

**Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert**

---

**Einfluss hämatopoetischer Zytokine auf die Genregulation  
muriner embryonaler E14 Stammzellen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von  
**Mareike Middeke**  
aus Lemgo

**Lübeck 2009**

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Stefan Peters  
2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Schlenke  
Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2009  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.11.2009

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

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIV
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hämatopoese.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Hämatopoese der Maus.....	2
1.1.1.1 Primitive Hämatopoese.....	2
1.1.1.2 Definitive Hämatopoese.....	3
<b>1.2 Murine ES-Zellen.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 ES-Zell-Kultivierung als adäquates Modell der Hämatopoese in vivo.....	4
<b>1.3 Hämatopoetische Stammzellen.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Funktionelle und morphologische Charakterisierung muriner HSC.....	5
<b>1.4 Ausgewählte charakterisierende Rezeptoren hämatopoetischer Zellen.....</b>	<b>8</b>
1.4.1 CD34.....	8
1.4.2 CD90.2 (Thy-1).....	8
1.4.3 CD117 (c-kit).....	8
1.4.4 CD135 (FLT3/FLK2).....	9
<b>1.5 Zytokine.....</b>	<b>10</b>
1.5.1 Das klinische Interesse an HGFs.....	10
1.5.2 IL-3.....	10
1.5.3 IL-6.....	11
1.5.4 SCF.....	11
1.5.5 Flt3-L.....	11
1.5.6 Zytokinkombinationen.....	12
<b>1.6 Genregulation in der Hämatopoese.....</b>	<b>13</b>
1.6.1 Flk1.....	13
1.6.2 SCL/TAL1.....	13
1.6.3 HOXB4.....	14
1.6.4 GATA2.....	14
1.6.5 EPO.....	14
1.6.6 PU.1.....	15
1.6.7 CyclinD1.....	15
1.6.8 Lmo2 und Lmo4.....	16
<b>1.7 Fragestellung der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>22</b>

2.2.1 Zellbiologische Methoden . . . . .	22
2.2.1.3 Präparation von embryonalen Fibroblasten . . . . .	22
2.2.1.4 Mitomycinbehandlung von Feederzellen . . . . .	22
2.2.1.5 Präparation der Kulturflaschen zur Kultivierung der ES-Zellen . . . . .	23
2.2.1.6 Passagierung und Kryokonservierung von Zellen . . . . .	23
2.2.1.7 Kultivierung von embryonalen Stammzellen . . . . .	23
2.2.1.8 Gewinnung von Embryoid Bodies . . . . .	23
2.2.1.9 Mediumwechsel . . . . .	24
2.2.1.10 Zytokin-Stimulation . . . . .	24
2.2.1.11 Ernte der ESC . . . . .	24
2.2.1.12 Präparation der durchflusszytometrischen Messung (FACScan) . . . . .	25
2.2.1.13 Durchflusszytometrische Separation . . . . .	25
2.2.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	27
2.2.2.1 RNS-Präparation aus kultivierten Zellen . . . . .	27
2.2.2.2 Spektralphotometrische Messung . . . . .	27
2.2.2.3 PCR-Prinzip . . . . .	27
2.2.2.4 Real-time-PCR . . . . .	28
2.2.2.4.1 Reverse Transkriptase Reaktion . . . . .	28
2.2.2.4.2 PCR-Amplifikation basierend auf der TaqMan-Methode . . . . .	29
2.2.2.4.3 Kalkulation der relativen Expressionsänderung der Gene unter Stimulation mit Zytokinen mittels der Comparativen $\Delta\Delta C_t$ Methode (basierend auf den PCR- Ergebnissen) . . . . .	29
2.2.2.4.4 Durchführung . . . . .	30
2.2.2.4.5 Kriterien für die Auswahl der Primer und Sonden . . . . .	30
2.2.2.5 Ermittlung der adäquaten Interleukin-6 Stimulationsdosis . . . . .	31
2.2.2.6 Versuchsaufbau . . . . .	32
<b>3 ERGEBNISSE . . . . .</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Untersuchung zentraler Gene der Hämatopoese mit Hilfe der Realtime-PCR . . . . .</b>	<b>33</b>
3.1.1 Expressionsverlauf der untersuchten Gene über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei unterschiedlicher Stimulationsdauer mit IL-6, IL-3 sowie SCF . . . . .	33
3.1.1.1 PU.1 . . . . .	34
3.1.1.1.1 Expressionsverhalten von PU.1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) . . . . .	34
3.1.1.1.2 Expressionsverhalten von PU.1 bei punktueller Stimulation (48-bzw. 72h) . . . . .	35
3.1.1.2 CyclinD1 . . . . .	36
3.1.1.2.1 Expressionsverhalten von CyclinD1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) . . . . .	36
3.1.1.2.2 Expressionsverhalten von CyclinD1 bei punktueller Stimulation (48-bzw. 72h) . . . . .	36
3.1.1.3 GATA2 . . . . .	37
3.1.1.3.1 Expressionsverhalten von GATA2 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) . . . . .	37
3.1.1.3.2 Expressionsverhalten von GATA2 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) . . . . .	38
3.1.1.4 EPO . . . . .	39
3.1.1.4.1 Expressionsverhalten von EPO bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) . . . . .	39

3.1.1.4.2	Expressionsverhalten von EPO bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) .	39
3.1.1.5	FLK1.....	41
3.1.1.5.1	Expressionsverhalten von FLK1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) . . .	41
3.1.1.5.2	Expressionsverhalten von FLK1 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) . . .	42
3.1.1.6	Lmo2 .....	43
3.1.1.7	HOXB4 .....	44
3.1.1.7.1	Expressionsverhalten von HOXB4 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage). . .	44
3.1.1.7.2	Expressionsverhalten von HOXB4 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) . .	44
3.1.1.8	Lmo4.....	46
3.1.1.9	TAL1.....	47
3.1.1.9.1	Expressionsverhalten von TAL1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) . . .	47
3.1.1.9.2	Expressionsverhalten von TAL1 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) . . .	47
3.1.1.10	Zusammenfassung.....	49
3.1.2	Expressionsverlauf der untersuchten Gene über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei Einzelstimulation mit Flt3 bzw. SCF sowie bei Kombinationsstimulation mit Flt3 und SCF .....	52
3.1.2.1	PU.1.....	52
3.1.2.1.1	Expressionsverhalten von PU.1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage) mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	52
3.1.2.2	CyclinD1 .....	53
3.1.2.2.1	Expressionsverhalten von CyclinD1 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	53
3.1.2.3	GATA2.....	54
3.1.2.3.1	Expressionsverhalten von GATA2 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	54
3.1.2.4	EPO .....	55
3.1.2.4.1	Expressionsverhalten von EPO unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	55
3.1.2.5	FLK1.....	56
3.1.2.5.1	Expressionsverhalten von FLK1 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	56
3.1.2.6	Lmo2 .....	57
3.1.2.6.1	Expressionsverhalten von Lmo2 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	57
3.1.2.7	HOXB4 .....	58
3.1.2.7.1	Expressionsverhalten von HOXB4 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	58
3.1.2.8	Lmo4.....	59
3.1.2.8.1	Expressionsverhalten von Lmo4 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination.....	59
3.1.2.9	TAL1.....	59

3.1.2.9.1 Expressionsverhalten von TAL1 unter kontinuierlicher Stimulation über 30 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination . . . . .	59
3.1.2.10 Zusammenfassung . . . . .	61
<b>3.2 Ergebnis der Fluorescence-Activated-Cell-Sorter-Analyse muriner ES-Zellen . . . . .</b>	<b>63</b>
3.2.1 Einfluss von IL-6, IL-3 sowie SCF auf die Bildung CD90.2 <sup>+</sup> Zellen . . . . .	63
3.2.1.1 Einfluss einer 30-tägigen Stimulation muriner ES-Zellen mit IL-6, IL-3 und SCF auf die Differenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzellen (CD90.2 <sup>+</sup> Zellen). .	63
3.2.1.2 Einfluss einer 48-stündigen Stimulation muriner ES-Zellen mit IL-6, IL-3 und SCF auf die Differenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzellen (CD90.2 <sup>+</sup> Zellen). .	64
3.2.1.3 Einfluss einer 72-stündigen Stimulation muriner ES-Zellen mit IL-6, IL-3 und SCF auf die Differenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzellen (CD90.2 <sup>+</sup> Zellen). .	65
3.2.2 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD90.2, CD34, CD117 sowie CD135 positiver Zellen. . . . .	66
3.2.2.1 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD90.2 <sup>+</sup> Zellen . . . . .	66
3.2.2.2 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD34 positiver Zellen. . . . .	67
3.2.2.3 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD117 positiver Zellen. . . . .	68
3.2.2.4 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD135 positiver Zellen. . . . .	69
<b>4 DISKUSSION . . . . .</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Phänotypische Veränderungen durch Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF bzw. mit Flt3-L             und SCF. . . . .</b>	<b>71</b>
4.1.1 Einfluss einer kontinuierlichen vs punktuellen Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF sowie einer kontinuierlichen Stimulation mit Flt3-L und SCF auf die CD90.2-Expression . . . .	71
4.1.2 Einfluss einer Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit Flt3-L und SCF auf die Expressi- on der Oberflächenmarker CD34, CD135, CD117 . . . . .	72
4.1.2.1 CD34 . . . . .	72
4.1.2.2 CD135 . . . . .	72
4.1.2.3 CD117 (c-kit) . . . . .	74
<b>4.2 Genotypische Veränderungen durch eine Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3 und SCF             sowie durch eine Stimulation mit Flt3-L und SCF . . . . .</b>	<b>75</b>
4.2.1 Beeinflussung der Expression hämatopoese-spezifischer Gene unter einer kontinuierlichen vs. punktuellen Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF. . . . .	75
4.2.1.1 Flk1 . . . . .	76
4.2.1.2 SCL/TAL-1 . . . . .	76
4.2.1.3 HOXB4 . . . . .	77
4.2.1.4 GATA2 . . . . .	77
4.2.1.5 EPO . . . . .	78
4.2.1.6 PU.1 . . . . .	78
4.2.1.7 Cyclin D1. . . . .	79
4.2.1.8 Lmo2 . . . . .	79
4.2.1.9 Lmo4 . . . . .	79
4.2.2 Beeinflussung der Expression hämatopoese-spezifischer Gene unter einer Einzelstimulation	

mit SCF und Flt3-L bzw. unter einer Kombinationsstimulation der beiden Zytokine . . .	80
4.2.2.1 SCF .....	80
4.2.2.2 Flt3-L .....	80
4.2.2.3 SCF und Flt3-L in Kombination .....	81
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>82</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>84</b>
<b>7 ANHANG</b> .....	<b>98</b>
<b>7.1 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 30 Tage</b>	
(s. 3.2.1.1) .....	98
<b>7.2 Versuchsreihe punktuelle Stimulation über 48h mit IL-6, IL-3 und SCF (s. 3.2.1.2)</b> . . . . .	99
<b>7.3 Versuchsreihe punktuelle Stimulation über 72h mit IL-6, IL-3 und SCF (s. 3.2.1.3)</b> . . . . .	100
<b>7.4 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit Flt3 und SCF (Einzel- bzw. Kombi- nationsstimulation)</b> .....	101
<b>7.5 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 30 Tage</b>	
(s. 3.1.1.1.1-3.1.1.9.1) Realtime-PCR-Daten .....	102
<b>7.6 Versuchsreihe punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48h bzw. 72 h</b>	
(s. 3.1.1.1.2 -3.1.1.9.2) .....	103
<b>7.7 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit Flt3-L (s. 3.1.2.1-3.1.2.9)</b> .....	105
<b>7.8 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit SCF (s. 3.1.2.1-3.1.2.9)</b> .....	106
<b>7.9 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit Flt3-L und SCF</b>	
(s. 3.1.2.1-3.1.2.9) .....	107
<b>8 DANKSAGUNG</b> .....	<b>108</b>
<b>9 LEBENS LAUF</b> .....	<b>109</b>

## Abbildungsverzeichnis

**Abb. 3.1** Das hämatopoetische System mit Darstellung ausgewählter Rezeptoren sowie dem Einfluss wesentlicher Zytokine

**Abb. 3.1.1.1.1** Übersicht der PU.1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.1.2** Übersicht der PU.1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.2.1** Übersicht der CyclinD1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.2.2** Übersicht der Cyclin D1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.3.1** Übersicht der GATA2-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.3.2** Übersicht der GATA2-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.4.1** Übersicht der EPO-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.4.2** Übersicht der EPO-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.5.1** Übersicht der FLK1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.5.2** Übersicht der FLK1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.6 A, B)** Übersicht der Lmo2-Expression über einen Zeitraum von 25- bzw. 30 Tagen bei kontinuierlicher (30 Tage) sowie punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.7.1** Übersicht der HOXB4-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.7.2** Übersicht der HOXB4-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.8 A, B)** Übersicht der Lmo4-Expression über einen Zeitraum von 25- bzw. 30 Tagen bei kontinuierlicher (30 Tage) sowie punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.9.1** Übersicht der TAL1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.9.2** Übersicht der TAL1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.1.10** Übersicht des Expressionsverhaltens der untersuchten Gene im Zeitverlauf in Abhängigkeit der Stimulationsdauer mit IL-6, IL-3 und SCF

**Abb. 3.1.2.1** Übersicht der PU.1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.2** Übersicht der CyclinD1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.2.1.3** Übersicht der GATA2-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.4** Übersicht der EPO-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.5** Übersicht der FLK1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.6** Übersicht der Lmo2-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.7** Übersicht der HOXB4-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.8** Übersicht der Lmo4-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.9** Übersicht der TAL1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3-L, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

**Abb. 3.1.2.10** Übersicht des Expressionsverhaltens der untersuchten Gene unter kontinuierlicher Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit Flt3-L und SCF im Zeitverlauf

**Abb. 3.2.1.1** Nachweis CD90.2+ Zellen mithilfe der FACScan-Analyse -Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation über 30 Tage mit IL-6, IL-3 und SCF

**Abb. 3.2.1.2** Ermittlung CD90.2+ Zellen mithilfe der FACScan-Analyse -Versuchsreihe 48-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF im 5 Tages-Rhythmus über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen

