

Aus der Medizinischen Klinik I
Direktor: Prof. Dr. Horst Lorenz Fehm
der Universität zu Lübeck

**Untersuchungen zum Einfluss von Zytokinen auf
hämatopoetische Stammzellen in der Expansionskultur:**

- Kompetitive Knochenmarktransplantationen in myeloablatierte C57BL/6 Mäuse
- Expression von Integrin $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4 in zytokinstimulierten FDCP1 Zellen

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Arne Diehl
aus Groß-Umstadt

Lübeck 2005

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med Stefan Oliver Peters
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Seyfarth

Tag der mündlichen Prüfung:	29.08.2006
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	29.08.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die hämatopoetische Stammzelle	1
1.2 Physiologie	4
1.3 Adhäsionsmoleküle	5
1.4 Wachstumsfaktoren	7
1.5 Purifizierte KM-Zellen und Zelllinien als Stammzellmodell	9
1.6 Das klinische Interesse	10
1.7 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	
2.1.1 Reagenzien und Labormaterialien	13
2.1.2 Enzyme, Antikörper und Zytokine	13
2.1.3 FDCP1 Zelllinie	13
2.1.4 Mäusestämme	14
2.2 Zellbiologische Methoden	
2.2.1 Medien für die Zellkultur	14
2.2.2 Kultivierungsbedingungen	14
2.2.3 Passagieren bzw. Gewinnung der Zellen	15
2.2.4 Methylzellulose-Assay - Ansetzen und Auswerten	15
2.2.5 Kryokonservierung der Zelllinien	16
2.2.6 Ablauf des Stimulationsexperiments der FDCP1 Zellen	16
2.2.7 Zellisolierung von Sca ⁺ lin ⁻ Zellen aus Knochenmark	17
2.3 Tierexperimentelle Methoden	
2.3.1 Entnahme von Knochenmark	18
2.3.2 Myeloablation durch Bestrahlung	18
2.3.3 Intravenöse Transplantation	18
2.3.4 Retroorbitale Blutentnahme	19
2.3.5 Kompetitive Knochenmarktransplantation	19
2.3.6 Ablauf des Transplantationsexperimentes	20
2.4 Durchflusszytometrie	
2.4.1 Analyse von Mäuseblut auf den Ptpcr a/b Chimerismus	22
2.4.2 Messung der Adhäsionsmoleküle $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4	23
2.4.3 Zellzyklusanalyse	23
2.5 Molekularbiologische Methoden	
2.5.1 RNA Isolierung aus kultivierten Zellen	24
2.5.2 Reverse Transkriptase-Reaktion	25
2.5.3 RNA und DNA Konzentrationbestimmung	25
2.5.4 Polymerase Kettenreaktion	
2.5.4.1 Primer	26
2.5.4.2 Standard PCR	27
2.5.4.3 Quantitative real-time PCR	27

2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.5.6	Gelextraktion von DNA	28
2.6	Zytologische Methoden	
2.6.1	Beurteilung und Erzeugung von Zytopsin-Präparaten	29
2.6.2	Pappenheim-Färbung	29
2.7	Statistische Berechnungen	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Kompetitive Transplantation in myeloabladierten C57BL/6 Mäusen	
3.1.1	Kultivierung des Knochenmark in Zytokinkulturen	30
3.1.1.1	Wachstum	30
3.1.1.2	Zytologie	31
3.1.1.3	Stammzellexpansion mit Zytokinen im Methylzellulose-Assay	34
3.1.2	Konkurrierende Repopulation zwischen frischen und zytokinkultivierten Knochenmarkzellen der Ptprc a/b kongenen C57BL/6 und B6.SJL Mäusestämme in letal vorbehandelte Empfängertiere	35
3.1.2.1	Kurzzeit- und Langzeit-Repopulation	35
3.1.2.2	Bultbilder nach Transplantation	40
3.2	Zellpopulationen zu molekularer Charakterisierung von Stammzellfunktionen	41
3.3	Expression der AM in der hämatopoetischen Zelllinie FDCP1	
3.3.1	Wachstumsverhalten	43
3.3.2	Zellzyklus	44
3.3.3	Durchflusszytometrie der Adhäsionsmoleküle	45
3.3.4	Quantitative PCR der Adhäsionsmoleküle	48
3.3.4.1	Regulation von $\alpha 4$	48
3.3.4.2	Regulation von $\alpha 5$	50
3.3.4.3	Regulation von CXCR4	50
4	Diskussion	52
4.1	Der Repopulationsdefekt	52
4.2	Ursachen des Repopulationsdefekts	53
4.2.1	Einfluss veränderter Adhäsionsmoleküle auf Homing und Repopulation	53
4.2.2	Einfluss unterschiedlicher Zytokinkombination auf die Repopulation	56
4.2.3	Expansion und <i>in vitro</i> Repopulationspotenzial	59
4.3	Erhaltene Stammzellfunktion unter SCF, Flt3L Kultivierung	61
4.4	Sind Zelllinien und purifizierte Zellen geeignete Stammzellmodelle?	62
4.5	Weiterführende Experimente	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
Anhang		
Danksagung		
Lebenslauf		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Hämatopoese im Überblick	4
Abb. 2	Schema der kompetitiven Knochenmarktransplantation	20
Abb. 3	Durchflusszytometrische Analyse peripherer Leukozyten	22
Abb. 4	Heterogene Leukozytenpopulation	23
Abb. 5	Zellzyklusanalyse der FDCP1 Zelllinie	24
Abb. 6	Agarosegeldokumentation der PCR-Produkte	26
Abb. 7	Gesamtzahl transplanteder B6.SJL KM-Zellen	30
Abb. 8	Natives KM der B6.SJL Mäuse vor Kultivierung	32
Abb. 9	IL-3, -6, -11, SCF kultiviertes KM nach 48h	32
Abb. 10	SCF, Flt3L kultiviertes KM nach 48h	32
Abb. 11	IL-3, -6, -11, SCF Kultur nach 72h	33
Abb. 12	SCF, Flt3L Kultur nach 72h	33
Abb. 13	Kurzzeit-Repopulationsfähigkeit	37
Abb. 14	Langzeit-Repopulationsfähigkeit	38
Abb. 15	Repopulation bei kompetitiver KM-Transplantation	39
Abb. 16	Erythrozyten	40
Abb. 17	Leukozyten	40
Abb. 18	Thrombozyten	40
Abb. 19	KM aus C57BL/6 Mäusen	41
Abb. 20	KM aus Balb/c Mäusen	41
Abb. 21	FDCP1 Wachstumskurven	43
Abb. 22	Durchflusszytometrische Messung der $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4 Expression auf FDCP1 Zellen (A-F)	46
Abb. 23	Durchflusszytometrische Messung der $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4 Expression auf FDCP1 Zellen (G-L)	47
Abb. 24	RNA Expression von $\alpha 4$ in FDCP1 Zellen	49
Abb. 25	RNA Expression von $\alpha 5$ in FDCP1 Zellen	50
Abb. 26	RNA Expression von CXCR4 in FDCP1 Zellen	51
Abb. 27	Zellzyklusanalyse (UVID) von FDCP1 Zellen in Relation von Zellgröße und $\alpha 4$ Expression	58
Abb. 28	Zellzyklus der FDCP1 Zellen nach BrdU-Inkorporierung	Anhang
Abb. 29	Zellzyklus der FDCP1 Zellen unter IL-3 Entzug nach BrdU-Inkorporierung	Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Medien für die Zellkultur	14
Tabelle 2	Zytokinbeimengungen im Stimulationsexperiment der FDCP1 Zellen	16
Tabelle 3	Erster Versuchstag des Transplantationsexperiments	20
Tabelle 4	Tag 3 des Transplantationsexperiments	21
Tabelle 5	Tag 4 des Transplantationsexperiments	21
Tabelle 6	Primer	26
Tabelle 7	Koloniebildung im Methylzelulose-Assay von KM nach Zytokinkultur	34
Tabelle 8	Versuchsgruppen im Transplantationsexperiment	36
Tabelle 9	FDCP1 Versuchsgruppen im Stimulationsversuch	44

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AM	Adhäsionsmoleküle
B6	C57BL/6 Mausstamm (auch mit „Black 6“ bezeichnet)
bp	Basenpaare
CCR5	Chemokin Rezeptor 5
CXCR4	Chemokin Rezeptor 4
d	Tage
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
Flt3L	Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
h	Stunde
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
KZ	Kurzzeit
lin	lineage
lin ⁻	lineage Depletion
LZ	Langzeit
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type C
Ptprc ^a	Allel a des Ptprc Gens
Ptprc ^b	Allel b des Ptprc Gens
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Sca ⁺	Positiv-Population für das Stem cell antigen auch mit Sca-1 bezeichnet
SCF	Stem cell factor
SDF1 α	Stromal cell derived factor 1 alpha
SDS	Natriumdodecylsulphat
SZ	Stammzellen
TPO	Thrombopoetin
u. a.	unter anderem
u/o	und / oder
w	Woche

1 Einleitung

Das blutbildende System ist ein Organ, das an die Blutstammzelle ganz besondere Anforderungen stellt. Vom Knochenmark [KM] gehen ein Leben lang allein für den Ersatz von verbrauchten Erythrozyten die extrem hohe Zahl von 2,5 Millionen neuer Erythrozyten pro Sekunde aus, zusätzlich werden 0,12 Millionen Granulozyten und 2,8 Millionen Thrombozyten pro Sekunde gebildet. Die entsprechende Regulation und die notwendige nährstoffreiche Wachstums Umgebung machen eine enge Anbindung an den Blutkreislauf unerlässlich. Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung ist die Mobilität der Stammzelle [SZ] innerhalb des blutbildenden Systems eine Besonderheit.¹ Die Zellen können durch molekularbiologisch komplex vermittelte Mechanismen aus den Knochenmarknischen freigesetzt werden. Den gegenteiligen Prozess, also das Zurückfinden der SZ ins KM, bezeichnet man als Homing der SZ. Definierte Oberflächenmoleküle auf SZ, Endothel- und Retikulumzellen spielen dabei eine besondere Rolle,² auf die im Folgenden besonders eingegangen werden soll. Das Kernstück dieser Dissertationsarbeit beschäftigt sich mit der Beeinflussbarkeit von hämatopoetischen SZ durch Zytokine in der Expansionskultur. Ein weiterer Abschnitt widmet sich den Wachstumsfaktoren, die im Bereich der SZ-Kultivierung *in vitro* eingesetzt werden und die damit möglicherweise eine größere Rolle im Rahmen klinischer Anwendungen finden werden.

1.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Die hämatopoetische SZ wurde erstmals durch Till und McCulloch 1961 beschrieben.³ Diese Autoren zeigten, dass sich die Blutbildung letal bestrahlter Mäuse nach einer Injektion von KM erholte und die Tiere so vor dem Tod durch hämatopoetische Insuffizienz gerettet wurden. Seitdem wurden vor allem Tiermodelle benutzt um die verantwortlichen SZ funktionell und morphologisch zu beschreiben. Sowohl in humanen und als auch in reinen Tiermodellen gelang es SZ-Populationen funktionell zu beschreiben, die einerseits in der Lage sind in alle Elemente des hämatopoetischen Systems auszureifen und andererseits die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern.⁴ Die Phänotypisierung dieser SZ hingegen gestaltet sich schwierig, und es ist bislang nicht gelungen anhand von Oberflächenmarkern die frühesten Zellpopulationen eindeutig zu beschreiben. Selbst die in der klinischen KM-Transplantation erprobte CD34-positive SZ ist bei gleichzeitiger Negativität für die hämatopoetischen linienspezifischen Marker CD10, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20 (lin⁻) biologisch

eine relativ fortgeschrittene SZ-Population. Ein mindestens gleichwertiges Selbsterneuerungs- und Differenzierungs-Potenzial konnte für CD34-negative Populationen gezeigt werden,⁵⁻⁷ aus der die CD34-positiven Zellen vermutlich hervorgehen.^{8,9} Eine phänotypische Definition von Vorläuferzellen beschreibt die eigentliche SZ bisher also nur unvollständig.

Im Mausmodell stellt sich die Situation ähnlich dar. Die bislang beschriebenen Marker unterscheiden sich von denen beim Menschen. Ein für die murine hämatopoetische SZ häufig verwendetes Synonym ist die von I. Weissman beschriebene Sca⁺ Thy-1^{low} lin⁻ Zelle,¹⁰ die der Autor Anfang der 90er Jahre als Mausstammzelle patentieren ließ.¹¹ Diese SZ ist als Zelle mit positiven stem cell antigen [Sca⁺], geringer Expression des Thy-1-Markers [Thy-1^{low}] und einer erfolgten Lineagedepletion [lin⁻], d.h. der Abwesenheit der Marker: CD3e, CD11b, B220, Ly6G /Ly6C, TER-119, definiert.

Eine sehr seltene, aber allen SZ-Definitionen am nächsten kommende, Zellpopulation ist durch die supravitalen Färbungen mit Höchst 33342 und Rhodamin 123 beschrieben (beide Färbungen sind dabei schwach signalgebend, so dass die Zellen mit Ho^{low}/Rho^{low} bezeichnet werden).¹² Da die entsprechenden Färbecharakteristika nur bei Zellen in tiefer Ruhephase (G₀) des Zellzyklus angetroffen werden können, entziehen sich der so definierten SZ-Form zwangsläufig die sich gerade selbst erneuernden und die mobilen SZ. Insgesamt stellt sich also die Frage, ob SZ überhaupt über einen einheitlichen, charakteristischen Phänotyp verfügen.

Aufgrund dessen ist eine Orientierung an funktionellen Eigenschaften durch Transplantationsexperimente nach wie vor von essenzieller Bedeutung in der Beurteilung von SZ-Populationen. Die Untersuchbarkeit am Menschen ist unter diesen Gesichtspunkten allerdings erheblich eingeschränkt. Neben den reinen Mausmodellen werden auch gemischte Modelle eingesetzt, bei denen humane SZ-Populationen xenogen transplantiert werden. Verwendung fand das Schafmodell von Zanjani et al.,¹³ in dem humane CD34-positive Zellen in utero in das Peritoneum fetaler Lämmer injiziert wurden. In den letzten Jahren ein häufiger zur Anwendung gekommenes Modell ist die Transplantation von humanen SZ in immundefizient NON/SCID Mäuse, um die SZ-Funktion näher beobachten zu können.¹⁴ Diese Arbeit beschränkt sich bewusst auf das Mausmodell mit den größeren experimentellen Möglichkeiten. Die Beobachtungen innerhalb einer Spezies erlauben es auch transplantationsfunktionelle Feinheiten wahrzunehmen.

Die Idee einer gemeinsamen „Ursprungszelle“ für hämatopoetische Zellen geht noch weiter zurück als ihre Entdeckung in den 60er Jahren. Die wesentliche Weiterentwicklung dieser Idee fand jedoch erst in jüngerer Zeit statt. Für viele Gewebe

wie Haut, Leber, Knochenmark, Mamma u.a.m. wurde neben dem hämatopoetischen Gewebe die Existenz einer adulten SZ-Population postuliert.¹⁵⁻¹⁸

Grundsätzliche Einigkeit herrscht in der Entwicklungsbiologie dabei darüber, dass die Zellen in der Embryogenese nach Einteilung in die Keimblätter durch weitere Differenzierungen eine strikte Zuordnung zu einer bestimmten Zellpopulation erfahren. So ging man bis vor kurzen davon aus, dass beispielsweise die hämatopoetischen SZ die gesamte Hämatopoese kontrollieren, aber eben auch nur diese.

Unerwartet waren demzufolge erste Ergebnisse Ende der 90er Jahre, die zeigten, dass nach einer KM-Transplantation Spenderzellen im Empfängertier bei der Repopulation nicht hämatopoetischen Gewebes mitwirkten.¹⁹ Die Abkömmlinge der transplantierten Zellen konnten durch spezifische Gene des Spenders in nicht-hämatopoetischen Geweben wieder aufgefunden werden. Verschiedene Reportergene wie lacZ, GFP (green fluorescent protein) oder das Y-Chromosom wurden zum Nachweis verwendet.¹⁹⁻²²

Schnell wurde der Begriff SZ-Plastizität²³ in diesem Zusammenhang geprägt. Gemeint ist damit die Fähigkeit von Zellen zu transdifferenzieren und andere organfremde Aufgaben zu übernehmen, also z.B. für eine hämatologische Vorläuferzelle im geschädigten Myokard an der Regeneration myokardialen Gewebes mitzuwirken.²⁴

In neuerer Zeit wurden diese Ergebnisse teilweise relativiert und auch die grundsätzliche Möglichkeit der Plastizität neu in Frage gestellt. Zellkontamination und vor allem Zellfusionen^{25,26} zwischen Spender- und Empfängerzellen werden als Gründe für die beschriebenen Phänomene angeführt. Jedoch gibt es auch weiterhin Berichte z.B. über die Regeneration von Skelettmuskel aus KM-Zellen.²⁷⁻²⁹ Auch die Bedeutung von mesenchymalen SZ aus dem KM für diesen Effekt wird neu diskutiert.³⁰ Bei allen diesen Untersuchungen spielt die hämatopoetische SZ eine zentrale Rolle, sie ist relativ einfach zugänglich und reamplifizierbar, und sie ist als Zellsuspension nicht an einen Gewebeverband gebunden. Auch fasziniert die Vorstellung, dass sie durch die Zirkulation prinzipiell über einen Zugang zu allen anderen Organen des Körpers verfügt. Immerhin ist denkbar, dass SZ aus dem KM, unter ihnen die hämatopoetische Zelle, eine Art Kontrollfunktion innehaben und bei Bedarf den Stammzellpool anderer Gewebe auffüllen könnten.

Die praktische Bedeutung der hämatopoetischen SZ liegt seit geraumer Zeit in ihrer Anwendung in der klinischen Transplantation. Hier spielt die Reinfusion von autologen und allogenen SZ zur Behandlung von malignen Erkrankungen eine tragende Rolle. In Zukunft könnten auch eine ganze Reihe anderer hämatoonkologischer Erkrankungen

mit genetisch manipulierten SZ behandelt werden. Gute Ansätze gibt es beispielsweise für die Fanconi-Anämie, bei der bisherige Therapien noch auf einer allogenen Stammzelltransplantation beruhen.³¹

1.2 Physiologie

Trotz der großen Zahl neu publizierter Erkenntnisse in den letzten Jahren bleibt die Physiologie der SZ noch weitgehend unverstanden. Erwähnt wurde die bisher unvollständige Möglichkeit der Phänotypisierung von SZ, aber auch Fragen nach der Regulation des SZ-Pools oder die Mechanismen der asymmetrischen Zellteilung sind noch wenig aufgeklärt. Weitergehende Fragen beziehen sich auf die molekularbiologischen Vorgänge, die die Differenzierung beschreiben oder gar Dedifferenzierung von Vorläuferzellen erklären könnten. All dies sind letztendlich noch unvollständig beantwortete Fragen.

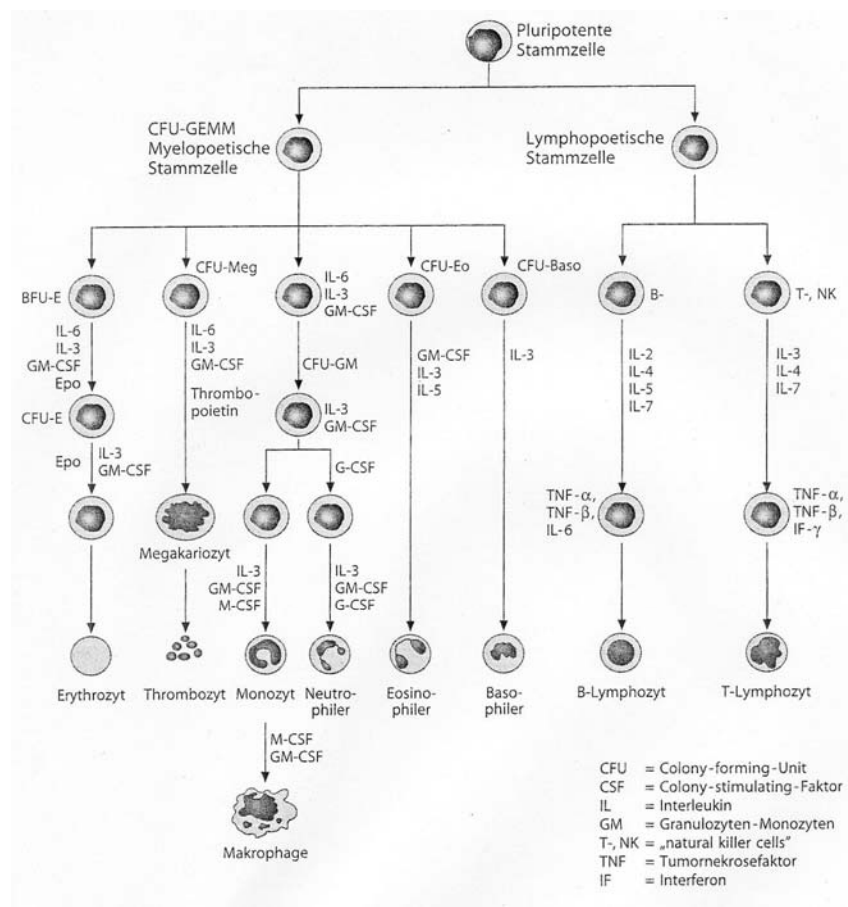


Abb. 1 Hämatopoese im Überblick. Abbildung aus dem „Atlas der klinischen Hämatologie“, 5. Auflage, mit freundlicher Erlaubnis des Springer Verlags und der Autoren H. Löffler und J. Rastetter.

Gezeigt sind die wesentlichen Wachstumsfaktoren auf dem Weg der Differenzierung von der hämatopoetischen SZ zu ausdifferenzierten Blutzellen. Die beeinflussenden Faktoren der frühen SZ sind schlecht definiert. Nach der Determinierung zu spezifischen Zellreihen gibt es viele überlappende Funktion der Wachstumsfaktoren. Exklusivität der Faktoren für eine bestimmte Differenzierung besteht praktisch nicht.

Was die hämatopoetische SZ angeht, wird ihr überwiegender Aufenthaltsort im KM vermutet. Während der intrauterinen Entwicklung oder bestimmter pathologischer Zustände kommt es auch zu einer extramedullären Blutbildung in Leber und Milz. Die Hämatopoese soll hier in Grundzügen dargestellt werden; Abbildung 1 gibt einen Überblick. In der Grafik ist die Zuordnung zu einzelnen Zellreihen klar gegliedert. Auch lassen sich verschiedene Vorläuferzellen voneinander abgrenzen. Dies wird aber um so schwieriger, je näher man dem Ursprung, also der eigentlichen SZ kommt. Serielle KM-Transplantationen haben gezeigt, dass es zu einer Selbsterneuerung des SZ-Pools kommt.³² Es wurde somit gefolgert, dass diese wenigen SZ aus dem KM mehrmals den tatsächlichen Ausgangspunkt der abgebildeten Differenzierungskette bilden können. Allerdings unterliegt auch der SZ-Pool, gerade bei extremer Beanspruchung, Veränderungen, die mit einer „Alterung“ der SZ in Verbindung stehen. Die Beschreibung dieses Alterungsprozesses ist Gegenstand laufender Forschung.^{33,34}

Den Vorgang des Zurückfindens der SZ in ihr KM-Kompartiment bezeichnet man als Homing. Nach einer Transplantation stellt das Homing einen entscheidenden Schritt in der Rekonstitution des KM dar. Den gesamten Prozess, das heißt alle Schritte, die notwendig sind damit die SZ ihre biologische Funktion wieder einnimmt, bezeichnet man als „Engraftment“. Im Folgenden soll hierfür der deutsche Begriff Repopulation verwendet werden. Die Beschreibung einer defekten Repopulation sagt uns also, dass einer oder mehrere Schritte nach der Transplantation auf dem Weg zur Bildung der Blutzellen nicht erfolgreich waren.

Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass das Homing durch Zytokine und Rezeptorblockaden beeinflussbar ist.^{35,36} Das Hauptaugenmerk bei der Beschreibung der Mikroumgebung der SZ gilt den Adhäsionsmolekülen sowie Zytokinen bzw. Chemokinen, die die Voraussetzungen für erfolgreiches Homing und Repopulation schaffen. Aus dem gegenteiligen Prozess, der Stammzellmobilisierung, ergaben sich weitere wertvolle Hinweise zum Verständnis dieses Prozesses (siehe folgenden Abschnitt).

1.3 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle [AM] finden sich auf allen zirkulierenden Zellpopulationen (SZ, Lymphozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten etc.) und erlauben die temporäre Anheftung an ein Partnermolekül, welches sich z.B. auf einer Endothelzelle befindet. Die dadurch entstehende Flussverlangsamung („Rolling“) stellt den

Ausgangspunkt für eine eventuell folgende Transmigration dar. Biochemisch findet man vier Hauptklassen unter den AM: die Immunglobulinsuperfamilie, Cadherine, Selektine und die Integrine.³⁷ Vor allem die Integrine vermitteln die Kontakte zur extrazellulären Matrix, aber auch Zell-Zellkontakte. Sie bestehen aus einer α - und β -Kette, wobei die kleinere β -Kette den Subtyp der Integrine bestimmt. Auf der Suche nach am Homing der hämatopoetischen SZ beteiligten Adhäsionsmolekülen, stellten sich das Integrin $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$ (beides sind also $\beta 1$ -Integrine)ⁱ sowie der Chemokinrezeptor CXCR4 als wichtige Faktoren heraus. Verschiedene andere Rezeptoren scheinen ebenfalls am Homing beteiligt zu sein, aber ihre kritische Rolle in diesem Prozess konnte für Transplantationsvorgänge nicht überzeugend gezeigt werden, wie u. a. LFA-1,³⁸ PECAM-1(CD31),³⁹ E-Selectin,⁴⁰ PSGL-1,⁴¹ CD43,⁴² VE-Cadherin.⁴³

Die besondere Bedeutung von $\alpha 4$ für transplantierte SZ wurde durch ein Experiment erkannt, in dem eine Blockade durch spezifische $\alpha 4$ -blockierende monoklonale Antikörper [AK] das Homing eingeschränkte, und SZ auch aus ihren Nischen mobilisiert wurden.³⁵ In der Klinik verwendet man zur Mobilisierung von CD34-positiven Zellen G-CSF. Es scheint Einfluss auf Metalloproteinasen, Elastase und Cathepsin G in der Knochenmarknische zu nehmen.⁴⁴ Es führt zu einem proteolytischen Milieu, das durch die Lösung von der extrazellulären Matrix zu einer Mobilisierung der SZ führt. Dies läuft indirekt auch über $\alpha 4$, dessen Bindungspartner VCAM-1 durch Cathepsin G und die neutrophile Elastase abgelöst wird;⁴⁴ andere Prozesse wie u.a. verminderte SDF1 α Konzentrationen im KM spielen dabei ebenfalls eine Rolle.^{45,46} Die Anwendung von G-CSF gründet allerdings im wesentlichen auf empirischen Erkenntnissen. Den Prozess der Mobilisierung durch G-CSF hat man noch immer nicht vollständig entschlüsselt; die Expression des G-CSF Rezeptors scheint z.B. für die Mobilisierung nicht obligat zu sein.⁴⁷ Neben weiteren hämatopoetischen Wachstumsfaktoren^{48,49} führen auch andere Stoffklassen wie etwa das zytotoxische Cyclophosphamid⁵⁰ oder das zu den Chemokinen zählende IL-8⁵¹ zu einer Mobilisierung, um hier nur einige stellvertretende Beispiele zu nennen.

Die Vorstellungen über die Transmigration der SZ aus dem Blut in das KM gründen auf den Erkenntnissen über die Transmigration von Leukozyten bei inflammatorischen Prozessen, bestehend aus Rolling, Adhäsion, Migration und Chemotaxis.⁵² Insbesondere SDF-1 α scheint hier einen starken chemotaktischen Reiz für SZ zur Transmigration über das KM-Endothel darzustellen.^{53,54}

Der zugehörige Chemokinrezeptor CXCR4 wurde zuerst als Co-Rezeptor neben CCR5 auf T-Helferzellen bei der HIV-Infektion ausgemacht.^{55,56} Die Bedeutung für das

ⁱ Im Folgenden werden das $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$ Integrin mit $\alpha 4$ bzw. $\alpha 5$ bezeichnet.

Homing wurde, wie für $\alpha 4$, durch blockierende AK herausgefunden, die eine effektive Repopulation verhindern.³⁶ Rasche Internalisierung des Rezeptors und eine bekannte, ähnliche Repopulationsfähigkeit für CXCR4-positive und negative Zellen⁵⁷ macht ihn als phänotypischen Marker allerdings problematisch. Gründe sind u.a. die Rezeptorregulation. Neben der schnellen Internalisierung gibt es auch Anhalte dafür, dass $\alpha 4$ und $\alpha 5$ durch CXCR4 teilreguliert bzw. aktiviert werden.^{38,58,59} Dies wäre auch damit vereinbar, dass die Effekte in der Mobilisierung bei Blockierungsexperimenten (mit Anti- $\alpha 4$ und Anti-CXCR4 AK) deutlich mehr als nur additiver Natur sind.⁶⁰

Weiterhin tauchte immer wieder die Frage auf, ob insbesondere CXCR4 und $\alpha 4$ eine zellzyklusabhängige Adhäsivität zeigen. Erstaunlicherweise werden nämlich mobilisierte Zellen in der peripheren Zirkulation überwiegend in G_0 gefunden (>90%).⁶¹ Es ist allerdings noch nicht geklärt, inwieweit eine unterschiedliche Adhäsivität von $\alpha 4$ während des Zellzyklus damit im Zusammenhang steht.^{62,63} Unabhängig davon wurde der Einfluss des Zellzyklus auf die Repopulationsfähigkeit mehrfach beschrieben,^{64,65} wobei die Repopulation vor allem während der S- und G_2/M -Phase als vermindert charakterisiert wurde.⁶⁶ Für eine erfolgreiche Repopulation wird übereinstimmend, neben $\alpha 4$ und CXCR4, Integrin $\alpha 5$ eine große Bedeutung zugemessen. Es ist wichtig in der Fibronectin-Bindung^{38,67} und hat so erheblichen Anteil am Überwinden der Endothelbarriere.

1.4 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren und Zytokine wirken rezeptorvermittelt auf das komplexe Netzwerk der Signaltransduktion und wirken dabei als positive bzw. negative Regulatoren von Wachstum und Differenzierung. Gebildet werden diese Faktoren in Stromazellen, Fibroblasten, Endothel oder während reaktiver Prozesse immunologischer oder inflammatorischer Art (v.a. aktivierte Makrophagen können hier eine Rolle spielen). In der Analyse bereitet dieses System Schwierigkeiten, da es äußerst dynamisch und vielfältig ist. Von Stromazellen werden beispielsweise nur sehr wenige Faktoren konstitutiv produziert, wie etwa IL-6 und SCF (auch mit c-kit Ligand bezeichnet), vielmehr wird die Bildung vieler Faktoren durch andere Zytokine erst stimuliert, so dass es schnell zu einer Milieuänderung kommen kann. Noch dazu bilden sich lokale Konzentrationsgradienten, die aufgrund der teilweise geringen Halbwertszeiten und durch Dilution in der Blutbahn kaum einen Niederschlag in systemisch messbaren Konzentrationen finden.

