlich im Gehirn exprimiert und lässt sich dagegen nicht in Plättchen und Milz nachweisen. Beide, also VASP und Mena, lassen sich in intestinalen glatten Muskelzellen, Blutgefäßen und Epithelzell-Membranen nachweisen. In den Nieren werden VASP und Mena hauptsächlich in den glomerulären Mesangiumzellen und in den Papillen gefunden. Schick et al.

(2003) konnten VASP und Zyxin, als ein wichtiger Partner für Motilität und Zell-Adhäsion, in Pillarzellen der Ratten-Cochlea nachweisen. Der Beginn der VASP-Expression trat dabei gleichzeitig mit dem Beginn des Hörens auf. Im menschlichen Herzen zeigen sich VASP und Mena an Gefäßen und Myozyten mit Connexin-43 kolokalisiert (Eigenthaler et al. 2003). Während der postnatalen Entwicklung des Herzens bei Tieren sinken die Mengen von VASP und Mena zunehmend von der neonatalen bis zur erwachsenen Entwicklung (Gambaryan et al. 2001). Das gemeinsame Vorhandensein von VASP und Ena in Zellen des Intestinal-Traktes, von Nieren und Herz lässt unter anderem darauf schließen, dass die Proteine der Ena/VASP Familie ähnliche Funktionen ausüben und sich gegenseitig in diesen Geweben kompensieren können (Gambaryan et al. 2001). In sehr hoher Konzentration findet man VASP in Thrombozyten (Eigenthaler et al. 1992). Es liegt in unbehandelten, humanen Thrombozyten in der 46 kDa-Dephospho-Form vor (Halbrügge et al. 1990). VASP stellt in Thrombozyten das am Besten charakterisierteste Substrat der PK-A und der PK-G dar (Butt et al. 1994). Dabei korreliert die VASP-Phosphorylierung über cAMP (PG-E₁, PG-I₂) - und cGMP-erhöhende (NO und NO-freisetzende Substanzen, z.B. SNP) Substanzen eng mit einer Thrombozyteninhibierung, die über eine Hemmung des Fibrinogenrezeptors vermittelt ist.

Auch in anderen Zelltypen konnte das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein sowie dessen Phosphorylierung über zyklische Nukleotide gefunden werden. Neueste Veröffentlichungen von Cook et al. (2007) beispielsweise konnten VASP und dessen Regulation über den NO/cGMP/PK-G Signalweg auch in humanen, kultivierten Stromazellen der Prostata nachweisen. Die Arbeitsgruppe um Andre et al. (2005) konnten die NO/cGMP/PK-G Signalkaskade mit konsekutiver VASP-Phosphorylierung in humanen embryonalen Nierenzellenlinien nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in humanen, unstimulierten CD34-positiven Stammzellen die Proteinkinase G und ihr Substrat VASP direkt mit Hilfe der Western-Blot-Technik unter Verwendung oben genannter spezifischer Antikörper

nachgewiesen werden. VASP fand sich dabei in unphosphoryliertem Zustand. Ferner konnte mit der cAMP-analogen Substanz cBIMPS, sowie cAMP-erhöhenden Substanzen (PG-E₁) in vivo eine VASP-Phosphorylierung bei CD34-positiven Zellen aufgezeigt werden. Dadurch wurde indirekt die PK-A in diesem Zellkollektiv nachgewiesen. Über die cGMP-erhöhende Substanz SNP konnte eine präferentielle Phosphorylierung an Ser-239 und aber auch an Ser-157 beobachtet werden. Die schon bei Smolenski et al. erwähnte Spezifität des AK 16C2 für Serin-239 phosphoryliertes VASP kann somit in den Versuchen an CD34-positiven Stammzellen bestätigt werden. Ebenso konnten durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes VASP bereits bestehende Ergebnisse aus Thrombozyten (Butt et al. 1994, Smolenski et al. 1998) auch in humanen CD34-positiven Stammzellen bestätigt werden. Die Tatsache, dass in den untersuchten Zellen dieser Arbeit VASP in der Dephospho-Form vorliegt, durch Aktivierung der PK-A oder PK-G wie in vielen anderen Zelltypen (Halbrügge et al. 1991) phosphoryliert werden kann, ist ein Indiz dafür, dass die Phosphorylierung von VASP auch in diesen Zellen eine Möglichkeit der Regulation intrazellulärer Vorgänge darstellt, analog der aus den Thrombozyten bekannten Korrelation mit der Inhibierung des Fibrinogenrezeptors.

In der Zusammenschau sind somit die für die cGMP/PK-G/VASP- und cAMP/PK-A/VASP-Signalkaskaden notwendigen Komponenten in humanen CD34-positiven Zellen identifiziert und die Signalwege in Stammzellen analog zu anderen Zellen, beispielsweise humanen Blutplättchen (Halbrügge et al. 1990), prinzipiell auslösbar.

Die Möglichkeit des Nachweises von VASP bzw. dessen Phosphorylierung mit Hilfe verschiedener Antikörper, die zwischen Phospho-VASP und Dephospho-VASP unterscheiden können, bietet auch die Möglichkeit, VASP als Indikatorprotein für weitere Stoffwechsellkaskaden nutzen zu können. Profirovic et al. (2005) beschreiben eine G_α13-induzierte VASP-Phosphorylierung, die unter anderem eine Aktivierung von RhoA und MEKK1, eine Phosphorylierung von

I_{kappa}B als auch ein Freisetzung der katalytischen Untereinheit der PK-A mit nachfolgender VASP-Phosphorylierung einbezieht.