**Abb. 3.2.1.3** Ermittlung CD90.2+ Zellen mithilfe der FACScan-Analyse -Versuchsreihe 72-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF im 5 Tages-Rhythmus über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen

**Abb. 3.2.2.1** Ermittlung des Einflusses von Flt3-L und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD90.2+ Zellen

**Abb. 3.2.2.2** Ermittlung des Einflusses von Flt3-L und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD34+ Zellen

**Abb. 3.2.2.3** Ermittlung des Einflusses von Flt3-L und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD117+ Zellen

**Abb. 3.2.2.4** Ermittlung des Einflusses von Flt3-L und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD135+ Zellen

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 2.1.1</b>	Chemikalien
<b>Tab. 2.1.2</b>	Zytokine
<b>Tab. 2.1.3</b>	Antikörper, Antibiotika, Enzyme, Inhibitoren
<b>Tab. 2.1.4</b>	Puffer und Stammlösungen
<b>Tab. 2.1.5</b>	Labormaterialien
<b>Tab. 2.1.6</b>	Murine embryonale Stammzellen und Feederzellen
<b>Tab. 2.1.7</b>	Oligonukleotide
<b>Tab. 2.1.8</b>	Geräte
<b>Tab. 2.2.1.1</b>	Lösungen und Medien für die ES-Zellkultur
<b>Tab. 2.1.2</b>	Chemikalien
<b>Tab. 2.2.2.4.1.1</b>	Standard RT-PCR-Mix
<b>Tab. 2.2.2.4.4.1</b>	allgemeiner Reaktionsansatz (TaqMan-PCR)
<b>Tab. 2.2.2.5.1</b>	Ermittlung der adäquaten IL-6 Dosis
<b>Tab. 2.2.2.5.2</b>	Ermittlung der adäquaten IL-6 Dosis
<b>Tab. 2.2.2.6.1</b>	Kontinuierliche Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3 und SCF über 30 Tage, Beginn der Stimulation: Tag 6+0
<b>Tab. 2.2.2.6.2</b>	Punktuelle Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3 und SCF an jedem 5. der 30 Tage, Ernte jeweils nach 48-, bzw. 72 h
<b>Tab. 2.2.2.6.3</b>	Kontinuierliche Stimulation der EBs mit Flt3-L und SCF über 20 Tage, Beginn der Stimulation: Tag 0
<b>Tab. 3.1</b>	Einteilung der Ratio des Gens in Hoch- und Runterregulation
<b>Tab. 7.1.1</b>	Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Stimulierte Population (IL-6,IL-3 und SCF) (Versuch IV, VIII, IX, XI)
<b>Tab. 7.1.2</b>	Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Kontrollpopulation (Versuch IV, VIII, IX, XI)
<b>Tab. 7.1.3</b>	Gesamtzellzahl der an den Erntezeitpunkten analysierten Proben Versuchsreihe 30-tägige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF (Versuch IV, VIII, IX, XI)
<b>Tab. 7.1.4</b>	Signifikanz der Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF über 30 Tage (Versuch IV, VIII, IX, XI)
<b>Tab. 7.2.1</b>	Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Stimulierte Population (Versuch V, VI, VII, X; 48-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF)
<b>Tab. 7.2.2</b>	Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Kontrollpopulation (Versuch V, VI, VII, X; 48-stündige Stimulation)
<b>Tab. 7.2.3</b>	Gesamtzellzahl der an den Erntezeitpunkten analysierten Proben (Versuch V, VI, VII, X; 48-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF)
<b>Tab. 7.2.4</b>	Signifikanz der Versuchsreihe punktuelle Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF über 48h (Versuch V, VI, VII, X)
<b>Tab. 7.3.1</b>	Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Stimulierte Population (Versuch V, VI, VII, X; 72-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF)
<b>Tab. 7.3.2</b>	Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Kontrollpopulation (Versuch V, VI, VII, X; 72-stündige Stimulation)

<b>Tab. 7.3.3</b>	Gesamtzellzahl der an den Erntezeitpunkten analysierten Proben (Versuch V, VI, VII, X; 72-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF)
<b>Tab. 7.3.4</b>	Signifikanz der Versuchsreihe punktuelle Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF über 72h
<b>Tab. 7.4.1</b>	Versuchsreihe CD34, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten
<b>Tab. 7.4.2</b>	Versuchsreihe CD117, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten
<b>Tab. 7.4.3</b>	Versuchsreihe CD135, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten
<b>Tab. 7.4.4</b>	Versuchsreihe CD90.2, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten
<b>Tab. 7.5.1</b>	Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF, Hochregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (IV, VIII, IX, XI), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4)
<b>Tab. 7.5.2</b>	Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF, Runterregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (IV, VIII, IX, XI), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4)
<b>Tab. 7.6.1</b>	Versuchsreihe 48-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF, Hochregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4)
<b>Tab. 7.6.2</b>	Versuchsreihe 48-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF, Runterregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4)
<b>Tab. 7.6.3</b>	Versuchsreihe 72-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF, Hochregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4)
<b>Tab. 7.6.4</b>	Versuchsreihe 72-stündige Stimulation mit IL-6,IL-3 und SCF, Runterregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).
<b>Tab. 7.7.1</b>	Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse (s. 2.2.2.4), Hochregulation. Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.
<b>Tab. 7.7.2</b>	Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse (s. 2.2.2.4), Runterregulation. Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung
<b>Tab. 7.8.1</b>	Versuchsreihe kont. Stim. mit SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse (s.2.2.2.4), Hochregulation. Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.
<b>Tab. 7.8.2</b>	Versuchsreihe kont. Stim. mit SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse (s. 2.2.2.4), Runterregulation. Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.
<b>Tab. 7.9.1</b>	Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L und SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse (s. 2.2.2.4), Hochregulation. Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.
<b>Tab. 7.9.2</b>	Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L und SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse (s. 2.2.2.4), Runterregulation. Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AGM	aorta-gonad-mesonephros
AK	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
BD	Becton Dickonson
BFU-E	erythroid burst forming unit
BL-CFC	blast colony forming cell
bp	base pair
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
cDNS	complementary DNS
CFU-Baso	Colony-forming Unit Basophile
CFU-E	Colony-forming Unit Erythroid
CFU-Eo	Colony-forming Unit Eosinophile
CFU-GEMM	Colony-forming Unit Granulocyte Erythroid Macrophage Megacaryocyte
CFU-Meg	Colony-forming Unit Megacaryocyte
CFU-S	Colony-forming Unit Spleen
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
DMEM	Dulbecco`s modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleotide triphosphate
EB	Embryoid Body
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epo	Erythropoetin
Epo-R	Erythropoetin Rezeptor
ESC	embryonal stem cell
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
evtl.	eventuell
FACScan	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FKS	Fetales Kälberserum
FLK-1	Fetal Liver Kinase-1
FSC	forward light scatter
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CFU	Granulocyte macrophage-Colony-forming Units
HKG	Housekeeping Gene
HSC	Hematopoietic Stem Cell

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
kDa	kiloDalton
KM	Knochenmark
LIF	leukaemia inhibitory factor
Min.	Minute(n)
lt-HSC	long-term self-renewing Hematopoietic Stem Cells
NEA	Non Essential Amino Acids
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pR-b	retinoblastoma gene product
p-Sp	para-aortale Splanchnopleura
RNS	Ribonucleid acid
RNSguard	Ribonuclease Inhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
Sca-1	stem cell antigen-1
SCF	stem cell factor
Sek.	Sekunde(n)
sog.	sogenannte/-er/-es
st-HSC	short-term self-renewing Hematopoietic Stem Cells
SSC	sideward light scatter
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
Taq-DNS-Polymerase	Thermus aquaticus-DNS-Polymerase
Tan	Annealingtemperatur
Tm	temperature of melting (Schmelztemperatur)
u.a.	unter anderem
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

## 1 Einleitung

Im Rahmen von Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe an murinen adulten KM-Zellen, der FDCP1-Zelllinie (factor dependant cell progenitors), hatte sich gezeigt, dass eine Kultivierung dieser Zellen mit der, bei retroviralen Transfektionsexperimenten anderer Arbeitsgruppen häufig verwendeten Zytokin-kombination IL-3, IL-6, IL-11 und SCF<sup>102</sup>, zwar morphologisch (sowie im klonogenen Assay) zu einer erfolgreichen Expansion der oben definierten Zellen führt, eine vollständige Wiederherstellung des blutbildenen Systems (Repopulation, s. 1.3) bei der anschließenden Transplantation in myeloablatierte Mäuse allerdings aufgrund eines schweren funktionellen Defektes der expandierten Zellen ausbleibt<sup>32</sup>.

Der Ursprung dieses Defektes ist im Wesentlichen unklar, die ersten Erklärungsversuche deuteten auf einen Zusammenhang mit dem Zellzyklus hin, wobei die begleitenden molekularen Mechanismen unklar blieben<sup>57,149</sup>. In diesem Zusammenhang konnten zellzyklusabhängige Veränderungen bei dem Auftreten einiger Zelloberflächenproteine, insbesondere von Adhäsionsmolekülen, dargestellt werden<sup>11,32</sup>. Die Versuche diese Phänomene auf Genexpressionsebene nachzuvollziehen scheiterten an der relativen Inhomogenität der zu untersuchenden Zellpopulationen. Die reinsten Vorläuferpopulationen aus murinen adulten Stammzellen können entweder mittels immunologischer Aufreinigung als Sca<sup>+</sup> Thy-1<sup>low</sup> lin<sup>-</sup> Zellen<sup>183</sup> (s. Abb.1.3) oder durchflusszytometrisch mittels supravitaler Färbung mit Höchst 33342 sowie Rhodamin 123 als Ho<sup>low</sup>/Rho<sup>low</sup>, identifiziert werden<sup>12,32</sup>. Ausreichende Untersuchungen auf diesem Gebiet scheiterten international bisher aus ethischen sowie finanziellen Gründen. Eine Alternative zu murinen adulten Stammzellen (SC) stellen murine embryonale Stammzellen (ESC) dar, die zum einen besser verfügbar sind sowie zum anderen eine homogene Zellpopulation darstellen. So wurden in unserer Arbeitsgruppe im in vivo ähnlichen Modell der murinen ESC bereits Untersuchungen zu den molekularen Ereignissen während der Vaskulo- und Angiogenese unter einer Behandlung mit dem vascular endothelial growth factor (VEGF) beschrieben, die eine Interpretationsbasis für die molekularen Mechanismen der Vaskulo- und Angiogenese in adulten Zellen lieferte<sup>174</sup>.

## 1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese stellt einen lebenslangen Prozess dar, der, aus einem Pool von long-term self-renewing hämatopoetischen Stammzellen (lt-HSC), sowohl die Produktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen als auch deren Reifung zu differenzierten Effektorzellen gewährleistet<sup>183</sup>. Das adulte hämatopoetische System umfasst ein hierarchisch konzipiertes Modell pluripotenter, multipotenter sowie unipotenter Stammzellen, an deren Spitze die in geringer, aber konstanter Anzahl im adulten Knochenmark vorhandenen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) stehen<sup>39</sup>. Durch fortlaufende Differenzierung der zunehmend determinierten Progenitorzellen<sup>39,18</sup> entstehen reife Effektorzellen, die Erythrozyten, Thrombozyten sowie mehr als acht unterschiedliche leukozytäre Linien und Osteoklasten<sup>155</sup>. Auf diese Weise nehmen alle im adulten Organismus zirkulierenden Blutzellen ihren Ursprung von den HSC. Die Produktion reifer Blutzellen ist, aufgrund der sehr kurzen Lebenszeit einer Vielzahl der Effektorzellen, ein fortwährender Prozess, der beim erwachsenen Menschen schätzungsweise jede Sekunde  $1.5 \times 10^6$  Blutzellen hervorbringt<sup>18</sup>. Während des gesamten Prozesses kommt es, unter Erhalt der Multipotenz der HSC zu einer beträchtlichen Proliferation und Differenzierung der Tochterzellen, um eine suffiziente Produktion differenzierter Zellen zu gewährleisten<sup>39</sup>. Dieser Zustand, der lediglich in spezialisierten Nischen des postnatalen Knochenmarks ablaufen kann, wird als steady state des hämatopoetischen Systems bezeichnet<sup>204</sup>. Der Großteil der adulten HSC ruht während des steady state und teilt sich nur selten, um eine angemessene Anzahl differenzierter Blutzellen sowie die Größe des HSC-Pools aufrechtzuerhalten<sup>25</sup>.

### 1.1.1 Hämatopoese der Maus

Ein etabliertes Modell zum Verständnis der Funktion humaner HSC ist die in vitro Kultivierung muriner ESC. Daher soll im nächsten Abschnitt zunächst ein Überblick über die Hämatopoese der Maus gegeben werden. Die Entwicklung des murinen hämatopoetischen Systems erfolgt in 2 Schritten, der primitiven und definitiven Hämatopoese<sup>111</sup>.

#### 1.1.1.1 Primitive Hämatopoese

Eine schon lang bestehende Hypothese besagt, dass die hämatopoetischen und endothelialen Zellen vom Hämangioblasten, einer mesodermalen Vorläuferzelle, abstammen<sup>161</sup>. Spätere Untersuchungen identifizierten im Dottersack zwischen dem 2,5-4. Tag post conceptionem (p.c.) eine transiente Vorläuferzelle mesodermaler Herkunft im Dottersack<sup>42</sup>. Hierbei handelt es sich um die sogenannte blast colony forming cell (BL-CFC), das in vitro Äquivalent des in vivo auftretenden Hämangioblasten. Die BL-CFC stellen den Ursprung sowohl primitiver als auch definitiver hämatopoetischer und endothelialer Zellen dar<sup>123</sup>. Der Nachweis sowohl primitiver Erythrozyten als auch colony-forming units (CFU) im Dottersack zwischen den Tagen 7,0 und 8,25 p.c führte zu der Erkenntnis, dass die primitive Hämatopoese extraembryonal, im Dottersack lokalisiert ist<sup>129,206</sup>. Neuere Untersuchungen bestätigten diese Aussage<sup>44,96,113</sup>. Es handelt sich um die primären primitiven erythroiden Zellen, die in die Blutzirkulation eintreten sowie um die, für die Etablierung der Hämatopoese in der fetalen Leber bestimmten, definitiven Progenitorzellen<sup>113</sup>. Kurze Zeit nach den primitiven Erythrozyten, sowie den CFU, entstehen die myeloerythroiden Vorläuferzellen im Dottersack<sup>29,145</sup>. Da das Milieu des Dottersacks die terminale, definitive Differenzierung der Progenitorzellen nicht unterstützen kann, siedeln sich diese Zellen im weiteren Verlauf der Hämatopoese in der fetalen Leber

an<sup>123</sup>.