Wachstumsfaktoren, die in der Hämatopoese die Differenzierung in eine bestimmte Zellrichtung auslösen, werden als Kolonie stimulierende Faktoren bezeichnet, wobei die Klassifikation hier nicht einheitlich ist und eine große Überlappungen in der Funktion der Faktoren besteht (siehe Abb. 1, S. 4)

Welche Faktoren SZ *in vivo* benötigen um zu expandieren, ist nicht vollständig geklärt. Vermutlich spielen zusätzliche Bedingungen und das zeitliche Konzentrationsmuster der Wachstumsfaktoren eine Rolle. Verschiedene Faktorkombinationen wurden zur SZ-Expansion *in vitro* verwendet. Insbesondere für die Kombination IL-3, IL-6, IL-11 und SCF, die für retrovirale Transplantationsexperimente verwendet wird,⁶⁸ wurde eine nach der Stimulierung defekte Repopulationsfähigkeit im Transplantationsexperiment gezeigt.⁶⁹ Für viele weitere Faktoren wurde die Verwendung zur SZ-Stimulation erprobt; darunter sind Flt3L, Thrombopoetin [TPO], G-CSF u.a. (siehe auch Diskussion 4.2.1). Es gibt bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse, die dazu veranlassen eine bestimmte Zytokinkombination zu favorisieren.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit zur Kultivierung von KM verwendeten murinen Faktoren kurz beschrieben werden:

IL-3 ist ein verbreiteter Wachstumsfaktor, der für viele Abläufe von Bedeutung ist. Er zeigt eine große Ähnlichkeit zu GM-CSF, IL-4 und IL-5, was sich durch den vermuteten gleichen Genursprung auf Chromosom 5 erklärt.⁷⁰ In serumfreien Kulturen unterstützt IL-3 das Wachstum von pluripotenten Vorläuferzellen, und im weiteren das Wachstum von determinierten Vorläuferzellen einzelner Reihen.⁷¹ In zahlreichen Kombinationen mit anderen Faktoren können sehr unterschiedliche Synergien erzeugt werden. Gemeinsam mit IL-6 wird beispielsweise verstärkt proliferativer u/o differenzierender Einfluss auf myeloische Vorläufer genommen.⁷²

IL-6 vermittelt sehr unterschiedliche Effekte. Multipotente SZ werden durch IL-6 alleine nicht stimuliert, jedoch werden IL-3-Effekte anscheinend durch Verkürzung der G₀-Phase verstärkt und somit die Zellteilung beschleunigt.⁷²⁻⁷⁴ Andere Effekte beruhen auf der Beeinflussung von ausdifferenzierten Zellen, wie die gesteigerte T-Zellproliferation und die B-Zelldifferenzierung, einschließlich geförderter Immunglobulinsekretion.

IL-11 wird vor allem von KM-Stromazellen gebildet.⁷⁵ Das IL-11 wirkt mit IL-3, sowie SCF synergistisch auf eine SZ-Proliferation.^{76,77} Zudem scheint es die Adipogenese im Knochenmarksstroma zu hemmen und so Einfluss auf die Relation von Fettzellen und blutbildenden Zellen im Knochenmark zu nehmen.⁷⁸

SCF hat einige synonyme Bezeichnungen wie c-kit Ligand oder steel factor, um hier nur zwei zu nennen. Der Stem cell factor gilt als SZ-Überlebensfaktor.⁷⁹ An seinem Rezeptor CD117 führt er in hohen Dosierungen zu einer Proliferation von SZ, auch wenn möglicherweise einige sehr primitive Zellen keine Stimulation durch SCF erfahren. Stimuliert wird auch die Differenzierung zu erythrozytären-, lymphozytären- sowie Mastzellvorläuferzellen.⁸⁰

Flt3L hat über seinem Rezeptor Flt3, auch mit flk-2 bezeichnet, eine stammzellerhaltende Funktion⁸¹ und findet sich vor allem auf frühen Vorläuferzellen.⁸² Während der Flt3-Ligand für sich kaum proliferative Effekte zeigt, so wirkt er gemeinsam mit anderen Zytokinen (u.a. SCF) synergistisch auf das Wachstum so genannter Long-term Culture-initiating Cells.^{83,84}

1.5 Purifizierte KM-Zellen und Zelllinien als Stammzellmodell

Da das KM eine sehr heterogene Zellmischung darstellt, müssen molekularbiologische Vorgänge an homogenen Zellpopulationen durchgeführt werden. Historisch wurden zur Aufklärung von Zytokineinflüssen auf die Signaltransduktionskaskade und auf Transkriptionsfaktoren zumeist Zelllinien verwendet. So wurden die Mechanismen der Wirkung von Wachstumsfaktoren zunächst auf Zelllinien beschrieben. Die FDCP1 Zelllinie (factor-dependent cell progenitors) wurde beispielsweise von Metcalf et al. benutzt um GM-CSF zu beschreiben.⁸⁵⁻⁸⁷ Die Zelllinie ist ursprünglich aus der Langzeit-Kultivierung von murinem KM entstanden.⁸⁸ Die kontinuierliche Zugabe von Wachstumsfaktoren führte zu einer IL-3 abhängigen Zelllinie; der Wachstumsfaktorentzug hingegen führt zu einem G_{0/1}-Arrest bzw. zu Apoptose. Die FDCP1 Zellen unterliegen damit signalabhängigen Regelkreisläufen, die einer Tumorzelle ähnlich sind, jedoch besteht durch die Faktorabhängigkeit keine völlige Entkopplung des Zellzyklus. Eine leukämische Transformation wurde für transplantierte FDCP1 Zellen in vorher bestrahlten Mäusen, abhängig von der Strahlendosis, nach mehreren Wochen gezeigt. In unbestrahlten Tieren tritt dies nicht regelhaft auf.⁸⁹ Aufgrund ihres Ursprungs und ihrer Eigenschaften wird die Zelllinie als SZ-Surrogat verwendet, auch Untersuchungen zur zytokinabhängigen Expression von Adhäsionsmolekülen wurden an FDCP1 Zellen durchgeführt.⁹⁰ In neuerer Zeit wurden sie vor allem für die Entschlüsselung von Signaltransduktionswegen und Genexpressionsverhalten verwandt.^{91,92}

Neben den Zelllinien konzentrieren sich die Bemühungen in den letzten Jahren auf purifizierte Zellpopulationen, die durch aufwendige Purifizierungsschritte charakterisiert sind. Beispiele dieser neueren Technologien sind die Isolation über Säulen und die durchflusszytometrische Zellselektionierung. Die hämatopoetischen SZ-Populationen sind morphologisch und immunphänotypisch recht schlecht charakterisiert. Wie oben erwähnt stellt die $\text{Ho}^{\text{low}}/\text{Rho}^{\text{low}}$ Population die wohl reinste Population der Maus da. Eine zahlenmäßig häufigere Zellpopulation, die biologisch den SZ-Kriterien noch gerecht wird, sind die oben genannten $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellen. Diese Zellen besitzen eine hohe Klonierungseffizienz, bilden aber biologisch immer noch eine heterogene Zellpopulation mit höchst diverssem SZ-Potenzial.⁹³ Dennoch stellen sie wohl die am besten untersuchte murine SZ-Population dar. Verwendet wird sie vor allem in Transplantationsexperimenten und für molekularbiologische Untersuchungen.

1.6 Das klinische Interesse

Heute werden in der Klinik autologe sowie allogene SZ-Transplantationen durchgeführt. Bei der autologen Transplantation wird prinzipiell auf die dem Individuum eigenen SZ zurückgegriffen. Beim Einsatz zur Behandlung maligner Erkrankungen birgt diese Art der Zellgewinnung aber das Risiko, ein durch Tumorzellen kontaminiertes Transplantat zu erhalten. Die SZ werden häufig erst nach multiplen Zyklen einer zytostatischen Tumorthherapie gewonnen und sind dann häufig funktionell eingeschränkt. Zur Generierung eines SZ-Pools für ein allogenenes, also von Familien- oder Fremdspendern abstammendes Transplantat, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Zum einen können direkt KM-Zellen verwendet werden, zum anderen können SZ nach Mobilisierung aus dem peripheren Blut gewonnen werden. Als Alternative kann hier, soweit verfügbar, auch Nabelschnurblut dienen. Da häufig eine limitierte Verfügbarkeit von SZ die therapeutischen Möglichkeiten einschränkt, würde die Expansion von SZ mit anschließend guter Repopulationsfähigkeit hier hilfreich sein. Mittel- bis langfristig könnten expandierte SZ aus dem KM in der somatischen Gentherapie eine vielseitige Anwendung finden. Bisherige Ergebnisse werden dieser Erwartung allerdings noch wenig gerecht. Hinsichtlich der denkbaren Anwendungen der somatischen Gentherapie zur Behandlung von malignen und nicht malignen hämatopoetischen Erkrankungen oder konstitutioneller Gendefekte wäre es wünschenswert, eine möglichst frühe Vorläuferzelle für diesen Zweck einzusetzen um langfristig Erfolg zu haben.

Ein anderes Anwendungsgebiet bietet sich im Bereich der regenerativen Medizin. Hier sollen ganze Gewebe aus SZ *in vitro* generiert werden. Diese Art von Tissue-Engineering wird vereinzelt in der Klinik angewandt (z.B. die autologe Chondrozytentransplantation bei Knorpeldefekten⁹⁴ oder bei der Transplantation von Hautlappen^{95,96}). Der von vielen Forschergruppen und in der Presse vermittelte große Optimismus hinsichtlich einer breiten Anwendung und einer Ausweitung auf andere Gebiete ist für die nahe Zukunft nicht klar zu erkennen.

Gemeinsam ist allen diesen Anwendungen, dass die Zellen kultiviert werden müssen. Hierbei werfen sich eine Reihe von gebietsspezifischen und generellen Fragen auf. Welche Stimuli benötigt die jeweilige SZ? Unter welchen Bedingungen proliferiert sie, ohne zu differenzieren bzw. differenziert sie in die gewünschte Zelllinie? Welche interzellulären Kontakte sind essenziell? Befinden sich die notwendigen spezifischen Vorläuferzellen in der kultivierten SZ-Population?

Transplantationsexperimente von hämatopoetischen SZ in der Vergangenheit haben gezeigt, dass die Kultivierung von KM-Zellen regelhaft zu einem so bezeichneten Repopulationsdefekt führt.⁶⁹ Das bedeutet, kultivierte und dann transplantierte Zellen führen ihre biologische Funktion nicht so gut aus, wie es frische, unkultivierte Zellen täten.

1.7 Fragestellung

Aus dem Beschriebenen geht hervor, dass eine gute Funktionsfähigkeit von kultivierten hämatopoetischen Zellen eine Grundlage multipler klinischer Anwendungen darstellt. Eines der Ziele, die SZ in einer proliferativen Zytokinkombination wie IL-3, -6, -11 und SCF zu kultivieren, lag in der Absicht, die SZ für eine retrovirale Transfektion zur gentherapeutischen Anwendung zum Eintritt in den Zellzyklus anzustoßen.⁹⁷ Im Angesicht verfügbarer lentiviraler Transfektionen, die eine Zellzykluspassage nicht notwendig machen, scheint dies aus heutiger Sicht nicht mehr so bedeutsam,^{98,99} obwohl zu bemerken ist, dass die lentivirale Transfektion in humane ruhende Lymphozyten noch nicht sehr effektiv ist.¹⁰⁰ Es stellte sich aber die Frage, ob andere, auch weniger proliferative Expansionskulturen, den Repopulationsdefekt vermindern, aufheben oder sogar eine verbesserte Repopulation zur Folge haben könnten. Interessant erschienen in diesem Zusammenhang der Einsatz stammzellerhaltender Zytokine wie SCF und Flt3L.

Wie unter 1.3 beschrieben, ließen publizierte Vorläuferexperimente erwarten, dass die proliferative Zytokinmischung mit IL-3, -6, -11, SCF einen Repopulationsdefekt zeigen würde. Die Erklärungen für dieses Phänomen sind bisher nicht zufriedenstellend. Es gab verschiedene Ansätze den Repopulationsdefekt zu erklären. Eine veränderte Expression und Funktionalität von AM wurde dabei vorrangig vermutet. Die Bedeutung der AM wurde vor allem für $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4 gezeigt. Andere Autoren sehen einen Zusammenhang mit dem Zellzyklus und schließlich kann vermutet werden, dass die Vorläuferzellen durch die Kultivierung möglicherweise differenzieren und biologische Kapazitäten verlieren (siehe Diskussion 4.2, Ursachen des Repopulationsdefekts).

Da weder die morphologische Charakterisierung noch die Phänotypisierung der SZ bisher übereinstimmend beantwortet sind, stellt die Beurteilung der Repopulationsfähigkeit im Tiermodell zur Zeit die beste Möglichkeit zur Beurteilen von SZ-Populationen dar. Im Gegensatz zur klinischen Praxis besteht in kompetitiven Transplantationsexperimenten im Mausmodell die Möglichkeit eine qualitative Beurteilung des Transplantats durchzuführen.

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift stellten sich somit folgende Fragen:

- 1) Kann eine Kultur von murinen KM-Zellen mit den Zytokinen SCF und Flt3L im Vergleich zu einer Kultivierung mit IL-3, -6, -11 und SCF den Repopulationsdefekt vermindern oder aufheben? Welche Auswirkungen haben unterschiedliche Kultivierungszeiten von 48 und 72h auf das Repopulationsverhalten bei kompetitiver Transplantation mit frischen Knochenmarkszellen in myeloablatierte Empfängermäuse? Bestehen Unterschiede in der Kurzzeit- bzw. Langzeit-Repopulationsfähigkeit?
- 2) Welche Veränderungen zeigen die Zellen morphologisch und im Methylzellulose-Assay nach der Kultivierung?
- 3) Gibt die als SZ-Surrogat verwendet FDCP1 Zelllinie Hinweise auf Veränderungen der Adhäsionsmoleküle $\alpha 4$ und $\alpha 5$ oder des Chemokinrezeptors CXCR4 bei gleichartiger Kultivierung in den oben erwähnten Zytokinkulturen? Welchen Einfluss auf die AM hat eine Stimulation von CXCR4 durch einen chemotaktischen Reiz mit SDF1 α ?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Labormaterialien

Im Anhang 1 findet sich die Liste der verwendeten Reagenzien und Materialien. Die aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Gibco (Karlsruhe), Fluka (München) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Gebrauchswaren wurden in der Regel von der Firma Omnilab, Hassa und Neolab, die die Produkte der meisten Firmen vertreiben, bezogen. In Anhang 2 findet sich ebenfalls eine Auflistung der notwendigen Geräte zur Versuchsdurchführung.

2.1.2 Enzyme, Antikörper und Zytokine

Eine genaue Auflistung der verwendeten Enzyme, Antikörper [AK] und Zytokine findet sich im Anhang 3, sämtliche angewandten AK und Zytokine waren spezifisch für das Maussystem. Die Arbeitsanweisungen werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

2.1.3 FDCP1 Zelllinie

Die FDCP1 (factor-dependent cell progenitors) Zelllinie ist ursprünglich aus der Langzeitkultivierung von nicht malignem, murinem KM entstanden.⁸⁸ Dabei wurde der zellfreie Überstand von WEHI-3B Zellen zugegeben, der im wesentlichen IL-3 enthält. Es entstand eine IL-3 abhängige Zelllinie, die bei Entzug von IL-3 zu einem G₁-Arrest bzw. zu Apoptose führt. Andere Faktoren können bedingt IL-3 ersetzen; dazu zählen IL-4, IGF-1 und IFN γ .^{101,102} Transplantierte FDCP1 Zellen in vorher bestrahlten Mäusen weisen, abhängig von der Strahlendosis, nach mehreren Wochen eine leukämische Transformation auf; in unbestrahlten Tieren tritt dies nicht regelhaft auf.⁸⁹ Aufgrund ihres Ursprungs und ihrer Eigenschaften wird die Zelllinie als SZ-Surrogat verwendet; in neuerer Zeit vor allem für die Entschlüsselung von Signaltransduktionswegen und Genexpressionsverhalten.^{91,92} Die FDCP1 Zellen wurden unserem Labor freundlicherweise von Carol Stocking, Henrich-Pette-Institut, Hamburg in einer frühen Passage zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Mäusestämme

In den Transplantationsexperimenten wurden im Ptprc-Gen chimäre Mäusestämme verwendet. Die C57BL/6 Mäuse, sowie die kongenen B6.SJL-Ptprc^a Mäuse wurden als männliche Tiere von Taconic Europe, Dänemark, im Alter von 5-6 Wochen bezogen und dann 2 Wochen später für die Transplantationsexperimente verwendet. Der Balb/c Mausstamm, der in Zellisolationsexperimenten Anwendung fand, wurde bei Charles River, Deutschland, bestellt.

Die Mäuse wurden artgerecht und pathogenfrei in der Tierhaltung der Universität Lübeck gepflegt, dabei wurde konventionelles Futter gefüttert. Die C57BL/6 Mäuse sind ein häufig verwendeter Mausstamm, er ist auch unter der kurzen Bezeichnung „Black 6“ [B6] bekannt. Der durch Inzucht erzeugte genetisch identische Wildtyp unterscheidet sich dabei nur im Ptprc-Gen von den B6.SJL Mäuse. Diese haben den genetischen Hintergrund einer C57BL/6 Maus, besitzen jedoch das Ptprc^a-Allel im Gegensatz zu dem Ptprc^b-Allel des Wildtyps.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Medien für die Zellkultur

Tabelle 1 Medien für die Zellkultur. Die entsprechenden Zytokine und Konzentrationen werden bei den einzelnen Versuchsdurchführungen angegeben. Als serumfreies Expansionsmedium [SFEM] wurde hier StemSpan™ der Firma Stemcell eingesetzt.

*in dem Stimulationsversuch ersetzt durch die entsprechend angegebene IL-3 Konzentrationen

Zellen	Medium	Zusätze
FDCEP1	DMEM	10% FKS 25% Wehi Überstand*
Wehi	RMPI 1640	10% FKS
Knochenmark	SFEM	Zytokine

Soweit nicht anders angegeben, wurde den Medien Penicillin/Streptomycin-Lösung in einer Konzentration von 100 Uml⁻¹ zugegeben.

2.2.2 Kultivierungsbedingungen

Sämtliche beschriebene Kultivierungen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank vorgenommen. Die Zelldichte zur Kultivierung war vom Experiment abhängig. Die KM-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1,8x 10⁶ Zellen je ml eingesät, während die

schnell wachsenden FDCP1 Zellen in einer Zellkonzentration von 2×10^5 Zellen je ml eingesetzt wurden.

2.2.3 Passagieren bzw. Gewinnung der Zellen

Die FDCP1 Zellen wurden in Suspensionskulturflaschen kultiviert und zeigten dabei keine Adhärenz. Sie konnten somit durch einfaches Abpipettieren und Zentrifugieren (300g / 5min) geerntet werden.

Das KM ließ sich ebenfalls gut in den Suspensionskulturflaschen („non-adherent cultureflasks“) kultivieren; nur wenige Zellen verhielten sich dabei adhärent. In einem ersten Schritt wurden die Zellen abpipettiert. Zum Lösen der wenigen, verbleibenden Zellen vom Boden der Kultivierungsflasche wurden zwei Schritte angewandt: (1) die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und (2) anschließend mit Hilfe eines Cell-Scrapers (Sarstedt) gelöst und mit PBS in die Suspension aufgenommen. Nach 48h wurden die Zellen geerntet bzw. für die längere Kultivierung von 72h in neues Medium überführt.

Im Falle der Transplantation nach Zellgewinnung wurden die Zellen nochmals abzentrifugiert, gewaschen und in einem entsprechenden Zielvolumen resuspendiert, so dass 1ml-Spritzen mit einem Volumen von 430µl aufgezogen werden konnten.

2.2.4 Methylzellulose-Assay – Ansetzen und Auswertung

Für den Ansatz wurde das Methylzellulosemedium der Firma Stemcell (Methocult™ GF M3434) verwendet. Dabei wurde im wesentlichen die Anleitung des Herstellers befolgt. Pro Schale (Dish) wurden 20.000 frische KM-Zellen eingesät bzw. das Äquivalent nach der Kultivierung, d.h. der proportionale Zellanteil, der aus 20.000 frischen KM-Zellen hervorgegangen ist. Da die meisten Zellen die Kultivierung nicht überstehen, handelt es sich absolut also um eine sehr viel kleinere Zellzahl. Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden 8 Schalen angesetzt. Die Zellen wurden in einem Zielvolumen von 100µl IMDM aufgenommen, mit Methylzellulosemedium durch Vortexen gemischt und anschließend in die Schalen pipettiert, 1,1ml pro Schale. Als Schale wurden 35mm Dishes mit Raster zur Erleichterung des Auszählens verwendet. Vier Schalen zusammen wurden unter Befeuchtung in einer größeren Schale in den Brutschrank gestellt. Die Auszählung erfolgte nach 9 Tagen, die Auszählung der Kolonien wurde nach zwei Tagen nochmals überprüft. Die Richtigkeit der Zuordnung zu den einzelnen Kolonietypen wurde stichprobenartig durch Abpipettierung der

Kolonien unter dem Auflichtmikroskop und in anschließende Zytospin-Präparate kontrolliert.

2.2.5 Kryokonservierung der Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zelllinien bei 300g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit Einfriermedium (cryo-safe™ von C-C-pro) auf eine Zellzahl von 1×10^6 pro ml eingestellt. Jeweils 1,8ml wurde anschließend in 1,8ml-Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden in Kryoboxen langsam auf -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Kultivierung wurden die Zellen unter Zugabe von 10ml Kultivierungsmedium aufgetaut, abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und in die Kultivierungsflaschen überführt.

2.2.6 Ablauf des Stimulationsexperiments der FDCP1 Zellen

Aus der Mitte der Log-Wachstumsphase (siehe Wachstumskurven Abb. 21) wurden die Zellen für die Experimente geerntet. Die Versuchsgruppen wurden allein unter Verwendung von DMEM-Medium und den in Tabelle 2 angegebenen Zytokinkonzentrationen angesetzt. Die Gruppen A bis F und G bis L stellten dabei getrennte Versuchblöcke dar, weil nur entsprechende Anzahlen von Gruppen zur zeitnahen Durchführung der einzelnen Untersuchungen verarbeitet werden konnten.

Tabelle 2 Zytokinbeimengungen im Stimulationsexperiment der FDCP1 Zellen. Gezeigt sind die Konzentrationen der Zytokine in ngml^{-1} , die den FDCP1 Zellen im Rahmen der Stimulationsexperimente in das Kulturmedium zugegeben wurden.

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
IL-3	10	10	10	10	10		10					
GM-CSF		10						10				
IL-6			20						20			
IL-11			20						20			
SCF			100	100					100	100		
Flt3L				100						100		
SDF1 α					100						100	

Jeweils zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 24h, 48h und 72h wurden dann Zellproben entnommen. Die Proben für die RNA-Analyse wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließen bei -80°C bis zur Durchführung gelagert. Die FACS-Analyse

und Zellzyklusanalyse wurden hingegen unmittelbar anschließend durchgeführt und die Zellen dafür während der Präparation auf Eis gelagert.

2.2.7 Zellisolierung von Sca⁺ lin⁻ Zellen aus Knochenmark

Das Prinzip der Zellisolierung über Magnetsäulen wird im Folgenden zusammenfassend beschrieben. Noch ausführlichere Beschreibungen dieser Methode finden sich in der Literatur des Herstellers (Miltenyi) und in den durchgeführten Studien.¹⁰³

Das Zielantigen der Zellisolierung wurde mit einem Antikörper markiert, an dem sich ein sogenannter „bead“ befindet – ein kleiner ferromagnetischer Metallpartikel. Anschließend liefen die Zellen über eine Säule, in der durch ein angeschlossenes Magnetfeld die entsprechend bead-markierten Zellen angezogen wurden und in der Säule hängen blieben. Die durchgelaufenen Zellen bildeten die für dieses Merkmal negative Zellpopulation. Bei einer positiv Selektion wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und gut durchgespült. So wurden die markierten Zellen aus der Säule gelöst.

Die Durchführung im Einzelnen: Das entnommene KM wurde mit PBS gewaschen und filtriert. Dies erfolgte mit einem 30µm-Filter, um die Suspension von möglichen Knochenfragmenten oder Bindegewebe zu befreien, die im weiteren Verlauf die Isolierungssäule verstopfen könnten. Als Puffermedium wurde PBS, pH 7,2, supplementiert mit 0,5% BSA und 2mM EDTA verwendet. Die Isolierung wurde maschinell am Auto MACS (Miltenyi) durchgeführt.

In einem ersten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem „Sca-1 microbead“ Antikörper. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen durch die Säulen geschickt. Dieser Vorgang wurde von dem Automaten durchgeführt und hat gegenüber der manuellen Isolierung den Vorteil, dass der Automat mit einer großen Konstanz arbeitet (v.a. das „Durchspritzen“ während der Spülschritte, bei dem unspezifischen Bindungen von der Magnetsäule gelöst werden sollen). Durch die größeren Säulen und die Automatisierung konnten große Zellzahlen in wenigen Minuten isoliert werden. Die verschiedenen Programme wurden miteinander verglichen, wobei sich eine Doppelisolierung (Lauf durch zwei Säulen) für diese Anwendung als besonders günstig erwies.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

Die Tierhaltung, sowie der tierexperimentelle Teil der Versuche, wurden in der Tierhaltung der Universität Lübeck durchgeführt. Die Experimente fanden die Zustimmung und Genehmigung zur Verwendung der entsprechenden Versuchsmäuse gemäß Tierantrag 12/1e/99 des Landes Schleswig Holstein (siehe Anhang 4).

2.3.1 Entnahme von Knochenmark

Die Mäuse wurden nach Betäubung durch Genickbruch getötet, anschließend erfolgte die Entnahme von Femur und Tibia. Die Knochen wurden mit Kompressen von dem übrigen Gewebe befreit und an beiden Enden soweit mit einem Skalpell aufgeschnitten, bis die Röhrenknochen mit Hilfe einer Spritze (22G-Nadel) durchspült werden konnten. Alle weiteren Schritte bis zur Kultivierung bzw. Transplantation erfolgten auf Eis. Durch diese übliche Methode erhält man ca. 25% des totalen KM einer Maus.¹⁰⁴ Je Maus wurden 5 - 10ml PBS zum Durchspülen benötigt, die zu erwartende Zellzahl lag zwischen $3\text{-}5 \times 10^7$ je Maus. Für die 7-8 Wochen alten Mäuse lagen die Zellzahlen sehr konstant zwischen $3,5 - 4 \times 10^7$ KM-Zellen je Maus.

2.3.2 Myeloablation durch Bestrahlung

Die Bestrahlung der Mäuse wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Strahlentherapie der Universität Lübeck durchgeführt. Verwendet wurde ein Beschleuniger vom Typ Mevatron 74 (Siemens) mit 10 MV. Die Mäuse erhielten eine Gesamtstrahlendosis von 10 Gy, aufgeteilt auf zwei Einzeldosen von je 5 Gy im Abstand von 4h. Die Dosimetrie und die Durchführung unterlag dabei den Mitarbeitern der Abteilung für Strahlenmedizin.

2.3.3 Intravenöse Transplantation

Die Transplantation der frischen bzw. kultivierten KM-Zellen erfolgte 6 Stunden nach der 2. Bestrahlung der Empfängertiere. Um die intravenöse Injektion in eine der vier Schwanzvenen der Maus durchzuführen, wurden die Mäuse in eine Plexiglasröhre mit

26mm Innendurchmesser gelassen, durch eine Lochplatte an einem Ende war der Schwanz von außen zugänglich. Durch kurzes Eintauchen des Schwanzes in warmes Wasser wurde eine Vasodilatation induziert, um die Injektion bei den 7-8 Wochen alten Mäusen zu erleichtern. Die Zellen wurden intravenös mit einer 1ml-Spritze (25G-Nadel), gelöst in PBS in einem Volumen von 430µl, appliziert.

2.3.4 Retroorbitale Blutentnahme

Zur Durchführung der Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran (Forene™) kurz betäubt. Der retroorbitale Sinus ist durch eine heparinisierte Hämokapillare leicht zugänglich, als Auffanggefäße für die entnommenen ca. 250µl Blut je Maus dienten kleine Tubes (Microtainer™). Anschließend erfolgte eine Ohrmarkierung (Lochung) der einzelnen Mäuse, um mögliche Veränderung nicht nur der Gruppen sondern auch im Individuum verfolgen zu können.

Die Messung der Blutbilder erfolgte maschinell mit einer speziellen Tiersoftware auf dem Messgerät Evita™ (Bayer) des hämatologischen Labors.

2.3.5 Kompetitive Knochenmarktransplantation

In Abbildung 2 wird das Prinzip der kompetitiven Transplantation veranschaulicht. Die KM-Entnahme erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Dabei entstammen die kultivierten KM-Zellen aus dem B6.SJL (also CD45.1+) Mausstamm, während die frischen KM-Anteile aus dem B6 Wildtyp (CD45.2+) entnommen wurden. Die Transplantation erfolgte in zuvor bestrahlte B6 Mäuse (s.o.), die dadurch über keine eigene Hämatopoese mehr verfügen, aber immunkompatibel zu beiden transplantierten Zelltypen sind.

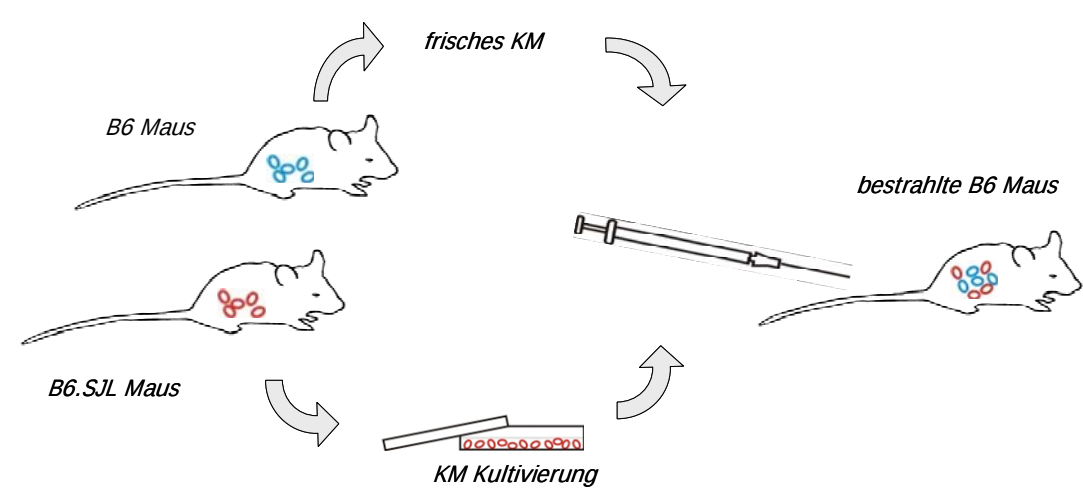


Abb. 2 Schema der kompetitiven Knochenmarkstransplantation. Frische KM-Zellen des B6 Wildtyps (blau) werden mit zuvor kultivierten KM-Zellen des B6.SJL Maustyps (rot) gemischt und in eine bestrahlte B6 Maus injiziert. Die symbolhaft dargestellte Färbung der Zellen entspricht dabei einem genetischen Chimerismus im Ptprc-Gen, der die Zellen später im Empfängertier durchflusszytometrisch unterscheidbar macht.

2.3.6 Ablauf des Transplantationsexperiments

Zu Beginn wurde 7-8 Wochen alten B6.SJL Mäusen das KM entnommen. Unmittelbar wurde dieses KM in die jeweilige Kultur eingesetzt. Bedingt durch die unterschiedlichen Kultivierungszeiten der Zellen wurden die Mäuse dementsprechend nach 48 bzw. 72h transplantiert. Am ersten Tag wurde auch frisches KM aus ebenfalls 7-8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen entnommen, um die Transplantation der Kontrollgruppen A, B und G durchzuführen, siehe Tabelle 3. Bei den gesamten Spendertieren in den einzelnen Experimenten wurde auf gleiches Lebensalter in Tagen der Mäuse geachtet.