6.2 Funktionen von VASP für die Differenzierung von CD34-positiven Stammzellen

Etliche Interaktionen zwischen VASP und Zytoskelettproteinen wie Aktin, Vinculin, Profilin und Zyxin sind bisher bekannt (Reinhard, Giehl et al. 1995, Reinhard, Jouvenal et al. 1995 Reinhard et al. 1996). Wie bereits in der Einleitung unter 1.4 beschrieben, verstärkt VASP die Aktinpolymerisation und die Bündelung von Aktinfilamenten (Bachmann et al. 1999). Mittels *in vitro*-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung die Bindung von VASP an F-Aktin reduziert und die Aktinpolymerisation und Bündelung der Filamente unterdrückt werden (Harbeck et al. 2000). Folglich könnte eine VASP-Phosphorylierung die verstärkende Wirkung von VASP auf die Aktinpolymerisation herunter regulieren. Dass VASP bereits in den humanen pluripotenten CD34-positiven Stammzellen, die zu Differenzierung und Proliferation befähigt sind, nachgewiesen werden konnte, unterstreicht die mögliche Rolle von VASP in der Organisation des Zytoskeletts.

Jedoch ist VASP nur eines von vielen weiteren Substraten der PK-A und der PK-G und so ist die genaue Funktion vor allem bei der Reorganisation des Zytoskeletts noch unklar. In weiteren Versuchsreihen sollte geprüft werden, inwieweit eine Veränderung des Phosphorylierungszustandes von VASP Hinweise auf mögliche intrazelluläre Vorgänge bereits in Stammzellen liefert.

Einfluss von VASP auf die Differenzierung von CD34-positiven humanen Stammzellen

Hauser et al. (1999) untersuchten die Rolle von VASP, indem sie Wildtyp-Maus mit VASP-defizienter Maus verglichen. In der Wildtyp-Maus wird VASP in Plättchen

und Geweben, die reich an glatter Muskulatur sind, wie Lunge, Magen, Dünndarm und Gefäßwand, gefunden. VASP-defiziente Mäuse zeigen eine Hyperplasie der Megakaryozyten in Knochenmark und Milz. Dies lässt auf eine inhibitorische Wirkung von VASP auf das Wachstum und Heranreifen von Megakaryozyten schließen.

In humanen CD34-positiven Zellen konnte in dieser Arbeit eine Expression von VASP nachgewiesen werden. Möglicherweise besteht demnach eine funktionale Rolle von VASP auf die Differenzierung von Stammzellen, zumindest in der Megakaryopoese. In wie weit ein genauer Zusammenhang beziehungsweise eine Regulation von VASP mit dem Differenzierungsverhalten von CD34-positiven Stammzellen besteht, ist noch unklar und erfordert weitere Untersuchungen beispielsweise mit Stammzellen VASP-defizienter Mäuse.

Weiter wird bei Hauser et al. (1999) in VASP-defizienten Mäusen eine verstärkte Thrombin-induzierte Plättchenaktivierung beobachtet. Die möglicherweise resultierende verstärkte Plättchenaggregation mit erhöhtem Plättchenverbrauch wird, wie oben erwähnt, möglicherweise durch die Hyperplasie von Megakaryozyten kompensiert. Erkrankungen, die mit einer erhöhten Plättchenaktivierung einhergehen, wie koronare Herzerkrankungen, Arteriosklerose und entzündliche Gefäßerkrankungen lassen sich mit Hilfe von VASP-knockout-Mäusen weiter untersuchen. Möglicherweise finden sich auch schon auf Stammzellebene Hinweise für Pathomechanismen zwischen VASP und den oben genannten Gefäßerkrankungen.

Hinsichtlich des Phänotyps zeigten sich bei den Versuchen von Hauser et al. (1999) keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und VASP-defizienter Maus, was auf die bereits erwähnte kompensatorische Funktion von VASP durch weitere Proteine der Ena/VASP Proteinfamilie schließen lässt.

Darüberhinaus zeigen die Versuche mit Thrombozyten von VASP-knockout-Mäusen, dass diese, nach Stimulation mit Thrombin, mit verstärkter Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und P-Selektin-Expression reagieren.

Weitere Forschungsarbeiten sind nötig, um zu untersuchen, ob bei Patienten mit myelodysplastischen Erkrankungen eine Funktionsänderung von VASP bereits auf Stammzellebene zu beobachten ist und somit sogar mögliche therapeutische Ansätze durch Regulation des VASP-Proteins gefunden werden können.

6.3 Effekte von DEA/NO auf die Proliferation humaner CD34-positiver Stammzellen

Zyklische Nukleotide spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation CD34-positiver Stammzellen. DEA/NO wurde in dieser Arbeit als NO-Donor eingesetzt, der mit einer kurzen Halbwertszeit von 2 min bei 37 °C NO freisetzt und die Signalkaskade NO/cGMP/PK-G auslösen kann. NO wird in vivo in hoher Konzentration von Gefäßendothelzellen freigesetzt und hat viele physiologische Funktionen. Unter anderem stimuliert es die lösliche Guanylzyklase zur Synthese von cGMP, das wiederum die PK-G aktivieren kann (Schmidt et al. 1993).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Konzentration von (1 µM) DEA/NO keinen fördernden Einfluss auf die Proliferation der humanen Stammzellen hat. Hingegen verstärkte die höhere Konzentration von 5 µM DEA/NO das Zellwachstum der humanen Progenitorzellen. Noch höhere Konzentrationen hatten vermutlich wegen eines toxischen Effekts von DEA/NO eine Inhibierung der Proliferation CD34-positiver Zellen zu Folge. Analysen der Proben an Tag 9 und 12 zeigten dabei das gleiche Proliferationsverhalten.

Stimulation humaner Progenitorzellen (von Gesunden und Patienten mit Tumorerkrankungen) mit 8-pCPT-cGMP zeigten ebenfalls einen dualen, konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferation derselben: niedrige 8-pCPT-cGMP-Konzentrationen inhibierten das Wachstum, dagegen konnte mit höheren Dosen von cGMP eine gesteigerte Proliferation beobachtet werden (Kobsar et al.