### 1.1.1.2 Definitive Hämatopoese

Um den 9.-10. Tag p.c. verlagert sich die Hämatopoese vom Dottersack nach intraembryonal. Die ersten hämatopoetischen Zellen, bei denen es sich um hämatopoetische Progenitorzellen handelt, konnten an Tag 8,5 p.c. in der sog. para-aortalen Splanchnopleura (p-Sp) identifiziert werden. Die p-Sp Region befindet sich in der Kaudalregion des Embryos. Die hämatopoetischen Zellen besitzen allerdings noch nicht die Fähigkeit zum long-term self renewal, erst an Tag 10,5-11,0 konnten HSCs mit dieser Fähigkeit in der p-Sp-Region nachgewiesen werden<sup>29,54,74,119</sup>. Während der Organogenese wird ein Teil der P-Sp zur aorta-gonad-mesonephros (AGM) Region verlagert<sup>137</sup>. Diese konnte als eine von anderen Geweben unabhängig initiierte Quelle des adulten Typs der colony forming unit-spleen (CFU-S), einer multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzelle, sowie der multipotenten long-term repopulating HSC (LTR-HSC) noch vor Kolonisation der fetalen Leber identifiziert werden<sup>29,39,54,118,119</sup>. Einige der typischen Oberflächenmarker der adulten hämatopoetischen Stammzellen, u.a. CD34 und c-kit (s.Abb.1.3), können auf den aus dieser Region stammenden, pluripotenten Stammzellen, nachgewiesen werden<sup>40</sup>. So konnte ab Tag 9 p.c. in der AGM-Region eine ähnliche CFU-S Aktivität wie im Dottersack gezeigt werden, die an Tag 10 p.c. einen Spitzenwert erreicht und schließlich am 11. und 12. Tag p.c., mit einem gleichzeitigen Anstieg in der fetalen Leber wieder abnimmt. Die primäre Kolonisierung der fetalen Leber, erfolgt an Tag 9,5-10,5 p.c. zum einen, wie mit dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, durch die CFUs der AGM-Region<sup>39</sup>. Zum anderen durch myeloerythroide Progenitorzellen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Dottersack stammen<sup>123</sup>. Die ersten HSCs, deren Herkunft vermutlich in der AGM-Region liegt, konnten an Tag 11,5 p.c. in der fetalen Leber nachgewiesen werden. In dieser Phase erlangen die HSCs die Kapazitäten, die es ihnen ermöglichen, sich um den Zeitpunkt der Geburt im Knochenmark anzusiedeln, um hier das hämatopoetische System für eine lebenslange Produktion hämatopoetischer Zellen zu etablieren<sup>123,202</sup>.

## 1.2 Murine ES-Zellen

Erstmals wurden im Jahre 1981 ESC aus murinen Blastozysten isoliert<sup>41,108</sup> und bereiteten damit den Weg für eine weitreichende, bis heute anhaltende Forschung auf diesem Gebiet.

ESC stammen aus der inneren Zellmasse des Embryos während des Blastozysten-Stadiums<sup>94</sup>. Es handelt sich um pluripotente Zellen, die fähig sind, eine unbegrenzte Anzahl symmetrischer Teilungen -ohne Differenzierung- zu durchlaufen, sowie Gewebe aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) des Embryos zu bilden<sup>94</sup>. Nach Isolierung der ES-Zellen aus der inneren Zellmasse des Embryos können diese *in vitro* unter Zugabe des differenzierungshemmenden Faktors Leukemia inhibitory factor (LIF), in einem primitiven, undifferenzierten Status unter Wahrung ihrer Pluripotenz gehalten werden<sup>94</sup>. Eine einzige ES-Zelle kann somit unter optimalen Bedingungen eine Kolonie genetisch identischer Zellen replizieren, die die gleichen Eigenschaften wie die ursprüngliche Zelle aufweisen<sup>94</sup>. Im Unterschied zu differenzierten somatischen Zellen brauchen ESC keine externen Stimuli zur DNA-Replikation<sup>94</sup>.

### 1.2.1 ES-Zell-Kultivierung als adäquates Modell der Hämatopoese *in vivo*

Doetschman et al konnten im Jahre 1985 erstmals zeigen, das murine ESC ab Tag drei bis Tag acht unter definierten Bedingungen der *in vitro* Kultivierung komplexe Zellaggregate bilden, die, aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Endoderm, Basallamina, Mesoderm sowie Ektoderm, als Embryoid Bodies (EB) bezeichnet werden<sup>37</sup>. Im weiteren Verlauf der Entwicklung bilden sich zystische Strukturen innerhalb der EBs, die dem 8-10 Tage alten, viszeralen Dottersack entsprechen<sup>37</sup>. Die Blastenkolonien<sup>93</sup> der EBs enthalten Vorläuferzellen aller hämatopoetischen Zellen, die während der Embryogenese auftreten, sowie Vorläuferzellen endothelialer, neuronaler und muskulärer Zelllinien<sup>26,76,93</sup> und können somit als Äquivalent des Hämangioblasten gesehen werden<sup>26</sup>. Ihr Verhalten entspricht der frühembryonalen Entwicklung *in vivo*<sup>88</sup>, wodurch es möglich ist, aus den *in-vitro* gewonnenen Daten Aussagen über die frühen hämatopoetischen Entwicklungen, der involvierten Zellen sowie ihrer Gene *in vivo* zu treffen<sup>40,46,68,75,112</sup>. Zellen eines 5 Tage alten Embryos (5 Tage p.c.) entsprechen den Zellen eines EBs der *in vitro* Kultivierung an Tag 7. Die Zellen, die bei primärem Nachweis hämatopoetischer Aktivität *in vivo*, in Form von Blutinseln im Dottersack an Tag 7,5 p.c. auftreten, finden sich *in vitro*, ungefähr in den Zellen eines 9,5 Tage alten EBs<sup>47,112,202</sup>. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Zeitpunkt als Tag 6+3,5 bezeichnet. Primär finden sich primitive Erythrozyten, kurze Zeit später definitive Erythrozyten, ab Tag 6+4 werden Zellen der myeloischen Reihe sowie ab Tag 6+6 auch der lymphatischen Reihe nachgewiesen<sup>77</sup>.

Die ES-Zell-Kultivierung ist somit ein vortrefflich geeignetes Modell zur Untersuchung der Hämatopoese sowie der geno- und phänotypischen Veränderungen während der Differenzierung und linienspezifischen Determination der beteiligten Zellen<sup>214</sup>, was auch durch neuere Untersuchungen gezeigt werden konnte<sup>28,88</sup>.

### 1.3 Hämatopoetische Stammzellen

Die Identifikation der HSCs gelang ursprünglich Till und McCulloch<sup>37</sup> im Jahre 1961. Sie zeigten, dass sich in der Milz letal bestrahlter Mäuse nach Applikation gesunden Knochenmarks makroskopische Kolonien (CFU-S) bildeten, die zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems (Repopulation) und dem damit einhergehenden Überleben der Mäuse führten. Diese Kolonien setzten sich aus differenzierten Vorläuferzellen verschiedenster Blutzelllinien zusammen<sup>37</sup>. Mit diesen Ergebnissen wurde eine Flut von Untersuchungen in Gang gebracht, die die Identifizierung, die funktionelle Charakterisierung sowie die Isolierung der HSC zum Ziel hatten<sup>94</sup>.

Da am lebenden Menschen nur begrenzt Untersuchungen durchführbar sind und auch *in vitro* Versuche einen vergleichsweise beschränkten Einblick in die Natur der Stammzelle bieten, ist der Großteil der heute über die funktionellen und morphologischen Charakteristika der humanen SC bekannten Fakten das Ergebnis von Transplantationsexperimenten. Zu den Eigenschaften der HSC gehören neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung des eigenen Zellpools und der Ausdifferenzierung zu Blutzellen aller hämatopoetischen Zelllinien die Fähigkeit zur Mobilisierung aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut sowie die Eigenschaft, zerstörter bzw. nicht gebrauchter Stammzellen in die Apoptose überzugehen<sup>39,131,218</sup>. So wird die Homöostase des HSC-Pools aufrechterhalten durch das Zusammenspiel positiver regulatorischer Signale, die zur Proliferation der HSC führen, sowie negativer Signale, die zur Apoptose der jeweiligen Zelle führen<sup>218</sup>.

#### 1.3.1 Funktionelle und morphologische Charakterisierung muriner HSC

Die HSCs, die lediglich 0,05% der gesamten Zellen des Knochenmarks ausmachen, konnten mittels durchflusszytometrischer Analyse der für jede Differenzierungsstufe charakteristischen Zelloberflächenmoleküle in zwei Subpopulationen geteilt werden<sup>135,156</sup>.

Der eine HSC-Typ der in einer Anzahl von 1:10000 im Knochenmark vorkommt, wird aufgrund seiner Fähigkeit die lebenslange Produktion der Blutzellen eines Organismus zu gewährleisten, als lt-HSC bezeichnet<sup>156</sup>. Diese Zellpopulation wird durch folgende phänotypische Merkmale charakterisiert: eine fehlende Expression linienspezifischer Marker, als lineage-depletion [ $lin^-$ ] bezeichnet, ein hohes Expressionsniveau der Rezeptoren c-kit [ $c-kit^+$ ] und stem cell antigen-1 [ $Sca-1^+$ ] sowie ein niedriges Expressionsniveau des Thy-1 [ $Thy-1^{lo}$ ] und des Flt3 Markers [ $Flt3^-$ ], zusammenfassend als  $c-kit^+ Thy-1^{lo} Sca-1^+ Lin^- Flt3^-$ , bezeichnet<sup>182</sup> (s. Abb.1.3).

Die short-term self-renewing hematopoietic stem cells (st-HSC), die aus den lt-HSC hervorgehen, und die lebenslange Selbsterneuerungskapazität bereits verloren haben, können lediglich für einen Zeitraum von 8 Wochen reife Blutzellen zur Verfügung stellen<sup>156</sup>. Sie kommen mit einer Häufigkeit von 1:2000 Zellen im Knochenmark vor und sind durch folgendes Expressionsmuster gekennzeichnet:  $c-kit^+ Thy-1^{lo} Sca-1^+ Lin^{lo/-} Flt3^+$ <sup>156</sup> (s. Abb.1.3). Bei den unmittelbaren Nachkommen der st-HSC, handelt es sich um multipotente Progenitorzellen, die zwar das Potential zur Differenzierung in alle Zelllinien bewahren, jedoch nur noch eine limitierte Kapazität zur Selbsterneuerung aufweisen. Sie sind durch folgendes Expressionsmuster gekennzeichnet:  $c-kit^+ Thy-1^- Sca-1^+ Lin^- Flt3^+$  (s. Abb.1.3). Die multipotenten Progenitorzellen differenzieren zu oligopotenten Progenitorzellen, die wiederum ein eingeschränkteres Differenzierungspotential aufweisen. Dies scheint eine Zweigstelle in der hämatopoetischen Hierarchie

darzustellen: die lymphoiden Progenitorzellen können zu reifen lymphoiden Zellen (B-, T-, dendritischen- sowie natürlichen Killerzellen) ausdifferenzieren, entsprechend können die myeloiden Progenitorzellen zu myeloerythroiden Zellen differenzieren<sup>2</sup>.

Zudem besteht die Möglichkeit lt- HSC von bereits in der Differenzierung fortgeschrittenen HSCs mit limitierter Selbsterneuerungskapazität durch die Abwesenheit des CD34- Oberflächenmarkers abzugrenzen<sup>143</sup>. Mithilfe des Stammzellantigens-1 (Sca-1) und des Stammzellfaktorrezeptors (c-kit) besteht die Möglichkeit, Stammzellen von Progenitorzellen zu unterscheiden<sup>154</sup>.



## 1.4 Ausgewählte charakterisierende Rezeptoren hämatopoetischer Zellen

### 1.4.1 CD34

Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein, welches sowohl von frühen hämatopoetischen Stammzellen als auch von bereits liniendeterminierten Vorläuferzellen exprimiert wird und im Laufe ihrer Differenzierung zu ausgereiften hämatopoetischen Zellen herunterreguliert wird<sup>136</sup>. Cheng et al konnten 1996 anhand von CD34 knock-out-Mäusen die wesentliche Rolle des Oberflächenmarkers während der Hämatopoese unter Beweis stellen<sup>24</sup>. Mit Hilfe des durchflusszytometrischen Nachweises CD34<sup>+</sup> Zellen in Kombination mit dem Nachweis anderer immunophänotypischer Charakteristika ist eine Unterscheidung unreifer Progenitorzellen von Zellen späterer Entwicklungsstadien realisierbar. Auch wenn die CD34<sup>+</sup> Zellen noch keine linienspezifischen Marker exprimieren, so stellen sie doch ein, relativ zu den ganz frühen Stammzellen (lt-HSC), fortgeschrittenes Stadium dar. Die Annahme, dass alle hämatopoetischen Stammzellen den CD34 Marker exprimieren wurde widerlegt, im Gegenteil, bei dem Großteil der hämatopoetischen Stammzellen handelt es sich um CD34<sup>-</sup>Zellen<sup>55,133,143,166,185,216</sup>. Mittels muriner Transplantationsstudien zeigten Tajima et al. im Jahre 2001, dass der Übergang von einer proliferativen fetalen HSC zu einer ruhenden, zur Selbsterneuerung befähigten Stammzelle, neben einer generellen Änderung im Expressionsmuster, insbesondere durch eine Runterregulation des CD34 Oberflächenmoleküls gekennzeichnet ist<sup>185</sup>. Es handelt sich somit um einen Marker, dessen Expression mit der Aktivität der Zelle assoziiert ist<sup>166,185</sup>. Die Expression des CD 34 Antigens wird zum Nachweis, zur Isolation sowie zur Aufreinigung von HSC genutzt.