Tabelle 3 Erster Versuchstag des Transplantationsexperiments. Gezeigt sind die Zellzahlen der jeweils frischen KM-Zellen und der kultivierten Zellen vom B6 bzw. B6.SJL Maustyp für die experimentellen Gruppen A bis G. In den unteren Zeilen ist die Dauer der Kultur der B6.SJL Zellen angegeben. Blau hervorgehoben sind die am ersten Tag transplantierten Gruppen A und B, die mit den angegebenen Zellzahlen transplantiert wurden. Gruppe G bekam eine äquivalentes Volumen PBS injiziert. Kultur 1: IL-3, -6, -11, SCF; Kultur 2: SCF und Flt3L.

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G
n	6	6	6	6	6	6	3
B6		4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	Äq. PBS
B6.SJL	8x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	
Kultur 1			48h	72h			
Kultur 2					48h	72h	

Die Empfängermäuse wurden, wie unter 2.3.2 beschrieben, 6 Stunden vorher durch Bestrahlung myeloabladiert. 48 Stunden später wurden die kultivierten Zellen für die die Gruppen C und E der Kultur entnommen und gemeinsam mit an diesem Tag frischen C57BL/6 KM-Zellen transplantiert (Tab. 4). Die Empfängertiere hatten jeweils ein Alter von 7-8 Wochen.

Tabelle 4 Tag 3 des Transplantationsexperiments. Blau hervorgehoben sind die am dritten Tag transplantierten Gruppen C und E. Dabei sind die Zellzahlen für das transplantierte frische KM der B6 Mäuse angegeben bzw. die in Kultur eingesetzten Zellzahlen der KM-Zellen aus den B6.SJL Mäusen. Kultur 1: SCF, IL-3, IL-6 und IL-11; Kultur 2: SCF, Flt3L.

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G
n	6	6	6	6	6	6	3
B6		4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	Äq. PBS
B6.SJL	8x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	
Kultur 1			48h	72h			
Kultur 2					48h	72h	

Die 72h-Kultur wurde nach 48h passagiert. An Tag 4 erfolgte die Transplantation dieser Zellen vermischt mit frischen KM-Zellen (Tab.5). Analog zu den vorherigen Tagen wurde das frische KM mindestens aus zwei B6 Mäusen entnommen und die Transplantation 6h nach Bestrahlung durchgeführt.

Tabelle 5 Tag 4 des Transplantationsexperiments. Blau hervorgehoben sind die am dritten Tag transplantierten Gruppen D und F. Dabei sind die Zellzahlen für das transplantierte frische KM der B6 Mäuse angegeben, sowie die in Kultur eingesetzte Zellzahl der KM Zellen aus den B6.SJL Mäusen Kultur 1: IL-3, -6, -11, SCF; Kultur 2: SCF, Flt3L

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G
n	6	6	6	6	6	6	3
B6		4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	Äq. PBS
B6.SJL	8x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	4x 10 ⁶	
Kultur 1			48h	72h			
Kultur 2					48h	72h	

2.4 Durchflussszytometrie

Alle durchflussszytometrischen Messungen wurden am FACSscan (Beckton Dickenson) des hämatologischen Labors durchgeführt. Die erstellten Settings für die unterschiedlichen Versuche wurden vor jedem einzelnen Experiment nochmals überprüft und wenn nötig angepasst.

2.4.1 Analyse von Mäuseblut auf den Ptprc a/b Chimerismus

Die durchflusszytometrische Analyse der Blutproben erfolgte orientierend an Mardiney et al.¹⁰⁵ Sie beruht auf dem Chimerismus des Ptprc-Gens (protein tyrosine phosphatase, receptor type C), bei dem in verschiedenen Mauslinien das Allel a (z.B. SJL Mäuse) oder b (z.B. C57BL/6 Mäuse) auftritt. Die entsprechende Ag-Spezifität wird nach der CD-Klassifikation auch mit CD45.1 (Ptprc^a) und CD45.2 (Ptprc^b) bezeichnet. Das Besondere an CD45 ist seine obligate Expression auf allen Leukozyten, weshalb es auch als „common leukocyte antigen“ bezeichnet wurde.

Die Analyse wurde direkt im Anschluß an die Blutentnahme durchgeführt. 70µl Blut jeder Maus wurden dazu in einem 2ml Eppendorfgefäß mit 1.5ml aqua dest. für 3 Minuten lysiert. Die kurze Expositionszeit

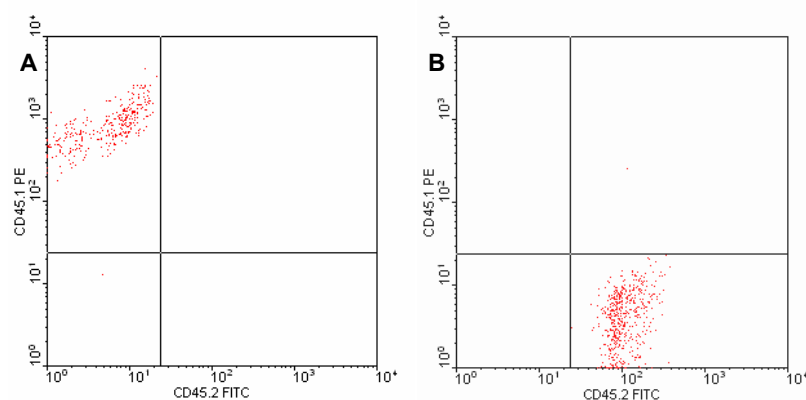


Abb. 3 Durchflusszytometrische Analyse peripherer Leukozyten von B6.SJL (A) und B6 (B) Mäusen. Der Chimerismus im Ptprc Gen zeigt sich an der Zelloberfläche in einer CD45.1 Expression der B6 Mäuse, während Leukozyten der B6.SJL Mäuse das CD45.2 tragen.

in hypotoner Lösung bewirkt lediglich eine Lyse eines Großteils der Erythrozyten. Anschließend wurde zentrifugiert (300g; 4min), der Überstand abpipetiert und unmittelbar in 100µl PBS resuspendiert. Unter Zugabe von je 0.7µl Anti-CD45.1 PE - und Anti-CD45.2 FITC - Antikörper erfolgte die Inkubation der Proben bei 4°C für 30 Minuten. Nach der Markierung folgten zwei Waschschrte mit dem oben definierten Zentrifugationsschritt und anschließender Analyse am FACSScan.

Anhand der unterschiedlichen Markierung FITC und PE lassen sich die Leukozyten auf einem zweidimensionalen Plot abbilden. Da die Zellen entweder der B6.SJL Maus entstammen und damit CD45.1-positiv sind oder dem CD45.2-positiven Wildtyp entsprechen lassen sich zwei getrennte Populationen darstellen wie in Abb. 3 illustriert. Bei einer gemischten Probe bzw. heterogenen SZ nach Transplantation (Abb. 4) erwarten wir diese zwei Populationen, da die Zellen einer der bei beiden „Stammzelltypen“ entstammen. Nicht markierte sowie positive Zellen für beide Merkmale sind nicht zu erwarten bzw. als unspezifische Bindungen einzuordnen.

Kontrollen unbehandelter Tiere zeigen dementsprechend für beide Typen einen Nachweis >99.5% des Antigens (siehe oben). Die Messfehler in der Zuordnung beider

Typen sind also äußerst klein, deshalb wurde bei der Auswertung der Anteil zuordenbarer Zellen gleich 100% gesetzt, in der Annahme, dass sich die <0.5% nicht zuordenbarer Zellen anteilsgemäß auf die beiden Populationen verteilen.

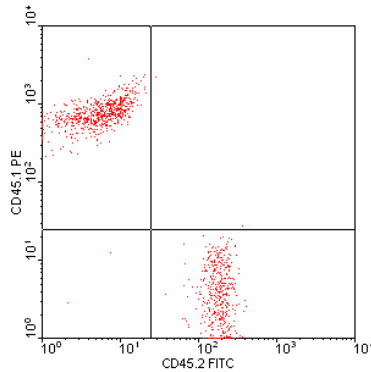


Abb. 4 Heterogene Leukozyten-population für das common leukocyte antigen (CD45) in der durchflusszytometrischen Analyse. Nach einer Transplantation mit einer genetisch unterschiedlichen SZ kann die anteilige Herkunft der peripheren Leukozyten bestimmt werden. In diesem Beispiel tragen 68% der Leukozyten das CD45.1 Antigen, sie sind somit aus SZ der B6.SJL Maus hervorgegangen.

2.4.2 Messung der Adhäsionsmoleküle $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4

Nach der Gewinnung der Zellen wurden diese in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in PBS resuspendiert. Dabei wurden ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen in 200 μ l PBS suspendiert und mit 0,6 μ l des entsprechenden PE markierten Antikörpers bei 4°C für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte, bevor die Zellen am FACSscan gemessen wurden. Alle Schritte erfolgten auf Eis, von einer Fixierung der Zellen konnte dadurch abgesehen werden.

Die Kontrollen mit Isotyp-Antikörpern zeigten konstant das gleiche Bild wie ungefärbte Zellen, so dass Kontrollmessungen im Verlauf aus Einsparungsgründen mit ungefärbten Zellen durchgeführt wurden.

2.4.3 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde nach Hammers et al.¹⁰⁶ durchgeführt. Dabei wird durch ultraviolette Strahlung die Zellmembran durchlässig gemacht, so dass inkorporiertes Bromodesoxyuridin [BrdU] durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen werden kann (Ultraviolet-Induced Detection [UID]). Die Inkubationszeit mit BrdU (unter normalen Wachstumsbedingungen der Zellen) variierte je nach Zelllinie; im Falle der FDCP1 Zellen fand sich eine optimale Zeit bei 45 min. Darauf folgte die UV-Bestrahlung (311 nm) für 5 min, anschließend eine Fixierung mit Dimethylsuperimide in entsprechendem Puffer für 5 min bei 4°C. Die Färbung mit Anti-BrdU FITC Antikörpern und 7-Amino-actinomycin D wurde für 2 Stunden vor der

durchflusszytometrischen Darstellung des DNA-Gehaltes der Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphase durchgeführt. Abbildung 5 zeigt eine beispielhafte Analyse.

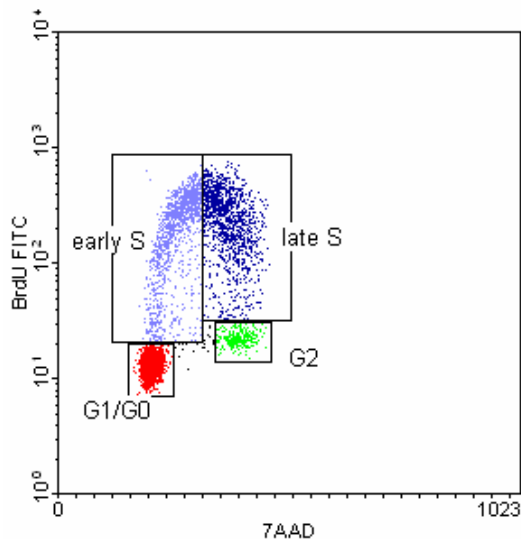


Abb. 5 Zellzyklusanalyse der FDCP1 Zelllinie. Die Analyse beruht auf der Inkorporierung von BrdU, das durch UV-Strahlung intrazellulär markierbar wird (UVID). Auf der X-Achse zeigt sich linear abgetragen der DNA-Gehalt der Zellen, markiert mit 7AAD. Entsprechend der verdoppelten DNA in Phase G2 wird dies in der zweifachen Fluoreszenz im Vergleich zu G1 abgebildet. Die Y-Achse bildet die BrdU-Inkorporierung während der S-Phase auf einer logarithmischen Skala ab. Unterscheiden kann man dabei zwischen einer frühen (early) und späten (late) Phase der Synthese.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden in Anlehnung an „Basic Methods in Molecular Biology“ von Davis, Kuehl und Battey¹⁰⁷ durchgeführt. Entsprechende Angaben der Hersteller Invitrogen (RNA Isolierung), real-time PCR (Applied Bioscience, Metabion und TIB Molbiol) wurden für einzelne Anwendungen verwendet.

2.5.1 RNA Isolierung aus kultivierten Zellen

Die entnommen Zellen aus den Kulturschalen wurden nach einmal Waschen mit PBS unmittelbar in Eppendorfgefäße abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen auf Eis genommen und mit 2ml Trizol (Invitrogen) lysiert. Anschließend wurde den Proben 200µl Chloroform hinzugegeben und in der Kühlzentrifuge mit 14.000rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase abpipettiert und in ein neues 2ml Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 1ml Isopropanol wurde wieder für 15 Minuten bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzer Trocknung bei Raumtemperatur [RT] wurde das Pellet anschließend in 100µl H₂O aufgenommen. Die Konzentration und die Ratio wurden photometrisch bestimmt (siehe 2.5.3).

2.5.2 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion [RT-PCR] wurde in der Regel unmittelbar im Anschluss an die RNA-Isolierung durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 20 µl für 5 Minuten auf 65°C erwärmt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Erst-Strangsynthese wurde für 60 Minuten bei 37 °C mit folgendem Ansatz durchgeführt:

Standard-RT-PCR-Mix

2	µl	4mM dNTP-Mix
8	µl	5xPuffer
2	µl	RNA-Guard (10U/µl)
2	µl	pd(N ₆)-Primer 50µM
2	µl	0,1M DTT
2	µl	M-MLV-Transkriptase 50U/µl
5	µg	Gesamt-RNA

Die Reaktion wurde danach durch Erhitzen bei 95 °C für 5 Minuten gestoppt. 3,7µl aus diesem Ansatz wurden anschließend für die Standard-PCR Reaktion verwendet.

2.5.3 DNA und RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen von DNA und RNA nach Isolation bzw. RT-PCR wurden spektralfotometrisch bestimmt. Als Referenzwert diente Wasser. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ gemessen. Die Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte [OD] von 1,0 einer Konzentration von 50ng/µl dsDNA, bzw. 40ng/µl RNA. Die Verunreinigung wurde mit Hilfe des Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt. Von einer reinen DNA bzw. RNA in der Lösung spricht man dann, wenn der Quotient bei 1,8 oder höher liegt.

2.5.4 Polymerase Kettenreaktion

2.5.4.1 Primer

Tabelle 6 Primer für die β 1-Integrine α 4, α 5 und den Chemokinrezeptor CXCR4 sowie für das als „house keeping gen“ verwendete β -actin. Die β -actin Oligonukleotide wurde von Metabion bezogen, die übrigen von der Firma TIB Molbiol.

Bezeichnung	Oligonukleotide	Produktgröße
mCXCR4 F	5'-ATGGAACCGATCAGTGTGAGTAT-3'	
mCXCR4 R	5'-GTGTGATGACAAAGAGGAGGTCA-3'	277 bp
m alpha4 F	5'-TGGATCGCCTCTCAAGGATAG-3'	
m alpha4 R	5'-TGTCCTCATTGGTCCAAT-3'	132 bp
m alpha5 F	5'-ATCTGGATGGCAATGGATACC-3'	
m alpha5 R	5'-CTGCCAGTCCAGTTGGAGT-3'	201 bp
β -actin F	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	
β -actin R	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	349 bp

Das Primer-Design wurden von den beauftragten Firmen Metabion und TIB Molbiol übernommen, dabei wurde auf die Oligonukleotidlänge, günstige Annealing-Temperaturen sowie das Überspannen von mindestens einem Intron geachtet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie in Abb. 6 dargestellt elektrophoretisch überprüft und zeigten Übereinstimmung mit der Schmelzkurvenanalyse bei der real-time PCR, so dass die Gelkontrolle später hierdurch ersetzt werden konnte.

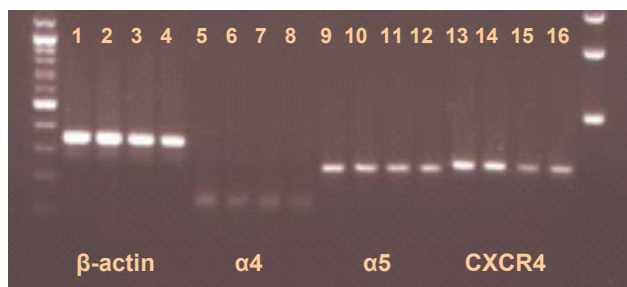


Abb. 6 Agarosegeldokumentation der PCR-Produkte des „house keeping gen“ β -actin (Lane 1-4), sowie den Zielgenen α 4 (5-8), α 5 (9-12) und CXCR4 (13-16). Die Produktgrößen stimmen mit den theoretischen Angaben Tab. 6 überein. Der Marker links gibt 100bp Schritte an (100bp Standard); rechts wird ein 1kb Standard verwendet.

2.5.4.2 Standard PCR

Die Reaktion wurde an dem Thermocycler der Firma Hybaid (PCRExpress) durchgeführt in einem Gesamtvolumen von 25µl. Folgender Standard-PCR-Mix wurde verwendet:

2	µl	Template-DNA (100ng)
0,75	µl	Oligonukleotid I (50pmol/ml)
0,75	µl	Oligonukleotid II (50pmol/ml)
0,5	µl	dNTP-Mix (jeweils 20mM)
2,5	µl	10 x PCR-Puffer
0,5	µl	Taq- Polymerase
H ₂ O		ad 25 µl

Die Reaktionsparameter, also die Zeit der Synthesephase und die Annealing-Temperatur, wurden dem jeweiligen Lauf angepasst. Das verwendete Standardprogramm ist hier aufgeführt:

1.	Denaturierung	93°C	3min
2.	Temperaturzyklus (30-36 Zyklen)	Denaturierung 93°C Primer-Annealing 55-63°C Synthese 72°C	55sec. 55sec. ca.60 sec/ 1kb
3.	Terminale Verlängerung	72°C	10min
4.	Kühlung		

2.5.4.3 Quantitative real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung von PCR-Produkten wurde in den hier gezeigten Ergebnissen das Taqman-System der Firma Applied Bioscience verwendet, die Vorteile dieses Systems liegen bei einer mit 96 möglichen Proben großen Kapazität gegenüber anderen Patenten. In 96-well Platten wurde folgender Ansatz pipettiert:

2,5 µl	10x PCR-Puffer
1,75 µl	MgCl ₂
1 µl	sNTP's
1 µl	β-actin bzw. Zielgen-Primer
0,125 µl	Polymerase
0,75 µl	Cybergreen
12,875µl	H ₂ O

Dem Ansatz wurden die jeweiligen Proben in einem Volumen von 5µl zugegeben, die Standards in 10er Verdünnungsreihen und die Proben in einer ungefähren Konzentration von 100µgml⁻¹. Bei der Reaktion wurde eine Hot-start-Polymerase verwendet, die zu Beginn mit einer 10minütigen Erwärmung auf 95°C aktiviert wurde.

Das Annealing bei den folgenden Zyklen fand bei 60°C statt. Die Analyse der Schmelzkurven erwies sich als valide Methode zur Kontrolle der PCR-Produkte, so dass auf regelhafte Gelkontrollen verzichtet werden konnte (siehe auch Abb.6). Ausgewertet wurden die Proben anhand der ABI Prism 7000 SDS Software. Die Berechnung der relativen Hoch- und Runterregulation der Zielgene gegenüber β -actin (gewähltes housekeeping Gen) wurde nach Winer et al.¹⁰⁸ anhand folgender Formel durchgeführt: $2^{-(C_{\text{target sample}} - C_{\text{house sample}}) - (C_{\text{target reference}} - C_{\text{house reference}})}$ Bei dieser Methode wurde von einer signifikanten Regulation bei einem Faktor größer 3-5fach ausgegangen.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [SDS-Page] wurde einerseits zur Kontrolle der PCR-Produkte verwendet, sowie vorbereitend für eine anschließende Gelextraktion. Auf diesem Weg wurden durch weitere Amplifikation (per PCR) reine Standards, zur Verwendung in der späteren realtime-PCR, erzeugt.

Für die hier erwähnten Anwendungen wurden 2%ige Agarosegele eingesetzt; die für die Auftrennung verwendete Spannung lag bei 120V. Mit einer Konzentration von $0,1\mu\text{gml}^{-1}$ Ethidiumbromid konnte anschließend unter UV-Licht eine gute Darstellbarkeit erreicht werden.

2.5.6 Gelextraktion von DNA

Die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Qiaquick-Kit (Qiagen) durchgeführt. Es basiert auf dem Herauslösen von DNA unter Erhitzung von selektierten Gelteilen, Aufnahme in Isopropanol und der anschließenden Aufreinigung über Säulen. Es wurde dabei die Anleitung des Herstellers befolgt.

2.6 Zytologische Methoden

2.6.1 Beurteilung und Erzeugung von Zytospin-Präparaten

Die Auswertungen der zytologischen Präparate erfolgt an einem Lichtmikroskop von Zeiss unter 100-1000facher Vergrößerung (ab 400fach unter Ölimmersion). Die in der Arbeit gezeigt Aufnahmen wurden mit einer Olympus Digitalkamera angefertigt und sind alle in der gleichen Vergrößerung dargestellt.

Die Zytospin-Präparate wurden einheitlich durchgeführt. Dazu wurden 1×10^4 - 5×10^4 Zellen in 100µl PBS aufgenommen, mit 50µl bovinem Albumin gemischt und anschließend in die spezielle Zytospinkammer überführt. Der eigentliche Spin wurde dann bei schneller Beschleunigung für 10 min bei 6500 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger bis zu 18h getrocknet und anschließend gefärbt.

2.6.2 Pappenheim-Färbung

Die Pappenheim-Färbung ist eine kombinierte Färbung aus der May-Grünwald- und Giemsa-Färbung. Es wurden gebrauchsfertige Lösungen verwendet; inkubiert wurde für 2 min in der May-Grünwald-Färbung und 20 min in der Giemsa Färbung. Dazwischen, sowie nach der Giemsa-Färbung wurde die Objektträger für ca. 30 Sekunden mit Aqua dest. gespült und am Ende schließlich luftgetrocknet.

2.7 Statistische Berechnungen

Die Berechnungen wurden mit Hilfe der SPSS Software durchgeführt. Die Ergebnisse des Methylzellulose-Assays wurden anhand des Wilcoxon-Rangsummentests analysiert. Im Transplantationsexperiment wurde eine Varianzanalyse der Gruppen ausgeführt, ebenso wurden weitere statistische Berechnungen zur Frage nach der Signifikanz anhand des T-Tests berechnet (Vergleich einzelner Gruppen).

3 Ergebnisse

3.1 Kompetitive Transplantation in myeloabladierte C57BL/6 Mäuse

3.1.1 Kultivierung des Knochenmark in Zytokinkulturen

3.1.1.1 Wachstum

In Abb. 7 ist das Wachstumsverhalten der KM-Zellen in den Zytokinkulturen dargestellt. Die Gesamtzellzahlen sinken im Verlauf der jeweiligen Kulturen. Von je 4×10^6 KM-Zellen, entsprechend der Spenderzellzahl pro Maus die in Kultur gebracht wurden, fanden sich nach der Kultur mit IL-3, -6, -11, SCF nach 48h nur noch $1,33 \times 10^6$ vitale Zellen und nach 72h $0,89 \times 10^6$ Zellen. Dies entspricht 33 bzw. 22% der Ausgangszellzahl. In der Kultur mit SCF und Flt3L liegen die entsprechenden Zellzahlen nach 48h bei $1,33 \times 10^6$ bzw. nach 72h bei $0,96 \times 10^6$. In Prozent ausgedrückt sind das 33 bzw. 24% der vitalen Ausgangszellen (Abb. 7). Die genannten Zellzahlen entsprechen den absolut transplantierten Zellzahlen je Maus, die kompetitiv mit je 4×10^6 frischen KM-Zellen injiziert wurden. Insgesamt ist das Verhalten in beiden Gruppen ähnlich. Es sind die relativ vor- und ausdifferenzierten Zellen, die den Großteil der in Kultur gebrachten Zellen darstellen, diese sterben relativ schnell ab. Morphologisch (Trypanblaufärbung) stellen sie sich bei 48h noch als tote Zellen dar, nach 72h lassen sie sich überwiegend nicht mehr als Zellen ausmachen.

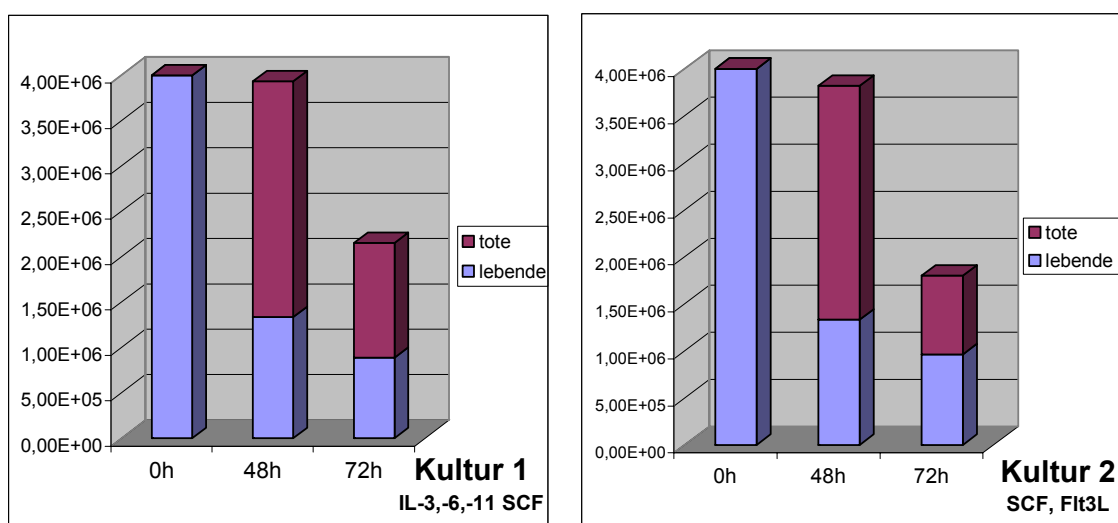


Abb. 7 Gesamtzahl transplantierter B6.SJL KM-Zellen vor bzw. nach Kultivierung. Die Zellzahlen entsprechen den für eine einzelne Maus eingesetzten bzw. letztlich transplantierten Zellzahlen. Die Vitalität der Zellen wurde durch eine Methylblaufärbung ermittelt. Es zeigen sich sinkende Zellzahlen, die nach 72h besonders durch den Wegfall der abgestorbenen Zellen zum Ausdruck kommt. Das Verhalten in beiden Kulturen ist ähnlich. Bei 72h werden geringfügig mehr vitale Zelle aus der SCF, Flt3L Kultur transplantiert.

Ob es unter den vitalen Zellen eine kleine Population SZ gibt, die sich im gleichen Zeitraum vermehrt hat, lässt sich anhand der Zellzahlbestimmungen (Abb. 7) nicht unmittelbar ablesen. Der Gehalt an SZ wurde mittels funktioneller Verfahren wie dem Mehtylzellulose-Assay und der *in vivo* Experimente bestimmt.

3.1.1.2 Zytologie

Neben der absoluten Zellzahl wurden die Zellen auch auf morphologische Veränderungen in nach Pappenheim gefärbten Zytospin-Präparaten untersucht. Im Verlauf der Kultur mit Zytokinen kommt es zu deutlichen morphologischen Veränderungen. Es fällt vor allem die Verschiebung des Zellbildes auf, mit deutlich mehr Vorläuferzellen, während die ausgereiften Zellelemente im Verlauf abnehmen (Abb. 8-12). Dabei lässt sich insgesamt feststellen, dass im Verlauf der 72h die Zellelemente aller Zellreihen erhalten bleiben, d.h. sowohl Elemente der Myelo-, der Erythro- und Megakaryopoese erkennbar sind. Der Einfluss der Kulturen auf die wirklichen SZ ist hingegen aufgrund der fehlenden morphologischen Zuordnungsmöglichkeit nicht eindeutig ableitbar.

Das native Knochenmark (Abb. 8) zeigt im Zytospin-Präparat einen typischen Befund. Im Präparat lassen sich die normalen Zellelemente der Hämatopoese in allen Reifungsstufen nachweisen. Quantitativ vorherrschend ist die Myelopoese. Hier sind neben den seltenen Myeloblasten viele Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, und Granulozyten zu finden. Die Granulozyten der Maus sind typischerweise ringförmig in ihrer Kernstruktur (engl. Donut-Shape). Daneben finden sich die Elemente der Erythropoese vom Proerythroblast zum Normoblast sowie vereinzelt Megakaryozyten.

Durch die Kultivierung verändert sich das Erscheinungsbild deutlich. Beiden Kultursystemen gemeinsam ist, dass jeweils die Anzahl der differenzierten Zellen sinkt. Nach 48h finden sich noch einige Granulozyten, während nach 72h kaum noch Granulozyten nachzuweisen sind. Die Stimulationen führen u.a. auch zu Bildung von jungen Megakaryozyten/Riesenzellen (Abb. 11 u. 12). Die Quantifizierung und nähere Charakterisierung dieser Zellen war jedoch nicht Ziel der Arbeit. Die Aktivierung der Zellen durch die Kultivierungen sind sehr deutlich in beiden Kulturen an der relativen Zunahme unreifer Zellen und dem Nachweis von Mitosefiguren auszumachen (siehe Abb. 9-12).

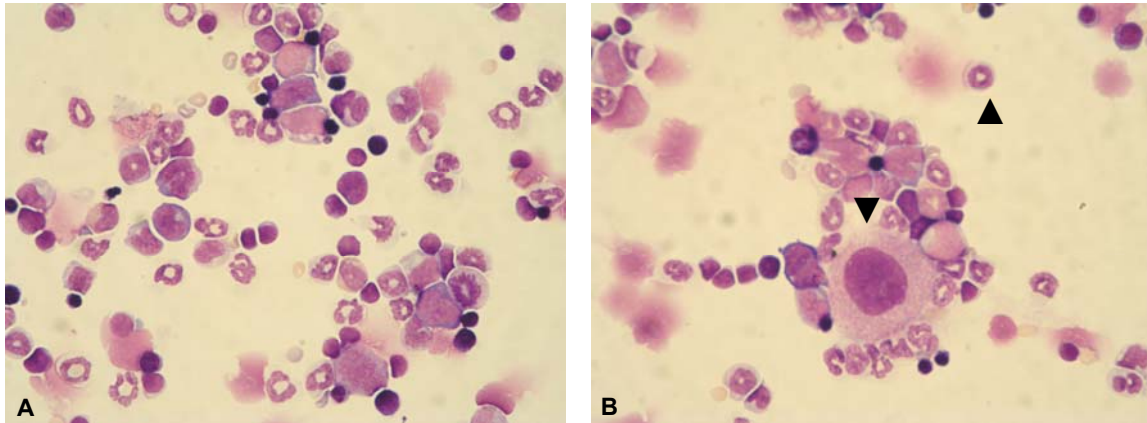
KM nativ

Abb. 8 Natives KM der B6.SJL Mäuse vor Kultivierung. Neben den Vorläuferzellen ist in Bild B auch ein Megakaryozyt (▼) zu sehen. Insgesamt kommen viele ausgereifte Zellen zur Darstellung: Granulozyten mit maustypischer Ringstruktur (▲), daneben finden sich Monozyten, Lymphozyten, Normozyten sowie fertige Erythrozyten.