2008). Bei dem Wachstumsverhalten von Stammzellen von CML-Patienten unter Stimulation mit cGMP konnte dieser eindeutige konzentrationsabhängige Effekt nicht aufgezeigt werden (Kobsar et al. 2008).

Aicher et al. (2003) beschreibt einen engen Zusammenhang der endothelialen NO-Synthase (eNOS) mit der Proliferation und Mobilisierbarkeit von Stammzellen aus dem Knochenmark. Knochenmarkszellen von eNOS-defizienten Mäusen zeigen dabei eine 2,4-fach verminderte Proliferation sowie eine reduzierte Fähigkeit, Kolonien zu bilden. Auch die Abwesenheit des Signaltransduktionsmoleküls cGMP-abhängige Proteinkinase (PK-G) weist vergleichbare Effekte auf. Matrixmetalloproteasen lösen Stroma-Stammzell-Interaktion proteolytisch und begünstigen somit den Übergang in proliferierende Stammzellen. In Knochenmark von eNOS-defizienten Mäusen fand sich eine reduzierte Freisetzung dieser Metalloproteasen. In humanen CD34-positiven Stammzellen konnte in dieser Arbeit eine Expression der PK-G mittels Western-Blot-Technik aufgezeigt werden. Möglicherweise hat die Anwesenheit dieser Proteinkinase auch einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der humanen Stammzellen. Die Stimulation der Zellen mit 5 μ M DEA/NO und das daraus folgende gesteigerte Wachstum unterstützt die Beobachtung von Aicher et al..

Bereits durchgeführte Untersuchungen mit dem zyklischen Nukleotid cAMP auf das Proliferationsverhalten humaner Progenitorzellen ergaben teils unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu cGMP: Es konnte gezeigt werden, dass cAMP gänzlich die Proliferation der myeloischen Zelllinien M07e und 32D inhibierte (Hendrie et al. 1994, Lee 1999). Untersuchungen des zyklischen Nukleotids cAMP, beziehungsweise dessen Analoga, auf das Wachstum humaner Progenitorzellen zeigten eine Konzentrations-abhängige Inhibierung des Wachstums der humanen Megakaryozyten-Zelllinie Dami (Vittet et al. 1995). Zudem wurde festgestellt, dass cAMP die Zellen vermehrt in der G2- und M-Phase zu halten vermag und dadurch den Zellzyklus verlangsamt. Auch cGMP weist diesen Effekt auf, was in dieser Arbeit nach Stimulation mit der Dosis von 5 μ M DEA/NO an humanen Progenitorzellen gezeigt werden konnte.

Es existieren aber auch Daten, die einen fördernden Einfluss von cAMP auf Proliferation und Differenzierung humaner Stammzellen aufzeigen. Beispielsweise werden auf humane CD34-positive Stammzellen und davon abstammenden Megakaryozyten durch cAMP Mechanismen zum Schutz vor Apoptose aktiviert (Negrotto et al. 2006, Pozner et al. 2005). Forskolin, ein cAMP Stimulator, und Cholera toxin stimulieren in der Knochenmarks-Zellkultur von Mäusen Osteoklasten-bildende Zellen (Ransjo et al. 1999). Auch bei humanen Progenitorzellen von Tumorpatienten zeigte sich eine deutlich gesteigerte Proliferation durch Forskolin (Kobsar et al. 2008).

6.4 Effekte von DEA/NO auf die Differenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen

Humane Stammzellen können zu Erythrozyten, Megakaryozyten, Monozyten/Granulozyten und Lymphozyten differenzieren. In dieser Arbeit wurde die Ausdifferenzierung humaner CD34-positiver Stammzellen von Gesunden und von Patienten mit Tumorerkrankungen zu Megakaryozyten und Monozyten/Granulozyten unter Stimulation von DEA/NO untersucht. Alle für die Differenzierungsprozesse wichtigen hämatopoetischen Faktoren wie Interleukine, colony stimulating factors, Erythropoetin und Thrombopoetin (TPO) wurden dem Nährmedium, wie im Methodenteil beschrieben, zugegeben. TPO ist ein physiologischer und auch der stärkste Regulator der Megakaryopoese in vitro und in vivo (Matsumara et al. 2002, Laluppa et al. 1997). Es fördert nicht nur die Proliferation, sondern auch die Reifung von Megakaryozyten über Aktivierung vieler Signalkaskaden, einschließlich der Ras/mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), der Phosphatidyl 3-Kinase (PI3-K)/Akt und der Proteinkinase C (Matsumara et al. 2002). In Kombination mit Il-3 oder Il-6 hat TPO einen additiven Effekt (Laluppa et al. 1997).

Die Kombination von GM-CSF und Interleukin-3, die in den Experimenten dieser Arbeit ebenfalls dem Kulturmedium hinzugefügt wurde, steigert die Anzahl von

Megakaryozyten-Kolonien (Bruno et al. 1992). Die Kombination von SCF plus Il-3 plus Il-6 plus TPO hat zudem eine gesteigerte Zahl von Megakaryozyten pro Kolonie zur Folge (Debili et al. 1995).