### 1.4.2 CD90.2 (Thy-1)

Bei dem Antigen CD90.2 handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, welches von unreifen murinen erythroiden sowie myeloiden hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird<sup>124,125</sup> (s.Abb.1.3). Durch in-vitro Studien konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des Antigens Thy-1 durch den Antikörper Thy-1.2 zu einer Wachstumsreduktion bei unreifen hämatopoetischen Progenitorzellen, erythroid burst-forming units (BFU-E) sowie bei granulocyte/macrophage colony-forming units (CFU-GM) führt<sup>125</sup>. In der Differenzierung bereits weiter fortgeschrittene erythroide sowie myeloide Progenitorzellen bleiben allerdings unbeeinflusst<sup>125</sup>.

### 1.4.3 CD117 (c-kit)

CD 117 ist eine transmembrane Tyrosinkinase, die den sogenannten Stammzellfaktor (SCF) bindet und auch als c-kit bezeichnet wird<sup>36</sup>. Im hämatopoetischen System erfolgt die Expression überwiegend von Stamm- bzw. Progenitorzellen<sup>105</sup> (s.Abb.1.3) und ist u.a. wesentlich an der Proliferation, der Differenzierung sowie dem Überleben dieser Zellen beteiligt<sup>176</sup>. Im Laufe der Differenzierung granulozytärer, monozytärer sowie erythroider Zellen wird c-kit herunterreguliert<sup>3</sup>, lediglich die Mastzellen weisen auch noch im reifen Stadium die Expression von c-kit auf<sup>36,105</sup>. Klinisch erhält der CD117-Marker insofern Bedeutung, als das ca. 95% der gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) immunhistochemisch CD117-positiv sind und somit eine Abgrenzung zu der Mehrzahl anderer Sarkome, Lymphome sowie Karzinome erfolgen kann. 80-85% aller GIST weisen zudem aktivierende Mutationen im Kit-Onkogen auf, die mittels Tyrosinkinase-Hemmern gehemmt werden können<sup>36</sup>.

#### 1.4.4 CD135 (FLT3/FLK2)

Hierbei handelt es sich um den Rezeptor des Flt3-Liganden, der auch als FLT3/FLK2 bezeichnet wird<sup>159</sup>. Ähnlich der c-kit-Expression weisen insbesondere hämatopoetische Stamm- bzw. Progenitorzellen eine FLT3/FLK2 Expression auf<sup>109</sup>, mit zunehmender Differenzierung nimmt die Expression ab<sup>21</sup> (s. Abb. 1.3). Im Gegensatz zu c-kit wird FLT3/FLK2 allerdings nicht von Mastzellen exprimiert<sup>105</sup>. Die frühesten CD135<sup>+</sup>-Zellen sind die multipotenten, hoch proliferativen CD117<sup>low</sup>, Lin<sup>-</sup> lymphoiden Progenitorzellen<sup>3</sup> als auch eine CD19<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> CD117<sup>low</sup> Subpopulation mit Potential sowohl zur myeloischen als auch zur lymphatischen Differenzierung, genannt „early progenitors with lymphoid and myeloid potential“ (EPLM)<sup>21</sup>. Klinisch ist Flt3 u.a. insofern Gegenstand aktueller Forschung, als dass aktivierende Mutationen in dem für Flt3 kodierenden Gen mit einer schlechten Prognose der akuten myeloischen Leukämie (AML) einhergehen und die vielversprechende Möglichkeit einer therapeutischen Intervention durch Tyrosin-Kinase Hemmer wie Lestaurtinib besteht<sup>201</sup>.

## 1.5 Zytokine

### 1.5.1 Das klinische Interesse an HGFs

Störungen der Hämatopoese, die durch Erkrankungen des hämatologischen Systems, wie beispielsweise Lymphome, Leukämien und Myelodysplasien sowie ihrer Therapie ausgelöst werden, führen zu einer Beeinträchtigung der Proliferation bzw. der Ausreifung und Funktion hämatologischer Zellen. Der Körper reagiert auf das jeweilige Defizit mit einer Ausschüttung von entsprechenden hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Viele dieser Faktoren sind biologisch untersucht und können gentechnologisch in der Forschung bzw. im klinischen Alltag eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um den Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF), den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF) sowie Erythropoetin (EPO). In den USA sind zudem Thrombopoietin-Analoga (sog. thrombopoetische Wachstumsfaktoren der zweiten Generation), für schwere chemotherapieinduzierte Thrombopenien zugelassen, nachdem die Produktion der rekombinanten Version des natürlich vorkommenden Thrombopoietins aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen durch Auto-AK-Bildung eingestellt wurde<sup>7,87,197,209</sup>.

Weitere Wachstumsfaktoren sind Gegenstand der derzeitigen Forschung, hierbei handelt es sich um SCF, den Flt3-L sowie um die Interleukine IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11 und IL-12. SCF und IL-3 dienen als Multiliniengewachstumsfaktoren für frühe sowie bereits liniendeterminierte Stammzellpopulationen. Da es aber unter beiden Wachstumsfaktoren zu erheblichen Nebenwirkungen kommt, sind sie im klinischen Alltag nur begrenzt einsetzbar. Zu den Nebenwirkungen gehören insbesondere Fieber, Krankheitsgefühl, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen und Urtikaria<sup>93,99,130</sup>.

Ein wesentliches Ziel der aktuellen Zytokin-Forschung besteht in dem Einsatz bestimmter Zytokine zur ex-vivo Expansion primitiver pluripotenter HSC. Für eine Vielzahl von Patienten, die auf eine Knochenmarkstransplantation angewiesen sind, besteht hierin die einzige Möglichkeit zur Wiederherstellung eines effizienten hämatopoetischen Systems. So könnte man z.B. die Anzahl der HSCs autologer Transplantate, die per se zu wenige HSCs enthalten bzw. die HSC-Anzahl allogener Transplantate, beispielsweise aus Nabelschnurblut, mit Hilfe der ex-vivo Expansion steigern um so eine suffiziente Zellzahl dem Patienten zur Verfügung stellen zu können. Bisher konnte jedoch kein klinischer Vorteil durch diese Methode erreicht werden. Die geeignete Zytokinkombination, die den Erhalt sowie die Expansion der st- sowie lt-HSCs in den Transplantaten gewährleisten könnte, ist Gegenstand der Forschung. Im Mittelpunkt des Interesse stehen hier insbesondere die beiden Zytokine SCF sowie Flt3-L, da beide, über ihre Tyrosin-Kinase Rezeptoren (c-Kit and Flk2/Flt3), die für die Entwicklung der HSC ausschlaggebende Signale übermitteln<sup>165</sup>.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten murinen Wachstumsfaktoren kurz beschrieben:

### 1.5.2 IL-3

IL-3, ein Glykoprotein-Hormon, spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der Expansion und Differenzierung hämatopoetischer Zellen. So konnte durch in vitro Untersuchungen gezeigt werden, dass humanes IL-3 das Überleben, die Proliferation und die Entwicklung sowohl multipotenter Progenitorzellen als auch bereits determinierter Vorläuferzellen myeloischer und erythrozytärer Zelllinien

unterstützt<sup>162,181</sup>. Es handelt sich um einen direkten Stimulator der CFU-GM<sup>203</sup> (s. Abb.1.3). Saeland et al. demonstrierten im Jahre 1988 einen rapiden Abfall CD34<sup>+</sup> Zellen sowie einen exponentiellen Anstieg der Zellen neutrophiler, eosinophiler, monozytärer und thrombozytärer Zelllinien anhand einer mit CD34<sup>+</sup> Zellen angereicherten und mit humanem IL-3 stimulierten Zellkultur<sup>162</sup>. Des Weiteren verstärkt humanes IL-3 Funktionen der myeloischen Effektorzellen, wie z.B. Phagozytose und die antikörper-abhängige Toxizität<sup>20,160</sup>. Die Expression des IL-3 Rezeptors nimmt mit steigender Differenzierung insbesondere zu myelomonozytären Zellen zu (s.Abb.1.3). So konnte durch Mc Kinstry et al. anhand von murinen Knochenmarkszellen im Jahre 1997 der IL-3 Rezeptor bei frühen HSC, reifen HSC sowie deren Progenitorzellen nachgewiesen werden<sup>116</sup>. Der unreife Teil der CD34<sup>+</sup> Zellen exprimiert den IL-3 Rezeptor nur sehr schwach.

### 1.5.3 IL-6

Bei IL-6 handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, dem eine Vielfalt biologischer Aktivitäten zugeschrieben wird. So aktiviert IL-6 u.a. T-Zellen<sup>51,100</sup> und triggert ihre Differenzierung zu zytolytischen Zellen<sup>186</sup>. Des Weiteren wurde ein stimulierender Effekt auf die B-Zell-Differenzierung und IgG-Sekretion<sup>66,132</sup> sowie die Induktion von akute-Phase Proteinen nachgewiesen<sup>50</sup>. Im Jahre 1988 demonstrierten Wong et al. am Mausmodell den indirekten Einfluss von IL-6 auf die Differenzierung verschiedener, einschließlich der von frühen Blastenzellen abstammenden, hämatopoetischen Kolonien sowie einen direkten Einfluss auf die Proliferation granulozytärer und monozytärer Progenitorzellen<sup>206</sup>. Ikebuchi et al zeigten, dass HSC unter der Stimulation mit IL-6 schneller aus der Ruhephase (G0-Phase) in die G1-Phase übertreten, in der sie empfänglicher für andere hämatopoetische Wachstumsfaktoren (HGF) sind<sup>72</sup>. Des Weiteren bewirkt die Stimulation mit IL-6 eine Proliferationssteigerung muriner Vorläuferzellen von Granulozyten bzw. Makrophagen, sowie von hämatopoetischen Stammzellen und erythroiden Progenitorzellen. Indirekt erfolgt eine Unterstützung der Formation zahlreicher hämatopoetischer Kolonien unterschiedlicher Art<sup>146,184,206</sup>.

### 1.5.4 SCF

Stem cell factor, der Ligand des c-kit-Rezeptors<sup>219</sup>, auch als mast cell growth factor oder steel factor bezeichnet, ist ein facettenreiches Zytokin, das die Proliferation sowie die Differenzierung primitiver HSC der erythroiden und myeloiden Zelllinie sowie reifer Progenitorzellen stimuliert<sup>117</sup>. Mäuse mit Mutationen in den für SCF oder den c-kit Rezeptor kodierenden Allelen weisen einen charakteristischen Phänotyp auf, der u.a. durch eine makrozytäre Anämie charakterisiert ist<sup>110</sup>. Antikörper, die den c-kit Rezeptor blockieren, induzieren eine erhebliche Abnahme hämatopoetischer Progenitorzellen<sup>138</sup>. Fleming et al beschrieben 1993, dass SCF zu einer Umverteilung der HSC führt, jedoch lediglich einen schwach ausgeprägten Effekt auf die Gesamtzellzahl ausüben<sup>48</sup>. SCF wird von Knochenmarksstromazellen, wie z.B. Fibroblasten und Endothelialzellen sezerniert<sup>190</sup>. Der SCF bindende c-kit-Rezeptor wird auf sehr unreifen Formen CD34 exprimierender Zellen nachgewiesen. Eine erythrozytäre Differenzierung führt zu einer Zunahme, wohingegen während der myelomonozytären, sowie der B-lymphoiden Differenzierung eine Abnahme desselben nachgewiesen wurde<sup>205</sup> (s.Abb.1.3).

### 1.5.5 Flt3-L

Bei dem Flt3-Liganden handelt es sich um ein Protein, das von lymphoiden Zellen sowie von Kno-

chenmarks-Stromazellen membrangebunden exprimiert wird und auch in löslicher Form vorkommt<sup>58,103</sup>. Seine Wirkung vermittelt der Flt3-L über den Flt3-R, der auch als FMS-like tyrosine kinase-3, CD135<sup>53</sup> bezeichnet wird (s.1.4.4) und hierüber wesentlich an der Gewährleistung einer normalen Proliferation primitiver hämatopoetischer Zellen ist<sup>201</sup>. Insbesondere zeigt sich ein aktivierender Effekt auf die B-Lymphopoese, was u.a. durch Flt3-knock-out Mäuse nachgewiesen werden konnte<sup>115</sup>. Eine Expression konnte bei 60-80% der CD34<sup>+</sup> Knochenmarkszellen, bei Progenitorzellen der B- und T-Zellreihe sowie bei CFU-GM und den sog. high-proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC) nachgewiesen werden<sup>1,49,152</sup>. Eine weitere Wirkung konnte auf eine, von Balciunaite et al im Jahre 2005 als EPLM-Zellen bezeichnete, Subpopulation der hämatopoetischen Zellen, mit den phänotypischen Merkmalen CD19<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>CD117<sup>low</sup>, gezeigt werden<sup>8</sup>. Es handelt sich hierbei um frühe Progenitorzellen, mit sowohl lymphoidem als auch myeloidem Potential, deren Proliferation durch Stimulation mit Flt3-L um den Faktor 50 gesteigert werden konnte<sup>21</sup>. Im Laufe der Zelldifferenzierung nimmt der Einfluss des Flt3-L durch eine abnehmende Expression des Flt3-R ab und auch von den noch primitiven HSC erfolgt keine Expression<sup>1,178</sup> (s.Abb.1.3). Flt3L übt hauptsächlich in Kombination mit anderen Zytokinen, insbesondere mit SCF seine Funktion aus<sup>104,105</sup>.

### 1.5.6 Zytokinkombinationen

In verschiedenen Untersuchungen wurde der synergistische Effekt einer Kombinationsstimulation von IL-6 und IL-3 auf hämatopoetische Stammzellen unter Beweis gestellt. Zahlreiche Effekte, insbesondere des IL-3, sind beschrieben, die unter einer Einzelstimulation nicht zum Ausdruck kommen. So konnte unter der Kombination eine Proliferationssteigerung der HSC, insbesondere in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, erreicht werden<sup>60,89,134</sup>. Des Weiteren wird eine Verkürzung der G<sub>0</sub>-Phase beschrieben, wodurch die Zellen zu einem früheren Zeitpunkt zugänglich für weitere Wachstumsfaktoren wie z.B. IL-3 werden<sup>60</sup>. Okano et al zeigten einen deutlichen Anstieg der GM-CFUs sowie kernhaltiger Zellen, in einer anderen Untersuchung wurde ein 8-facher Anstieg der CFU unter dieser Kombination nachgewiesen<sup>15,141</sup>.