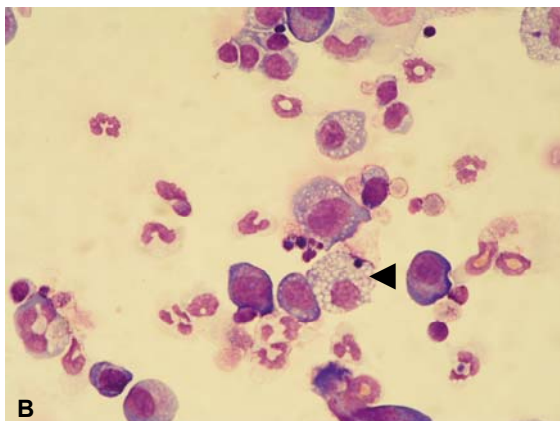
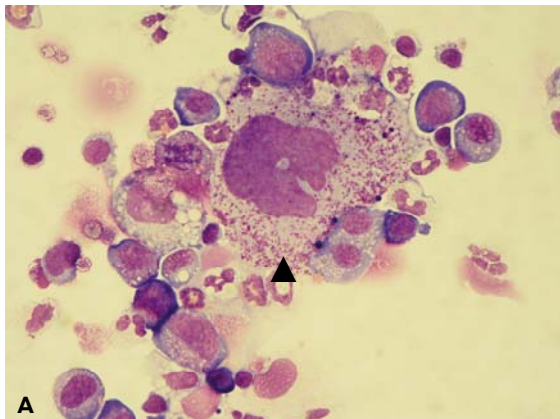
KM IL-3, -6, -11, SCF**48h**

Abb. 9 IL-3,-6,-11, SCF kultiviertes KM nach 48h. Es zeigt sich eine starke Aktivierung der Vorläuferzellen durch Zunahme der Granulierung und Vakuolisierung (◄), besonders ist dies an dem Megakaryozyten (▲) in Bild A im Vergleich zum nativen KM zu sehen.

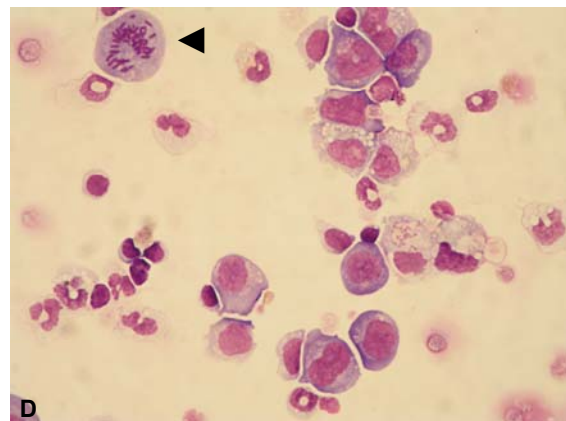
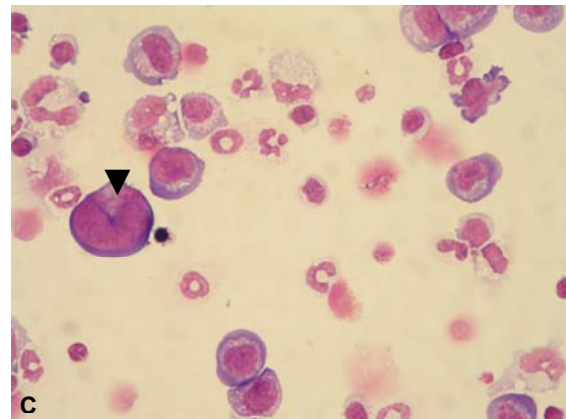
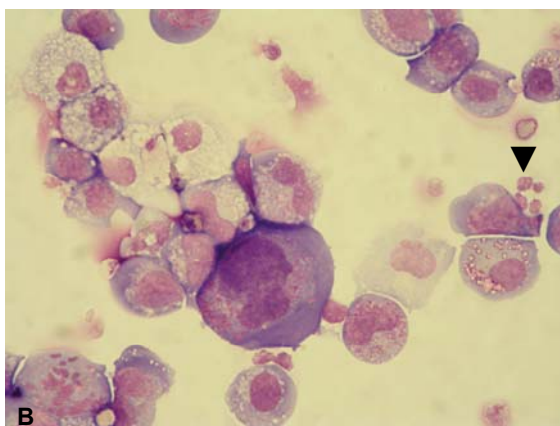
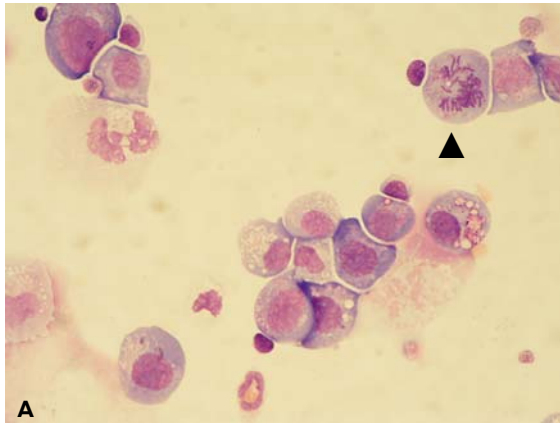
KM SCF, Flt3L**48h**

Abb. 10 SCF, Flt3L kultiviertes KM nach 48h. Die alternative Kultur zeigt ebenso eine starke Aktivierung, Zeichen sind hier eine Vergrößerung der Granulierung und das gehäufte Auftreten von Mitosen (◄). Der Anteil ausgereifter Zellen hingegen sinkt. In C ist ein Mikromegakaryozyt (▼) zu sehen.

KM IL-3, -6, -11, SCF

72h



KM SCF, Flt3L

72h

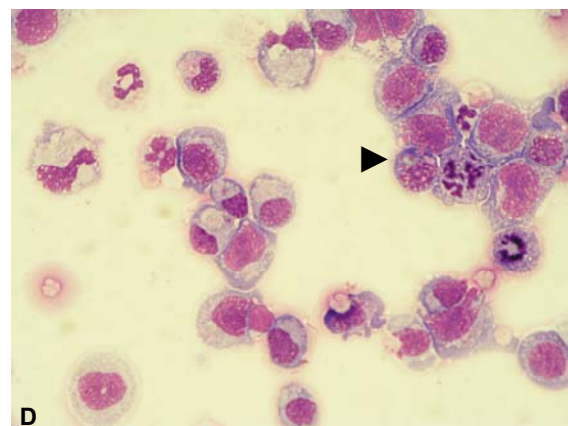
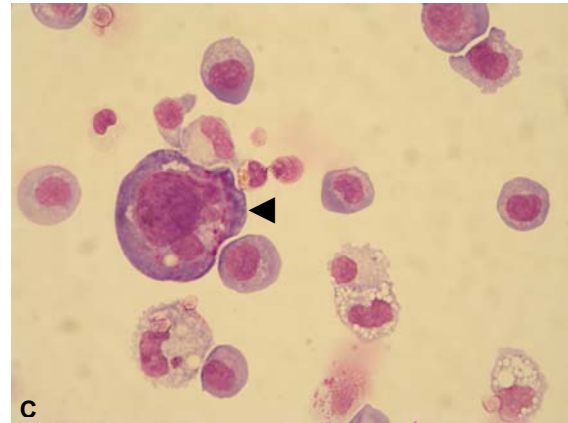


Abb. 11 IL-3,-6,-11, SCF Kultur nach 72h. Dominierend sind die Vorläuferzellen, sie nehmen von der Zellgröße noch weiter zu, Zellteilungen treten jedoch weiterhin auf (▲); vereinzelt finden sich auch Riesenzellen, die Merkmale der Aktivierung zeigen. Ausdifferenzierte Zellen treten hingegen kaum noch auf (▼).

Abb. 12 SCF, Flt3L Kultur nach 72h. Es zeigen sich noch immer die Merkmale der Aktivierung mit Granulierung und Vakuolisierung wie bei 48h (►), auch wenn die Aktivierung auf einem Plateau angekommen zu sein scheint. Riesenzellen (◄) finden sich auch in dieser Kultur.

Insgesamt ist es jedoch morphologisch nicht möglich, konkret Unterschiede zwischen der IL-3, -6, -11 und SCF stimulierten Kultur 1 und der zweiten Kultur mit SCF und Flt3L zu beschreiben. Eine Auszählung von Mitosen pro 1000 aktivierter Vorläuferzellen zeigt bei 48h eine etwas vermehrte Proliferation in der SCF, Flt3L Kultur mit 1,1% gegenüber 0,9% in der IL-3, -6, -11, SCF Kultur. Auch nach 72h tritt dieser Unterschied auf, allerdings auf einem niedrigeren Niveau mit 0,8% bzw. 0,6%. Ansonsten können die beschriebenen Veränderungen jeweils in beiden Gruppen gefunden werden. Einzig erscheinen die Präparate von Kultur 2 (SCF, Flt3L) beim Durchsehen mitunter ein etwas gleichförmigeres Zellbild zu haben, was sich aber nicht in einer auszählbaren Unterscheidbarkeit niederschlägt.

3.1.1.3 Stammzellexpansion mit Zytokinen im Methylzellulose-Assay

Die kultivierten KM-Zellen wurden in den Methylzellulose-Assay eingesetzt um ihre potenzielle Klonogenität, also die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien aller Zellreihen, zu testen. Die Auszählung der entstandenen Kolonien erlaubt die Abschätzung des Gehalts an Vorläuferzellen in der Kultur. Die Auswertung des Methylzellulose-Assays ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 Koloniebildung im Methylzellulose-Assay von KM nach Zytokinkultur, aufgeschlüsselt in die einzelnen Kolonietypen. Gezeigt wird dabei jeweils die Koloniegesamtzahl jeder Gruppe aus jeweils 8 Kulturschalen (flask). Das kultivierte KM zeigt in beiden Kulturen eine deutliche Konzentrierung an koloniebildenden Zellen gegenüber dem nativen KM. BFU-E *burst forming unit-erythroid*; CFU-GM *colony-forming unit granulocyte-macrophage*; CFU-GEMM *colony-forming unit granulocyte-erythroid-makrophage-megakaryocyte*.

	nativ	Kultur 1 SCF, IL-3,6,11			Kultur 2 SCF, Flt3L
	0h	48h	72h	48h	72h
Zellen je flask	20000	6650	4445	6650	4815
BFU-E	45	79	82	51	36
CFU-GM	364	525	568	628	770
CFU-GEMM	15	20	34	34	27
total	424	624	684	713	833

Zunächst lässt sich feststellen, dass die Vorläuferzellen nach beiden Kultivierungen die Fähigkeit zur Koloniebildung in allen Reihen des hämatopoetischen Systems behalten. Es zeigt sich, dass die Anzahl koloniebildender Zellen deutlich ansteigt. Auch der Anteil der einzelnen Kolonietypen verhält sich proportional zu den frischen KM-Zellen.

Eine längere Vorstimulation über 72h führt zudem zu einer deutlich gesteigerten Koloniebildung. Die Koloniezahlen für die mit SCF, Flt3L stimulierte Kultur sind höher, als die der IL-3, -6, -11, SCF Kultur. Die wachstumsbedingten absoluten Zellzahlverminderungen nach den Kulturen sind in dem Experiment berücksichtigt. Die pro Kulturschale eingesetzte Zellmenge steht in Relation zu den ermittelten Gesamtzellzahlen (siehe Abb. 7). So bedeutet dies für eine einzelne Kulturschale, dass für die native Kultur 20000 Zellen eingesetzt wurden, nach der entsprechenden Stimulation für 48 und 72h verblieben gemäß dem Wachstumsverhalten sehr viel weniger Zellen (im Falle der IL-3, -6, -11, SCF Kultur waren das 6650 Zellen nach 48h bzw. 4445 nach 72h). Der Methylzellulose-Assay zeigt aber, dass aus weniger eingesetzten vorab kultivierten Zellen mehr Kolonien entstehen. Dieser Anstieg ist für beide Kultivierungen im Vergleich zum nativen KM statistisch signifikant (p jeweils <0.0005 im Wilcoxon Test). Auch die vermehrte Koloniebildung der SCF, Flt3L Kultur nach 48h und 72h gegenüber der IL-3, -6, -11, SCF stimulierten Kultur ist signifikant (p jeweils <0.01).

3.1.2 Konkurrierende Repopulation frischer und zytokinkultivierter Knochenmarkzellen der Ptprc a/b kongenen C57BL/6 und B6.SJL Mäusestämme in letal vorbehandelte Empfängertiere

Die durchgeführten Transplantationsexperimente erlauben die Beurteilung der gesamten biologischen Funktionsfähigkeit von SZ, sich im KM einzunisten und im Verlauf zur Blutbildung beizutragen. In der internationalen Literatur wurde für diese komplexen SZ-Funktionen der Begriff „Engraftment“ geprägt, im Rahmen dieser Arbeit wird hierfür das Wort Repopulationsfähigkeit gebraucht werden. In diesen Experimenten werden kompetitive, also konkurrierende Repopulationsmodelle angewendet. Die Repopulationsanteile können durch die Bestimmung des Ptprc a/b Chimerismus (früher auch mit dem Namen Ly 5.1/ 5.2 bezeichnet) der Leukozyten im peripheren Blut, ihrer Herkunft nach bestimmt werden und zuverlässig entweder dem frischen KM der B6 Mäuse oder dem kultivierten KM der im Ptprc-Gen veränderten B6.SJL Mäuse zugeordnet werden (siehe auch Beschreibungen im Methodenteil 2.4.1, S.22). Das Oberflächenmerkmal des Ptprc-Gens wird nach der CD-Klassifikation mit CD45.1 (Ptprc^a) bzw. CD45.2 (Ptprc^b) beschrieben. Um zudem mögliche Veränderungen der roten Blutbildung und der Blutplättchen zu erkennen, werden in einem zweiten Abschnitt die murinen Blutbilder mit Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten dargestellt.

3.1.2.1 Kurzzeit- und Langzeit-Repopulation

Die Repopulation (Engraftment) des KM im Verlauf der Posttransplantationsphase erfolgt durch individuell unterschiedliche Ausgangszellen (clonal succession). Dabei werden in der Transplantationsterminologie vor allem kurzzeitrepopulierende von langzeitrepopulierenden SZ unterschieden. Erstere führen nach der therapiebedingten Hypoplasie des KM zur ersten Regeneration der Hämatopoese. Diese Zellklone lassen sich jedoch Monate nach der Transplantation nicht mehr nachweisen. Statt dessen erfolgt dann die dauerhafte Repopulation aus den langzeitrepopulierenden SZ, die erst Wochen bis Monate nach der Transplantation nachweisbar zur Blutbildung beitragen, diese jedoch dann dauerhaft erhalten.

Um zwischen der Kurzzeit- und Langzeit-Repopulationsfähigkeit (engl. short-term bzw. long-term Engraftment) zu unterscheiden wurden die Betrachtungen sowohl nach 17 Tagen [17d] als auch nach 19 Wochen [19w] durchgeführt. Diese komplexen Ergebnisse sind kompakt in den Grafiken für die Kurzzeit-Repopulation (Abb. 13) und Langzeit-Repopulation (Abb. 14) zusammengefasst und gemeinsam im direkten Vergleich in Abb. 15 dargestellt. Es wird dabei die anteilige Repopulation der kultivierten Ptprc^a KM-Zellen dargestellt, der komplementäre, nicht dargestellte Anteil geht von den kompetitiv mittransplantierten frischen Ptprc^b KM-Zellen aus. Die Balken in den Grafiken stellen jeweils den Anteil der CD45.1-positiven (Ptprc^a) Zellen des peripheren Leukozytenpool dar. Die Erläuterung der Versuchsgruppen findet sich in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Versuchsgruppen im Transplantationsexperiment in myeloablatierte B6 Mäuse. Die Kompetition gibt das Verhältnis der transplantierten frischen B.6 KM-Zellen zu den in die Kultur eingesetzten B6.SJL KM-Zellen an. Für die Kontrollgruppe B werden hier nicht kultivierte B6.SJL-Zellen als konkurrierendes Transplantat zu den B6 KM-Zellen in die Maus injiziert. In den übrigen Gruppen C-F sind es die entsprechend kultivierten B6.SJL Zellen, die mit den frischen B6 Zellen konkurrieren. Die (nicht bestrahlten) Tiere der Gruppe G erhalten lediglich eine volumengleiche Injektion mit PBS. Siehe auch Methodenteil 2.3.

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G
Kompetition (B6.SJL:B6)	100:0	50:50	50:50	50:50	50:50	50:50	PBS
Kultur 1 (SCF, Flt3)			48h	72h			
Kultur 2 (IL-3,-6,-11, SCF)					48h	72h	

Die Empfängertiere der (Kontroll-) Gruppe A erhielten 100% CD45.1-positive KM-Zellen transplantiert, es zeigt sich eine nahezu komplett aus dem Transplantat stammende Repopulation. Die minimalen Abweichungen von 100% (0,13 und 0,04% siehe Abb. 13 u. 14) könnten methodologischer Natur sein oder zirkulierenden Zellen (wie alten Lymphozyten oder mesenchymalen Zellen) der Empfängertiere entsprechen. In Gruppe A konnte somit eine vollständige Myeloablation und Konversion in den Spendertyp durch das Transplantat gezeigt werden. Die ursprünglichen Stammzellen wurden durch die Bestrahlung zerstört, eine Restfunktion besteht nicht. Hingegen zeigten Mäuse der Gruppe G, die nicht bestrahlt wurden und lediglich eine PBS-Injektion bekommen haben, einen reinen Empfängertyp. In Gruppe B wurde frisches unkultiviertes B6-KM und B6.SJL-KM zu gleichen Teilen gemischt und transplantiert. Erwartungsgemäß zeigt sich jeweils für Kurz- und Langzeitrepopulation eine mit ~53 und ~55% ausgeglichene Kompetition (Abb. 13 u. 14). Neben der Funktionstüchtigkeit des kompetitiven Transplantationsmodell stellen diese oben genannten Gruppen auch einen Indikator für die Genauigkeit der Versuchsdurchführung dar (Umgang mit kleinen Flüssigkeitsmengen, Zellzählung etc.).

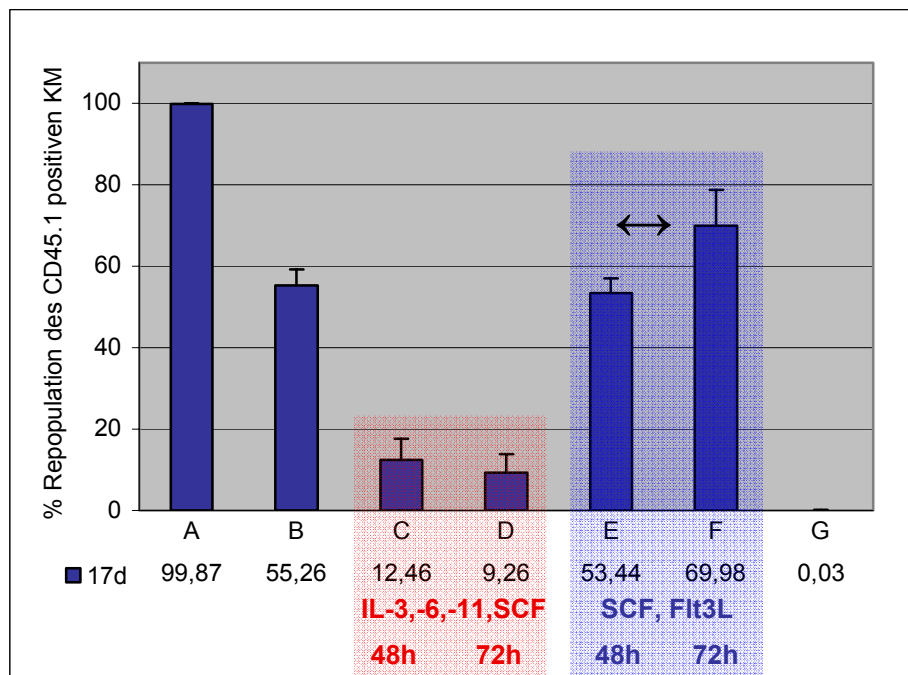


Abb. 13 Kurzzeit-Repopulationsfähigkeit 17 Tage [d] nach Transplantation. Die Grafik zeigt die jeweiligen Transplantationsgruppen mit dem Prozentsatz der peripheren Leukozyten, die sich aus dem CD45.1-positiven; also kultiviertem B6.SJL Knochenmark generiert haben. Angegeben werden die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken. In den Kontrollgruppen A und G sind die Standardabweichungen so gering, daß sie graphisch mit dem Prozentbalken zusammenfallen. In der Tab. 8 sind die Versuchsgruppen nochmals aufgeschlüsselt. Die Repopulationsfähigkeit der IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Gruppen ist deutlich vermindert. Der Pfeil hebt den Repopulations-Unterschied zwischen einer 48 und 72stündigen Kultivierung mit SCF und Flt3L in der Kurzzeit-Repopulation hervor.

Die Versuchsgruppen C-F mit entsprechend kultiviertem KM und dem frischen KM im Transplantat zeigen deutliche Abweichungen von der Referenzgruppe B. Sehr auffällig ist die deutlich verminderte Repopulationsfähigkeit der mit IL-3, -6, -11 und SCF stimulierten Gruppen C und D, sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeit-Betrachtung (Abb. 13 u. 14). Die in Abb. 13 dargestellte Kurzzeit-Repopulationsfähigkeit dieser Gruppen zeigt sich für die über 48h IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Zellen deutlich vermindert, 17d nach der Transplantation stammen lediglich ~13% der Blutzellen von diesem KM ab. Für die 72h lang kultivierten Zellen stellt sich der Funktionsdefekt mit nur ~9% Repopulation noch ausgeprägter dar.

Eine 48 stündige Kultur mit SCF, Flt3L hingegen zeigt für die Kurzzeit-Repopulation (Abb. 13), also nach 17 Tagen, eine im Vergleich zu frischen KM-Zellen erhaltene Repopulationsfähigkeit von ~53%. Die 72h Kultur mit SCF, Flt3L führt zu einer Expansion des SZ-Pools mit einer anteiligen Repopulation der kultivierten Zellen von ~70% (Abb.13, Gruppe D). Dieser Unterschied in der Kurzzeit-Repopulationsfähigkeit zwischen der 48h und 72h Kultur (Pfeil Abb.13) ist im T-Test mit einem $p < 0.01$ signifikant.

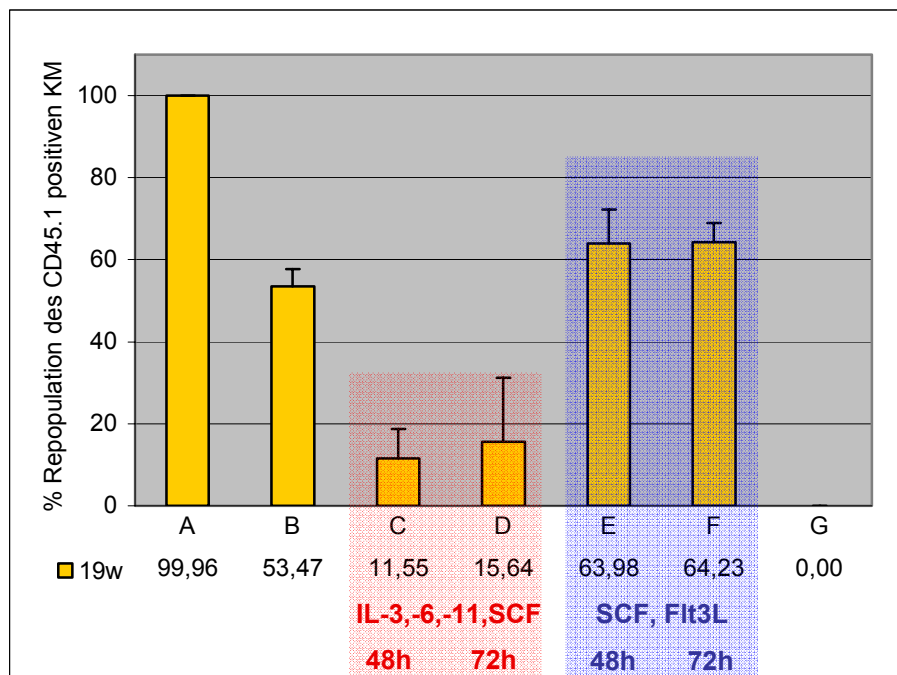


Abb. 14 Langzeit-Repopulationsfähigkeit 19 Wochen [w] nach Transplantation. Die Grafik zeigt die jeweiligen Gruppen mit dem Prozentsatz der peripheren Leukozyten, die sich aus dem CD 45.1-positiven, also kultiviertem B6.SJL Knochenmark, generiert haben. Angegeben werden die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken. In den Kontrollgruppen A und G sind die Standardabweichungen so gering, dass sie grafisch mit dem Prozentbalken zusammenfallen. In Tab. 8 sind die Versuchsgruppen nochmals aufgeschlüsselt. Die defekte Repopulationsfähigkeit der IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Zellen gegenüber der SCF, Flt3L Kultivierung tritt deutlich hervor.

Für die langzeitrepopulierenden SZ (gelbe Balken, Abb.14) der IL-3, -6, -11, SCF Kultur findet sich ein ähnlich ausgeprägter Repopulationsdefekt wie im Kurzzeit-Verhalten. Die anteilige Repopulation liegt bei der 48h Kultivierung bei ~12% bzw. ~16% für die 72h Kultur. Im Gegensatz dazu erweisen sich die mit SCF und Flt3L stimulierten Zellen, die in den Gruppen E und F dargestellt sind, als erheblich potenter. Wie schon in der Kurzzeit-Repopulation zeigt sich auch nach 19 Wochen eine erhaltene Repopulationsfähigkeit gegenüber unkultivierten CD45.1-positiven Zellen der Gruppe B. Das Langzeit-Potenzial der repopulierenden Zellen (Abb. 14) zeigt sich in der 48h Kultur mit SCF und Flt3L mit ~64% expandiert (Gruppe E). Dafür kommt es bei einer längeren Kultivierung von 72h in Gruppe F nicht zu einer weiteren Steigerung (~64%) wie dies in der Kurzzeit-Repopulation der Fall ist. Es besteht in der Langzeit-Repopulation also kein Unterschied bei unterschiedlichen Kultivierungszeiten für die SCF, Flt3L Kultur.

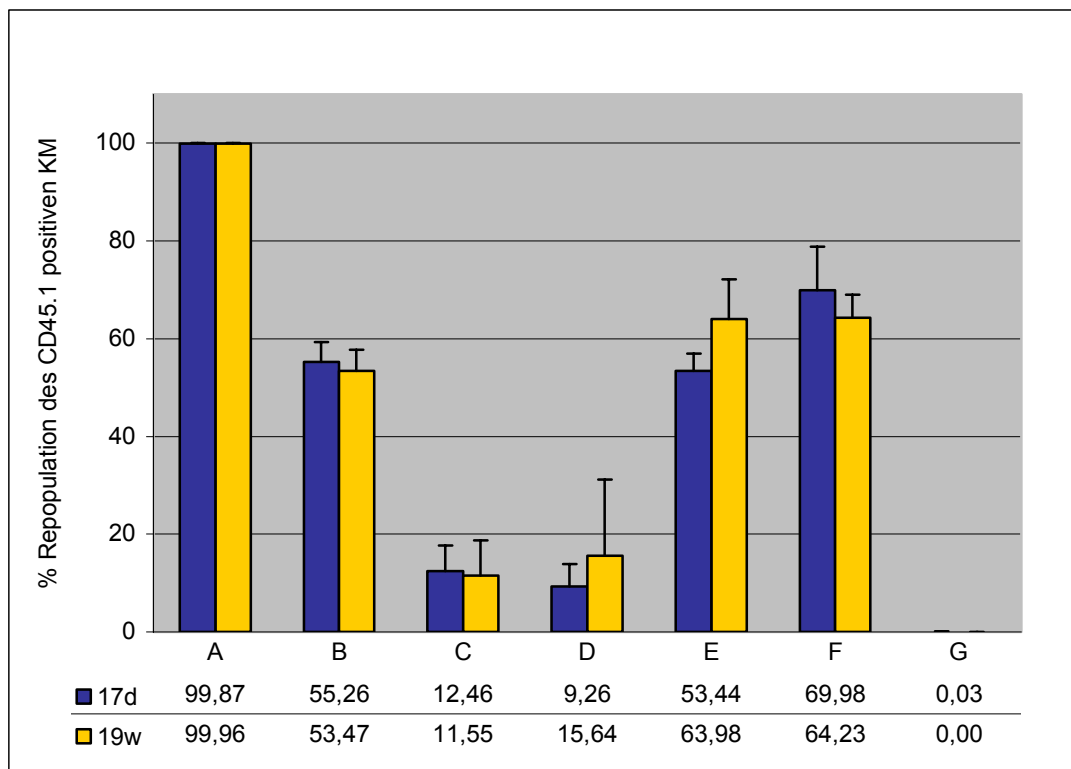


Abb. 15 Repopulation bei kompetitiver KM-Transplantation anhand des Ptprc-Chimerismus. Die Grafik zeigt die jeweiligen Gruppen mit dem Prozentsatz der peripheren Leukozyten, die sich aus dem CD45.1-positiven, also kultiviertem B6.SJL-Knochenmark, in den Empfängermausen generiert haben. Die Kurzzeit-Repopulationsfähigkeit nach 17 Tagen ist dabei blau und die Langzeit-Repopulationsfähigkeit nach 19 Wochen orange dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken den Mittelwerten aufgesetzt. In den Kontrollgruppen A und G sind die Standardabweichungen so gering, dass sie grafisch mit dem Prozentbalken zusammenfallen. Sowohl nach 17 Tagen, als auch nach 19 Wochen zeigen die IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Zellen (C; D) eine deutlich verminderte Repopulationsfähigkeit im Vergleich zu den SCF, Flt3L kultivierten Zellen der Gruppen E und F. In Tab. 8 sind die Versuchsgruppen aufgeschlüsselt.

Abbildung 15 zeigt den direkten Vergleich zwischen Kurzzeit- und Langzeit-Repopulation. Es stellt die gleichartig defekte Repopulation der IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Gruppen C und D (p jeweils ≤ 0.0015 im t-Test gegenüber B) dar. Diese Ergebnisse bestätigten sich in Wiederholungsexperimenten. Das trifft auch für das mindestens erhaltene Engraftment bei Stimulation mit SCF und Flt3L in den Gruppen E und F zu – die somit belegen, dass der Repopulationsdefekt aufhebbar ist. Der Unterschied zwischen den Gruppen E und F in der Kurzzeit-Repopulation zwischen 48h und 72h Kultivierung (Pfeil Abb. 13) erwies sich in unabhängigen Experimenten nicht konstant signifikant unterschiedlich.

3.1.2.2 Blutbilder nach Transplantation

Im Folgenden werden die ausgewählten Parameter Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl aus den Blutbildern der Mäuse dargestellt. Die Zeitpunkte und Gruppenbezeichnungen (siehe Tab. 8) entsprechen denen im vorangestellten Abschnitt über das Repopulationsverhalten.

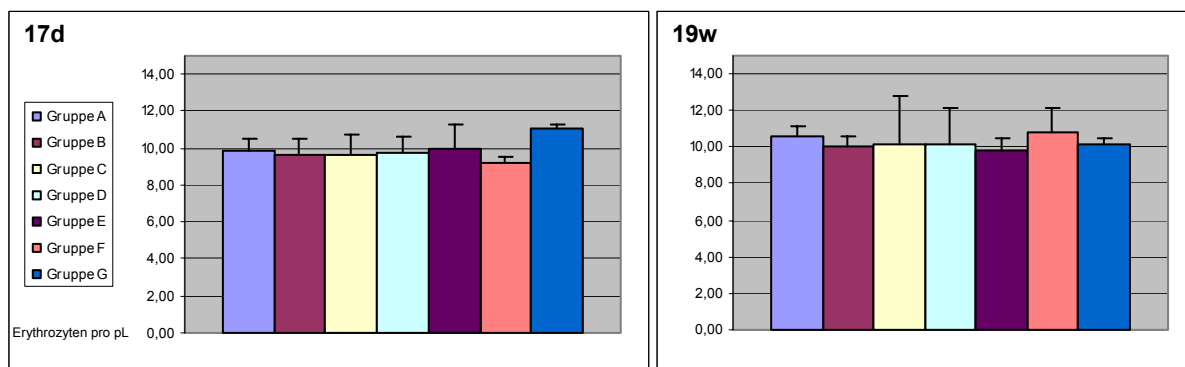


Abb. 16 Erythrozyten, angegeben in Erythrozytenzahl pro pL nach kompetitiver KM-Transplantation. Nach 17 Tagen [17d] sind normwertige Erythrozytenlevel zu finden, gleiches gilt für die Betrachtung nach 19 Wochen [19w]. *Bemerkung:* das Erythrozytenvolumen liegt bei Mäusen bei nur 50 fl, womit sich die deutlich höheren Erythrozytenzahlen als beim Menschen erklären.