Laluppa et al. (1997) untersuchten unter anderem Zytokin-Kombinationen, die das Wachstum von Granulozyten/Monozyten steigern können. In Bezug auf eine Differenzierung zu Granulozyten/Monozyten hatte sich eine Kombination von Il-6, Il-3, SCF, TPO, GM-CSF und G-CSF (Laluppa et al. 1997) bewährt, wobei letzterer den Haupt-Stimulus darstellte. Das Zellkulturmedium, das in dieser Arbeit für die Proliferations- Differenzierungs- und Zellzyklus-Experimente verwandt wurde, setzt sich aus genau dieser Kombination, in derselben Endkonzentration und unter gleichen Kulturbedingungen zusammen. Die Proliferationsergebnisse der humanen CD34-positiven Zellen bestätigen den günstigen Effekt der genutzten Zytokin-Kombination. Da sich in dieser Arbeit jedoch unter der Stimulation mit DEA/NO im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine verminderte Differenzierung in diese Zelllinien gezeigt hatte, lässt sich ein hemmender Effekt von DEA/NO auf die Ausdifferenzierung zu Monozyten/Granulozyten erkennen, der sogar mit steigender Konzentration von DEA/NO zunimmt. Anders verhält es sich bei der Entwicklung von humanen Progenitorzellen zu Megakaryozyten, die unter täglicher Stimulation mit 1 μM DEA/NO vermehrt gezählt werden konnten. Somit kann, im Hinblick auf eine Expansion der Megakaryozyten-Linie, der günstig beeinflussende Effekt der Kombination des Kulturmediums, das sich bereits bei Laluppa et al. (1997) bewährt hatte, in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei höheren Konzentration DEA/NO (5 μM) schließlich wurde das Wachstum der Megakaryozyten gehemmt, so dass zusammenfassend ein Konzentrations-abhängiger Effekt von NO sowohl auf Proliferation als auch auf Differenzierung humaner Progenitorzellen vorhanden zu sein scheint.

Shami et al. (1996) zeigten den Einfluss von SNP und SNAP (S-nitroso-acetylpenicillamin), weiteren NO-Donoren, auf das Wachstum CD34-positiver Zellen:

Hohe NO-Konzentrationen inhibierten das Wachstum sowohl der CFU-Eo als auch der myeloischen Zelllinie. Hingegen zeigten niedrige Konzentrationen von NO

einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum der CFU-GM bei weiterhin bestehender Inhibierung der Erythrozyten-Zelllinie.

Stimulationen von Stammzellen mit DETA/NO zeigten bei Schattner et al. (2001) ein vermindertes Wachstum von Megakaryozyten. DETA/NO setzt NO mit einer Halbwertszeit von 20 Stunden frei. Womöglich hat diese längere Halbwertszeit von 20 Stunden im Gegensatz zu der Halbwertszeit von 2 min bei DEA/NO einen stärker inhibierenden Effekt auf das Wachstum von Megakaryozyten zur Folge. Andererseits zeigten Schattner et al. eine Inhibierung des Wachstums von Megakaryozyten auch nach Stimulation mit SNP, einem weiteren NO-Donor, der NO für nur wenige Sekunden freisetzt (Ignarro 1989). Durchflusszytometrische Analysen dieser Zellen lassen vermuten, dass Apoptosevorgänge bei CD34-positiven Zellen und Megakaryozyten bei der inhibitorischen NO-Wirkung mit einer Rolle spielen (Schattner et al. 2001).

Der Unterschied im Wachstumsverhalten der Megakaryozyten von Schattner et al. und den Ergebnissen dieser Arbeit kann sich jedoch auch durch die Benutzung unterschiedlicher Konzentrationen von TPO erklären. So verwendete die Arbeitsgruppe um Schattner 10 ng/ml TPO, in der vorliegenden Arbeit wurde TPO hingegen in einer höheren Konzentration von 25 ng/ml benutzt. So könnte es sein, dass Thrombopoetin, das für das Wachstum der Megakaryozyten verantwortlich ist, dem zytotoxischen Effekt von DEA/NO, zumindest in der niedrigen Konzentration von 1 μ M, entgegenwirken konnte. Eine weitere Erklärung für das Wachstum der Megakaryozyten-Zelllinie unter 1 μ M DEA/NO könnte das Vorhandensein von Zytokinen sein, welche die Progenitorzellen vor den zytotoxischen Effekten von NO schützen. Darüberhinaus bewirkt die Konzentration von 5 μ M DEA/NO auf die Proliferation generell ein deutliches Wachstum, so dass gegebenenfalls hemmende Effekte lediglich auf die Differenzierung angenommen werden können. In besonderem Maße trifft dies in dieser Arbeit auf die Entwicklung von humanen CD34-positiven Zellen zu Granulozyten/Monozyten zu, deren Wachstum durch beide Konzentrationen (1 und 5 μ M) von DEA/NO, in unterschiedlich starker Ausprägung, gehemmt wurde. Die gleiche Entwicklung

konnte bei Kobsar et al. (2008) in der Stimulation von CD34-positiven Stammzellen zu Granulozyten/Monozyten mit 8-pCPT-cGMP gesehen werden. Überraschenderweise zeigten sich bei Stimulations-Versuchen mit CD34-positiven Zellen von CML-Patienten eine gesteigerte Differenzierung zu CD15- und CD41-positiven Zellen unter 8-pCPT-cGMP im Vergleich zu Kontroll-Personen. Dieser Effekt kann sich beispielsweise durch fehlerhafte Apoptosevorgänge oder mangelnde Kontrollmechanismen im Rahmen des Zellzyklus der leukämischen Zellen erklären lassen.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde in humanen CD34-positiven Stammzellen die PK-G sowie ihr Substratprotein VASP nachgewiesen. Dabei liegt VASP in unstimulierten Zellen in nicht-phosphorylierter Form vor. Die VASP-Phosphorylierung kann durch die aus anderen Zellsystemen bekannten cAMP- und cGMP- abhängigen Signalkaskaden auch im Zellkultursystem von humanen CD34-positiven Stammzellen reguliert werden. Mit den zu Verfügung stehenden Methoden und Antikörpern sind diese Signalwege – prinzipiell auch quantitativ – auswertbar.