Eine Kombination von IL-3 und SCF ist insofern sinnvoll, als dass die hämatopoetischen Progenitorzellen entsprechend ihrer Differenzierung unterschiedliche Zytokin-Rezeptoren exprimieren, bzw. aktivieren. So sind z.B. CD 34<sup>+</sup> Zellen sensitiv für eine Stimulation mit SCF, CD34<sup>-</sup> Zellen hingegen bereits nicht mehr. Das Gegenteilige gilt für eine Stimulation mit IL-3<sup>215</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationsstimulation mit IL-3 und SCF zu einem Anstieg hämatopoetischer Progenitorzellen sowie zu einer Aktivitätszunahme der CFCs und CFU-S führt<sup>138</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten, dass SCF in der Kombination mit IL-6 sowie IL-3 die Proliferation Kolonie-bildender, hämatopoetischer Zellen fördert<sup>4,107,219</sup>. Die Zahl der CFUs steigt und, in geringerem Ausmaß, zusätzlich die Selbsterneuerungs-Kapazität der Zellen<sup>15</sup>. Eine simultane Stimulation der Zellen mit SCF und IL-6 verkürzt die Zeit bis zum Auftreten multipotenter Blastenzell-Kolonien, ähnlich des Effektes, den IL-6 und IL-3 in Kombination ausüben<sup>194</sup>. SCF mit Flt3 übt einen synergistischen Effekt auf das Wachstum sogenannter Long-term Culture-initiating Cells aus<sup>73,150</sup>.

## 1.6 Genregulation in der Hämatopoese

Der Ablauf der Hämatopoese unterliegt der präzisen Regulation sowohl extra- als auch intrazellulärer Stimuli, die letztendlich durch Aktivierung von Signalkaskaden und der daraus folgenden Modulation von Transkriptionsfaktoren auf der Ebene der Genexpression ihre Wirkung entfalten. Durch Integration zahlreicher Signalkaskaden sowie der konsekutiven Genexpressionsänderung kommt den Transkriptionsfaktoren hier eine zentrale Funktion zu. So beeinflussen sie in einer komplexen Interaktion mit Koaktivatoren und -repressoren unter Bindung spezifischer, regulatorischer DNA-Sequenzen<sup>158</sup> eine Vielzahl der, für die Hämatopoese relevanten Gene, wie z.B. die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und ihre zugehörigen Rezeptoren, sowie andere Transkriptionsfaktoren. Der Einfluss kann sowohl zu einer Verstärkung wie auch zu einer Hemmung der Genexpression führen<sup>9</sup>. In den letzten Jahren konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Expression linienspezifischer Gene, die für bestimmte Entwicklungsstadien der Zellen charakteristisch sind, durch die Kooperation verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Daher ist es möglich, durch Nachweis der vorhandenen Transkriptionsfaktoren auf das Stadium der Differenzierung zu schließen und einen Einblick in die molekularen Mechanismen der hämatopoetischen Zellentwicklung zu erlangen<sup>158</sup>. Das Verständnis der Wirkungsweise einzelner Transkriptionsfaktoren stellt die Grundlage der Untersuchungen zur HSC-Differenzierung dar.

### 1.6.1 Flk1

Fetal liver kinase 1 (Flk-1), ein Tyrosin-Kinase Rezeptor, dessen Ligand als vascular endothelial growth factor (VEGF) bezeichnet wird, spielt eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung der mesodermalen Zelllinien<sup>65</sup>. So konnten D'Souza et al 2005 zeigen, dass eine Flk1-Expression bereits auf den blast colony forming cells (BL-CFCs) nachgewiesen werden kann<sup>38</sup>. Es handelt sich also um einen ontogenetisch sehr früh exprimierten Rezeptor, der an der Differenzierung der BL-CFCs zu hämatopoetischen, endothelialen und vaskulären Zellen wesentlich beteiligt ist<sup>65</sup>. Eine Mutation im Flk-1 Gen führt zu einer von der physiologischen Entwicklung abweichenden Differenzierung endothelialer sowie hämatopoetischer Zellen<sup>175</sup>. Flk-1 knock-out Mäuse weisen weder eine strukturierte Blutgefäßbildung noch die Bildung von Blutinseln im Dottersack auf. Die Anzahl der hämatopoetischen Progenitorzellen ist bei diesen Mäusen stark reduziert, zudem fehlen ihnen sowohl reife endotheliale als auch hämatopoetische Zellen, was zwischen Tag 8,5 und 9,5 p.c. zum Tod der Embryonen führt<sup>163,175</sup>.

### 1.6.2 SCL/TAL1

SCL/TAL1 kodiert für einen, während der primitiven und definitiven Hämatopoese essentiellen, Transkriptionsfaktor<sup>157</sup>. Während der Embryogenese kann die SCL/TAL1 Expression in-vitro primär in einer mesodermalen Vorläuferzellen, dem Hämangioblasten, nachgewiesen werden. Das in vitro Äquivalent des Hämangioblasten wird als BL-CFC bezeichnet<sup>26</sup>. Die Expression von SCL/TAL1 ist essentiell für die Differenzierung dieser Zellen zu primitiven hämatopoetischen Zellen und kann ab diesem Stadium kontinuierlich in fetalen sowie adulten HSCs nachgewiesen werden<sup>52,210,170,171</sup>. Insbesondere scheint SCL/TAL1 einen Einfluss auf die geordnete Differenzierung sowohl primitiver als auch definitiver Erythrozyten zu nehmen<sup>171</sup>. Ein essentieller Einfluss auf die Regeneration des HSC-Pools sowie den Erhalt der Multipotenz der HSC konnte jedoch ausgeschlossen werden<sup>171</sup>.

### 1.6.3 HOXB4

HOXB4 ist ein Vertreter der sogenannten Homeobox Genfamilie, die für insgesamt 39 Transkriptionsfaktoren kodiert und mittels dieser eine Schlüsselrolle bei der Regulation des HSC-Pools einnimmt<sup>188</sup>. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es während der Entwicklung des Organismus im Mesoderm, dem Ursprung des hämatopoetischen Systems, sowie in der fetalen Leber zur Expression von HOXB4 kommt<sup>56,69</sup>. Am stärksten wird HOXB4 in den frühesten Stadien humaner hämatopoetischer Zellen exprimiert, während es im Laufe der Differenzierung zu einer Runterregulation desselben kommt<sup>61</sup>. Eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors HOXB4 aktiviert bestimmte Pathways, die zu einer verstärkten Regeneration des HSC-Pools führen<sup>218</sup>. Zudem wird unter der HOXB4-Expression die Differenzierung von ESCs zu HSCs gefördert<sup>218</sup>. Auf die Differenzierung, Morphologie und Funktion bereits stärker differenzierter, linienspezifischer Zellen sowie terminal-differenzierter Zellen zeigt sich hingegen kein Einfluss<sup>218</sup>. Eine Inaktivierung des für HOXB4 kodierenden Gens führte zu einer Abnahme der Anzahl hämatopoetischer Zellen, zudem weisen die vorhandenen hämatopoetischen Zellen ein beeinträchtigtes Proliferationspotential auf<sup>17</sup>.

### 1.6.4 GATA2

GATA2 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor des hämatopoetischen Systems, der von HSCs und den, von ihnen abstammenden, Progenitorzellen exprimiert wird. Zum einen spielt GATA2 eine wesentliche Rolle während der Embryogenese bei der Produktion und Expansion der HSCs der AGM-Region (s.1.1.1.2) und zum anderen während der Proliferation der HSCs im adulten Organismus<sup>98</sup>. Neuere Untersuchungen brachten den Beweis für eine Beteiligung von GATA2 an der Bildung und Differenzierung des Hämangioblasten zu hämatopoetischen Zellen<sup>101</sup>. Die GATA2-Expression spielt insofern eine stammzellerhaltende Rolle, als dass eine Hochregulation die Amplifikation und Differenzierung der Zellen hemmt, eine Runterregulation hingegen die Amplifikation, Differenzierung und Reifung der Zellen fördert<sup>147</sup>. Tsai und Orkin konnten im Jahre 1997 zeigen, dass GATA2 für die Expansion multipotenter Progenitorzellen sowie für die Formation von Mastzellen benötigt wird, nicht jedoch für die terminale Differenzierung erythropoetischer Zellen sowie Makrophagen<sup>192</sup>.

Im Mausmodell konnte zudem nachgewiesen werden, dass GATA2-defiziente ESC nicht zur Ausbildung des hämatopoetischen Systems im Knochenmark beitragen, was auf die wesentliche Rolle GATA2s bei der Produktion und Aufrechterhaltung des adulten HSC-Pools sowie der Sicherung des Überlebens hämatopoetischer Progenitorzellen hinweist<sup>191</sup>.

### 1.6.5 EPO

Erythropoietin (EPO) ist ein Hormon, dessen Wirkung über den von unreifen erythropoetischen Progenitorzellen exprimierten Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) vermittelt wird<sup>31,169</sup>. Diese Wirkung besteht in einer Regulation der Proliferation, Differenzierung sowie des Überlebens erythropoetischer Vorläuferzellen<sup>83</sup> (s.Abb.1.3), die, sofern EPO nicht vorliegt, durch Apoptose eliminiert werden<sup>86</sup>. Anhand von EPO- bzw. EPO-R-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass EPO bzw. sein Rezeptor für einen physiologischen Ablauf der Erythropoese essentiell ist. Die Zuordnung der Progenitorzellen zu der erythropoetischen Zelllinie sowie die Proliferation und Differenzierung der erythroid burst forming unit (BFU-Es) zu CFU-Es ist jedoch nicht eingeschränkt, da beide Differenzierungsstadien in den Mäusen

nachgewiesen werden konnten<sup>208</sup>. Des Weiteren ist bekannt, dass es bei Reifestadien jenseits des basophilen Erythroblasten zu einer Runterregulation des EPO-R kommt, somit verläuft die anschließende Reifung EPO unabhängig<sup>78</sup>.

### 1.6.6 PU.1

De Koter et al konnten 1998 zeigen, dass der Transkriptionsfaktor PU.1 von primitiven CD34<sup>+</sup> Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen sowie Erythroblasten in frühen Stadien exprimiert wird<sup>34</sup>. In Kooperation mit mehr als 12 anderen Transkriptionsfaktoren reguliert PU.1 die physiologische Entwicklung und somit die Proliferation und Differenzierung myeloider sowie lymphoider Zellen<sup>158</sup>. Die wichtigsten myeloiden Zielgene sind die der charakteristischen Antigene CD11b und CD18<sup>144</sup> sowie die der Rezeptoren für M-CSF<sup>217</sup>, GM-CSF<sup>67</sup>, und G-CSF<sup>179</sup>, außerdem reguliert PU.1 seinen eigenen Promotor<sup>158</sup>, so beschreiben Chen et al. im Jahre 1995 eine positive Autoregulation für PU.1<sup>23</sup>.

Die höchsten Expressionslevel finden sich in myeloiden Zellen sowie B-Zellen, nicht jedoch in T-Zellen und erythroiden Zellen<sup>22,82,114,217</sup>. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Höhe der PU.1-Expression einen entscheidenden Faktor bei der Zelldifferenzierung darstellt. So kommt es unter einem hohen Level und somit unter einer Hochregulation der PU.1-Expression präferentiell zu einer Bildung von Monozyten mit simultan ablaufender Blockade der lymphatischen Differenzierung, ein niedrigeres Level der PU.1 Expression hingegen fördert die Differenzierung zu Granulozyten sowie B-Lymphozyten<sup>30,35</sup>. Während der erythroiden Differenzierung erfolgt eine Runterregulation der PU.1 Expression. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten anhand von PU.1 knock-out Mäusen zeigen, dass ein Verlust von PU.1 zu schweren, letal verlaufenden Abnormalitäten in der Entwicklung myeloider Zellen führt<sup>158</sup>. Scott et al. beschrieben, dass fetale Hepatozyten homozygoter knock-out Embryos (PU.1 -/-) weder in der Lage sind, Makrophagen und Granulozyten zu bilden, noch eine Differenzierung zu B-Lymphozyten zu durchlaufen<sup>173</sup>. Eine nachfolgende Untersuchung bestätigte diese Ergebnisse, so zeigten Singh et al dass PU.1 knock-out Mäuse weder in der Lage sind Leukozyten noch B-Lymphozyten zu produzieren und als Konsequenz dessen um den Tag 16 der intrauterinen Entwicklung (16 d.p.c.) versterben<sup>34</sup>. Zu einem anderen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe um Maki et al, deren PU.1 -/- knock-out Mäuse unter sterilen Bedingungen sowie Antibiotika-Applikation für einige Tage nach der Geburt überleben konnten. Zwar blieb auch hier die Produktion von Monozyten und reifen B-Zellen aus, B-Progenitorzellen hingegen konnten nachgewiesen werden<sup>4</sup>.

Eine Mutation des für PU.1 kodierenden Gens trägt direkt zur Entstehung einer AML bei<sup>30,158</sup>.

### 1.6.7 CyclinD1

CyclinD1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus. Durch Bindung an cyclin-dependant Kinasen 4 (oder 6) und der daraus folgenden Phosphorylierung des retinoblastoma gene product (pRb), welches in unphosphorylierter Form den Zellzyklus in der G1-Phase hält, wird es den Zellen letztendlich ermöglicht in die S-Phase überzutreten<sup>80</sup>. Zudem beeinflusst CyclinD1 die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, so führt z.B. eine CyclinD1 Überexpression zu einer Hemmung der STAT3-Transkriptionsfaktoren<sup>13</sup>. Bienvenue et al wiesen zudem im Jahre 2005 daraufhin, dass CyclinD1 Teil eines transkriptionsregulierenden Komplexes darstellt, worüber die CyclinD1 Expression Einfluss auf die Transformation von Zellen ausübt<sup>14</sup>.