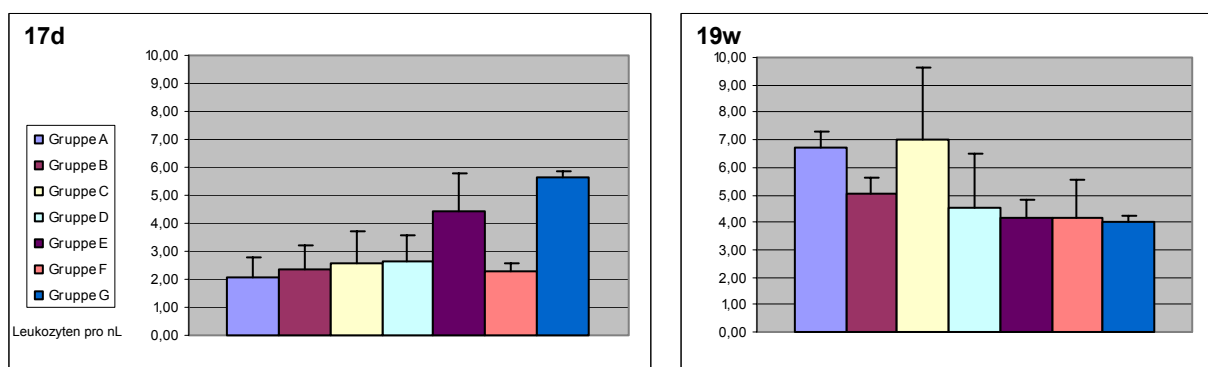


Abb. 17 Leukozyten, angegeben in Leukozytenzahl pro nL nach kompetitiver KM Transplantation. Die dargestellten Leukozytenzahlen unterliegen nicht unüblichen Schwankungen, dennoch liegen tendenziell in den bestrahlten Gruppen A-F nach 17 Tagen noch verminderte Leukozytenlevel vor. Nach 19 Wochen besteht in keiner Gruppe eine Leukopenie.

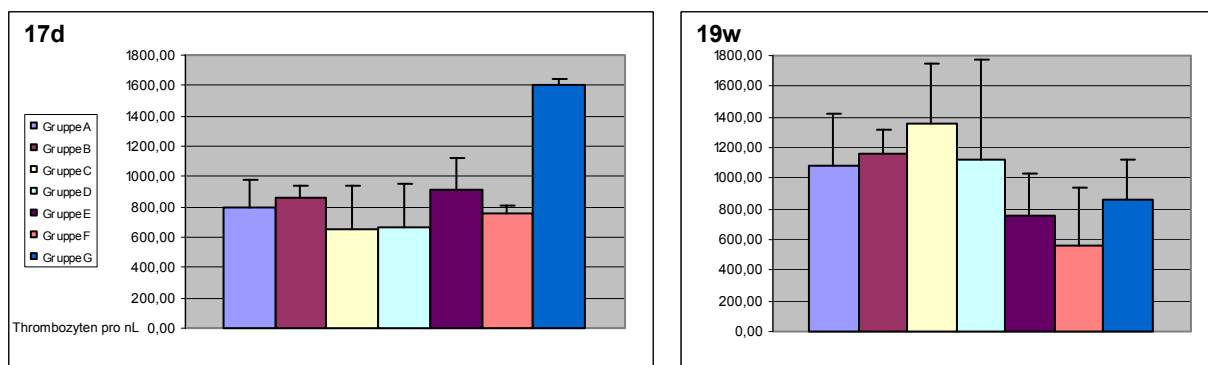


Abb. 18 Thrombozyten, angegeben als Thrombozytenzahl pro nL nach kompetitiver KM Transplantation. Es zeigen sich keine Defizite in der Thrombozytenbildung im peripheren Blut. Die hohen Werte in der nicht bestrahlten Kontrollgruppe G (dunkelblau) bei 17 Tagen sind wohl kaum von Bedeutung.

Die Messung der Blutbilder zeigt, dass die Regeneration des KM nach 17 Tagen im wesentlichen abgeschlossen ist. Sowohl für Erythrozyten- und Thrombozytenwerte zeigen sich schon nach 17 Tagen normale Befunde für alle Gruppen. Auch nach 19 Wochen finden sich anhaltend Normalwerte. Die Leukozytenzahlen hingegen liegen nach 2 ½ Wochen noch unterhalb der Normalwerte. Sie erholen sich nach 19 Wochen. Insgesamt lässt sich jedoch eine gute Regeneration schon nach 17 Tagen feststellen; die Transplantationstiere zeigen keine Dysplasie.

3.2 Zellpopulationen zu molekularer Charakterisierung von Stammzellfunktionen

Um die biologischen Einflüsse von Zytokinen auf molekularbiologisch–zellulärem Niveau untersuchen zu können, benötigt man ausreichend verfügbare homogene Ausgangspopulationen. Zur experimentellen Klärung dieser Einflüsse auf molekularer Ebene werden häufig Zelllinien, wie die homogene FDCP1 Zelllinie verwendet. Diese ist aus der Kultivierung von murinem KM hervorgegangen (siehe auch 2.1.4). Neuere Bemühungen beziehen sich auch auf purifizierte Zellpopulationen, dabei sind relativ heterogene, noch schwer isolierbare SZ-Populationen wie die $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Population von größter Bedeutung (siehe auch Einleitung 1.5). In dieser Arbeit wurden für die geplanten umfangreichen Analysen, die eine Erklärung für den gefundenen Repopulationsdefekt in den Transplantationsexperimenten liefern sollten, die $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellpopulation in die Überlegungen miteinbezogen. Für den Sca-Marker gibt es stark und schwach exprimierende Mausstämme. In Abb.19 ist das starke Expressionsmuster bei KM-Zellen aus C57BL/6 Mäusen nach Isolierung über 2 Säulen deutlich zu sehen, allerdings finden sich unter den Sca-positiven nur ein geringer Anteil ($\sim 5\%$) lineage-negativer Zellen. Die

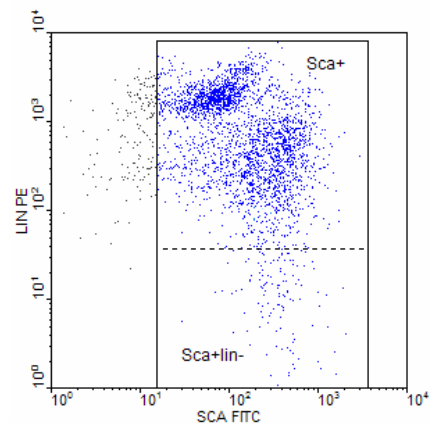


Abb. 19 KM aus C57BL/6 Mäusen. Isolation nach dem Sca-Antigen über 2 Säulen. Bei guter Aufreinigung zeigt sich unter den Sca^+ Zellen mit $\sim 5\%$ nur ein geringer Anteil der $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zielpopulation.

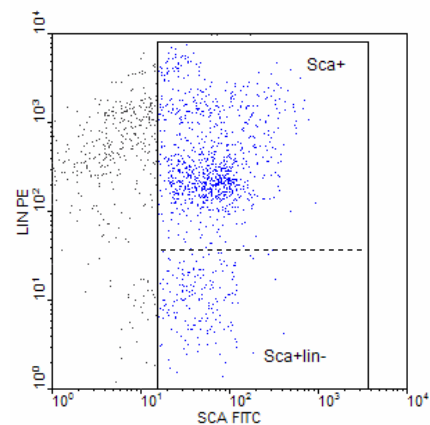


Abb. 20 KM aus Balb/c Mäusen. Isolation nach dem Sca-Antigen über 2 Säulen. Bei guter Aufreinigung zeigt sich unter den Sca^+ Zellen mit $\sim 22\%$ ein vergleichsweise großer Anteil der $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zielpopulation.

Gesamtausbeute $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellen aus einer einzelnen Maus liegen ca. bei $7,5 \times 10^4$ Zellen. Balb/c Mäuse gehören zu den schwach exprimierenden Mausstämmen für den Sca-Marker, so ist auch nach der Isolation nur ein sehr viel kleinerer Anteil an Zellen vorhanden. Interessanterweise ist jedoch der Anteil an den gesuchten lineage-negativen Zellen im Sca^+ -Isolat wesentlich größer (~22%, siehe Abb. 20). Insgesamt kommt man zu etwa gleicher Ausbeute an $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellen nach der lineage Depletion bei beiden Mausstämmen. Es wäre zu diskutieren ob der Sca-Marker für sich allein bei Balb/c Mäusen sogar einen höherwertigeren SZ-Marker darstellt, als bei stark exprimierenden Mausstämmen wie dem C57BL/6 Mausstamm.

Die weiteren Berechnungen für die geplanten Versuche ergaben unter den gegebenen technischen Möglichkeiten in unseren Labor einen Bedarf an 9×10^6 $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellen für ein einzelnes Experiment (RNA-Analysen und Durchflusszytometrie der AM), dies entspricht einem Bedarf von ca. 120 Mäusen. Es würden also mit Wiederholungsexperimenten mehrere Hundert Versuchstiere zusätzlich gebraucht. Dabei muss womöglich noch von einem höheren Bedarf an Versuchstieren ausgegangen werden, da Vorläuferzellen nur sehr geringere Mengen an RNA ergeben. Die Gesamtschau dieser Berechnung und die Möglichkeiten einer Realisation eines solchen Tierantrags führten zu der Folgerung, dass sich ein solches Experiment unter den derzeit gegebenen Forschungsbedingungen mit $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellen nicht verwirklichen lässt. Da selbst Daten einer heterogenen $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellpopulation günstigerweise an einer homogenen Population nachvollzogen werden sollten, griffen wir auf die FDCP1 Zellen zur Versuchsdurchführung zurück (siehe auch Diskussion Abschnitt 4.4. in dem die Wertigkeit von purifizierten SZ behandelt wird). FDCP1 Zellen wurden u.a. auch für die Beschreibung von Veränderungen von AM bei Zytokinkultivierung gebraucht.⁹⁰ Die Versuchsdurchführung wurde durch die Verwendung der FDCP1 Zellen gesichert und der Bedarf an Versuchstieren so auf die Transplantationsexperimente beschränkt.

3.3 Expression der AM in der hämatopoetischen Zelllinie FDCP1

3.3.1 Wachstumsverhalten

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der FDCP1 Zellen unter entsprechender Zytokinstimulation zeigte charakteristische Wachstumskurven wie in Abb. 21 abgebildet. Den Versuchsgruppenⁱⁱ A bis F wurde neben den unterschiedlichen Zytokinen das für die FDCP1 Zelllinie prinzipiell notwendige IL-3 zugegeben. In den jeweils getrennt dargestellten Versuchsgruppen G bis L wurde den Zellen das IL-3 vorenthalten.

Die Zytokinkulturen der Transplantationsexperimente sind hier für die (IL-3), IL-6, -11, SCF-stimulierten Zellen die Gruppen C und I, sowie für SCF, Flt3L die Gruppen D und J. Die Kontrollgruppen A und G sowie F und L entsprechen sich. A und G zeigen die normalen Kulturbedingungen mit IL-3; F und L zeigen das Wachstum in Medium ohne Zusätze. Die genaue Aufteilung der Versuchsgruppen ist am Ende dieses Absatzes in Tab. 8 aufgeschlüsselt.

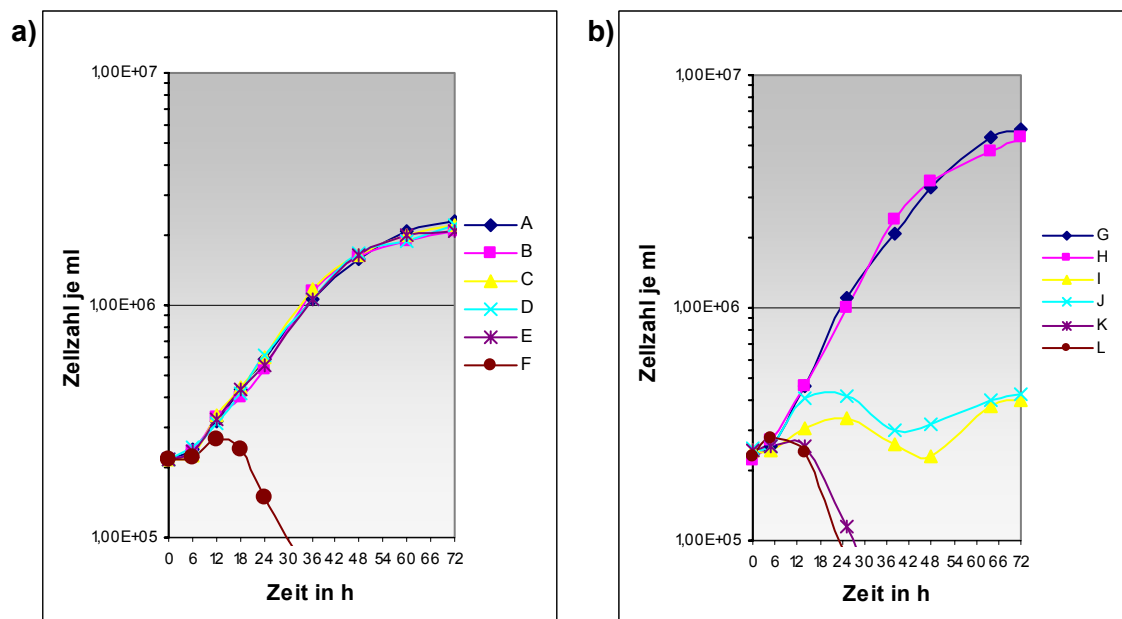


Abb. 21 FDCP1 Wachstumskurven. Die aus kultiviertem KM entstandene Zelllinie ist in ihren Wachstum IL-3 abhängig. a) zeigt das Wachstumsverhalten der Versuchsgruppen unter Gabe von IL-3. Zusehen sind keine zusätzlichen Effekte, Kontrolle F erhielt kein IL-3. Die genaue Aufschlüsselung der Gruppen ist aus Tab.8 zu entnehmen. In b) wird außer für Kontrollgruppe G kein IL-3 zugegeben. FDCP1 Zellen wachsen ohne IL-3 nur bedingt. GM-CSF vermag IL-3 zu substituieren (H), die Kultur mit IL-6, -11, SCF (I) und SCF, Flt3L (J) ergeben ein schwankendes Wachstum, während SDF1 α (L) keinen positiven Einfluss auf das Wachstum nimmt.

Anhand der Wachstumskurven (Abb. 21) zeigt sich für die FDCP1 Zelllinie unter Stimulation mit IL-3 eine exponentielle Wachstumskurve, die nach 72h eine Zellzahl

ⁱⁱ Die durchgehend verwendete Bezeichnung der Versuchsgruppen A bis L der FDCP1 Experimente entsprechen in der Nomenklatur nicht den Gruppen A bis G der Transplantationsexperimente.

von $\sim 2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ erreicht. Die Zugabe von zusätzlichen Zytokinen neben IL-3 erwirkt keine Veränderung des Wachstumsverhalten der FDCP1 Zelllinie. Die Zellen der Kontrollgruppe F ohne die Zugabe von IL-3 sterben ab und belegen damit die IL-3-Abhängigkeit. Es ist wahrscheinlich, dass die Zelllinie sich jeweils unter optimalen Bedingungen maximal teilt und eine Zugabe von Zytokinen keine weitere Steigerung des Wachstums zulässt.

Alternativ wurden die Zytokine getrennt, unter Auslassung des IL-3, untersucht (Abb. 21). Hier zeigt sich für die Gruppen G und H wieder eine maximale Stimulierung und interessanterweise für die Gruppen I und J eine Erhaltung der Zellzahl ohne Anhalt auf erhöhte Apoptoseinduktion. Das DMEM-Medium allein oder die Zugabe von SDF1 α in Gruppe K bzw. L erhält die Zellen nicht länger und führt zum Absterben.

Tabelle 9 FDCP1 Versuchsgruppen im Stimulationsversuch. Die Zugabe der Zytokine ist jeweils durch ein x gekennzeichnet. Die Kontrollgruppen A, G und F, L entsprechen sich. Für die genauen Zytokinkonzentrationen siehe Material und Methoden 2.2.6.

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
IL-3	x	x	x	x	x		x					
GM-CSF		x						x				
IL-6,-11,SCF			x						x			
SCF, Flt3L				x						x		
SDF1 α					x						x	

3.3.2 Zellzyklus

In den Versuchsreihen wurde durchflusszytometrisch eine Zellzyklusanalyse jeweils nach BrdU-Inkorporierung durchgeführt, wie ausführlich im Methodenteil unter 2.4.3 beschrieben. Die erhobenen Daten sind zur besseren Übersicht in Balkendiagrammen in Anhang 2 abgebildet. Die Gruppen A bis E zeigen ein ähnliches Zellzyklusverhalten, das ihrer Wachstumskurve entspricht. Zunächst, während der Konditionierung des Mediums, nimmt der Anteil der Zellen in $G_{0/1}$ zu. Es treten wenige Zellen in die S-Phase ein. Danach, bei 12h entsprechend der Log-Phase in der Wachstumskurve, kommt es zu einer starken Proliferation mit einem hohen Zellanteil in der S-Phase, während sich beim Erreichen der Plateau-Phase das Bild wieder umkehrt; wenige Zellen treten in die frühe Synthese-Phase ein und es kommt zu einem entsprechenden höheren Anteil in $G_{0/1}$ und G_2 . In Gruppe F sind die spärlich überlebenden Zellen abgebildet, die im Verlauf kaum mehr in den Zellzyklus eintreten und in $G_{0/1}$ verweilen. Es kommt also zu einem $G_{0/1}$ -Arrest.

Aufgrund des Versuchsumfangs wurden die Gruppen G bis L in einem separaten Experiment gemessen. Im Vergleich zu den Gruppen A und B des ersten

Experimentteils wurde in den Gruppen G und H bei 72h ein höherer Zellanteil in $G_{0/1}$ gefunden. Dies ist bedingt durch eine etwas höhere Ausgangszellzahl und somit höherer Gesamtzellzahl zu den folgenden Zeitpunkten. Die GM-CSF stimulierte Gruppe H verhält sich dabei in ihrem Zyklusverhalten wie die entsprechenden IL-3 substituierten Zellen. Gruppe K ($SDF1\alpha$) stirbt wie Gruppe L (ohne Zytokinzusatz) ab. Die Gruppen I (IL-6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L) zeigen hingegen einen andersartigen Verlauf. Bei 6 h zeigt sich ein vermehrter Eintritt in den Zellzyklus (wohingegen alle anderen Gruppen hier ein zumindest vorläufig abgeschwächtes Wachstum zeigen). Darauf folgt jedoch eine erheblich abgeschwächte Proliferationsprofil mit einem Anteil von knapp 65% der Zellen in G_1 bei 24h, ehe es wieder zu einem Anstieg der Proliferation kommt, in noch relativ unverbrauchtem Medium.

3.3.3 Durchflusszytometrie der Adhäsionsmoleküle

Die Untersuchung am Durchflusszytometer erlaubt eine zeitnahe Beurteilung von Oberflächenmerkmalen auf Einzelzell-Niveau. Sie bietet auch die Möglichkeit einer quantitativen Analyse anhand der mittleren Fluoreszenzstärke, sowie den bildhaften Eindruck der Fluoreszenzpeaks. In Abbildung 22 und 23 sind für die einzelnen Zeitpunkte und Gruppen Histogramme dargestellt. Die Isotypkontrolle (bzw. nicht markierten Zellen siehe Material und Methoden 2.4.2) sind als grauer Referenzpeak zu sehen. Die Fluoreszenz der jeweiligen spezifischen Phycoerythrin [PE] gebundenen AK ist auf der X-Achse in einer logarithmischen Skala abgebildet, während die Y-Achse die Häufigkeit der Zellereignisse angibt. Es wurden jeweils 5000 Ereignisse gemessen, was bedeutet, dass die Fläche unter der Kurve jeweils gleich ist. Für die Y-Achse wurde dabei eine freie Skalierung gewählt. Die X-Achse reicht von 0 bis 10^3 . Die Versuchsgruppenbezeichnungen sind übereinstimmend, wie in den vorangehenden Darstellungen für das Wachstum- und Zellzyklusverhalten, verwendet (siehe Tab.9).

Die Gruppen A bis E zeigen schon wie im Zellzyklusverhalten und Wachstumsverlauf ein gleichartiges Verhalten, da sie das essenziell notwendige IL-3 erhalten. Die AM werden durchgehend für 48h exprimiert. Zum Zeitpunkt 72h kommt es bei großer Zelldichte zu einer, vermutlich Zellkontakt induzierten, Runterregulation von CXCR4 und $\alpha 4$. Der $\alpha 5$ -Peak bleibt unverändert. Leichtere Verschiebungen lassen sich in Gruppe E finden. Das in dieser Gruppe zugeführte $SDF1\alpha$ scheint seinen Rezeptor CXCR4 nach 6h leicht runter zu regulieren, was im zeitlichen Verlauf später kaum mehr auszumachen ist.

Die apoptotischen Zellen von Gruppe F, die allein in Medium kultiviert sind, zeigen eine progrediente CXCR4 Hochregulation und eine größere Fluoreszenzvariation der $\alpha 4$

Expression bei 24h. Diese Zellen befinden sich in der Apoptose und können zu späteren Zeitpunkten nicht sinnvoll weiter untersucht werden.

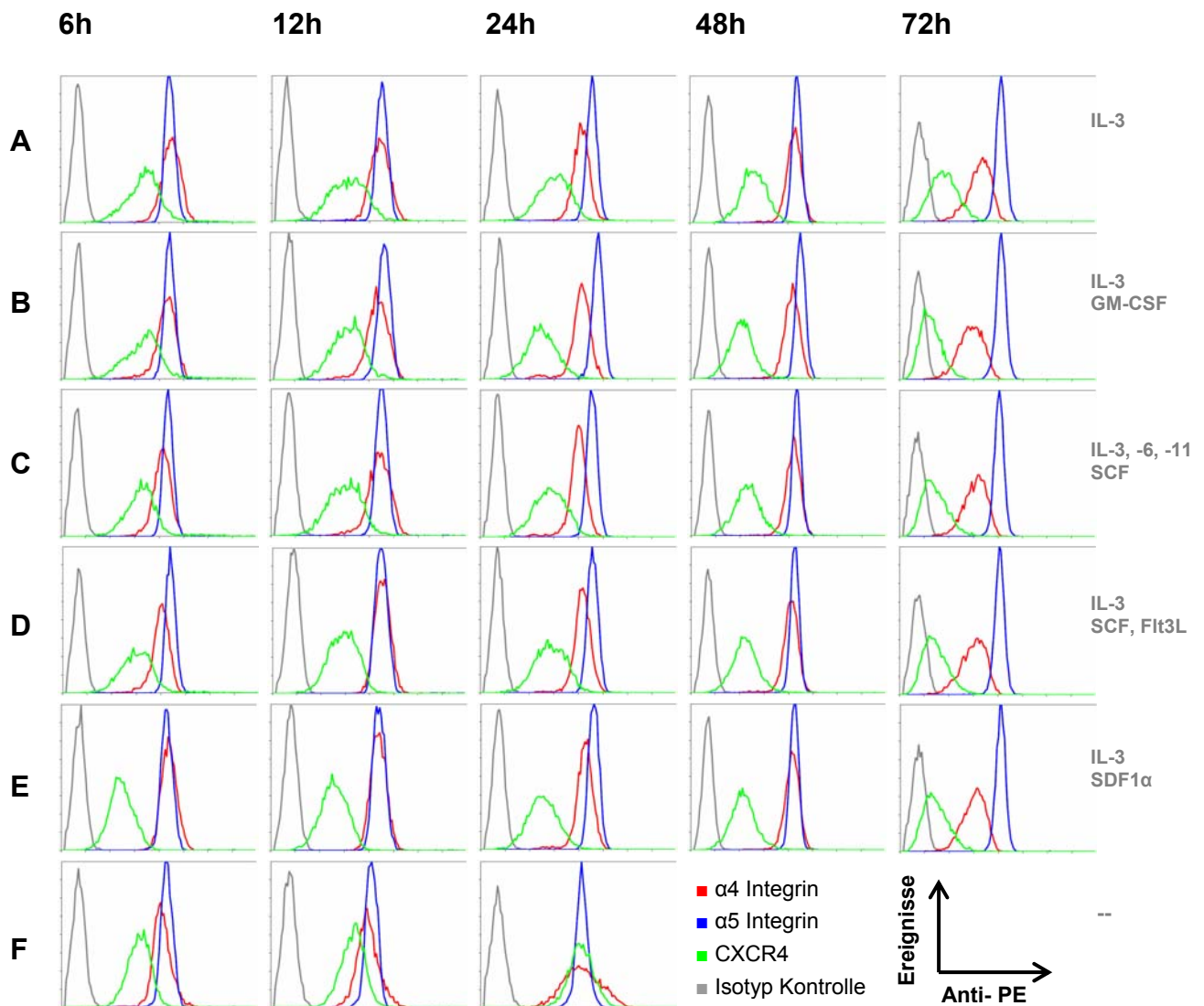


Abb. 22 Durchflusszytometrische Messung der $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4 Expression auf FDCP1 Zellen. Die einzelnen AM sind farbig dargestellt $\alpha 4$ (rot), $\alpha 5$ (blau) und CXCR4 (grün), die entsprechende Kontrolle ist in grau gezeigt. In den Histogrammen sind jeweils insgesamt 5000 Ereignisse von FDCP1 Zellen für jede Markierung abgebildet auf einer frei skalierten Y-Achse, während auf der X-Achse logarithmische Werte für die Fluoreszenz von 0 bis 10^3 abbildet werden. Die jeweils mit IL-3 substituierten Gruppen A bis E zeigen einen gleichartigen Verlauf. Konstante Expression der AM mit einer Abschwächung bei hoher Zelldichte des CXCR4 sowie des $\alpha 4$ -Moleküls. Die SDF1 α stimulierte Gruppe E zeigt initial eine abgeschwächte CXCR4 Expression. Die apoptotische unsubstituierte Gruppe F zeigt eine CXCR4 Hochregulation, eine größere Variabilität der $\alpha 4$ Expression und ebenso wie in den sonstigen Gruppen einen konstanten $\alpha 5$ -Peak.

Hiervon abweichend stellt sich die Situation in den Gruppen G bis L dar (Abb. 23, nächste Seite), in denen die IL-3 Substitution lediglich in der Kontrollgruppe G erfolgte. Sie zeigt wie im ersten Experimentabschnitt (Abb. 22) eine durchgehend positive Expression der AM. Die Kontaktinhibition des CXCR4 und $\alpha 4$ bei 72h ist in dem dargestellten Experiment etwas schwächer ausgeprägt. Das GM-CSF (Gruppe H) kann

das Expressionsverhalten der Kontrollgruppe G imitieren. Sowohl eine Kultivierung in DMEM-Medium alleine (Gruppe L) als auch die Stimulation mit SDF1 α (Gruppe K) führt zum Absterben der Zellen mit der charakteristischen CXCR4 Hochregulation und einer größeren Fluoreszenzvariation von $\alpha 4$.

Die zytokinstimulierten Gruppen I (IL-6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L) erhalten die FDCP1 Zellen in ihrer Zellzahl und verhindern die Apoptose, durchflusszytometrisch stellen sich die AM-Profile untereinander gleichartig alteriert dar.

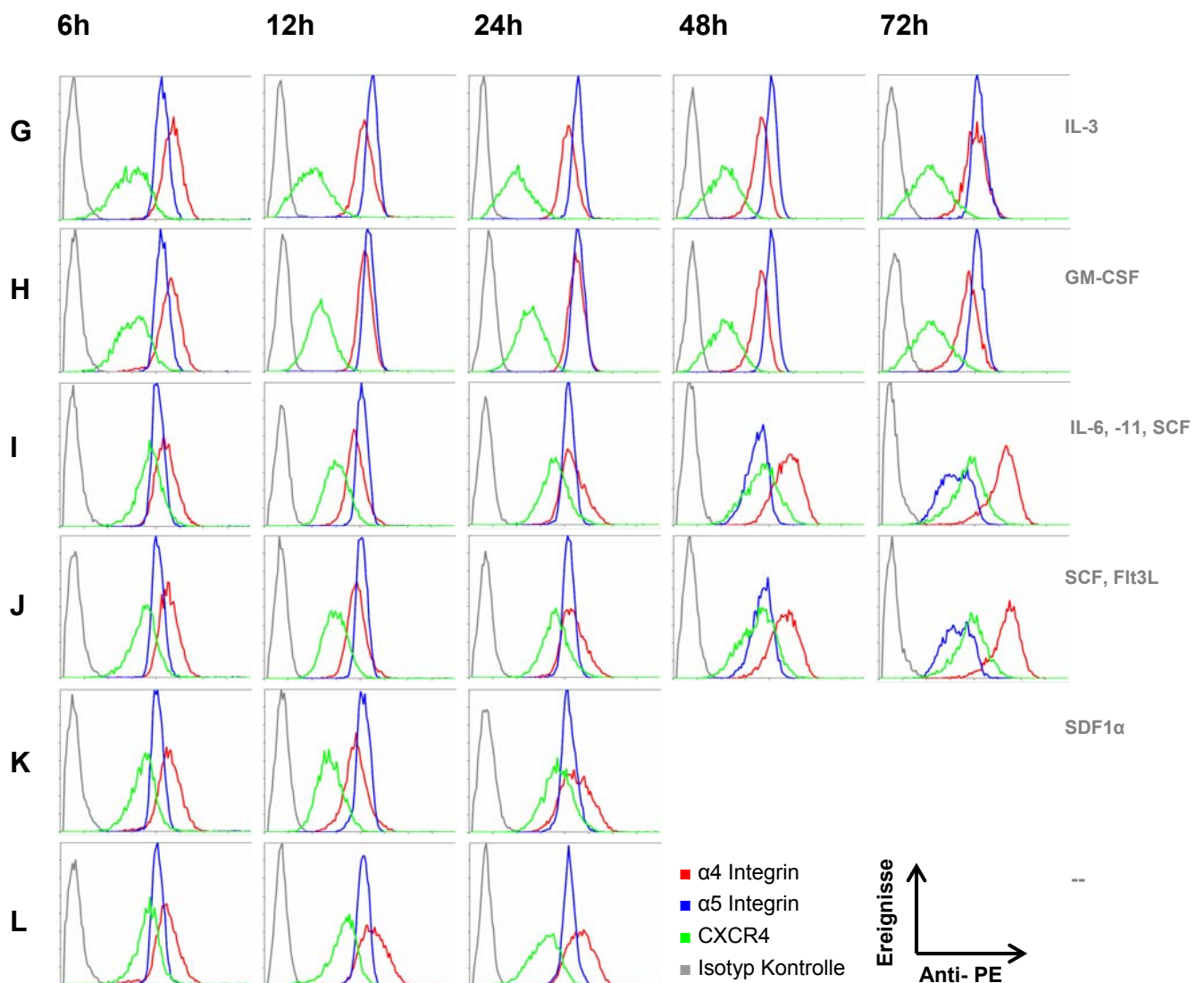


Abb. 23 Durchflusszytometrische Messung der $\alpha 4$, $\alpha 5$ und CXCR4 Expression auf FDCP1 Zellen. In den Histogrammen sind jeweils 5000 Ereignisse für jede Markierung auf einer frei skalierten Y-Achse abgebildet, während auf der X-Achse logarithmischen Werte für die Fluoreszenz von 0 bis 10^3 abgebildet sind. In den Versuchsgruppen G bis L wurde außer in Kontrollgruppe G kein IL-3 substituiert. Gruppe H (GM-CSF) imitiert den Verlauf der Kontrollgruppe G. Alle anderen Gruppen zeigten von Beginn eine hochreguliertes CXCR4, jedoch unter unterschiedlichen Umständen. Die Gruppen K (SDF1 α) und L (nur Medium) führen zum Absterben der Zellen während die Gruppen I (IL-3, -6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L) die Zellen erhalten. Ab 48h kommt es zudem in diesen Gruppen (I und J) zu einer Hochregulation des $\alpha 4$ Moleküls, während sich die $\alpha 5$ Expression leicht abschwächt.