Ein weiterer Teilaspekt war der Einfluss des Stickstoffmonoxyd-Donors DEA/NO auf das Proliferations,- und Differenzierungsverhalten humaner CD34-positiver Stammzellen. Hierbei fand sich ein dualer konzentrationsabhängiger Effekt von DEA/NO. Niedrige Konzentrationen von DEA/NO (1 μM) haben einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von humanen Stammzellen, jedoch gleichzeitig über den NO/cGMP-Signalweg einen aktivierenden Effekt auf die Differenzierung zu CD41-positiven Megakaryozyten.

Dagegen beeinflusst die höhere Konzentration von 5 μM DEA/NO zwar das Zellwachstum positiv, die Differenzierung der CD34-positiven Zellen hingegen wird gehemmt. Die Konzentration von 10 μM DEA/NO stellt für die humanen Progenitorzellen wahrscheinlich bereits eine toxische Dosis dar, so dass deren Proliferation stark gehemmt wird. Eine Zelldifferenzierung von humanen CD34-positiven Stammzellen zu CD15-positiven Granulozyten /Monozyten unter DEA/NO war nicht zu beobachten.

Mittels Zellzyklus-Analysen konnte unter Stimulation mit DEA/NO in beiden Konzentrationen (1 μM und 5 μM) ein gesteigerter Anteil an humanen Stammzellen, die sich in der S-Phase, der G₂,- und M-Phase befinden, beobachtet werden. Unter der Konzentration von 1 μM DEA/NO zeigten sich mehr Zellen in der S-Phase, die der Replikation und Verdopplung der Zellen dient. Dagegen

befanden sich unter Stimulation mit 5 μ M DEA/NO vermehrt Zellen in der prämitotischen Ruhephase und Mitose.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Signalwege, die über zyklische Nucleotide reguliert werden, eine wichtige Rolle in Proliferations- und Differenzierungsvorgängen humaner hämatopoetischer Progenitorzellen spielen. Damit stehen diese Signalwege prinzipiell als Grundlage für neue pharmakologische Therapieoptionen zu Verfügung.

Die Daten dieser Dissertationsarbeit sind Bestandteil der folgenden Veröffentlichung:

Kobsar, A., S. Heeg, K. Krohne, A. Opitz, U. Walter, M. Böck, S. Gambaryan and M. Eigenthaler. 2008. Cyclic nucleotide-regulated proliferation and differentiation vary in human hematopoietic progenitor cells derived from healthy persons, tumor-patients and chronic myelocytic leukemia patients. *Stem cells and Dev.* 17:81-91.

8. Literaturverzeichnis

Aicher, A., C. Heeschen, C. Mildner-Rihm, C. Urbich, C. Ihling, K. Technau-Ihling, A.M. Zeiher, S. Dimmler. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 9(11):1370-6.

Alison, M., R. Poulsom, R. Jeffery, A. Dhillon, A. Quaglia, J. Jacob, M. Novelli, G. Prentice, J. Williamson and N. Wright. 2000. Cell differentiation: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406(257):10.1038/35018642.

Andre, M., H. Lotado, E. Felley-Bosco. 2005. Inducible nitric oxide synthase-dependent stimulation of PKGI and Phosphorylation of VASP in human embryonic kidney cells. *Biochem Pharmacol.* 69(4) :595-602.

Antin, JH. 1993. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood.* 82:2273-7.

Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter and M. Reinhard. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem.* 274:23549-57.

Baum, C.M., I.L. Weissman, A.S. Tsakumoto, A.M. Buckle and B. Peault. 1992. Isolation of candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci.* 89:2804-8.

- Blakely, E., P. Chang, L. Lommel, K. Bjornstad, M. Dixon, C. Tobias, K. Kuma, W.F. Blakely. 1989. Cell-cycle radiation response: role of intracellular factors. *Adv Space Res.* 9(10):177-86.
- Blom, B., H. Spits. 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.* 24: 287-320.
- Bollerot, K., C. Pouget, T. Jaffredo. 2005. The embryonic origins of hematopoietic stem cells: a tale of hemangioblast and hemogenic endothelium. *APMIS.* 113(11-12): 790-803.
- Bruno, E., R.A. Briddell, R.j. Cooper, J.R. Brandt, R. Hoffman. 1992. Recombinant GM-CSF/IL-3 fusion protein its effect on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol.* 20(4) :494-9.
- Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J.Hoppe, and U. Walter. 1994. cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro in intact human platelets. *J Biol Chem.* 269:14509-14517.
- Butt, E., C. Nolte, S. Schulz, J. Beltman, J.A. Beavo, B. Jastorff, and U. Walter. 1992. Analysis of the functional role of the cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol.* 43:2591-600.
- Cardier, J.E., D.C. Foster, S. Lok, S.E. Jacobson, M.J. Murphy Jr..1996. Megakaryocytopoiesis in vitro: from the stem cells` perspective. *Stem Cells.* 1:163-72.

- Chakraborty, T., F. Ebel, E. Domann, K. Niehbuhr, B. Gerstel, S. Pistor, G. Temm, B.M. Jockusch, M.Reinhard, and U. Walter. 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* 14:1314-1321.
- Chivu, M., C.C. Diaconu, L. Brasoveanu, I. Alexiu, C. Bleotu, G. Banceanu, D. Miscalencu and C. Cernescu. 2002. Ex vivo differentiation of umbilical cord blood progenitor cells in the presence of placental conditioned medium. *J Cell Mol Med.* 6:609-20.
- Civin, C.I., L.C. Strauss, M.J. Fackler, T.M. Trischmann, J.M. Wiley and M.R. Loken. 1990. Positive stem cell selection—basic science. *Prog Clin Biol Res.* 333:387-401.
- Cook, A.L., J.M. Haynes. 2007. Phosphorylation of the PKG substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), in human cultured prostatic stromal cells. *Nitric Oxide.* 16(1):10-7.
- Cook, N., TM Dexter, BI Lord, EJ Cragoe Jr., AD Whetton. 1989. Identification of a common signal associated with cellular proliferation stimulated by four hematopoietic growth factors in a highly enriched population of granulocyte/macrophage colony-forming cells. *EMBO J.* 8(10):2967-74.
- Debili, N., F. Wendling, A. Katz, J. Giuchard, J. Breton-Gorius, P. Hunt, W. Vainchenker. 1995. The Mpl-ligand or thrombopoetin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. 1995. *Blood.* 86(7):2516-25.