### 1.6.8 Lmo2 und Lmo4

Lmo2, ein Mitglied der LIM-only Protein Familie<sup>59</sup>, enthält eine LIM-Domäne, die zahlreiche andere Proteine, in Abhängigkeit des jeweiligen zellulären Milieus, bindet<sup>151</sup>. So bildet Lmo2 mit anderen regulatorischen Proteinen, wie TAL-1 und GATA2 einen sog. erythroiden Komplex in den Promotorregionen zahlreicher erythropoetischer Gene<sup>187</sup>. Eine eigenständige DNA-Bindungskapazität konnte für Lmo2 allerdings bisher nicht nachgewiesen werden<sup>59</sup>. Lmo2 spielt eine essentielle Rolle sowohl bei der primitiven als auch bei der definitiven Hämatopoese<sup>212</sup>, was anhand von Lmo2 knock-out Mäusen, die 9-10 Tage p.c. sterben, gezeigt werden konnte<sup>211</sup>. Auch die adulte Hämatopoese kann ohne die Expression von Lmo2 nicht ablaufen<sup>211</sup>. Auf die Blastenproliferation hat Lmo2 einen stimulierenden Effekt, die T-lymphatische Differenzierung wird hingegen unter der Expression von Lmo2 inhibiert<sup>79</sup>. Eine klinische Bedeutung kommt Lmo2 insofern zu, als dass eine aberrierende Lmo2 Expression bei T-ALL Patienten nachgewiesen werden konnte<sup>45</sup>. Zudem konnten Yamada et al. zeigen, dass es sich bei Lmo2 um einen obligatorischen Regulator der Neo-Vaskularisation verschiedener Tumoren darstellt<sup>213</sup>.

Bei Lmo4 handelt es sich um ein weiteres Mitglied der LIM-Familie, dessen Funktion jedoch bisher unbekannt ist. Ein ähnlich hohes Expressionsniveau wie Lmo2 in erythropoetischen Zellen weist jedoch auf eine Beteiligung an der Differenzierung dieser Zellen hin<sup>59</sup>. Eine Induktion der Differenzierung erythropoetischer Zellen konnte allerdings nur für Lmo2 nachgewiesen werden<sup>59</sup>. Lmo4 wird zudem in reifen T-Zellen exprimiert<sup>79</sup>. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Lmo4-Gens zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Blutbildung führt, weswegen Lmo4 in dieser Beziehung eine eher untergeordnete Rolle zugeschrieben wird<sup>193</sup>.

## 1.7 Fragestellung der Arbeit

Der Forschung gelang in den letzten Jahren die Identifizierung zahlreicher, für die Hämatopoese relevanter Gene sowie charakteristischer Oberflächenmoleküle der verschiedenen Stadien hämatopoetischer Zelldifferenzierung. Mittels dieser phäno- und genotypischen Merkmale gelingt die Zuordnung der jeweils untersuchten Zellen zu den zahlreichen Reifestadien der Hämatopoese. Dadurch ergibt sich unter anderem die Möglichkeit, den Einfluss hämatopoetischer Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und die Reifung von in-vitro kultivierten Stammzellen zu analysieren. So wurde bereits in vorausgegangenen Untersuchungen der proliferative Effekt der Zytokine IL-6 und IL-3 sowie der Liganden des c-kit- und des Flt3-Rezeptors, SCF und Flt3-Ligand, auf unterschiedliche Reifestadien hämatopoetischer Zellen gezeigt. Um sich die Funktion der Zytokine für die Therapie verschiedener Erkrankungen zu Nutze zu machen, wie dies beispielsweise für G-CSF bei Zytopenien infolge Chemotherapie realisiert wurde, und um die Knochenmarkstransplantation durch ex-vivo-Expansion der HSC's zu optimieren gilt es, weitere in-vitro Untersuchungen auf diesem Gebiet voranzubringen.

Diese Arbeit befasst sich zum Einen mit dem Einfluss einer punktuell beziehungsweise kontinuierlich durchgeführten Kombinationsstimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen. Zum Anderen mit dem Effekt einer kontinuierlich durchgeführten Einzelstimulation mit Flt3-L beziehungsweise SCF sowie einer Kombinationsstimulation dieser beiden Faktoren.

Folgende Fragen liegen dieser Arbeit zu Grunde:

- Welchen Einfluss hat eine Kombinationsstimulation (IL-6, IL-3, SCF) auf die Genexpression sowie auf die Expression des CD90.2 Oberflächenmoleküls?
- Kann durch eine Variation der Stimulationsdauer (IL-6, IL-3, SCF) – kontinuierlich vs punktuell – ein signifikanter Unterschied im Effekt auf die Gen- bzw. CD90.2 Expression erzielt werden?
- Welchen Effekt hat eine Einzelstimulation mit Flt3-L bzw. SCF sowie eine Kombinationsstimulation aus den beiden auf die Expression Hämatopoese-spezifischer Gene?
- Inwiefern beeinflusst eine Einzelstimulation mit Flt3-L bzw. SCF sowie eine Kombinationsstimulation aus den beiden die Expression der, für unterschiedliche Differenzierungsgrade der hämatopoetischen Zellen spezifischen, Oberflächenmarker CD34, CD135, CD117 sowie CD90.2?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tab. 2.1.1 Chemikalien

Reagenzien	Hersteller
Agar	Fluka
Agarose (electrophorese grade)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Gibco
Chloroform p.a.	Sigma
Collagenase IV	Gibco
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DMSO (cell cultered tested)	Sigma
DTT (1,4,-Diithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendinitetraessigsäure)	Sigma
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
FKS Gold (Fötale Kälberserum)	Sigma
Gelantine (cell cultered tested)	Gibco
Glutaraldehyd	Sigma
Glycin	Sigma
Isopropanol	Sigma
LIF ESGRO (leukaemia inhibitory factor)	Chemikon
L $\times$ Glutamin 200mM	Gibco
β-Mercapthoethanol	Gibco
NEA (Non Essential Amino Acids)	Gibco
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Gibco

Tab. 2.1.2 Zytokine

Zytokine	Hersteller
Murines IL-3	Peppo Tech
Murines IL-6	Peppo Tech
Murines SCF	Peppo Tech
Murines Flt3-L	Tebu

Tab. 2.1.3 Antikörper, Antibiotika, Enzyme, Inhibitoren

Antikörper:	Firma:
CD 90.2 (murin)	BD Bio Science
CD135 (murin)	BD Bio Science
CD117 (murin)	BD Bio Science
CD34 (murin)	BD Bio Science

<b>Antibiotika:</b>	<b>Firma:</b>
Penicillin/Streptomycin	Gibco
<b>Enzyme:</b>	<b>Firma:</b>
Reverse Transkriptase	
Taq- (Thermus aquaticus) DNS-	Amersham Biosciences
<b>Inhibitoren:</b>	<b>Firma:</b>
Ribonuklease-Inhibitor (RNS-Guard)	Amersham

Tab. 2.1.4 Puffer und Stammlösungen

<b>Puffer</b>	<b>Firma:</b>
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma
50 x TAE (2M Tris-HCL (pH8,0), 1M Essigsäure, 50mM EDTA)	Bio-Rad, Sigma
<b>Stammlösungen:</b>	<b>Firma:</b>
FACScan Clean	BD (Becton Dickinson)
RNS-Clean	Hybaid

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrock et al.<sup>146</sup> angesetzt.

Die benötigten Chemikalien wurden mit bidestilliertem Wasser gelöst und je nach Bedarf autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Tab. 2.1.5 Labormaterialien

<b>Materialien</b>	<b>Firma</b>
Cell-Scraper, 25 cm	Sarstedt, Inc; Newton, NC
Einmalfilter (Porengröße 0,22µm)	Millipore Express, PES-Membrane
Pre-Separation Filter (Porengröße )	Miltenyl Biotec
Gewebekulturschalen (6 – well – Platten)	Greiner bio – one
Cryo-Tube (Nunc Cryo-Tube)	Nunc
Falcon Röhrchen (PP-Test-Tubes, 15ml,50 ml)	Greiner bio-one
Messzylinder	Schott
Neubauer Zählkammer	Assistent
Objektträger und Deckgläser	Schütz, Menzel
Reaktionsgefäße 0,1ml; 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml	Eppendorf
Pipetten (2ml bis 50ml)	Greiner bio – one
Plastikwaren ( Petrischalen etc.)	Greiner, Sarstedt, Falcon
Zellkulturflasche	Nunc

Tab. 2.1.6 Murine Embryonale Stammzellen und Feederzellen

Zellen	Herkunft
E14-ES-Zellen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Matthias Müller, Med. Klinik II, Lübeck, seit 1999 bei Novartis, Basel
Feederzellen	Embryonale Fibroblasten, Thromb-X, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgien

Tab. 2.1.7 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide sind von der Firma Metabion International AG, Stocklösung gelöst zu 100pmol/μl

Bezeichnung	Oligonukleotid
PU-1 F	5'-GAG AAC CAC TTC ACA GAG CT-3'
PU-1 R	5'-TAC AGG CGA ATC TTT TTC TT-3'
Cyclin D-1 F	5'-GGC ACC TGG ATT GTT CTG TT-3'
Cyclin D-1 R	5'-CAG CTT GCT AGG GAA CTT GG-3'
GATA $\alpha$ 2 F	5'-ATG GGT GGA ACA TAC TCT TG-3'
GATA $\alpha$ 2 R	5'-TCT CCA AAC AAA CAC TCT CC-3'
Epo F	5'-GGA CAC CTA CTT GGT ATT GG-3'
Epo R	5'-GAC GTT GTA GGC TGG AGT CC-3'
Flk $\alpha$ 1 F	5'-ATG CAC GGC ATC TGG GAA TC-3'
Flk $\alpha$ 1 R	5'-GCT ACT GTC CTG CAA GTT GCT GTC-3'
LMO2 F	5'-GCT ACT TCC TGA AAG CCA TC-3'
LMO2 R	5'-AGT CTC TCC TGC ACA ATT TC-3'
HOX B-4 F	5'-TCA CAG AGC GAT TAC CTA CCC AGC-3'
HOX B-4 R	5'-GGT AGA CGA CGG GCT CTT TGC-3'
LMO4 F	5'-AGT CGA TTC CTG CAA GTG AG-3'
LMO4 R	5'-TGA CCT CTC AGC AGA CCT TC-3'
SCL/TAL $\alpha$ 1 F	5'-TGC GTT TTA TTC GTT GTA TG-3'
SCL/TAL $\alpha$ 1 R	5'-AAG CAG ATG AAC ACG AGC TA-3'
$\beta$ -Actin F	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
$\beta$ -Actin R	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'

Tab. 2.1.8 Geräte

Geräte	Hersteller
Pipetus – Akku	Hirschmann
Phasenkontrast Mikroskop	Zeiss
PCR-Maschine	Hybaid <sup>260</sup>
Photometer	Eppendorf
Schüttler	Eppendorf
Spannungsverstärker	Pharmacia
Taqman-PCR	ABI PRISM™
Thermocycler	Hybaid
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech
Waage	Scaltec
FACscan	Becton Dickinson
Power Macintosh	Apple
Vortex	Heidolph
Wasserbad	GFL
Werkbank	Gelaire
Brutschrank	Heraeus

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

**Tab. 2.2.1.1 Lösungen und Medien für die ES-Zellkultur**

Medium	Komponente	Volumen	Endkonzentration
EF-Medium (für Feederzellen)	DMEM	450ml	90%
	FKS	50ml	10%
ES-Medium (für ES-Zellen)	DMEM	400ml	80%
	FKS	100ml	20%
Einfrier-Medium	DMEM		70%
	FKS		20%
	DMSO		10%

Außerdem wurden den Medien 5ml einer 100 x Stocklösung nicht essentieller Aminosäuren-, Penicillin/Streptomycin-Lösung, 5ml L-Glutamin und 0,1 mM Endkonzentration  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben. Zur Inhibierung der Differenzierung wurde bei Bedarf 1000 U/ml Leukemia Inhibitor Factor (LIF) beigefügt.

**Tab. 2.2.1.2 Chemikalien**

Chemikalie	Zusammensetzung
Gelatine Lösung	0,1% Gelatine in PBS
Trypsin-EDTA	9 Teile PBS + 1 Teil 10 x Trypsin/EDTA
PBS	135mM NaCl
	+3mM KCL
	+8mM Na <sub>2</sub> POH <sub>4</sub>
	+2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 500ml H <sub>2</sub> O

#### 2.2.1.3 Präparation von embryonalen Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten (Feederzellen) mit einer Neomycinresistenz wurden von der Fa. Eurogentec, Belgien in Mengen von  $3 \times 10^6$  Zellen bezogen. Die Zellen wurde in Gewebekulturschale in EF-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zu einer 80-90% Konfluenz kultiviert und maximal bis Passage 7-8 passagiert.

#### 2.2.1.4 Mitomycinbehandlung von Feederzellen

Bei einer erreichten Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen für 2 Stunden mit Mitomycin C in einer Endkonzentration von 10 $\mu$ g/ml behandelt. Bei Mitomycin handelt es sich um ein Zytostatikum, das die Weiterteilung nach der Behandlung unterdrückt. Die Zellen wurden anschließend ausgezählt und in einer Menge von  $1 \times 10^6$  kryokonserviert.

### 2.2.1.5 Präparation der Kulturflaschen zur Kultivierung der ES-Zellen

Um den ES-Zellen optimale Proliferationsbedingungen zu bieten, wurde die Kulturflasche mit einer 1%igen Gelatine Lösung versehen, diese ermöglicht den Zellen eine bessere Adhäsion am Boden. Des Weiteren wurden die Kulturflaschen, 3 Tage vor Kultivierungsbeginn, mit Feederzellen und 15 ml Medium versehen. Diese Zellen dienen als Nährstoffquelle, sowie als Produzent des LIF. Bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Flasche für 2-3 Tage inkubiert.

### 2.2.1.6 Passagierung und Kryokonservierung von Zellen

Zur Ablösung der ES-Zellen vom Boden der Kulturflasche wurden die ES-Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für ungefähr 5 Min. mit einer 10%igen Trypsin- EDTA Mischung im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Mittels Mikroskop wurde das Resultat überprüft um bei Erfolg die gelösten Zellen in DMEM mit 10% FKS zu resuspendieren und zu zentrifugieren (1000rpm, 5 Min., bei RT). Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Um die Kryokonservierung anzuschließen wurden die Zellen erneut bei 1000rpm für 5 Min. bei Raumtemp. zentrifugiert und auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt. Die 1,8ml Kryo-Röhrchen wurden jeweils 1ml der Suspension gefüllt. In Kryoboxen wurden die Zellen langsam auf -80°C runtergekühlt und ungefähr einen Tag später in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Nutzung wurden die ES-Zellen unter Zugabe von 5 ml Kultivierungsmedium aufgetaut, mehrfach resuspendiert, zentrifugiert (1300rpm bei RT für 15 Min) und nach Zugabe von 14ml Nährmedium sowie 14µl LIF in die präparierte Gewebekulturflasche transferiert.