Von Beginn der Messungen ab 6h an zeigt sich für die Gruppen I und J eine CXCR4 Hochregulation, die bis 72h konstant auf diesem Niveau bleibt. Quantitativ stellt sich diese Hochregulation zwar ähnlich dem Niveau der Hochregulation der Gruppen K und L dar, sie muss jedoch anders gewertet werden, da es hier nicht zum Absterben der Zellen kommt (siehe auch Abschnitt 3.3.1). Die $\alpha 4$ Expression zeigt für die beiden Gruppen I (IL-6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L) erst im Verlauf deutliche Veränderungen. Nach 48 und 72h ist eine deutliche Hochregulation im Vergleich zu der Kontrollgruppe G und auch im Vergleich zu den apoptotischen Zellgruppen K und L (bei 24h) zu beobachten, die mittlere Fluoreszenz steigt auf das 3-6 fache an. Das $\alpha 5$ -Molekül zeigt sich, ebenso wie in allen anderen Gruppen unbeeinflusst, nach 48 und 72h kann jedoch eine leichte Runterregulation beobachtet werden. Zusammenfassend kommt es durch die Zytokinkombinationen IL-6, -11, SCF bzw. SCF, Flt3L zu identischen AM Veränderungen.

3.3.4 Quantitative PCR der Adhäsionsmoleküle

In diesem Abschnitt werden Veränderungen der AM stimulierter FDCP1 Zellen auf RNA-Ebene dargestellt. Die Versuchsgruppen entsprechen denen vorangegangener Abschnitte, die genauen Angaben der Gruppen finden sich in Tabelle 9, Abschnitt 3.3.1. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Regulation der AM Integrin $\alpha 4$ und $\alpha 5$, Abb. 29 des Chemokinrezeptors CXCR4. Von einer signifikanten Regulation wurde dabei, wie im Methodenteil beschrieben, ab RNA-Veränderungen um den Faktor 3-5 nach oben oder unten ausgegangen. Des weiteren wurden viele Messpunkte im zeitlichen Verlauf gewählt, die die Plausibilität der Ergebnisse bekräftigen.

3.3.4.1 Regulation von Integrin $\alpha 4$

In dem Teilexperiment a) (Abb. 24) wurden FDCP1 Zellen unter Bedingungen, bei denen das überlebenswichtige IL-3 zugegeben wurde, auf den Einfluss zusätzlicher Zytokine überprüft. In den Gruppen A bis E zeigt sich keine veränderte Expression von Integrin $\alpha 4$. Die aufgrund fehlender Zugabe von IL-3 nicht wachsende Gruppe F zeigt eine Hochregulation vom Zeitpunkt 6h an. Nach 48h überleben keine Zellen dieser Zellpopulation und standen somit nicht für molekularbiologische Untersuchung zur Verfügung. Die identische Kontrollgruppe L, Experiment b), Abb. 24 zeigt ein analoges Verhalten, es besteht ebenfalls eine Hochregulation. Die leicht unterschiedliche $\alpha 4$

Expression, dieser prinzipiell gleichen Gruppen spiegelt das Absterbeverhalten wieder. Schwierigkeiten der RNA-Extraktion dieser absterbenden Population spielen zusätzlich eine Rolle. Gleichartig verhält sich die $\alpha 4$ Expression der Gruppe K, in der durch SDF1 α (ohne IL-3) ebenso keine Zellen überleben. Die allein mit IL-6, -11, SCF bzw. SCF, Flt3L stimulierten Gruppen I und J, die ja ein partielles Wachstum aufweisen, zeigen ebenso eine deutliche Hochregulation. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser $\alpha 4$ Hochregulation ist ein anderer als der der apoptotischen Gruppen. Die genannten Veränderungen treten spätestens ab 24h deutlich hervor. Nach 12h kommt

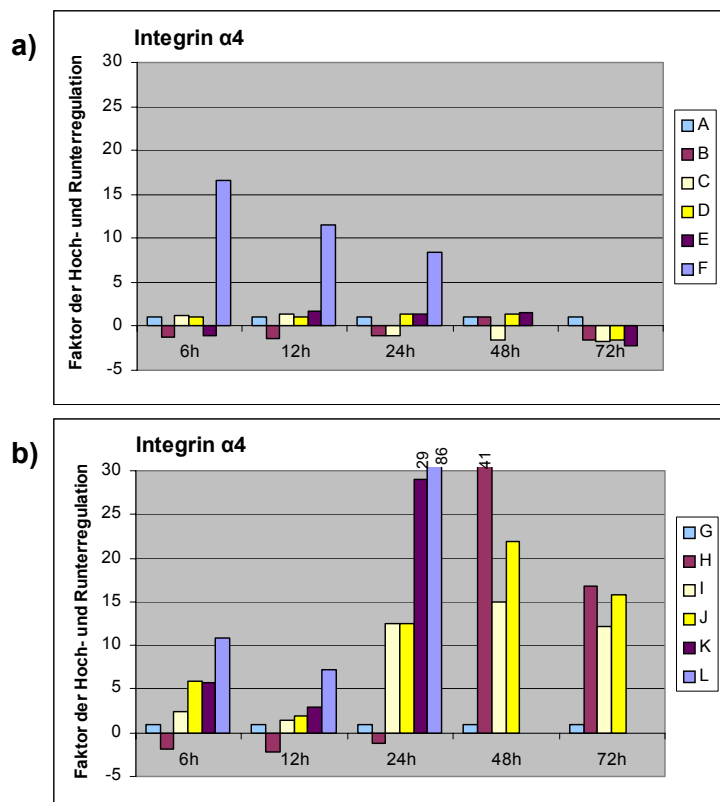


Abb. 24 RNA-Expression von $\alpha 4$ in FDCP1 Zellen. Dargestellt sind quantitative RT-PCR Daten stimulierter Zellen Block a) mit IL-3 in b) unter IL-3 Entzug und den jeweiligen Zytokinen nach Tab. 9. Die Y-Achse bildet den Faktor der Hoch und Runterregulation von Integrin $\alpha 4$ relativ zu den Kontrollgruppen A bzw. G ab. Die in Apoptose befindlichen Zellen der Gruppen F, K, L sind aufgrund der RNA-Gewinnung nur bis 24h untersucht. Diese Gruppen zeigen eine Hochregulation der $\alpha 4$ Expression. In a) haben die zusätzlich gegebenen Zytokine keine Effekte; in b) hingegen erkennt man für Gruppe I (IL-6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L) eine deutliche Hochregulation ab 24h. Es zeigt sich auch eine Hochregulierung in H (GM-CSF) ab 48h.

es zu einer geringeren Expression als nach 6h.

Interessant ist hingegen das Ergebnis für Gruppe H (GM-CSF ohne IL-3), die ein gleichartiges Wachstum wie IL-3 allein (Gruppen A und G) induzieren konnte. Bis 24h zeigt sich hier keine Veränderung der Expression; anschließend jedoch kommt es zu einer deutlichen Hochregulation. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das GM-CSF kein vollständiger IL-3 Ersatz ist, wie häufig angenommen wird. Insgesamt zeigen sich für die $\alpha 4$ Regulation unterschiedliche Ursachen verantwortlich, eine Hochregulation kann zumindest nicht allein mit dem Zellwachstum erklärt werden. (So lässt sich etwa die Hochregulation der GM-CSF stimulierten Gruppe H nach 48h nicht durch Zunahme der Zellzahl erklären.)

3.3.4.2 Regulation von Integrin $\alpha 5$

Das $\alpha 5$ assoziiert ebenso wie das $\alpha 4$ mit der $\beta 1$ -Kette ($\beta 1$ -Integrine-Familie), unterliegt aber bei diesen Experimenten offenbar keiner bzw. einer anderen Regulation (Abb.25).

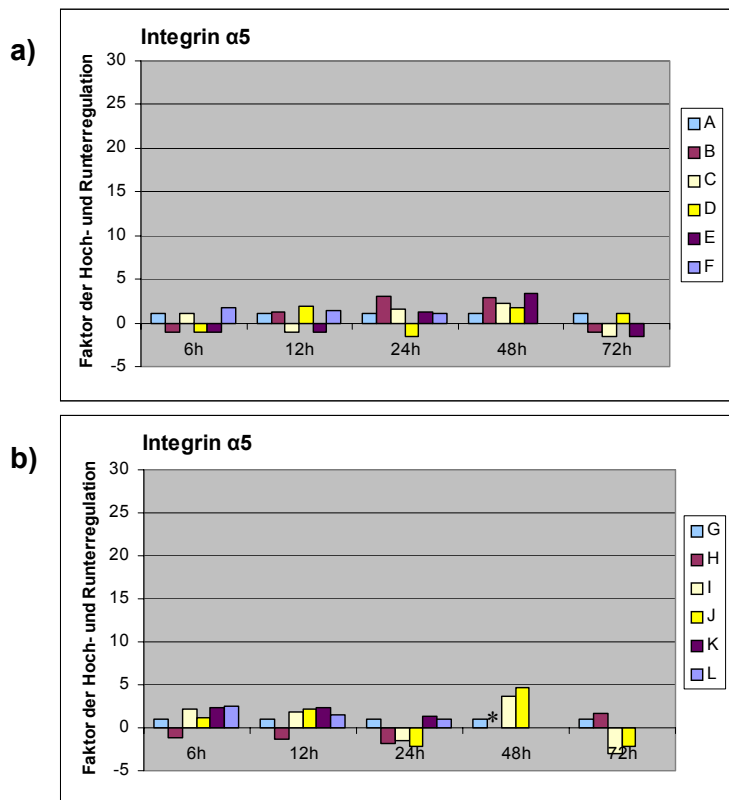


Abb. 25 RNA-Expression von $\alpha 5$ in FDCP1 Zellen. Dargestellt sind quantitative RT-PCR Daten stimulierter Zellen Block a) mit IL-3 in b) unter IL-3 Entzug und den jeweiligen Zytokinen nach Tab.9. Die Y-Achse bildet den Faktor der Hoch- und Runterregulation von Integrin $\alpha 5$ relativ zu den Kontrollgruppen A bzw. G ab. Die in Apoptose befindlichen Zellen der Gruppen F, K, L sind aufgrund der RNA-Gewinnung nur bis 24h untersucht. In keiner Gruppe, auch unter Entzug des IL-3 für die abhängigen FDCP1 Zellen (Block b), zeigen sich Veränderungen der $\alpha 5$ Expression. (*)wiederholt falsches PCR-Produkt bei dem Zeitpunkt 48h Gruppe H.

Ungeachtet des Wachstumsverhaltens der Zellen liegen keine Veränderungen der $\alpha 5$ Expression vor. Die leichten Erhöhungen etwa bei 48h zwischen Faktor 3 bis 5 dürften, da sie nur zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden, keine biologische Bedeutung haben. Für die GM-CSF stimulierten Zellen der Gruppe H fanden sich zum Zeitpunkt 48h, nicht ganz erklärt, wiederholt falsche PCR-Produkte.

Insgesamt zeigt $\alpha 5$ also keine Regulation in dem beobachteten Zeitabschnitt und wird somit auch unabhängig vom Wachstumsverhalten der Zellen gleichförmig exprimiert.

3.3.4.3 Regulation von CXCR4

Die Abbildung 26 zeigt in den Telexperimenten a) und b) die Genexpression des Chemokinrezeptors CXCR4. Dabei zeigt sich ein der $\alpha 4$ Expression (Abb. 24) sehr ähnliches Expressionsverhalten. Die Gruppen A bis E (erhalten ebenfalls IL-3) zeigen durch die Stimulationen keine CXCR4 Expressionsveränderungen. Die leichten Erhöhungen nach 48h dürften, da sie in allen Gruppen nur zu diesem Zeitpunkt auftreten, keine Bedeutung haben. Die Kontrollgruppe F induzierte kein Wachstum und

zeigte eine gleichartige Hochregulation wie das $\alpha 4$ zu den entsprechenden Zeitpunkten. Die Gruppen K (SDF1 α) und L (keine Zytokine) zeigten eine deutliche Hochregulation mit dann weiter steigendem Niveau. Interessanterweise ist der zeitliche Verlauf der CXCR4 Expression bei den partiell wachsenden, IL-6, -11, SCF bzw. SCF, Flt3L stimulierten, Gruppen I, J den apoptotischen Gruppen K und L ähnlich. Nach 48h

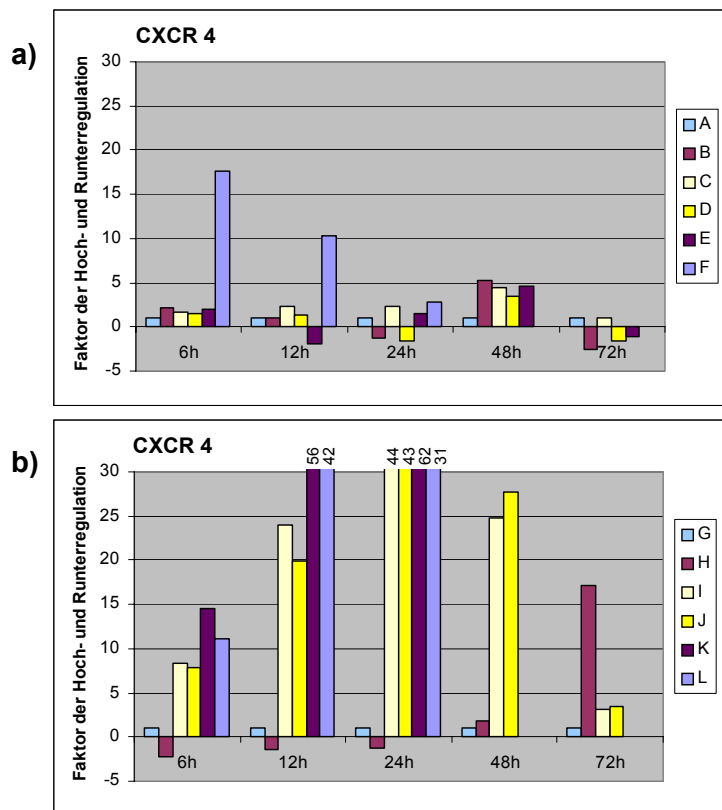


Abb.26 RNA-Expression von CXCR4 in FDCP1 Zellen.

Dargestellt sind quantitative RT-PCR Daten stimulierter Zellen Block a) mit IL-3 in b) unter IL-3 Entzug und den jeweiligen Zytokinen nach Tab. 9. Die y-Achse bildet den Faktor der Hoch- und Runterregulation von CXCR4 relativ zu den Kontrollgruppen A bzw. G ab. Die in Apoptose befindlichen Zellen der Gruppen F, K, L sind aufgrund der RNA-Gewinnung nur bis 24h untersucht. Diese Gruppen zeigten eine Hochregulation der CXCR4 Expression. In a) haben die zusätzlich gegebenen Zytokine keine Effekte; in b) hingegen erkennt man für Gruppe I (IL-6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L) eine deutliche Hochregulation schon ab 6h, die nach 72h wieder verschwindet. Es zeigte sich zudem eine Hochregulierung in H (GM-CSF) nach 72h.

zeigte sich dann jedoch ein Abfall und keine Hochregulation mehr bei 72h. In dem beobachteten Zeitabschnitt kommt es zu einer vorübergehend Hochregulation, diese tritt aber deutlich früher ein als die Hochregulation des $\alpha 4$ in der IL-6, -11, SCF stimulierten Gruppe I und der SCF, Flt3L stimulierten Gruppe J. Die mit GM-CSF stimulierten Zellen der Gruppe H zeigen zunächst bis zum Zeitpunkt 48h kein Anzeichen einer Expressionsveränderung.

Jedoch nach 72h wird das CXCR4 deutlich hochreguliert. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass es zum Ausdruck einer sich spät zeigenden nicht vollständigen Ersetzbarkeit des IL-3 durch GM-CSF kommt.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine KM-Zellen untersucht, die mit zwei unterschiedlichen Zytokinkulturen *in vitro* stimuliert worden sind. Bekannt war, dass eine Kultivierung von KM-Zellen mit der Zytokinkombination IL-3, -6, -11 und SCF bei anschließender Transplantation in myeloablatierte Mäuse zu einem Repopulationsdefekt führt.⁶⁹ Hypothesiert wurde, dass eine Kultivierung mit SCF und Flt3L das Repopulationspotenzial erhält. Um Untersuchungen auf der Suche nach Ursachen für den Repopulationsdefekt durchführen zu können, wurden die FDCP1 Zellen als SZ-Modell gewählt und hinsichtlich des AM-Profiles, der Genexpression und des Zellzyklus untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden in Hinblick auf *in vitro* SZ-Expansion und auf Ursachen des Repopulationsdefektes sowie auf zukünftige Auswirkungen dieser Erkenntnisse diskutiert.

4.1 Der Repopulationsdefekt

Verschiedene experimentelle Untersuchungen zeigten, dass nur wenige bis eine einzelne Stammzelle von Nöten sind, das Leben einer Maus nach letaler Bestrahlung zu erhalten und eine vollständige Wiederherstellung des blutbildenden Systems zu bewirken.^{109,110} Diese außergewöhnliche Fähigkeit bedingt ein vorausgehend erfolgreiches Homing der SZ ins KM, sowie die Verankerung in ihrer KM-Nische und der Fähigkeit die Blutzellelemente zu rekonstituieren.

Kultivierte SZ-Populationen hingegen zeigten Einschränkungen dieser Fähigkeiten, die sich am empfindlichsten im Sinne eines Funktionsverlusts im Vergleich zu frischen Zellen darstellten. Dies wurde hinreichend belegt und für eine Zytokinkultivierung mit IL-3, -6, -11 und SCF beschrieben.^{69,111} Die verminderte Repopulationsfähigkeit für diese Zytokinmischung konnte auch in vorliegender Arbeit dargelegt werden, ungeachtet der Zeit in Kultur von 48 oder 72 Stunden. Entgegen anderen Daten, die eine wieder leicht erholte Repopulationsfähigkeit bei 72h im Vergleich zu 48h beschreiben,⁶⁵ konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein gleichbleibend schlechtes Repopulationsverhalten mit zunehmender Kultivierungsdauer vorlag. Des weiteren konnte die Erhaltung der Repopulationsfähigkeit nach Kultur mit SCF und Flt3L gezeigt werden, diese Beobachtung wird in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Die Ergebnisse des Repopulationsdefektes führten zu weiteren Fragen nach den Bedingungen und Ursachen dieses Defektes und der möglichen Aufhebung. Für embryonale SZ beispielsweise kennt man die Wachstumsbedingungen recht gut, die ihre Multipotenz erhalten,¹¹² was vermutlich an der inhärenten Stabilität der SZ-

Funktionen und Homogenität der Populationen liegt. Welche Bedingungen aber erhalten adulte hämatopoetische SZ in ihrer Funktion? Unterschiedliche Untersuchungen, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen werden soll, beschäftigen sich mit der Darstellung und der Aufklärung der defekten Repopulationsfähigkeit von SZ nach Kultivierung.

4.2 Ursachen des Repopulationsdefekts

Erste Versuche, die Ursachen des Defektes zu beschreiben, führten zunächst zur Feststellung, dass die Kultur den Zellzyklus der SZ aktiviert und dass es zeitgleich zu dem Repopulationsdefekt kommt.⁶⁴ Dieser rein phänomenologischen Erklärung folgten dann erste Bestrebungen den Defekt auf molekularem Niveau zu erklären.⁹⁰ In dieser Arbeit konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Adhäsionsmoleküle $\alpha 4$ und $\alpha 5$ sowie den Chemokinrezeptor CXCR4, die als kritische Moleküle dieser SZ-Funktion beschrieben werden. CXCR4 ist für die chemotaktische Vermittlung ins KM, die Integrine $\alpha 4$ und $\alpha 5$ für die Migration (u.a. durch die Fibronectinbindung) bedeutend. Das $\alpha 4$ -Molekül trägt zudem wesentlich zur Verankerung der hämatopoetischen SZ in der KM-Nische bei (siehe auch Ausführungen in 1.3.).

4.2.1 Einfluss veränderter Adhäsionsmoleküle auf Homing und Repopulation

Eine erfolgreiche Repopulation ist bedingt durch den erfolgreichen Abschluss mehrerer Einzelschritte. Dazu gehören der Eintritt ins KM (Homing), die Anhaftung in der Knochenmarknische und schließlich die Fähigkeit, im dort herrschenden Mikromilieu die immense Kette von Zellteilungen zu beginnen, die schließlich das hämatopoetische System rekonstituiert.² Vielfach wurde die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen in diesem Zusammenhang dargestellt. Die Annahme, eine veränderte Expressivität oder Funktionalität der AM auf SZ mit Einfluss auf die Repopulationsfähigkeit als Erklärung in Betracht zu ziehen, lag nahe.

Szilvassy et al.¹¹³ beschreibt eine defekte Repopulation in Abhängigkeit von der $\beta 1$ -Integrinⁱⁱⁱ Expression von murinem KM und Sca⁺ lin⁻ Zellen nach Kultivierung. Die Zellen wurden für 7 Tage in IL-6, -11, G-CSF, SCF, Flt3L, TPO kultiviert und durch durchflusszytometrische Zellselektionierung (engl. cell sorting) vor der Transplantation,

ⁱⁱⁱ Funktionelles $\beta 1$ assoziiert mit dem $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Molekül.

je nach schwacher und starker Expression für das $\beta 1$ -Integrin, getrennt (die $\beta 1$ -Integrine konstituieren sich vor allem aus dem $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ Integrin). Das $\beta 1$ -positive KM, sowohl frisch als auch nach Kultivierung, konnte das Überleben der myeloabladierten Tiere immer sichern. Hingegen konnte das $\beta 1$ -negative KM nur die Hälfte der Tiere repopulieren und das in Kultur expandierte $\beta 1$ -negative KM nur weniger als 10% der Mäuse am Leben erhalten. Szilvassy et al. zeigte ebenfalls für $Sca^+ lin^-$ Zellen eine hundertfach reduzierte mittlere Fluoreszenz des $\beta 1$ -Integrin nach Kultivierung, sowie ein deutlich vermindertes Homing ins KM in der $\beta 1$ -Integrin negativen Fraktion nach 24h. Interessanterweise zeigten auch die $\beta 1$ -positiven Zellen nach Kultivierung ein um 50% vermindertes Homing gegenüber frisch isolierten Zellen. Insgesamt korrelierte die schwache $\beta 1$ -Integrin Expression mit schlechter Repopulation. Unabhängig davon führte die Kultivierung generell zu einer Verschlechterung der Repopulationsfähigkeit.

In einer Arbeit von Traycoff¹¹⁴ wurden die $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Integrine differenzierter betrachtet. $Sca^+ lin^-$ Zellen wurden durch Zellselektionierung in stark und schwach exprimierende Zellen für das $\alpha 4$ u/o das $\alpha 5$ Integrin aufgeteilt. Dabei zeigten Zellen mit einem starken [^{bright}] Signal für $\alpha 5$ gutes Engraftment, schwach exprimierende Zellen überhaupt keinen Repopulationserfolg. Für das $\alpha 4$ zeigte sich, gegenläufig zum $\alpha 5$, bei schwacher [^{dim}] Expression eine gute Repopulationsfähigkeit und umgekehrt. Insgesamt zeigten Zellen mit der Kombination $\alpha 4^{dim} \alpha 5^{bright}$, neben anderen betrachteten Markern, das beste Repopulationsergebnis.

Es zeigten sich also deutlich Zusammenhänge zwischen der Expression des $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Integrin und dem Repopulationspotenzial, sowohl in expandierten, als auch nativen Zellpopulationen.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit für die hämatopoetischen FDCP1 Zellen in den beiden Kultivierungen des Transplantationsexperiments eine Hochregulation für $\alpha 4$ beobachtet werden; im Genexpressionsverhalten, sowie an der Zelloberfläche in der Durchflusszytometrie. Dies ist unabhängig von der Hochregulation in den apoptotischen Zellgruppen zu betrachten, da die Zellen durch SCF, Flt3L und IL-6, -11, SCF in Kultur erhalten werden, nicht absterben (siehe Abb. 21, S. 43) und doch hochreguliert sind für das $\alpha 4$. Die durchflusszytometrische Analyse spricht ebenfalls dafür, dass es sich um eine unterschiedliche Hochregulation handelt, da gegenüber den apoptotischen Zellgruppen eine stärkere Fluoreszenz besteht (siehe Ergebnisse 3.2.3).

Die beobachtete Hochregulation von Integrin $\alpha 4$ in der Apoptose ist in dieser Form bisher nicht gezeigt worden. Bekannt ist, dass die Interaktion des Integrins als

Überlebensfaktor wichtig ist.¹¹⁵⁻¹¹⁷ So führt beispielsweise die Zugabe von $\alpha 4$ blockierenden Antikörpern bei CD34-positiven Zellen, in Kultivierung mit Stromazellen, zum programmierten Zelltod,¹¹⁵ umgekehrt können B-Zellen über eine Fibronectin-Bindung an $\alpha 4$ vor der Apoptose geschützt werden.¹¹⁸

Im Gegensatz zu hier vorgelegten Daten bei FDCP1 Zellen wird auf WEHI-231 Zellen, 48h nach Apoptoseinduktion, durchflusszytometrisch keine Hochregulation des $\alpha 4$ beobachtet.¹¹⁹ Es muss vermutet werden, dass Integrine einer zellspezifischen Regulation unterliegen¹²⁰ und ihre Funktionalität sowohl durch ihre Expression als auch durch spezifische Interaktion mit der Umgebung reguliert sind.¹²¹ Trotzdem erstaunt die gleichartige Hochregulation von $\alpha 4$ auf den FDCP1 Zellen in der IL-3, -6, -11, SCF und der SCF, Flt3L Kultur, da diese Kultivierungen ein deutlich variierendes Repopulationsverhalten im KM-Transplantationsmodell zeigten. Nach Traycoff et al. ginge eine Hochregulation von $\alpha 4$ mit einer verschlechterten Repopulation einher, die nach den Ergebnissen dieser Arbeit aber nur für die IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Gruppen nachweisbar war. Die konstante Positivität von Integrin $\alpha 5$ auf den stimulierten FDCP1 Zellen, wäre aber mit den Beobachtung von Traycoff et al. und Szilvassy et al. vereinbar. Die leichte Runterregulation von $\alpha 5$ gegen Ende der Kultivierung wurde nur durchflusszytometrisch beobachtet und konnte auf molekulargenetischer Ebene nicht bestätigt werden und ist so in ihrer Bedeutung nicht eindeutig. Somit ist davon auszugehen, dass parallel ablaufende Phänomene, etwa Differenzierungsprozesse, gleichzeitig eine Rolle spielen.

Für den Chemokinrezeptor CXCR4 sind die Beobachtungen ähnlich vielfältig wie für das $\alpha 4$. Wie $\alpha 4$ wird auch das CXCR4 auf den FDCP1 Zellen durch IL-3, -6, -11, SCF und SCF, Flt3L hochreguliert. IL-6 und SCF wurden als Faktoren für eine Hochregulation von CXCR4 beschrieben.¹²² In den apoptotischen Zellgruppen wird die Genexpression von CXCR4 schon zum Beginn der Messung hochreguliert, also deutlich früher als das $\alpha 4$ Integrin (durchflusszytometrisch ist dieser zeitliche Unterschied nicht zu sehen). Als Apoptose oder präapoptotischer Marker ist CXCR4 bisher nicht beschrieben. Bekannt ist, dass das virale Nef-Protein bei der HIV-Infektion einen programmierten Zelltod über eine Interaktion mit CXCR4 auslöst.^{123,124} Dieser Mechanismus findet sich nicht nur auf CD4⁺ Zellen^{125,126} und könnte unter bestimmten Bedingungen auch über SDF1 α vermittelt sein.¹²⁷ Es wäre vorstellbar, dass ein hochreguliertes CXCR4 auf FDCP1 Zellen einen präapoptotischen Marker bildet oder direkt an der Vermittlung der Apoptose beteiligt ist.

Im Gegensatz dazu beobachtet Denning-Kendall¹²⁸ an expandierten CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut eine Runterregulation von CXCR4 nach 7 Tagen Kultur mit

SCF, Flt3L, TPO und G-CSF. Für das $\alpha 4$ hingegen konnte von Denning-Kendall et al. bei einer Stimulation eine Hochregulation beschrieben werden, parallel dazu exprimierten die Zellen das $\alpha 5$. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten der FDCP1 Zellen aus dieser Arbeit. Gleichartige Veränderungen wurden von Ramirez et al. in einer 6tägigen Kultur mit IL-3, -6, SCF oder IL-11, SCF, Flt3L beschrieben.¹²⁹ Wie bereits in der Einleitung unter 1.3 beschrieben ist eine Beurteilung der CXCR4 Messdaten aufgrund der dynamischen Expression des Rezeptors schwierig. Die CXCR4 Regulation ist komplex und dennoch tritt die einzigartige Bedeutung von CXCR4 auf hämatopoetischen SZ immer mehr in den Vordergrund. Bei einem breiten Screening nach Chemokin-Reizen, die eine vermehrte Migration von Sca⁺ lin⁻ Thy1.1^{lo} c-Kit⁺ Zellen bewirken, wurde allein die SDF1 α -CXCR4-Achse bedeutend gefunden, da sie zu einer spezifischen Migrationsantwort der SZ führt.¹³⁰

Die auf absterbenden FDCP1 Zellen gefundene Hochregulation von CXCR4 kann als früher Marker der Apoptose verstanden werden. Dieses ist auch für alternde neutrophile Granulozyten beschrieben, die durch hohe CXCR4 Expression ins KM zurückkehren bevor sie apoptotisch werden.¹³¹

Die Hochregulation von CXCR4 bei Zytokinkultivierung mit IL-6, -11, SCF bzw. SCF, Flt3L verhält sich gleich in beiden Kultivierungen analog zu $\alpha 4$ und kann somit nicht als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen der hämatopoetischen SZ im *in vivo* Experiment gelten, da hier eine Gruppe ihre Funktionsfähigkeit voll erhält.

4.2.2 Einfluss unterschiedlicher Zytokinkombinationen auf die Repopulation

Vergleicht man die publizierten Arbeiten, kommt zu ihrer Beurteilung erschwerend hinzu, dass zum einen unterschiedliche Zellpopulationen verwendet werden und zum anderen auch verschiedene Zytokinkombinationen verwendet werden, von denen man ihren Effekt auf hämatopoetische SZ-Populationen im Einzelnen wenig kennt. Dabei darf allerdings auch nicht vergessen werden, dass sehr ähnliche zellbiologische Vorgänge auf komplett unterschiedlichen Zelltypen gefunden werden. So konnte beispielsweise für Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die auch häufig ins KM metastasieren, eine hohe Expression von CXCR4 gezeigt werden. Bei Aktivierung durch SDF1 α kam es bei diesen Zellen zu einem u.a. $\alpha 4$ -vermittelten Überlebenssignal sowie zu vermehrter Adhäsion an der extrazellulären Matrix.¹³² Auf FDCP1 Zellen verändert sich die Expressivität von $\alpha 4$ durch eine SDF1 α Stimulation nicht. Das Überleben konnte durch SDF1 α allein nicht erhalten werden, ob dies z.B. durch eine

zusätzliche $\alpha 4$ -Bindung an einer Fibronectinmatrix geschieht, wäre nach diesen Ausführungen denkbar.