- den Dekker, E., G. Gorter, J. Heemskerk, and J-W. Akkerman. 2002. Development of Platelet Inhibition by cAMP during Megakaryocytopoiesis. *J Biol Chem.* 32:29321-29319.
- den Dekker, E., J.W. Heemskerk, G. Gorter, H. van der Vuurst, J. Donath, C. Kroner, K. Mikoshiba, and J.W. Akkerman. 2002. Cyclic AMP raises intracellular Ca(2+) in human megakaryocytes independent of protein kinase A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:179-86.
- de Sauvage, F., P. Hass, S.Spencer, B. Malloy, A. Gurney, S. Spencer, W. Darbonne, W. Henzel, S. Wong, W. Kuang, K. Oles, B. Hultgren, L. Solberg, D. Goeddel, D. Eaton. 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-mpl ligand. *Nature.* 369:533.
- Eigenthaler, M., S. Engelhardt, B. Schinke, A. Kobsar, E. Schmitteckert, S. Gambaryan, C.M. Engelhardt, V. Krenn, M. Eliava, T. Jarchau, M.J. Lohse, U. Walter, L. Hein. 2003. Disruption of cardiac Ena-VASP protein localization in intercalated disks causes dilated cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H2471-H2481.
- Eigenthaler, M., C. Nolte, M. Halbrügge, and U. Walter. 1992. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of the cGMP-regulated and the cAMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem.* 205:471-481.
- Eigenthaler, M. and U. Walter. 1994. Signal transduction and cyclic nucleotides in human platelets. *Thromb. Haemorrh. Disorders.* 8:41-46.

- Eschbach, JW., Egrie JC., Downing MR., Browne JK., Adamson JW. Jan. 1987. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med.* 316(2):73-78.
- Ferrara, JL., K. Cooke, L. Pan and W. Krenger. 1996. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells.* 14:473-89.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu and F. Mavilio. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 279:1528-30.
- Friedman, D.L.. 1976. Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. *Physiol Rev.* 56:652-708.
- Gambaryan, S., W. Hauser , A. Kobsar, M. Glazova, U. Walter. 2001. Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem Cell Biol.* 116(6):535-43.
- Geiger, J., C. Nolte, E. Butt, S.O. Sage and U. Walter. 1992. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1031-5.
- Geiger, J., C. Nolte and U. Walter. 1994. Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *AM J Physiol.* 267:C236-44.
- Germing, U.. 2006. Myelodysplastic syndroms – new treatment options. *Med Klin (Munich).* 1:123-6.

- Gratwohl, A. 2002. New developments in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Umsch.* 59:571-6.
- Haffner, C., T. Jarchau, M. Reinhard, J. Hoppe, S.M. Lohmann, and U. Walter. 1995. Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *EMBO J.* 14:19-27.
- Hagemeister, FB. 2002. Treatment of relapsed aggressive lymphomas: regimes with and without high-dose therapy and stem cell rescue. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49(1):S13-20.
- Halbrügge, M., C. Friedrich, M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher, and U. Walter. 1990. Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem.* 265(6):3088-3093.
- Halbrügge, M., M. Eigenthaler, Ch. Polke and U. Walter. 1991. Protein phosphorylation regulated by cyclic nucleotid-dependent protein kinases in cell extracts and in intact human lymphocytes. *Cellular Signalling.* 4(2):189-199.
- Halbrügge, M. and U. Walter. 1989. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem.* 185:41-50.
- Harbeck, B., S. Hüttelmaier, K. Schluter, B.M. Jockusch, S. Illenberger. 2000. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J. Biol. Chem.* 275(40): 30817-30825.

- Hassan, HT., A. Zander. 1996. Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol.* 95(3-4):257-62.
- Hauser, W., K.-P. Knobloch, M. Eigenthaler, S. Gambaryan, V. Krenn, J. Geiger, M. Glazova, E. Rohde, I. Horak, U. Walter, and M. Zimmer. 1999. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8120-8125.
- Hendrie, PC., HE. Broxmeyer. 1994. Myeloid cell proliferation stimulated by Steel factor is pertussis toxin sensitive and enhanced by cholera toxin. *Int J Immunopharmacol.* 16:547-560.
- Hill, B., E. Rozler, M. Travis, S. Chen, A. Zannettino, P. Simmons, A. Galy, B. Chen and R. Hoffman. 1996. High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells. *Exp Hematol.* 24:936-43.
- Horstrup, K., Jablonka B., P. Honig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek, and U. Walter. 1994. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem.* 225:21-7.
- Ignarro, LJ. 1989. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 3(1):31-6.
- Karussis, D., S. Grigoriadis, E. Polyzoidou, N. Grigoriadis, S. Slavin, O. Abramsky. 2006. Neuroprotection in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 108(3):250-4.

Kaushansky, K., S. Lok, R. Holly, V. Broudy, N. Lin, M. Bailey, J. Forstrom, M. Buddle, P. Oort, F. Hagen, G. Roth, T. Papayannopoulou, D. Foster. 1994. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by c-mpl ligand thrombopoetin. *Nature*. 369:568.

Keilbach, A., P. Ruth, et al. 1992. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* 208(2): 467-73.

Kobari, L., M.C. Giarratana, F. Pflumio, B. Izac, L. Coulombel and L. Douay. 2001. CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cells Res*. 10:273-81.