### 2.2.1.7 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Die gesamten Arbeitsschritte der ES-Zell-Kultivierung erfolgen unter optimalen Bedingungen an der sterilen Werkbank. Die verwendeten Geräte (Pipetten, Pinzetten, Ständer etc.) werden vor Gebrauch bei 140°C autoklaviert, einmalig gebrauchte Utensilien wie Kulturschalen oder Pippetenspitzen sind in sterilem Zustand im Handel erhältlich. Den Medien werden Antibiotika zugeführt. Generell gilt es an der Werkbank auf ein ständig steriles Arbeiten zu achten. Bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) handelt es sich um pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Mäuse-Blastozysten gewonnen werden. In den ersten 6 Tage der Versuche soll, zur Erhaltung der Pluripotenz, eine Differenzierung der ES-Zellen verhindert werden. Um dies zu gewährleisten, wird dem Nährmedium (ES-Medium) LIF zugeführt, in dessen Gegenwart eine Differenzierung, nicht aber die Proliferation, unterdrückt wird. Des Weiteren wird der Boden der Kulturflaschen mit Feederzellen präpariert die neben Nährstoffen auch LIF produzieren. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen keine hohen Passagenzahlen (>15) und Zelldichte erreichen, da dadurch die spätere Differenzierung beeinträchtigt sein könnte. Die Zellen wurden mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml kryokonserviert. Die Kultivierung fand insgesamt über einen Zeitraum von 36 Tagen statt.

### 2.2.1.8 Gewinnung von Embryoid Bodies

Nach Abschluss der Proliferations-Phase in den Kulturflaschen wird den Zellen das LIF entzogen um die Differenzierung zu sogenannten Embryoid Bodies zu ermöglichen. Um diesen Prozess zu optimieren, werden die kultivierten ES-Zellen geerntet und auf eine Zellzahl von 400Zellen/20µl Medium eingestellt. Anschließend wird das Medium in Form hängender Tropfen (20µl Medium/400 ES-Zellen) auf Petrischalen-Deckel (ca. 56 Tropfen/Deckel) verteilt, deren Boden, zur Feuchthaltung, mit PBS gefüllt

ist. Nach 2-3 Tagen im Brutschrank (37°C und 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Tropfen mit 15ml Kulturmedium in neue Petrischalen gespült, in denen die Kultivierung über 3-4 Tage fortgeführt wurde. Anschließend, d.h. an Tag 6+0 werden die EB's in Gewebekulturschalen überführt. Der Boden der 6-well-Platten wurde im Vorfeld gelatinisiert um den EB's eine Adhärenz zu ermöglichen. Bei einem Mediumwechsel alle 48h können die EB's bis Tag 6+30 im Brutschrank kultiviert werden<sup>106</sup>.

### 2.2.1.9 Mediumwechsel

Im stromafreien Milieu der Gewebekulturschalen war alle 48 Std. ein Mediumwechsel erforderlich. Hierzu wurden aus jedem Well die gesamten 2ml Medium entnommen, durch 2ml Frischmedium ersetzt und die jeweilige Menge an IL-6, IL-3 und SCF (s. 2.2.2.5) dem stimulierten Teil der EB's hinzugegeben. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität, Zellanzahl, Dichte und Homogenität beurteilt.

### 2.2.1.10 Zytokin-Stimulation

Die Zytokin-Dosis war bei allen Versuchen konstant, lediglich der Beginn, sowie die Dauer der Stimulation differierten. So wurden die EB's für die Versuchsreihe der kontinuierlichen Stimulation mit Beginn an Tag 6+0 über den gesamten Versuchszeitraum mit IL-6, IL-3 sowie SCF versetzt. Eine gleiche Anzahl an 6-well-Platten wurde als Kontrolle lediglich mit Medium versorgt. Mit jedem Mediumwechsel, der alle 48h erfolgte, wurde auch die Zytokin-Dosis erneuert. Im Abstand von fünf Tagen wurden jeweils zwei, d.h. eine stimulierte Platte, sowie eine unstimulierte Platte (Kontrolle) geerntet und anschließend am FACScan gemessen bzw. für die TAQMAN-Untersuchung eingefroren.

Für die punktuellen Stimulationen wurden alle 5 Tage, mit Beginn an Tag 6+0, vier der 6-well-Platten isoliert. Zwei 6-well-Platten wurden mit IL-6, IL-3 und SCF stimuliert, 2 dienten als Kontrolle. Nach 48h wurde eine der stimulierten Platten, sowie eine der Kontroll-Platten geerntet, am FACS-Gerät gemessen, bzw. für die TAQMAN-PCR eingefroren. 24h später, d.h. nach einer Stimulation über insgesamt 72h, wurde mit den beiden anderen Platten genauso verfahren.

### 2.2.1.11 Ernte der ESC

Generell wurden bei jeder Ernte sowohl stimulierte, als auch unstimulierte Zellen genommen.

Bei den Versuchen der kontinuierlichen Stimulation erfolgte die Zellernte primär an Tag 6+5 (kontinuierliche Stimulation) bzw. an Tag 3 (kontinuierliche Stimulation mit Flt3-L/SCF) und anschließend im 5-Tages-Rhythmus über die gesamten 30 bzw. 26 Tage.

Die Zellen der Versuchsreihe mit punktueller Stimulation wurden stets nach Abschluss der 48-bzw. 72h geerntet. Erstmals wurde an Tag 6+0+48h, bzw. an Tag 6+0+72h geerntet um dies anschließend alle 5 Tage bis zur letzten Ernte an Tag 6+30+48h, bzw. 6+30+72h durchzuführen. Alle Arbeitsschritte der Zellernte erfolgten auf Trockeneis. Der folgende Ernte-Ablauf gilt für die Zellen, deren genetisches Material mittels TAQMAN-PCR gemessen werden sollte. Das Medium wurde von den wells abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gespült um gelöste Zellen oder deren Bestandteile von den adhärenen, vitalen Zellen zu trennen. Anschließend wurden in jedes well 500µl PBS vorgelegt um die Zellen mit einem Zell-Scraper vom Boden zu lösen und mitsamt des PBS in Falcon-Röhrchen zu überführen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1300rpm konnte der Überstand abgesaugt werden. Ein Röhrchen mit stimulierten ESC, sowie ein Röhrchen mit Zellen der Kontrolle wurde bei -80°C für die TAQMAN-PCR

eingefroren. Mit den EB's, deren Oberfläche mittels FACScan untersucht werden sollte, wurde folgendermaßen verfahren. Nach Spülung der EB's mit kaltem PBS wurde jedes well mit einem Kollagenase/ Trypsin Gemisch (3:1), zur Lösung der Adhärenz unter den einzelnen Zellen, versetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zell-Scrapers vom Boden gelöst und anschließend in 2 15ml Falcon-Röhrchen transferiert. Nach 15-minütiger Einwirkung wurden die Zellen mehrmals resuspendiert um eine Einzelzellsuspension zu gewinnen. Mitsamt des Kollagenase/ Trypsin Gemisches wurde die Suspension zur Elimination großer Zellen sowie Zellresten über einen 0,2µm großen Filter in 2 neue 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Um das Absaugen des Überstandes zu ermöglichen, wurden die Zellen bei 1500U für 10 Min. zentrifugiert. Zur folgenden Präparation für die FACScan Messung wurde in jedes Röhrchen zur Resuspension der Zellen 1ml kaltes PBS gegeben.

#### 2.2.1.12 Präparation der durchflusszytometrischen Messung (FACScan)

Die beiden Röhrchen (unstimulierte/ stimulierte Zellen) wurden für 10 Min bei 1500rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert. Die sich anschließenden Vorgänge, einschließlich der Messung am FACScan wurden stets auf Trockeneis durchgeführt. Sofern die Zellkonzentration, ermittelt mit Hilfe der Neubauer Zählkammer, das Limit der Antikörper-Bindungs-kapazität (max.  $1 \times 10^6$  Z./500µl) nicht überschritt, wurden je 500µl der Zellsuspension in 4, optisch dichte, 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert. 1 Eppendorfgefäß mit Zytokin-stimulierten Zellen, sowie 1 Eppendorfgefäß mit unstimulierten Zellen (Kontrolle) wurde zudem mit 1µl [Stocklösung 0,5mg/ml] CD90.2 (Thy1.2) FITC bzw. mit CD117/135/34 markiert. Die beiden übrigen Eppendorfgefäße dienten als Negativkontrolle ohne eine Antikörpermarkierung. Sie sollten bei der durchflusszytometrischen Analyse nur die Eigenfluoreszenz, nicht aber die FITC-Fluoreszenz zeigen. Die Zellen wurden für 30min bei 4°C und unter Lichtausschluss mit dem Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurden zur Spülung 500µl PBS in jedes Eppendorfgefäß gegeben und für 10min bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert, dieser Vorgang wurde 3x wiederholt. Für die Messung wurden die Zellen in 300µl resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt.

#### 2.2.1.13 Durchflusszytometrische Separation

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Partikeln (z.B. Zellen). Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse dient ein Argon-Laser der Licht mit einer Wellenlänge von 488nm, emittiert. Es können nur solche Fluoreszenzfarbstoffe genutzt werden, deren Absorptionsspektrum mit dem Frequenzspektrum des Lasers übereinstimmt. Die maximale Absorption, des für diese Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) liegt bei 525nm. Die Zellen werden in Einzelzellsuspension nacheinander an dem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet, der die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau anhebt. Das einfallende Licht wird in Vorwärtsrichtung (forward light scatter, FSC) und im rechten Winkel zum einfallenden Licht (sideward light scatter, SSC) gestreut. Unter Abgabe von Energie, in Form von Photonen, fallen die Elektronen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Des Weiteren werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas etc.) geliefert.

Die gesamten FACS- Ergebnisse dieser Arbeit wurden stets direkt im Anschluss an die Zellernte mit dem FACScan ( Beckton Dickinson, Heidelberg) des hämatologischen Labors erstellt. Vor jeder Messung wurden die Einstellungen überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die durchflusszytometrische Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest (Fa. BD).

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden Methoden wurden nach Sambrook et al.<sup>164</sup> durchgeführt. Es wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Arbeitsschritte, die unter Kühlung durchzuführen sind, wurden auf Trockeneis ausgeführt. Jegliche Materialien, sowie die Arbeitsflächen wurden vor Nutzung mit 70% EtOH gereinigt. Die Labormaterialien, die Kontakt mit RNS bzw. DNS hatten wurden bei 140°C autoklaviert.

### 2.2.2.1 RNS-Präparation aus kultivierten Zellen

Auf die, in 15ml Falcon-Röhrchen aufbewahrten Zellen, wurden je 2ml RNS-Clean (Hybaid) pipetiert, resuspendiert und nach wiederholtem Vortexen in 2ml Eppendorfcups transferiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform, wurden die Zellen für 5min auf Eis gekühlt und anschließend bei 14000rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abpipetiert, in ein neues 2ml Eppendorfcup überführt, für 15min mit 1ml Isopropanol inkubiert und erneut bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert, das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und für 10min bei 10000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei Raumtemperatur für 5min trocknen gelassen. Das Pellet wurde anschließend in 100µl Wasser aufgenommen. Die Konzentration der RNS und die Ratio wurden anschließend spektralphotometrisch bestimmt. Die RNS wurde bei -40°C für die TAQMAN-PCR aufbewahrt

### 2.2.2.2 Spektralphotometrische Messung

Die Nukleinsäurekonzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm in Wasser bestimmt. Bei doppelsträngigen Nukleinsäuren entspricht eine  $E_{260\text{ nm}} = 1$  einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngigen von 40 µg/ml. Das Verhältnis  $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$  gibt Aufschluß über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung. Bei reinen Lösungen ist das Verhältnis  $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}} = 1,8-2,0$ <sup>164</sup>. Verunreinigende Faktoren stellen v.a. Fällungsreagenzien und Proteine dar.

### 2.2.2.3 PCR-Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation der DNS. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Denaturierungsphase: eine aus DNS-Molekülen, DNS-Polymerasen, Primern und Nukleotiden bestehende Reaktionslösung wird auf 95°C erhitzt. Erreicht wird durch die Denaturierung der Proteine eine Auftrennung der beiden komplementären Stränge.
2. Hybridisierung: die Reaktionslösung wird auf 55°C heruntergekühlt wodurch den in der Reaktionslösung enthaltenen Primern eine Anlagerung an die aufgetrennten, komplementären DNS-Stränge ermöglicht wird. Die Anlagerung erfolgt unter Ausbildung von Basenpaaren.
3. Verlängerung: für diese Phase wird die Temperatur auf ideale Arbeitstemperatur der DNS-Polymerasen (72°C) erhöht. Diese lagern weitere Nukleotide an die entstehenden DNS-Stränge an. Lose Verbindungen zwischen Primern und solchen DNS-Abschnitten, die nicht komplementär sind, brechen wieder auf.

Diese drei Schritte werden fortlaufend wiederholt und auf diese Weise verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl kopierter DNS-Moleküle. Die Geschwindigkeit, mit der diese Schritte ablaufen ändert sich jedoch im Laufe der Messung. Man unterscheidet drei aufeinanderfolgende Phasen einer PCR:

1. Exponentielle Phase: Verdopplung des Templates bei jedem Zyklus, (100% Reaktions-Effizienz), die Reaktion läuft hoch präzise und spezifisch ab
2. Lineare Phase (hohe Variabilität): die Komponenten der Reaktionslösung sind nicht mehr in ausreichenden Mengen vorhanden, die Reaktion ist weniger spezifisch und verlangsamt sich
3. Plateauphase (End-Punkt): die Reaktion wurde beendet, es werden keine weiteren Produkte hergestellt, die Produkte der Reaktion beginnen zu degradieren

#### 2.2.2.4 Real-time-PCR (Taqman Gerät ABI PRISM™ 7000 Detection System)

Die Real Time PCR stellt zur Zeit eins der exaktesten und schnellsten molekularbiologischen Verfahren zur Bestimmung und Quantifizierung von DNS bzw. indirekt RNS, dar. Die Methode ermöglicht bereits während der Exponentiellen Phase der Amplifikation (in der sich die Menge des DNS-Templates tatsächlich bei jedem Zyklus verdoppelt) die Anzahl gebildeter DNS-Kopien zu errechnen und daraus eine quantitative Aussage über den Wert der Ausgangs-DNS zu machen. Post-PCR Analysen sind somit unnötig. Dies ist der Vorteil zur End-Punkt-PCR, bei der die Messung während der Plateau-Phase stattfindet und die DNS Produkte lediglich qualitativ nachgewiesen werden können. Die Real-Time-PCR besteht aus 2 grundlegenden Schritten, der Reversen Transkriptase Reaktion und der DNS-Amplifikation mittels TaqMan.