Den vielen beschriebenen Zytokinkultivierungen, meist auch in leicht unterschiedlichen Konzentrationen, scheint die Induktion alterierter AM-Profile, die fast unabhängig von den verwendeten Zytokinen auftreten gemeinsam zu sein. Wenige Arbeiten sprechen von einer fehlenden oder nur einer leichten Beeinflussung im AM-Profil unter Zytokinkultivierung.^{133,134} Ein weiterer entscheidender Faktor, der während dieser Arbeit auffiel, ist die Zelldichte in der Kultur. Sie kann einerseits die Zell-Zell-Interaktion aber auch die Konditionierung des Mediums und damit unmittelbar auch die Konzentrationen der Zytokine beeinflussen. Zu vermuten ist, dass die Zelldichte auch die Abschwächung des AM-Profils in der FDCP1 Kultur bei Erreichen der Plateauphase des Wachstums bedingt hat (siehe Abb. 22). Die Zellen liegen so dicht, dass eine Auswirkung auf das AM-Profil im Sinne einer Runterregulation gut vorstellbar ist. Das $\alpha 5$ ist davon nicht betroffen.

Demnach ist die Beurteilung von Zytokinkulturen, mit den derzeitigen Kenntnissen über Zytokine und ihre Einflüsse auf die hämatopoetische SZ, durchaus schwierig. Es konnte hier durch die kompetitiven Transplantationsexperimente dargelegt werden, dass die Zytokinkombination aber kritisch für die Repopulation ist und sich keine einfachen Parameter (wie Zellzahl, Morphologie, *in vitro* Verhalten) finden lassen, die einen Kultivierungsunterschied beschreiben.

Die Arbeitsgruppe um P. Becker, University of Massachusetts, bemühte sich initial um die Aufklärung des durch die Zytokinkombination IL-3, -6, -11, SCF induzierten Repopulationsdefekts.^{90,135} Sie verwendete vergleichbare Konzentrationen der Zytokine, wie in den vorgestellten Experimenten dieser Arbeit, um anhand von $\text{Ho}^{\text{low}}/\text{Rho}^{\text{low}}$ und FDCP1 Zellen Erklärungen für den Repopulationsdefekt in dieser Zytokinkultivierung zu finden. $\text{Ho}^{\text{low}}/\text{Rho}^{\text{low}}$ Zellen zeigten dabei nach 48h Kultur fluoreszenzmikroskopisch einen von 29% auf 9% verringerten Anteil $\alpha 4$ -positiver Zellen, die $\beta 1$ Expression verschwand von 33% Ausgangsniveau ganz.¹³⁵ Nach Traycoff et al. müsste diese $\alpha 4$ Runterregulation sogar für eine verbesserte Repopulationsfähigkeit sprechen, nach Szilvassy et al. dagegen wäre es mit einer defekten Repopulation vereinbar. FDCP1 Zellen wurden von Becker et al. auch auf eine zellzyklusabhängige Exprimierung von $\alpha 4$ untersucht.⁹⁰ Die Zellen wurden durch Isoleucindeprivation in der $\text{G}_{0/1}$ -Phase synchronisiert. Es zeigte sich eine deutliche Hochregulation von $\alpha 4$ in $\text{G}_{0/1}$, die im Verlauf bei wieder Zugabe des Isoleucin im weiteren Verlauf wieder absank. In der späten S-Phase zeigte sich wieder ein leichter Peak. Diese von P. Becker et al. gefundenen Ergebnisse sind kritisch zu bewerten. Wie aus den vorliegenden Daten hervorgeht, ist durch Faktorentzug (Gruppe F und L)

ebenfalls auch ein Aufhalten der FDCP1 Zellen in $G_{0/1}$ zu erreichen (siehe 3.3.2 Zellzyklus und Anhang 5). Zwar konnte auch hier eine Hochregulation von $\alpha 4$ gezeigt werden wie von Becker et al. Es ist allerdings anzumerken, dass ein sehr großer apoptotischer Zellanteil vorlag und somit die Daten bezüglich der AM-Expression nicht aussagekräftig sind. In eigenen Experimenten dieser Dissertationsarbeit wurde auch das Protokoll zur Zellzyklussynchronisation durch Isoleucindeprivation von Becker et al.⁹⁰ durchgeführt (nicht gezeigte Daten). Es wurden ebenfalls hohe Apoptoseraten beobachtet, so dass die aus diesem Ansatz entstammenden Daten zweifelhaft sein müssen und dieser Ansatz somit nicht weiter verfolgt wurde.

Zunehmende Expression von $\alpha 4$ im Verlauf des Zellzyklus, wie von Becker im weiteren beobachtet, ist ebenfalls kritisch zu werten. Betrachtet man Zellen, die für $\alpha 4$ im Durchflusszytometer einen recht symmetrischen Peak ergeben, liegt darin eine Relation zur Zellgröße und damit dem Zellzyklus verborgen (Abb. 27).

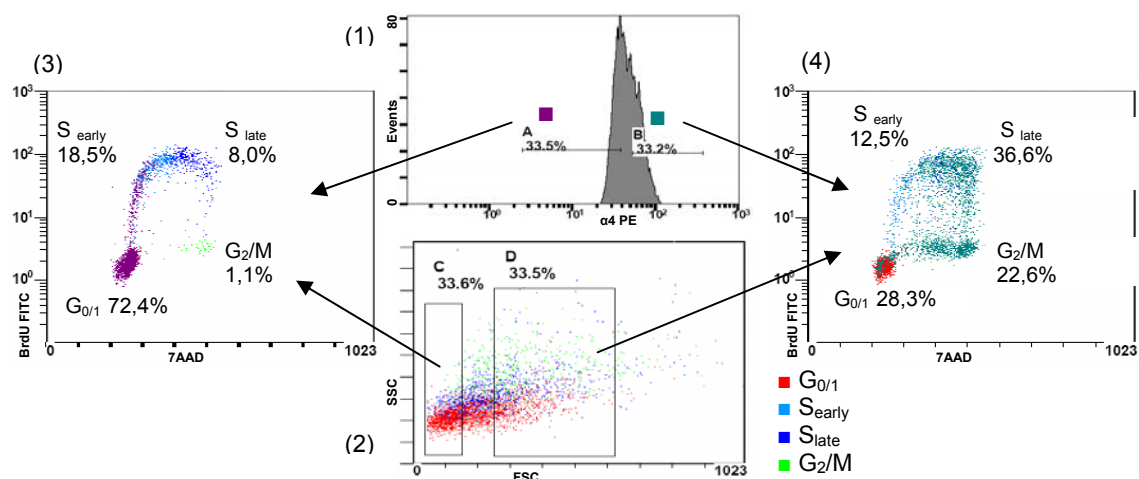


Abb. 27 Zellzyklusanalyse (UVID) von FDCP1 Zellen in Relation von Zellgröße und $\alpha 4$ Expression. In (1) ist das $\alpha 4$ Expressionsverhalten von FDCP1 Zellen dargestellt. Dabei wurde von dem Peak ein schwach (A) und stark (B) exprimierendes Drittel abgeteilt. (2) Ebenso wurden die Zellen nach der Zellgröße (forward scatter) in kleinere (C) und größere (D) Zellen eingeteilt. Die Farbkodierung ist entsprechend den Zellzyklusphase G1 (rot), frühe S-Phase (hellblau), späte (dunkelblau), G2/M (hellgrün) gewählt. Teilabbildung (3) stellt die Zellzyklusanalyse der kleineren und schwächer exprimierenden Zellen dar. Die Zellen befinden sich vor allem in frühen Zellzyklusphasen, 72,4% der Zellen sind in $G_{0/1}$. Für die größeren und stärker exprimierenden Zellen (dunkelgrün) in (4) zeigt sich ein Zusammenhang zu späteren Phasen des Zellzyklus. Hieraus wird deutlich, dass bei Selektion nach schwach exprimierenden oder kleinen Zellen jeweils auch eine bevorzugte Selektion nach frühen Zellzyklusphasen vorgenommen wird. Dies gilt umgekehrt auch für stark exprimierende bzw. große Zellen. (eigene Daten)

Schlicht ausgedrückt zeigen also große Zellen mit größerer Zelloberfläche eine tendenziell stärkere Fluoreszenz und sind zudem im Zellzyklus weiter vorangeschritten. Dies ist auch bei den zitierten Arbeiten von Traycoff et al.¹¹⁴ und Szilvassy et al.¹¹³ zu bedenken. Da bei einer, wie bei Traycoff et al. vorgenommenen, Zellselektionierung einer relativ homogen Population nach den 30-40% schwach und stark exprimierenden

Zellen gleichzeitig eine gewisse Selektion nach Zellzyklusstatus und Zellgröße durchgeführt wurde.

Es ist anzuzweifeln, dass ein direkter Zusammenhang zwischen möglicherweise nur passageren Hochregulationen von AM nach der Kultivierung und der Repopulationsfähigkeit besteht. Die Repopulation ist ein Vorgang, der zeitlich gestreckt abläuft; allein das Homing erfolgt über mehrere Stunden.¹³⁶ Transplantierte Zellen werden nach einer Transplantation zumeist in der Milz und Lunge abgefangen und wandern von dort in die Zielorgane. Die Hoch- und Runterregulation von AM sind Vorgänge, die sich innerhalb weniger Stunden abspielen und so unter *in vivo* Einflüssen ein schneller Wechsel des AM-Profiles denkbar ist. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die Repopulation eher mit kultivierungsbedingten Differenzierungsschritten innerhalb des SZ-Pools zu tun hat. Andere molekulare Ereignisse, die das Repopulationsverhalten erklären, sind nicht bekannt.

4.2.3 Expansion und *in vitro* Repopulationspotenzial

Bei der Beurteilung einer vermeintlichen SZ-Population in Kultur taucht immer wieder das grundsätzliche Problem auf, wie das Wachstumsverhalten von SZ zu messen ist. Unterschiedliche Autoren definieren den Ausdruck Expansion recht unterschiedlich. Häufige Praxis ist dabei eine definierte Vorläuferpopulation in die Zytokinkultur einzusetzen und anschließend die Expansion anhand der Zellzahl zu dokumentieren.^{137,138} Für CD34-positive Zellen konnte dabei gezeigt werden, dass es durch Kultur auch zu einem Erhalt von Zellen, die diesen Marker tragen, kommt. Für andere isolierte Zellpopulationen ist der Erhalt von Markern nach Expansion weniger gut dokumentiert. Vor allem fehlen funktionelle Analysen der Zellen, die belegen, dass selbst bei erhaltenen Markern die Funktionalität der Ursprungszellen erhalten bleibt. Es gibt keinen schlüssigen Hintergrund um anzunehmen, dass der immunphänotypische Erhalt einer Zelle nach Kultivierung eine erhaltene Funktionalität bedeutet.¹³⁹ Solange SZ mit Hilfskonstrukten wie Oberflächenmarkern beschrieben werden, muss Ihre Wertigkeit an funktionellen Assays nachgewiesen werden. Insofern muss der Begriff einer Expansion von SZ bei genauerer Betrachtung von Literaturdaten mit äußerster Vorsicht bedacht werden. Kommt es in einer Kultur morphologisch zu einer Vermehrung von SZ, so ist nicht gesagt, dass sich nicht minimale Differenzierungen oder anders bedingte Funktionsdefekte entwickelt haben könnten. Eine Zellzahlvermehrung darf also bei strenger Betrachtung nicht mit einer Expansion von SZ gleichgesetzt werden. Zudem könnte eine Kontamination mit anderen

proliferierenden Zellen, wie es bei den meisten Aufreinigungsverfahren der Fall ist, von Bedeutung sein.

Angesichts dieser strengen Betrachtung stellt sich die Frage nach der biologischen und klinischen Relevanz, da etwa auch (aus Sicht des SZ-Puristen) weniger pure Vorläuferpopulationen, wie die CD34-positiven Zellen beim Menschen, in entsprechenden Zellzahlen transplantiert die Funktion der SZ umfassend erfüllen können. Während die primitivste SZ wohl CD34-negativ ist, erscheint die Verwendung CD34-positiver SZ aus klinischer Sicht richtig. (siehe auch Einleitung S. 2)

Die vorliegenden Daten zeigen bei der Zytokinkultivierung von murinem KM, wie zu erwarten, einen starken Abfall der Zellzahlen, was im wesentlichen auf das Zugrundegehen der ausdifferenzierten Zellen zurückzuführen ist. Die resultierenden Zellzahlen sind in beiden Kulturen vergleichbar. Daneben beobachtet man einen morphologisch ähnlichen Aspekt der Zellen nach beiden Kulturformen. Es soll hier jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass auch nach 72h und einer Dezimierung der vitalen KM-Zellen auf weniger als 25% der Ausgangszellzahl, die Zellpopulationen noch so groß sind, dass ein Bruchteil der vitalen Gesamtzellen, die eine SZ-Expansion erfahren haben, auffiele. Dies sei an einem Rechenbeispiel erläutert: Nehmen wir eine Häufigkeit einer SZ wie der $Sca^+ lin^- Thy1.1^{low}$ von 0.05% im KM an¹⁴⁰ und gehen weiter davon aus, dass sich diese Zellen in 72h maximal verachtfacht,¹⁴¹ dann hätten diese SZ im Fall der hier gezeigten reduzierten Zellzahl des KM nach 72h Kultivierung nur einen Anteil von 2% an den vorliegenden Zellen. (Bemerkung: Etwa auch 2% der Zellen der 72h Kultur mit SCF und Flt3L zeigen im Methylzellulose-Assay eine Koloniebildung). Selbst unter diesen Annahmen wäre der Einfluss auf die Gesamtzellzahl also nicht nachweisbar. Das heißt auch, dass im zytologischen Präparat vor allem andere Vorläuferzellen auffindbar sind.

Wenn die Zellzahl also kein geeigneter Parameter ist um Expansion zu messen, auch der Ausschluss einer Expansion bei gleichen Zellzahlen nicht möglich ist, müssen alternative Beurteilungsmethoden der SZ-Expansion verwendet werden.

Vielfach wird der Methylzellulose-Assay verwendet, der die Anzahl der klonogenen Zellen vor und nach Expansion beurteilen lässt. Hier zeigt sich, dass die Koloniezahlen bei Stimulierung mit IL-3, -6, -11, SCF signifikant gegenüber nativen KM-Zellen ansteigen. Die Anzahl klonogener Zellen steigt nach SCF, Flt3L Kultur noch weiter an. Man kann hiernach also davon ausgehen, dass es tatsächlich in beiden Kultivierungen zu einer Vermehrung von SZ gekommen ist. Werden diese Ergebnisse jedoch in Beziehung zu den *in vivo* Repopulationsdaten gesetzt, dann wird klar, dass sie nicht das defekte Repopulationsverhalten der IL-3, -6, -11, SCF Kultur widerspiegeln.

Nach der Literatur muss angenommen werden, dass sich in dem Assay eine Expansion von SZ nachweisen lässt, eine Vermehrung klonogener Zellen muss sich offensichtlich aber nicht in gutem Repopulationsverhalten widerspiegeln. Umgekehrt kann man allerdings erwarten, dass gut repopulierende Zellen ein korrelierendes Ergebnis im Methylzellulose-Assay ergeben. Dies ist so der Fall für die SCF, Flt3L kultivierten Zellen, aber auch hier bildet die verdoppelte Koloniebildung *in vitro* nicht das *in vivo* Ergebnis ab. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Expansion der koloniebildenden Zellen im Methylzellulose-Assay die zur Repopulation befähigten Zellen nicht genau nachweisen kann. Letztendlich kann nur eine qualitative Beurteilung durch kompetitive Repopulationsmodelle weiterhelfen, SZ-Expansion festzustellen. Dabei hat man die Möglichkeit, vermeintlich expandierte Populationen direkt mit einer nativen Population zu vergleichen, und den Erhalt der Stammzellfunktion zu beurteilen. Kommt es in dem Endpunkt Repopulation zu einer verbesserten Funktion der Zellen gegenüber der nativen Population, so kann von einer tatsächlichen Expansion sicher ausgegangen werden.

Die Ergebnisse im Methylzellulose-Assay lassen an eine funktionelle Störung der IL-3, -6, -11, SCF kultivierten Zellen in ihrer Interaktion mit dem Endothel¹³⁶ oder den Stromazellen denken, da diese Interaktionen im Assay ohne Bedeutung sind.

4.3 Erhaltene Stammzellfunktion unter SCF, Flt3L Kultivierung

Eindrücklich konnte für die mit SCF und Flt3L kultivierten KM-Zellen eine mindestens erhaltene Repopulationsfähigkeit nach einer 48 und 72 stündigen Kultivierung gezeigt werden. Die Aufhebung des Repopulationsdefekts stellt ein außerordentliches, bisher nicht publiziertes Ergebnis dar. Hier gemachte Beobachtungen zeigen eine Erhaltung des Repopulationpotenzials für die SCF, Flt3L kultivierte Population, die sogar der frischen Kontrolle überlegen erscheint. Es ist möglich, dass sich diese Überlegenheit in größeren Serien statistisch nachweisen ließe. Dann dürfte auch gesichert von einer SZ-Expansion unter den genannten Bedingungen gesprochen werden. Kongruent mit den bisherigen Ergebnissen wurde in diesen Experimenten das bekannte Phänomen einer defekten Repopulationsfähigkeit bei einer Kultivierung mit IL-3, -6, -11, SCF bestätigt.

Weiterhin wurde bei der repopulationerhaltenden SCF, Flt3L Kultur eine weitere Verbesserung der Kurzzeit-Repopulation zugunsten einer längeren Kultivierungszeit von 72h gefunden. Dies zeigt, dass die kurzzeit- und langzeitrepopulierenden Zellen eine unterschiedliche Population darstellt. Vorstellbar wäre, dass bei einer längeren

Kultivierung mehr Zellen in die aktiven Phasen des Zellzyklus eintreten und zu einer Expansion führen bzw. in eine günstige Phase des Zellzyklus bewegt werden und so ein erfolgreiches Homing und anschließende Kurzzeit-Repopulation durchführen. Bei langzeitrepopulierenden SZ wird davon ausgegangen, dass in der physiologisch normalen Situation *in vivo* eine mehrmonatige G₀-Phase durchschritten werden muss, bevor diese Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten. Eine unterschiedlich lange Kultivierung von 2 bzw. 3 Tagen dürfte unter diesem Gesichtspunkt also keinen Einfluss nehmen können. *In vitro* zeigt sich aber selbst für die Zellzyklus inaktiven Ho^{low}/Rho^{low} Zellen in einer Kultur mit IL-3, -6, -11, SCF nach 40 Stunden eine zahlenmäßige Verdoppelung der Population.¹⁴¹ Für die Zytokine SCF und Flt3L sind sogenannte Überlebensfunktionen beschrieben;¹⁴² sollte es aber zu einer Expansion von Zellen gekommen sein, müsste eine Zellzyklusaktivierung auch für diese Zytokine angenommen werden. Alternativ könnte das Homing der bestehenden Zellen günstig beeinflusst worden sein und so bessere Repopulationsergebnisse im Vergleich zu einer „nativen SZ“ erklären.

4.4 Sind Zelllinien und purifizierte Zellen geeignete Stammzellmodelle?

Es wäre wünschenswert, die hier gezeigten Ergebnisse auch an einer purifizierten Population aus KM nachzuvollziehen. Die Verwendung von unfraktioniertem KM hat den Vorteil, dass wenig oder nicht identifizierte SZ-Fractionen nicht entfernt werden. Zudem enthält das ganze KM auch die für die Repopulation wichtigen repopulierenden Helferzellen. Diese Zellen sind vermutlich neben T-Zellen auch Makrophagen und Monozyten. Die Ergebnisse würden anhand purifizierter SZ auf eine breitere Grundlage gestellt werden, auch wenn bei den heterogenen purifizierten Zellen andere Schwierigkeiten in der Interpretation auftauchen. Die Eignung der verschiedenen Populationen soll hier umrissen werden. Die FDCP1 Zelllinie ist aus der Kultivierung von murinem KM hervorgegangen und hat ihren Wert als homogene Vorläuferzellen; problematisch ist die gestörte Zellzyklusregulation der Zellen. Zwar ist diese, im Falle der FDCP1 Zellen, nicht gänzlich unbeeinflussbar durch Wachstumsfaktoren, doch ist zu vermuten, dass die SZ ihre Zellteilung und somit auch das Verhalten in einer Zytokinkultur durch eigene Regelmechanismen bestimmt. So weiß man, dass die Ruhephase der SZ in der G₀-Phase allein durch ein defizientes p21 (CDK Inhibitor) am Kontrollpunkt in die G₁-Phase durchbrochen werden kann.¹⁴³ Dieses Molekül scheint bei den FDCP1 Zellen keine große Rolle zu spielen. Ebenso sind *in vivo* Experimente mit FDCP1 Zellen durch die häufige leukämische Transformation nicht sinnvoll.

Purifizierte Zellen aus KM lassen sich, abgesehen von ihrer aufwendigen Aufbereitung, meist durch durchflusszytometrische Zellselektionierung oder Säulen frisch gewinnen. Hier wird ein interessanter Weg beschritten, einerseits eine möglichst reine SZ-Population zu gewinnen, und andererseits keine SZ durch das Verfahren auszuschließen. Bei den $\text{Ho}^{\text{low}}/\text{Rho}^{\text{low}}$ Zellen sind per Definition der Färbungen zirkulierende SZ ausgeschlossen, diese sind aber seit längerem beschrieben. Könnten die Ergebnisse der erhaltenen Repopulationsfähigkeit an $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ oder $\text{Ho}^{\text{low}}/\text{Rho}^{\text{low}}$ Zellen auch nachgewiesen werden, wäre es eine Bestätigung der so charakterisierten SZ. Die Mittransplantation relativ ausdifferenzierter Zellen wäre dabei als ein weiterer Einflussfaktor auf die Repopulation zu bedenken.¹⁴⁴ In den hier beschriebenen Experimenten kann das Argument dieser „Helferzellen“, aufgrund der Ähnlichkeit des Zellbildes und der Zellzahl der transplantierten Zellen, nicht als Erklärung für den Repopulationsunterschied gelten. Im Rahmen der Dissertation sollten $\text{Sca}^+ \text{lin}^-$ Zellpopulationen die Daten der FDCP1 Zellen verstärken, aufgrund der geringen Zellfrequenz und dem enormen Tierbedarf war die für das Experiment notwendige Tierzahl aus Tierschutzgründen nicht verfügbar (siehe Ergebnisse 3.2).

Definierte Zellpopulationen können durchaus als Modelle verwendet werden, um mehr Verständnis über SZ-Funktionen zu gewinnen, jedoch sind auch hier die jeweiligen Einschränkungen zu beachten. Betrachtungen am gesamten KM, so wie in dieser Arbeit, bieten dabei den Vorteil, alle extrahierten Populationen zu beinhalten. Neben geeigneten Zellpopulationen, ist man auch auf der Suche nach den tatsächlichen Bedingungen, denen die SZ in ihrer KM-Nische ausgesetzt ist, um sie zukünftig besser simulieren zu können. Die Beschreibung des lokalen Zytokinmilieus und das Verständnis der Nische gestalten sich bisher jedoch schwierig.¹⁴⁵ Die beschriebenen Modelle werden also weiterhin Verwendung finden, bis genauere und bessere gefunden werden.

4.5 Weiterführende Experimente

Die Ausführungen machen deutlich, dass es zwar eine Vielzahl von Erklärungsansätzen für die defekte Repopulationsfähigkeit nach Zytokinkultur gibt, ohne dass dabei ein grundlegender Konsens ihrer Wertigkeit besteht. Weiterhin wird deutlich, dass eine Vielzahl von Veränderungen in den Zytokinkulturen auftreten, die nicht unbedingt im Bezug zu dem Funktionsverlust der SZ zu sehen sind. Durch die hier vorgestellten Ergebnisse ergibt sich ein Modell, in dem in gleichen Zellausgangspopulationen in einem Fall durch eine Kultivierung die

Repopulationsfähigkeit erhalten wird (SCF, Flt3L), und im anderen Falle der Repopulationsdefekt induziert wird (IL-3, -6, -11, SCF). Daraus können eine ganze Reihe von Experimenten abgeleitet werden. Aus dem kultivierten KM, das die Repopulationsfähigkeit erhält, könnten verschiedene Zellpopulationen isoliert und analog in kompetitiver KM-Transplantation überprüft werden, um die SZ-Population näher einzugrenzen. Beobachtete Veränderungen der AM könnten an dem Modell ebenfalls auf ihre Relevanz für das Engraftment überprüft werden. Außerdem dürfte es höchst interessant sein, in neuerer Zeit gefundene molekulargenetische Mechanismen an mit Flt3L und SCF kultivierten Zellen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die *ex vivo* Expansion von Stammzellen bildet eine Grundlage für eine Vielzahl von Anwendungen der klinischen Transplantations- und Gentherapie. Geeignete Kultivierungsbedingungen sind dabei bisher nur unzureichend und nicht in Verbindung mit dem Nachweis des Funktionserhalt der Zellen beschrieben. Für IL-3, -6, -11, SCF *ex vivo* expandierte Knochenmarkzellen ist ein defektes Repopulationsverhalten in myeloablierten Mäusen nachgewiesen worden. Auf diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob eine andere, eher stammzellerhaltende Kultivierung mit SCF und Flt3L, möglicherweise kein defektes Repopulationsverhalten zeigen würde. Zur Evaluierung des Repopulationsverhalten wurden kultivierte Zellen kompetitive mit frischen Knochenmarkzellen transplantiert und ihr Anteil an der hämatopoetischen Rekonstitution in der Maus nach 17 Tagen bzw. 19 Wochen beurteilt. Hinsichtlich der Ursachen des Repopulationsdefekts wurden die im Homing als nachweislich entscheidenden Adhäsionsmoleküle $\alpha 4$ und $\alpha 5$, sowie der Chemokinrezeptor CXCR4 auf FDCP1 Zellen untersucht. Dabei wurden die Effekte der Zytokinkultivierung auf des Adhäsionsmolekülprofil der Zellen auf molekulargentischem Niveau durch RNA-Analysen sowie durchflußzytometrisch an der Zelloberfläche nachgewiesen und Relation zu den gefundenen *in vivo* Daten diskutiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen zum einen den vorbeschriebenen Repopulationsdefekt, zum anderen konnte hier erstmalig ein erfolgreiches Repopulationsverhalten bei SCF, Flt3L kultivierten Stammzellen nachgewiesen werden. *In vitro* Untersuchungen zeigten eine Stammzellexpansion im Methylzellulose-Assay. Hier zeigten sich die mit SCF und Flt3L behandelten Stammzellen nach 48 Stunden um 68% und nach 72 Stunden um 96% expandiert. In einem kompetitiven Transplantationsmodell in Ptprc-chimären Mäusen zeigten sich sowohl die für 48 Stunden als auch die für 72 Stunden mit SCF, Flt3L expandierten Zellen gegenüber frischem Knochenmark als gleichwertig bzw. leicht überlegen. Der Methylzellulose-Assay allein erwies sich als schlechter Prädiktor der biologischen Funktion *in vivo*. Die weitreichende Suche nach Ursachen des Repopulationsdefektes von IL-3, -6, -11, SCF stimulierten Zellen auf molekularbiologischem Niveau umfasste $\alpha 4$, $\alpha 5$ und den Chemokinrezeptor CXCR4. Hierbei wurde die FDCP1 Vorläuferzelllinie *in vitro* den oben genannten Zytokinmischungen ausgesetzt. Diese Zellen finden aufgrund ihres hämatopoetischen Ursprungs als Stammzell-Surrogat Verwendung. Es zeigte sich, dass beide Zytokinmischungen sowohl das $\alpha 4$ Integrin als auch das CXCR4 hochregulieren, während die $\alpha 5$ Expression weitgehend unverändert blieb.

Diese Ergebnisse ließen sich sowohl durchflusszytometrisch an der Zelloberfläche als auch durch quantitative PCR auf Ebene der Genexpression nachweisen. Auch das Zellzyklusverhalten der FDCP1 Zellen verhielt sich trotz der verschiedenen Expansionskulturbedingungen mit IL-3, -6, -11, SCF bzw. SCF, Flt3L untereinander gleichartig.

Die Adhäsionsmolekülprofile auf hämatopoetischen Zellen werden durch Expansionskulturen alteriert. Die Regulation von $\alpha 4$ und CXCR4 zeigt sich jedoch bei beiden Kultivierungen, obwohl diese *in vivo* ein deutlich variierendes Repopulationsverhalten aufweisen. Dies bedeutet, dass der Repopulationsdefekt nicht durch die Regulationen der Adhäsionsmoleküle erklärbar ist. Ihre grundsätzliche Bedeutung für die Repopulation bleibt davon unberührt, sie ist hinreichend belegt.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit somit erstmalig Kulturbedingungen beschrieben, die zum einen eine Stammzellexpansion ermöglichen, zum anderen die Repopulationsfähigkeit der Zellen erhält. Desweiteren konnten gezeigt werden, dass die beobachteten Veränderungen des Adhäsionsprofils keine gültige Erklärung für den Repopulationsdefekt darstellt. Andere, noch nicht beschriebene Defekte müssen hier eine Rolle spielen. Eine partielle Ausdifferenzierung könnte ursächlich eine Hauptrolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Barr,R.D., Whang-Peng,J. & Perry,S. Hemopoietic stem cells in human peripheral blood. *Science* **190**, 284-285 (1975).
2. Lapidot,T., Dar,A. & Kollet,O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901-1910 (2005).
3. Till,J.E. & McCulloch,E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213-222 (1961).
4. Watt,F.M. & Hogan,B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-1430 (2000).
5. Zanjani,E.D., Almeida-Porada,G., Livingston,A.G., Flake,A.W. & Ogawa,M. Human bone marrow. *Exp. Hematol.* **26**, 353-360 (1998).
6. Bhatia,M., Bonnet,D., Murdoch,B., Gan,O.I. & Dick,J.E. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat. Med.* **4**, 1038-1045 (1998).
7. Zanjani,E.D., Almeida-Porada,G., Livingston,A.G., Zeng,H. & Ogawa,M. Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **31**, 406-412 (2003).
8. Goodell,M.A. *et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med.* **3**, 1337-1345 (1997).
9. Nakamura,Y. *et al.* Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood* **94**, 4053-4059 (1999).
10. Spangrude,G.J., Heimfeld,S. & Weissman,I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62 (1988).
11. Weissman,I.L. & Spangrude,G.J. Homogeneous mammalian hematopoietic stem cell composition. *United States Patent Nr. 5087570* (1992).
12. Bertoncello,I. & Williams,B. Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining. *Methods Mol. Biol.* **263**, 181-200 (2004).
13. Zanjani,E.D., Flake,A.W., Almeida-Porada,G., Tran,N. & Papayannopoulou,T. Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood* **94**, 2515-2522 (1999).
14. Lapidot,T. *et al.* Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* **255**, 1137-1141 (1992).
15. Watt,F.M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **353**, 831-837 (1998).
16. Alison,M. & Sarraf,C. Hepatic stem cells. *J. Hepatol.* **29**, 676-682 (1998).