Kobsar, A., S. Heeg, K. Krohne, A. Opitz, U. Walter, M. Böck, S. Gambaryan and M. Eigenthaler. 2008. Cyclic nucleotide-regulated proliferation and differentiation vary in human hematopoietic progenitor cells derived from healthy persons, tumor-patients and chronic myelocytic leukemia patients. *Stem cells and Dev*. 17:81-91.

Kopen, G.C., D.J. Prockop and D.G. Phinney. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci*. 96:10711-6.

Kubik, S., Visceral lymphatic system. In: Viamonte, Jr., a. Ruettmann: Atlas of Lymphography. 1980, Thieme, Stuttgart-New York.

Laane E., AR. Derolf, E. Bjorklund, J. Mazur, H. Everaus, S. Soderhall, M. Bjorkholm, A. Porwit-Macdonald. 2006. The effect of allogenic stem cell transplantation on outcome in younger acute myeloid leukemia patients with

minimal residual disease detected by flow cytometry at the end of post-remission chemotherapy. *Haematologica*. 91(6):833-6.

Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. Weissman and M. Grompe. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 6:1229-34.

Lagasse, E., J. Shizuru, N. Uchida, A. Tsukamoto and I. Weissman. 2001. Toward regenerative medicine. *Immunity*. 14:425-436.

Laluppa, J., E. Papoutsakis and W. Miller. 1997. Evaluation of Cytokines for Expansion of the Megakaryocyte and the Granulocyte Lineages. *Stem Cells*. 15:198-206.

Lee, AW.. 1999. Synergistic activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic cAMP and myeloid growth factors opposes cyclic AMP's growth inhibitory effects. *Blood*. 93:537-553.

Li, TS., M. Hayashi, H. Ito, A. Furutani, T. Murata, M. Matsuzaki, K. Hamano. 2005. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation*. 111(19):2438-45.

Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, et al. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 22(8): 307-12.

Matsumara I., Y. Kanakura. 2002. Molecular control of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Int J Hematol*. 75(5):478-83.

- Moncada, S., R.M. Palmer and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-42.
- Negrotto, S., N. Pacienza, LP. D`Atri, RG. Pozner, E. Malaver, O. Torres, MA. Lazzari, RM. Gomez, M. Schattner. 2006. Activation of cyclic AMP pathway prevents CD 34(+) cell apoptosis. *Exp Hematol.* 34:1420-1428.
- Pereira, R.F., K.W. Halford, M.D. O`Hara, D.B. Leeper, B.P. Sokolov, M.D. Pollard, O. Bagasra and D.J. Prockop. 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cell for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4857-61.
- Pfeifer, A., P. Ruth, et al. 1999. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 105-49.
- Pozner, RG., S. Negrotto, LP. D`Atri, ML. Kotler, MA. Lazzari, RM. Gomez, M. Schattner. 2005. Prostacyclin prevents nitric oxide-induced megakaryocyte apoptosis. *Br J Pharmacol.* 145:283-292.
- Profirovic, J., M. Gorovoy, J. Niu, S. Pavlovic, T. Voyno-Yasenetskaya. 2005. A novel mechanism of G protein-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein. *J. Biol Chem.* 280(38):32866-76.
- Ransjo, M., A. Lie, EJ. Mackie. 1999. Cholera toxin and forskolin stimulate formation of osteoklast-like cells in mouse cultures and cultured mouse calvarial bones. *Eur J Oral Sci.* 107:45-54.
- Ravandi, F.. 2006. Role of cytokines of acute leukemias: a review. *Leukemia.* 20(4):563-71.

Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B.M. Jockusch, and U. Walter. 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14:1583-1589.

Reinhard, M., M. Halbrügge, U. Scheer, C. Wiegand, B.M. Jockusch, and U. Walter. 1992. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* 11:2063-2070.

Reinhard, M., K. Jouvenal, D. Tripier, and U. Walter. 1995. Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7956-7960.

Reinhard, M., M. Rudiger, B.M. Jockusch, and U. Walter. 1996. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* 399:103-107.

Sandberg, M., E. Butt, C. Nolte, L. Fischer, M. Halbrugge, J. Beltman, T. Jahnsen, H.G. Genieser, B. Jastorff, and U. Walter. 1991. Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole-3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-cBIMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem J.* 279 (Pt2):521-527.

Schachinger V., S. Dimmler, AM. Zeiher. 2006. Stem cells after myocardial infarction. *Herz.* 31(2):127-36.

- Schattner, M., R.G. Pozner, I. Engelberger, A. Gorostizaga, N. Maugeri, R. Gomez, A. Pasqualini, O. Torres, and M.A. Lazzari. 2001. Effect of nitric oxide on megakaryocyte growth induced by thrombopoietin. *J Lab Clin Med.* 137:261-269.
- Schick, B., M. Praetorius, M. Eigenthaler, A. Mack, P. Plinkert, U. Walter, S. Dazert, M. Knipper. 2003. Expression of VASP and zyxin in cochlear pillar cells: indication for actin-based dynamics? *Cell Tissue Res.* 311(3):315-23.
- Schmidt, H.H., S. Lohmann, U. Walter. 1993. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta.* 1178:153-175.
- Schwarz, U.R., U. Walter, and M. Eigenthaler. 2001. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 62:1153-1161.
- Shami, P.J., J.B. Weinberg. 1996. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid growth from CD34+ human bone marrow cells. *Blood.* 87:977-82.
- Shimazaki, C., T. Inaba, H. Uchiyama, T. Sumikuma, T. Kikuta, H. Hirai, Y. Sudo, N. Yamagata, E. Ashihara, H. Goto, S. Murakami, H. Haruyama, N. Fujita, M. Nakagawa. 1997. Serum thrombopoietin levels in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 19(8):771-5.
- Smolenski, A., C. Bachmann, K. Reinhard, L. Honig, T. Jarchau, H. Hoschuetzky, and U. Walter. 1998. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 273:20029-20035.

- Snyder, B.J., CW. Olanow. 2005. Stem cell treatment for Parkinson`s disease: an update for 2005. *Curr Opin Neurol.* 18(4):376-85.
- Spaulding, S.W.. 1993 The ways in which hormones change cyclic adenosine 3`,5`-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior. *Endocr Rev.* 14:632-50.
- Siu, X., K. Tsuji, Y. Ebihara, R. Tanaka, K. Muraoka, M. Yoshida, K. Yamada, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, T. Nakahata. 1999. Soluble interleukin-6 (Il-6) receptor with Il-6 stimulates megakaryopoiesis from human CD 34 (+) cells through glycoprotein (gp) 130 signaling. *Blood.* 93(8):2525-32.
- Tavian, M., B. Peault. 2005 Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol.* 49(2-3):243-50.
- Theise, N.D., S. Badve, R. Saxena, O. Henegariu, S. Sell, J.M. Crawford and D.S. Krause. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 31:235-40.
- Theise, N.D., M. Nimmakayalu, R. Gardner, P.B. Illei, G. Morgan, L. Teperman, O. Henegariu and D.S. Krause. 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 32:11-6.
- Vane, J.R., E.E. Anggaard and R.M. Botting. 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 323:27-36.
- Viallard, J.F., F. Lacombe, F. Belloc, J.L. Pellegrin, J. Reiffers. 2001. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother.* 5(2):109-29.

- Vittet, D., C. Duperray, C. Chevillard. 1995. Cyclic-AMP inhibits cell growth and negatively interacts with platelet membrane glycoprotein expression on the Dami human megakaryoblastic cell line. *J Cell Physiol.* 163:645-655.
- Waldmann, R., S. Bauer, C. Gobel, F. Hofmann, KH. Jakobs, U. Walter, 1986. Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem.* 158(1):203-10-
- Waldmann, R., M. M. Nierberding, and U. Walter. 1987. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP-and cGMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem.* 167:441-448.
- Wall, M. E., S. H. Francis, et al. 2003. Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*100(5): 2380-5.
- Walter, U., M. Eigenthaler, J. Geiger, and M. Reinhard. 1993. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol.* 344:237-249.
- Wendling, F., E. Maraskovsky, N. Debili, C. Florindo, M. Teepe, M. Titeux, N. Methia, J. Breton-Gorius, D. Cosman, W. Vainchenker. 1994. cMPL ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature.* 369:571.
- Woulfe, D., J. Yang and L. Brass. 2001. ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest.* 107:1503-1505.

Yoshimura, C., S. Nomura, K. Katsura, K. Yamaguchi, S. Fukuhara. 2000. Thrombopoietin levels in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 78(2):106-12.

Zimmer, M., T. Finke, L. Fischer, W. Hauser, K. Scherer, P. Lichter and U. Walter. 1996. Cloning of the VASP genes in human and mouse: structure, sequence, and chromosomal localization. *Genomics.* 36(2):227-33.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Brich, Sonja Monika, geb.: Heeg
Geburtsdatum, -ort: 15.02.1978, Aschaffenburg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

09/1984 – 08/1988 Grundschohle, Goldbach
09/1988 – 06/1997 Maria-Ward-Gymnasium, Aschaffenburg

Hochschulbildung:

09/1998 – 06/2000 Studium der Humanmedizin an der
Sommelweis - Universität Budapest
27.06.2000 **Ärztliche Vorprüfung**
10/2000 – 03/2004 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
28.08.2001 **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
29.03.2004 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung**
04/2004 – 03/2005 Studium der Humanmedizin an der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
28.04.2005 **Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

Ärztliche Tätigkeit:

seit 08/2005 Assistenzärztin der Inneren Medizin,
Ameos Krankenhaus Dr. Lay, Vogtsburg –
Bischoffingen,
Chefarzt: Dr. med. Erwin Grom
Seit 09/2009 Assistenzärztin der Allgemein-und
Viszeralchirurgie,
Universitätsklinikum Freiburg
Chefarzt: Prof. Dr. med. Ulrich Hopt

Freiburg, den 19.Januar 2009

Danksagung

An erster Stelle möchte ich ganz besonders herzlich Herrn Professor Dr. med. Martin Eigenthaler danken, dass ich diese Arbeit unter seiner Anleitung durchführen konnte. Seine zahlreichen Anregungen und Ratschläge, seine stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft sowie seine fachlich wie auch menschlich hervorragende Betreuung verpflichten mich zu besonderem Dank.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Ulrich Walter durchgeführt, dem ich sehr herzlich für seine hilfreiche und freundliche Unterstützung danken möchte.

Frau Dr. Anna Kobsar danke ich für die kompetente Einführung in die Arbeitstechniken sowie die herausragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Durch ihre unerschöpfliche Geduld und Hilfe während meiner ganzen Tätigkeit entstand eine ausgezeichnete, freundschaftliche und wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Birgitta Schinke danke ich ebenfalls für ihre Ratschläge und Hilfe während meiner Arbeit. Ihre freundliche und stets hilfsbereite Art trugen zu der herzlichen Arbeitsatmosphäre während meiner Laborzeit enorm bei.

Bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Biochemie und Pathobiochemie möchte ich mich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. med. Markus Böck aus der Abteilung für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Übernahme des Koreferates.

Für die stete Unterstützung, Motivation und Geduld danke ich meinem lieben Ehemann Jochen und unserem Sohn Leopold.

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern Bernhard und Betty Heeg gewidmet.

Meine Liebe und Dankbarkeit für Ihre liebevolle Begleitung meines Lebensweges lassen sich nicht in Worte fassen.