17. Weissman,I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-168 (2000).
18. Gage,F.H., Ray,J. & Fisher,L.J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 159-192 (1995).
19. Ferrari,G. *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-1530 (1998).
20. Theise,N.D. *et al.* Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-240 (2000).
21. Gussoni,E. *et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-394 (1999).
22. Brazelton,T.R., Rossi,F.M., Keshet,G.I. & Blau,H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-1779 (2000).
23. Graf,T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* **99**, 3089-3101 (2002).
24. Orlic,D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705 (2001).
25. Wang,X. *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901 (2003).
26. Terada,N. *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545 (2002).
27. Corbel,S.Y. *et al.* Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* **9**, 1528-1532 (2003).
28. Sherwood,R.I., Christensen,J.L., Weissman,I.L. & Wagers,A.J. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **22**, 1292-1304 (2004).
29. Camargo,F.D., Green,R., Capetanaki,Y., Jackson,K.A. & Goodell,M.A. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* **9**, 1520-1527 (2003).
30. Kawada,H. *et al.* Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* **104**, 3581-3587 (2004).
31. Ayas,M. *et al.* Stem cell transplantation for patients with Fanconi anemia with low-dose cyclophosphamide and antithymocyte globulins without the use of radiation therapy. *Bone Marrow Transplant.* **35**, 463-466 (2005).
32. Ogden,D.A. & Mickliem,H.S. The fate of serially transplanted bone marrow cell populations from young and old donors. *Transplantation* **22**, 287-293 (1976).
33. Bell,D.R. & Van Zant,G. Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene* **23**, 7290-7296 (2004).

34. Rossi,D.J. *et al.* Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 9194-9199 (2005).
35. Craddock,C.F., Nakamoto,B., Andrews,R.G., Priestley,G.V. & Papayannopoulou,T. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* **90**, 4779-4788 (1997).
36. Peled,A. *et al.* Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* **283**, 845-848 (1999).
37. Aplin,A.E., Howe,A., Alahari,S.K. & Juliano,R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 197-263 (1998).
38. Peled,A. *et al.* The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* **95**, 3289-3296 (2000).
39. Yong,K.L. *et al.* Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). *Blood* **91**, 1196-1205 (1998).
40. Naiyer,A.J. *et al.* Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin. *Blood* **94**, 4011-4019 (1999).
41. Dimitroff,C.J., Lee,J.Y., Schor,K.S., Sandmaier,B.M. & Sackstein,R. differential L-selectin binding activities of human hematopoietic cell L-selectin ligands, HCELL and PSGL-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 47623-47631 (2001).
42. Anzai,N., Gotoh,A., Shibayama,H. & Broxmeyer,H.E. Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C-gamma. *Blood* **93**, 3317-3326 (1999).
43. van Buul,J.D. *et al.* Migration of human hematopoietic progenitor cells across bone marrow endothelium is regulated by vascular endothelial cadherin. *J. Immunol.* **168**, 588-596 (2002).
44. Levesque,J.P., Takamatsu,Y., Nilsson,S.K., Haylock,D.N. & Simmons,P.J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **98**, 1289-1297 (2001).
45. Levesque,J.P., Hendy,J., Takamatsu,Y., Simmons,P.J. & Bendall,L.J. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J. Clin. Invest* **111**, 187-196 (2003).
46. Petit,I. *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* **3**, 687-694 (2002).
47. Liu,F., Poursine-Laurent,J. & Link,D.C. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood* **95**, 3025-3031 (2000).

48. Drize,N., Chertkov,J. & Zander,A. Hematopoietic progenitor cell mobilization into the peripheral blood of mice using a combination of recombinant rat stem cell factor (rrSCF) and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF). *Exp. Hematol.* **23**, 1180-1186 (1995).
49. Brasel,K. *et al.* Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood* **90**, 3781-3788 (1997).
50. Neben,S., Marcus,K. & Mauch,P. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **81**, 1960-1967 (1993).
51. Laterveer,L., Lindley,I.J., Hamilton,M.S., Willemze,R. & Fibbe,W.E. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* **85**, 2269-2275 (1995).
52. Springer,T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314 (1994).
53. Voermans,C., Rood,P.M., Hordijk,P.L., Gerritsen,W.R. & van der Schoot,C.E. Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* **18**, 435-443 (2000).
54. Bautz,F., Denzlinger,C., Kanz,L. & Mohle,R. Chemotaxis and transendothelial migration of CD34(+) hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood* **97**, 3433-3440 (2001).
55. Feng,Y., Broder,C.C., Kennedy,P.E. & Berger,E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
56. Oberlin,E. *et al.* The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**, 833-835 (1996).
57. Rosu-Myles,M. *et al.* The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 14626-14631 (2000).
58. Shen,W., Bendall,L.J., Gottlieb,D.J. & Bradstock,K.F. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Exp. Hematol.* **29**, 1439-1447 (2001).
59. Hidalgo,A. *et al.* Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **29**, 345-355 (2001).
60. Gazitt,Y. & Liu,Q. Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients. *Stem Cells* **19**, 37-45 (2001).

61. Uchida,N. *et al.* The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* **89**, 465-472 (1997).
62. Yamaguchi,M. *et al.* Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle. *Blood* **92**, 842-848 (1998).
63. Huygen,S. *et al.* Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture. *Blood* **100**, 2744-2752 (2002).
64. Gothot,A., van der Loo,J.C., Clapp,D.W. & Srour,E.F. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* **92**, 2641-2649 (1998).
65. Habibian,H.K. *et al.* The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit. *J. Exp. Med.* **188**, 393-398 (1998).
66. Glimm,H., Oh,I.H. & Eaves,C.J. Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0). *Blood* **96**, 4185-4193 (2000).
67. van der Loo,J.C. *et al.* VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J. Clin. Invest* **102**, 1051-1061 (1998).
68. Luskey,B.D., Rosenblatt,M., Zsebo,K. & Williams,D.A. Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* **80**, 396-402 (1992).
69. Peters,S.O., Kittler,E.L., Ramshaw,H.S. & Quesenberry,P.J. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* **87**, 30-37 (1996).
70. van Leeuwen,B.H., Martinson,M.E., Webb,G.C. & Young,I.G. Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood* **73**, 1142-1148 (1989).
71. Williams,D. & Nathan,D.G. Introduction: the molecular biology of hematopoiesis. *Semin. Hematol.* **28**, 114-116 (1991).
72. Leary,A.G. *et al.* Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. *Blood* **71**, 1759-1763 (1988).
73. Patchen,M.L., MacVittie,T.J., Williams,J.L., Schwartz,G.N. & Souza,L.M. Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. *Blood* **77**, 472-480 (1991).
74. Ikebuchi,K. *et al.* Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 9035-9039 (1987).

75. Paul, S.R. *et al.* Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 7512-7516 (1990).
76. Musashi, M. *et al.* Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 765-769 (1991).
77. Lemoli, R.M. *et al.* Interleukin-11 stimulates the proliferation of human hematopoietic CD34+ and CD34+CD33-DR- cells and synergizes with stem cell factor, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* **21**, 1668-1672 (1993).
78. Kawashima, I. *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Lett.* **283**, 199-202 (1991).
79. Peters, S.O., Kittler, E.L., Stewart, F.M., Ramshaw, H.S. & Quesenberry, P.J. Culture of murine marrow with sublethal amounts of stem cell factor promotes survival of hematopoietic progenitors in cell cycle dormancy. *Blood* **86**, 492a (1995).
80. Migliaccio, G. *et al.* Stem cell factor induces proliferation and differentiation of highly enriched murine hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 7420-7424 (1991).
81. Veiby, O.P., Jacobsen, F.W., Cui, L., Lyman, S.D. & Jacobsen, S.E. The flt3 ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential. Suppression of apoptosis and counteraction by TNF-alpha and TGF-beta. *J. Immunol.* **157**, 2953-2960 (1996).
82. Matthews, W., Jordan, C.T., Wiegand, G.W., Pardoll, D. & Lemischka, I.R. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* **65**, 1143-1152 (1991).
83. Broxmeyer, H.E. *et al.* Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp. Hematol.* **23**, 1121-1129 (1995).
84. Jacobsen, S.E., Okkenhaug, C., Myklebust, J., Veiby, O.P. & Lyman, S.D. The FLT3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: synergistic interactions with interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J. Exp. Med.* **181**, 1357-1363 (1995).
85. Metcalf, D. *et al.* Synergistic suppression: anomalous inhibition of the proliferation of factor-dependent hemopoietic cells by combination of two colony-stimulating factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 2819-2823 (1992).
86. Metcalf, D., Nicola, N.A., Gearing, D.P. & Gough, N.M. Low-affinity placenta-derived receptors for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor can deliver a proliferative signal to murine hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 4670-4674 (1990).
87. Nicola, N.A. *et al.* Neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies to the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha-chain. *Blood* **82**, 1724-1731 (1993).

88. Dexter,T.M., Garland,J., Scott,D., Scolnick,E. & Metcalf,D. Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J. Exp. Med.* **152**, 1036-1047 (1980).
89. Duhrsen,U. & Metcalf,D. Effects of irradiation of recipient mice on the behavior and leukemogenic potential of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* **75**, 190-197 (1990).
90. Becker,P.S. *et al.* Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. *Exp. Hematol.* **27**, 533-541 (1999).
91. Gobert,G.S., Bourgin,C., Liu,W.Q., Garbay,C. & Mouchiroud,G. M-CSF stimulated differentiation requires persistent MEK activity and MAPK phosphorylation independent of Grb2-Sos association and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal.* **17**, 1352-1362 (2005).
92. Young,S.M., Cambareri,A.C. & Ashman,L.K. Role of c-KIT expression level and phosphatidylinositol 3-kinase activation in survival and proliferative responses of early myeloid cells. *Cell Signal.* (2005).
93. Li,C.L. & Johnson,G.R. Rhodamine123 reveals heterogeneity within murine Lin⁻, Sca-1⁺ hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **175**, 1443-1447 (1992).
94. Minas,T. & Bryant,T. The role of autologous chondrocyte implantation in the patellofemoral joint. *Clin. Orthop. Relat Res.* 30-39 (2005).
95. Horch,R.E., Kopp,J., Kneser,U., Beier,J. & Bach,A.D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell Mol. Med.* **9**, 592-608 (2005).
96. Kashiwa,N. *et al.* Treatment of full-thickness skin defect with concomitant grafting of 6-fold extended mesh auto-skin and allogeneic cultured dermal substitute. *Artif. Organs* **28**, 444-450 (2004).
97. Kittler,E.L. *et al.* Cytokine-facilitated transduction leads to low-level engraftment in nonablated hosts. *Blood* **90**, 865-872 (1997).
98. Naldini,L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267 (1996).
99. Horn,P.A. *et al.* Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* **103**, 3710-3716 (2004).
100. Verhoeven,E. *et al.* IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes. *Blood* **101**, 2167-2174 (2003).
101. Kelso,A. & Trouth,A.B. Survival of the myeloid progenitor cell line FDC-P1 is prolonged by interferon-gamma or interleukin-4. *Growth Factors* **6**, 233-242 (1992).
102. McCubrey,J.A. *et al.* Growth-promoting effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hematopoietic cells: overexpression of introduced IGF-1 receptor abrogates interleukin-3 dependency of murine factor-dependent cells by a ligand-dependent mechanism. *Blood* **78**, 921-929 (1991).

103. Lagasse,E. *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* **6**, 1229-1234 (2000).
104. Boggs,D.R. The total marrow mass of the mouse: a simplified method of measurement. *Am. J. Hematol.* **16**, 277-286 (1984).
105. Mardiney,M., III & Malech,H.L. Enhanced engraftment of hematopoietic progenitor cells in mice treated with granulocyte colony-stimulating factor before low-dose irradiation: implications for gene therapy. *Blood* **87**, 4049-4056 (1996).
106. Hammers,H.J., Kirchner,H. & Schlenke,P. Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers. *Cytometry* **40**, 327-335 (2000).
107. L.Davis, M.Kuehl & J.Battey. Basic Methods in Molecular Biology, 2nd Edition. *Appleton & Lange* (1994).
108. Winer,J., Jung,C.K., Shackel,I. & Williams,P.M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* **270**, 41-49 (1999).
109. Krause,D.S. *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-377 (2001).
110. Osawa,M. *et al.* In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* **156**, 3207-3214 (1996).
111. Peters,S.O., Kittler,E.L., Ramshaw,H.S. & Quesenberry,P.J. Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp. Hematol.* **23**, 461-469 (1995).
112. Williams,R.L. *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687 (1988).
113. Szilvassy,S.J., Meyerrose,T.E., Ragland,P.L. & Grimes,B. Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin. *Exp. Hematol.* **29**, 1494-1502 (2001).
114. Orschell-Traycoff,C.M. *et al.* Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood* **96**, 1380-1387 (2000).
115. Wang,M.W. *et al.* Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non-CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ.* **9**, 105-112 (1998).
116. Leu,S.T. *et al.* Integrin alpha4beta1 function is required for cell survival in developing retina. *Dev. Biol.* **276**, 416-430 (2004).
117. Zhang,H. *et al.* Beta 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *Cancer* **95**, 896-906 (2002).

118. Garcia-Gila,M., Lopez-Martin,E.M. & Garcia-Pardo,A. Adhesion to fibronectin via alpha4 integrin (CD49d) protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas/Apo-1 receptors. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 455-462 (2002).
119. Johnson,J.D., Hess,K.L. & Cook-Mills,J.M. CD44, alpha(4) integrin, and fucoidin receptor-mediated phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 810-820 (2003).
120. Smyth,S.S., Joneckis,C.C. & Parise,L.V. Regulation of vascular integrins. *Blood* **81**, 2827-2843 (1993).
121. Hynes,R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
122. Christopherson,K.W., Hangoc,G., Mantel,C.R. & Broxmeyer,H.E. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* **305**, 1000-1003 (2004).
123. Huang,M.B. *et al.* Characterization of Nef-CXCR4 interactions important for apoptosis induction. *J. Virol.* **78**, 11084-11096 (2004).
124. Herbein,G. *et al.* Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* **395**, 189-194 (1998).
125. James,C.O. *et al.* Extracellular Nef protein targets CD4+ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors. *J. Virol.* **78**, 3099-3109 (2004).
126. Ullrich,C.K., Groopman,J.E. & Ganju,R.K. HIV-1 gp120- and gp160-induced apoptosis in cultured endothelial cells is mediated by caspases. *Blood* **96**, 1438-1442 (2000).
127. Hesselgesser,J. *et al.* Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr. Biol.* **8**, 595-598 (1998).
128. Denning-Kendall,P., Singha,S., Bradley,B. & Hows,J. Cytokine expansion culture of cord blood CD34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells* **21**, 61-70 (2003).
129. Ramirez,M. *et al.* Ex vivo expansion of umbilical cord blood (UCB) CD34(+) cells alters the expression and function of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Br. J. Haematol.* **115**, 213-221 (2001).
130. Wright,D.E., Bowman,E.P., Wagers,A.J., Butcher,E.C. & Weissman,I.L. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J. Exp. Med.* **195**, 1145-1154 (2002).
131. Martin,C. *et al.* Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* **19**, 583-593 (2003).
132. Hartmann,T.N., Burger,J.A., Glodek,A., Fujii,N. & Burger,M. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* **24**, 4462-4471 (2005).

133. Dravid,G. & Rao,S.G. Ex vivo expansion of stem cells from umbilical cord blood: expression of cell adhesion molecules. *Stem Cells* **20**, 183-189 (2002).
134. Reems,J.A., Mielcarek,M. & Torok-Storb,B. Differential modulation of adhesion markers with ex vivo expansion of human umbilical CD34+ progenitor cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **3**, 133-141 (1997).
135. Berrios,V.M. *et al.* The molecular basis for the cytokine-induced defect in homing and engraftment of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **29**, 1326-1335 (2001).
136. Cerny,J. *et al.* Homing of purified murine lymphohematopoietic stem cells: a cytokine-induced defect. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **11**, 913-922 (2002).
137. Kobari,L. *et al.* In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Exp. Hematol.* **28**, 1470-1480 (2000).
138. Rebel,V.I., Dragowska,W., Eaves,C.J., Humphries,R.K. & Lansdorp,P.M. Amplification of Sca-1+ Lin- WGA+ cells in serum-free cultures containing steel factor, interleukin-6, and erythropoietin with maintenance of cells with long-term in vivo reconstituting potential. *Blood* **83**, 128-136 (1994).
139. Spangrude,G.J., Brooks,D.M. & Tumas,D.B. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* **85**, 1006-1016 (1995).
140. Uchida,N. & Weissman,I.L. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J. Exp. Med.* **175**, 175-184 (1992).
141. Reddy,G.P. *et al.* Cell cycle analysis and synchronization of pluripotent hematopoietic progenitor stem cells. *Blood* **90**, 2293-2299 (1997).
142. Domen,J. & Weissman,I.L. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *J. Exp. Med.* **192**, 1707-1718 (2000).
143. Cheng,T. *et al.* Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **287**, 1804-1808 (2000).
144. Adams,G.B. *et al.* Heterologous cells cooperate to augment stem cell migration, homing, and engraftment. *Blood* **101**, 45-51 (2003).
145. Taichman,R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* **105**, 2631-2639 (2005).

Anhang 1 Reagenzien und Labormaterialien

7-Amino-actinomycin D	Sigma
Agarose (electrophorese grade)	Sigma
BORAX	Sigma
BrdU (Bromodesoxyuridin)	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Dimethylsuperimide	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco
DMSO (cell cultered tested)	Sigma
EDTA (Ethyldinitrotetraessigsäure)	Sigma
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
FKS (Fötales Kälberserum)	Gibco
Formaldehyd	Sigma
IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium)	Gibco
Isofluran (Forene™)	Abbott
Isopropanol	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
Methylformamide	Fluka
Methylzellulosemedium (Methocult™ GF M3434)	Stemcell
Nukleotide	Hybaid
RPMI (Medium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)	Gibco
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
SFEM Serumfreies Expansions Medium (StemSpan™)	Stemcell
β-Mercapthoethanol	Gibco
TEMED (N, N, N', N'-Tertamethylethylendiamin)	Sigma
Tris (hydroxymethyl-amoniummethan; ultrapure)	Bio-Rad
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Sigma
Einfrierröhrchen	Nunc
Objektträger und Deckgläser	Schütt, Menzel
Plastikwaren	Sarstedt, Falcon
Microtainer™ bis 400µl	Becton Dickinson
Einmalfilter (Porengröße 0,22µm)	Millipore
Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml und 2ml	Eppendorf

Anhang 4 Tierversuche

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein – Campus Lübeck
Medizinische Klinik I
Ratzeburger Allee 160 • 23538 Lübeck

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Campus Lübeck
Medizinische Klinik I – Direktor Prof. Dr. H. L. Fehm
Bereich Hämatologie/Onkologie
PD Dr. S. Peters

Tel: 0451 / 500-2349 / 2316
Fax: 0451 / 500-2356
e-mail: Stefan.Peters@uni-luebeck.de
Internet: <http://www.innere1.mu-luebeck.de>

Datum: 11. Dezember 2005

Erklärung zu den Tierexperimenten

Die Transplantationsexperimente zur Untersuchung des Einfluß von Zytokinen auf hämatopoetische Stammzellen im Rahmen der Dissertation von Arne Diehl sind in Antrag 12/1e/99 „ In Vitro Expansion langzeit-repopulierender hämatopoetischer Zellen“ am 31.5.1999 vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt worden. Die jeweiligen Verlängerungen des Antrags liegen vor. Des weiteren wurde die Verwendung von C57BL/6 anstatt von Balb/c Mäusen am 20.11.2002 genehmigt.



PD Dr. S. Peters

Anhang 5 Zellzyklus siehe 3.3.2

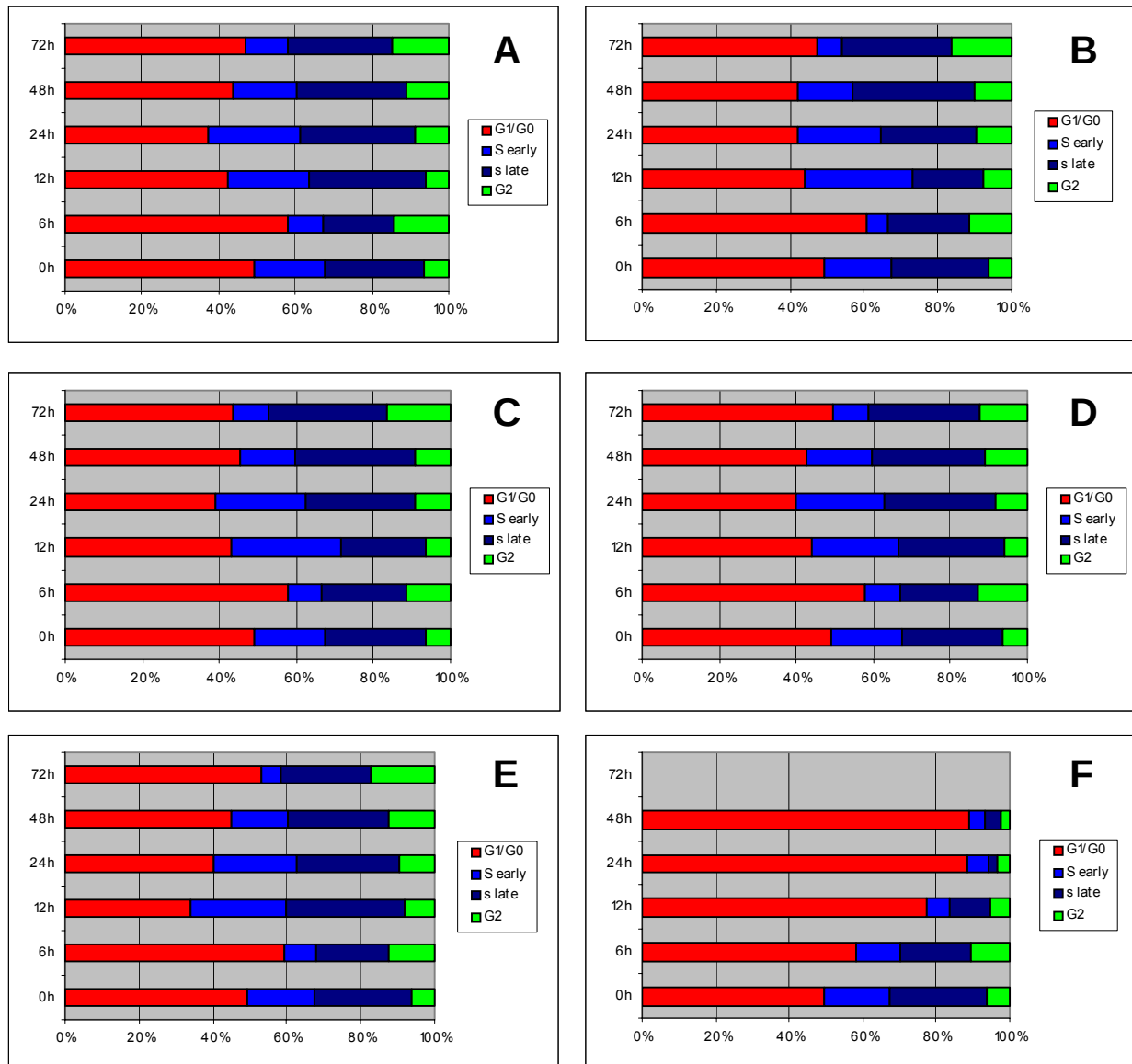


Abb. 28 Zellzyklus der FDCP1 Zellen nach BrdU-Inkorporierung. Wie in 2.4.3 beschrieben kann nach UV-Bestrahlung intrazellulär eingebautes BrdU markiert werden und so die S-Phase gegenüber der alleinigen Darstellung des DNA-Gehaltes durch 7AAD abgegrenzt werden. Gezeigt wird die anteilige Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellphasen an den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72h. In dem Experimentblock A-F wurden den FDCP1 Zellen IL-3 zugegeben, außer in der absterbenden Kontrollgruppe F, die noch nicht apoptotischen Zellen zeigen einen G1-Arest. Die übrigen Gruppen zeigen einen typischen Wachstumsverlauf. Zunächst erhöht sich der Anteil der Zellen in G1, wenige Zellen treten in die frühe S-Phase (S early) ein. Nach der Konditionierung des Mediums folgt eine starke Proliferation mit Abschwächung hin zur Plateau-Phase des Wachstums bei 72h.

Fortsetzung Anhang 5

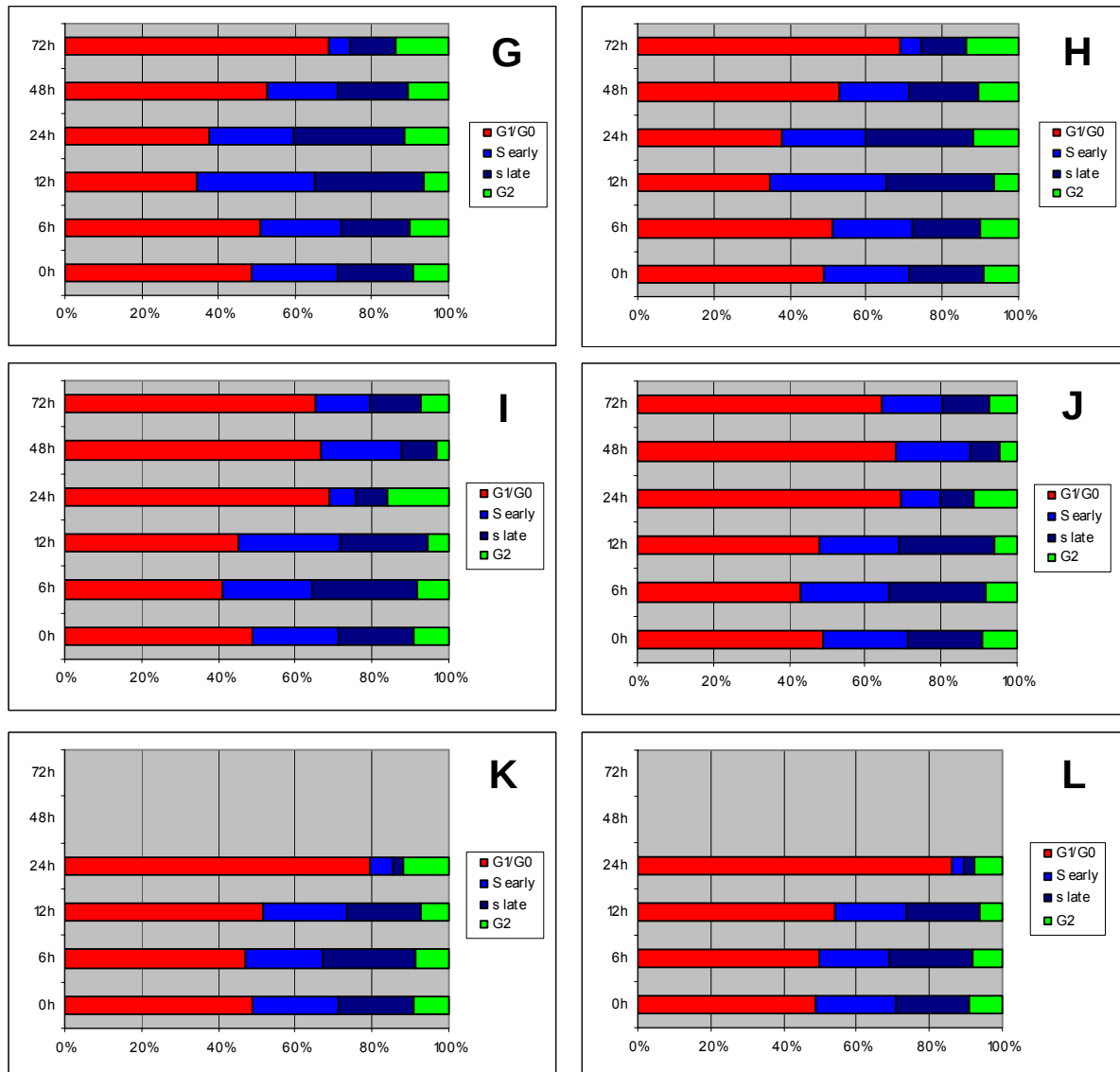


Abb. 29 Zellzyklus der FDCP1 Zellen unter IL-3 Entzug nach BrdU-Inkorporierung. Wie in 2.4.3 beschrieben kann nach UV-Bestrahlung intrazellulär eingebautes BrdU markiert werden und so die S-Phase gegenüber der alleinigen Darstellung des DNA-Gehaltes durch 7AAD abgegrenzt werden. Gezeigt wird die anteilige Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellphasen an den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72h. In dem Experimentblock G-L wurden den FDCP1-Zellen IL-3 entzogen, außer in Kontrollgruppe G, die ein normales Wachstums und Zellzyklusverhalten zeigt. Gruppe H mit GM-CSF hat einen gleichen Verlauf wie G. In den Gruppen I (IL-6, -11, SCF) und J (SCF, Flt3L), analog ihren Wachstumskurven in Abb. 21, zeigt der Anteil der Zellen in Synthese einen wellenförmigen Verlauf. Initial werden mehr Zellen aus G1 mobilisiert, es folgt fast ein G1-Arrest bevor bei 72h erneut mehr Zellen im Vergleich zu Gruppe G in aktiven Phasen des Zellzyklus sind. Gruppe K (SDF1 α) kann, wie L kein Wachstum unterhalten, es kommt zu einem G0/1-Arrest.

Danksagung

Ich danke PD Dr. Stefan Peters, hämatologische Abteilung der Medizinischen Klinik I, Universität Lübeck, für die Betreuung der Arbeit und die Überlassung des Themas. Insbesondere bin ich dankbar für die fortwährende Bereitschaft zur Diskussion und Entwicklung neuer Ideen; die Begleitung in Zeiten von Erfolg und Mißerfolg, ohne dabei die zentralen Fragen und die Hintergründe der Stammzellforschung aus den Augen zu verlieren.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Thomas Wagner für die Überlassung der Räumlichkeiten, Nutzung der Gerätschaften und die Bereitstellung der vielen Verbrauchsmaterialien.

Dr. Philipp Simon und Dr. rer. nat. Steffi Stölting möchte ich danken für die Diskussionsbereitschaft molekulargenetischer Fragen und die darüber hinausgehende freundschaftliche Begleitung. Dr. hum. biol. Zouhair Ahherahrou danke ich für inspirative Gespräche und Anregungen zu dem tierexperimentellen Teil der Arbeit.

Heike Albrecht, Claudia Kauderer, Monica Vollmert und Biggi Branke danke ich für die Hilfe bei Fragen in der praktischen Laborarbeit und Organisation des Labors. Desweiteren gilt ein herzlicher Dank allen MTA's des Hämatologischen Klinik für das Öffnen der Labortür zu allen Uhrzeiten und die gute Absprache bei Benutzung der Gerätschaften der Klinik.

Mein Dank gilt auch der Kooperation mit dem Leiter der Tierhaltung, Dr. Ralf Noël und allen Tierpflegern für die Betreuung der Mäuse. Ebenso danke ich für die koordinierte Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie, besonders vertreten durch Dr. Roger Nadrowitz; die Beratung der Arbeit am Automacs durch Herrn Wolfram (Firma Miltenyi), sowie für die Bemühungen um Zellselektionierung durch Herrn Rimek am Heinrich-Pette-Institut.

Zum Schluß möchte ich allen anderen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, allen voran wird dieser besondere Dank meinen Freunden zuteil, die diese Zeit mit mir geteilt und mich immer ermutigt haben.

Lebenslauf

Name: Arne Diehl

Anschrift: Kirchweg 53
23569 Lübeck

Tel. 0175-1782212

Email: arne.diehl@web.de

Geburtsdaten: 16.01.1976

Geburtsort: Groß-Umstadt

Schulbildung:

8/82 – 7/86	Grundschule Gersprenz-Schule in Reinheim
8/86 – 7/88	Förderstufe Kurt-Schumacher-Schule in Reinheim
8/88 – 6/95	Gymnasium Edith-Stein-Schule in Darmstadt
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/97 – 8/00	Studium der Medizin an der Universität Lübeck
10/00 – 8/01	7./8. Fachsemester an der Universidad de Barcelona, Spanien
10/01 – 5/05	Abschluß des Studiums an der Universität Lübeck

Promotion: 11/01 – 9/04 experimentelle Arbeiten am hämatologischen Institut der Universität Lübeck im Rahmen der Dissertation (Doktorvater: PD Dr. S. O. Peters)