##### 2.2.2.4.1 Reverse Transkriptase Reaktion

Dieser Schritt dient der Umwandlung der, aus den Zellen isolierten, empfindlichen mRNA in die weit-aus stabilere, einzelsträngige cDNS (komplementäre DNS). Zudem wird für die bei der PCR eingesetzten spezifischen Polymerasen Genmaterial in Form von DNS benötigt. Hierzu wird nachstehender Mix eingesetzt:

###### Tab.2.2.2.4.1.1 Standard RT-PCR-Mix

(Mengenangabe bezieht sich auf eine Probe, bei mehreren Proben: Herstellung eines Master-Mix)

Menge	Reagenz
4µl	5x Puffer
1µl	RNS-Guard (Ribonuklease Inhibitor)
1µl	dNTP's
1µl	pd Primer (oligo primer)
2µl	DTT
1µl	Transkriptase

Mit den Proben wird folgendermaßen verfahren:

1. Denaturierung der RNS bei 65°C (5min) im Thermocycler
2. Abkühlung auf Eis
3. Zugabe des Standard RT-PCR-Mix, kurze Anzentrifugation
4. Synthese der cDNS bei 37°C (60min) im Thermocycler
5. Inhibierung der Enzyme 95°C (5min) im Thermocycler
6. Abkühlung auf Eis, Zentrifugation, Lagerung der Proben bei -40°C

#### 2.2.2.4.2 PCR-Amplifikation basierend auf der TaqMan-Methode

Die cDNS, das Resultat der Reversen Transkriptase Reaktion, wird in diesem Schritt als Vorlage (Schablone) für die Amplifikation der DNS genutzt.

Die Real-Time-PCR mittels TaqMan beruht auf einer Messung emittierter Fluoreszenz als Indikator für gebildete Amplifikate während der exponentiellen Phase der Polymerase-Ketten-Reaktion. Das Signal steigt proportional zu der Menge gebildeter PCR-Produkte. Der Thermocycler des TaqMan-Gerätes ist mit einer sensitiven Kamera ausgestattet, welche die Fluoreszenz in jedem der 96-wells der Messplatte während der PCR bestimmt. Für die Durchführung der Messung werden speziell gewählte Primer benötigt, sowie fluoreszierende Sonden, bei denen es sich um Oligonukleotide handelt. Diese sind länger als Primer (20-30 Basenpaare lang) und bestehen am 5' Ende aus einem fluoreszierenden Farbstoff, sowie einem dämpfenden Farbstoff am 3' Ende. Sie sind so gestaltet, dass sie an interne Regionen der PCR-Produkte binden. Wenn die Taq-Polymerase ein template, an dem eine hydrolysierende Sonde gebunden ist, repliziert, spaltet die 5' Exonuklease das 5' Ende mitsamt des Farbstoffes. Durch die Spaltung wird der fluoreszierende Teil der Sonde vom dämpfenden Teil isoliert. Die Menge der durch diesen Prozess emittierten Fluoreszenz steigt proportional zur Menge gespaltener Sonden. Während der nicht hybridisierenden Phasen der PCR verhindert die Nähe des fluoreszierenden Farbstoffes zu dem dämpfenden Farbstoff eine Fluoreszenz-Emission.

#### 2.2.2.4.3 Kalkulation der relativen Expressionsänderung der Gene unter Stimulation mit Zytokinen mittels der Comparativen $C_t$ Methode (basierend auf den PCR-Ergebnissen)

Die Berechnung des Wertes  $C_t$  basiert auf der Bestimmung des Zeitpunktes (gemessen wird die Anzahl bereits durchlaufender PCR-Zyklen), an dem die Menge der emittierten Fluoreszenz einer Probe über einen, für das Gerät definierten, Schwellenwert ansteigt. Dieser Schwellenwert ergibt sich aus der Hintergrundfluoreszenz des Gerätes. Somit stellt der  $C_t$  Wert ein direktes Maß für die Anzahl gebildeter DNS-Amplifikate dar. Der  $C_t$  Wert korreliert mit der eingesetzten cDNS Menge, ein höherer Wert derselben führt dementsprechend zu einem niedrigeren Schwellenwert. Der  $C_t$  Wert einer jeden Probe stellt keine absolute Kopieanzahl dar, sondern ist ein relativer Wert, stets normalisiert durch den Wert eines internen Standards. Hierbei handelt es sich um  $\beta$ -Aktin, ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen, welches ubiquitär homogen exprimiert wird.

Die Methode beruht auf einem Vergleich der  $C_t$  Werte der behandelten Probe mit den  $C_t$  Werten der unbehandelten Probe.

Der relative Expressionsunterschied einer Probe (stimulierte vs unstimulierte), bezeichnet als Ratio der Probe, ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Fold-induction} = 2^{-[\Delta\Delta C_t]}$$

Dabei ermittelt  $\Delta C_t = [C_t \text{ GI (stim. Probe)} - (C_t \beta\text{-Aktin})] - [C_t \text{ GI (unstim. Probe)} - (C_t \beta\text{-Aktin})]$  die Hochregulation sowie  $\Delta C_t = [C_t \text{ GI (unstim. Probe)} - (C_t \beta\text{-Aktin})] - [C_t \text{ GI (stim. Probe)} - (C_t \beta\text{-Aktin})]$  die Runterregulation der Expression eines Gens. GI bezeichnet das gene of interest. Eine Hochregulation bedeutet eine Steigerung der Expression eines Gens unter Stimulation. Dies ist eine relative Angabe zu der Expression des gleichen Gens einer unstimulierten Probe. Eine Runterregulation bezeichnet

dementsprechend eine Senkung der Expression eines Gens unter Stimulation, wiederum relativ zu der Expression des gleichen Gens ohne Stimulation zu betrachten.

Die Formel beruht auf der Annahme, dass die Änderung des Zusammenhangs zwischen  $C_t$  Wert und dem Wert neu gebildeter Amplifikate für das Zielgen und das „Housekeeping“- Gen identisch sind. Das also eine Verdopplung der Ziel cDNS zu einem  $C_t$  Abfall um den Wert eines Cyclus führt.

Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte sowie der standard error of mean berechnet. Zur grafischen Verlaufsdarstellung wurden die Mittelwerte konstanten Geraden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet.

#### 2.2.2.4.4 Durchführung

In einer ersten Versuchsreihe wurde bestimmt, wie viele PCR- Zyklen durchgeführt werden konnten, ehe das PCR Fragment die logarithmische Amplifikationsphase verließ. Die Intensität der amplifizierten DNS-Fragmente nahm bis zum Verlassen dieser Phase zu.

Anschließend konnten verschiedene Zell-Lysate miteinander abgeglichen werden, indem man jeweils nur so viel Zell-Lysat für die PCR einsetzte, dass das mit dem ersten Primerpaar amplifizierte Haushaltsgen in allen Reaktionen die gleiche Bandintensität aufwies. Die Intensität ließ sich entweder mit bloßem Auge abschätzen oder wurde mit Hilfe der Software ONE-DScan.

Als Material für die Messung diente je eine mit Zytokinen stimulierte Probe sowie eine unstimulierte, als Kontrolle dienende, Probe.

**Tab. 2.2.2.4.4.1 Allgemeiner Reaktionsansatz für eine Gesamtkonzentration von 25µl**

Menge (µl)	Reagenz
2,5	10X TaqMan buffer
1,75	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1	5mM dNTP mix
0,125	Hot Gold Star ist das die Polymerase?
0,75	Diluted CYBR
2,5	Primer F (10 mM)
2,5	Primer R (10 mM)
11,38	H <sub>2</sub> O
2,5	Probe

#### 2.2.2.4.5 Kriterien für die Auswahl der Primer und Sonden

Die Länge der ausgewählten Primer sollte zwischen 20 und 30 Basen betragen, der Guanosen, bzw. Cytosin Anteil sollte bei 50-60 % liegen. Eine Wiederholung identischer Nukleotide sollte vermieden werden, insbesondere gilt dies für Guanosen. Sekundäre Strukturen (z.B Haarnadelstrukturen) sollten im Vorfeld weitestgehend eliminiert werden. Die Schmelztemperatur beider Primer sollte gleich, bzw. ähnlich und

über 50°C sein, da dies wesentlich für die Festlegung der Annealingtemperatur ist. Die Schmelztemperaturberechnung setzt sich aus folgenden Parametern zusammen:

1. Sequenz des Primers
2. Länge
3. Konzentration

Die Schmelztemperatur der Sonden sollte ungefähr 5-10°C über der des zugehörigen Primerpaares liegen. Die Länge der Sonden sollte 40 Basenpaare nicht übertreffen. Am 5' Ende sollte sich kein Guanosin befinden, da die, bei der Spaltung der Sonde freiwerdende, Energie zu Guanosin transferiert wird und somit die gemessene Emission erniedrigt wird.

### 2.2.2.5 Ermittlung der adäquaten Interleukin-6 Stimulationsdosis

Aus vorherigen Arbeiten des hämatologischen Labors ist die optimale Dosis für eine Bearbeitung der EBs mit IL-3 und SCF bereits bekannt. Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde diese für IL-6 ermittelt, die EBs wurden auf 6 6-well Platten (s. 2.2.1.8) kultiviert. 3 der 6 6-well Platten wurden zur Kontrolle lediglich mit Medium versorgt. Die EBs der 6 Wells der 3 weiteren Platten wurden wie folgt mit IL-6 stimuliert:

Tab. 2.2.2.5.1 Ermittlung der adäquaten IL-6 Dosis

1.Well	2.Well	3.Well	4.Well	5.Well	6.Well
1 pg IL6	10 pg IL-6	100 pg IL-6	1 ng IL-6	10 ng IL-6	100 ng IL-6

Die Dosis ist jeweils pro ml Medium angegeben, jedes well wurde mit 2ml Medium versorgt.

Unter mikroskopischer Kontrolle, die alle 48h erfolgte, konnte beobachtet werden, welche IL-6 Dosis zu der stärksten Ablösung der EB's vom Boden der Wells führte. Weitere wesentliche Kriterien waren die Änderung der Größe, der Dichte und der Homogenität der EBs über den Zeitverlauf. Aufgrund der, relativ gesehen, besten, dennoch nicht optimalen, Ergebnisse unter einer Dosis von 100 ng IL-6 entschieden wir uns für einen Probe-Versuch mit der Hälfte dieser Dosis (50ngIL-6/ml Medium). Hier zeigte sich erneut eine zu extreme Ablösung. Mit dem nächsten Versuch testeten wir die Ergebnisse unter einer IL-6 Dosis von 25ng -50ng in Kombination mit den anderen Zytokinen.

Tab. 2.2.2.5.2 Ermittlung der adäquaten IL-6 Dosis

3 Platten	3 Platten	3 Platten	3 Platten
25ng IL-6/ml Medium	30ng IL-6/ml Medium	40ng IL-6/ml Medium	50ng IL-6/ml Medium
10ng IL-3/ml Medium	10ng IL-3/ml Medium	10ng IL-3/ml Medium	10ng IL-3/ml Medium
1 ng SCF/ml Medium			

Als Konsequenz der Ergebnisse wurde die IL-6 Dosis für die weiteren Versuchsreihen auf 25ng/ml Medium festgelegt.

Somit ergab sich folgendes Stimulationsschema:

- IL-6: 25ng/ml
- IL-3: 10ng/ml
- SCF: 1ng/ml

### 2.2.2.6 Versuchsaufbau

Tab. 2.2.2.6.1 Kontinuierliche Stimulation der EB's mit IL-6, IL-3, SCF über 30 Tage, Beginn der Stimulation: Tag 6+0

Erntezeitpunkte	6+5	6+10	6+15	6+20	6+25	6+30
<b>Stim. Platten</b>	2 Pl.					
<b>Kontrollplatten</b>	2 Pl.					

Tab. 2.2.2.6.2 Punktuelle Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3, SCF an jedem 5. der 30 Tage, Ernte jeweils nach 48-, bzw. 72 h

| Erntezeitpunkte        | 6+0+48h |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                        | 6+0+72h |
| <b>Stim. Platten</b>   | 2 Pl.   |
| <b>Kontrollplatten</b> | 2 Pl.   |

Tab. 2.2.2.6.3 Kontinuierliche Einzel- bzw. Kombinationstimulation mit Flt3-L und SCF über 26 Tage, Beginn der Stimulation: Tag 1, erste Ernte: Tag 3, (Flt3-L 8pg/ml; SCF: 1ng/ml)

Erntezeitpunkte	3	6+0	6+5	6+10	6+15	6+20
<b>Stim. Platten</b>	2 Pl.					
<b>Kontrollplatten</b>	2 Pl.					

An jedem 2. Tag wurde das Medium gewechselt und bei den Versuchsreihen der kontinuierlichen Stimulation neue Wachstumsfaktoren hinzugegeben. Bei der punktuellen Stimulation wurden jeweils die Wachstumsfaktoren an jedem 5. Tag für 48 bzw. 72 Stunden hinzugegeben. Die geernteten EBs von jeweils einer der stimulierten Platten und einer der Kontrollplatten wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren um am Ende des Versuches insgesamt für die PCR verarbeitet werden zu können. Die Ernte der jeweils anderen Platte wurde direkt weiter verarbeitet um die Messungen am FACScan durchführen zu können.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung zentraler Gene der Hämatopoese mit Hilfe der Realtime-PCR

Die Durchführung der Expressionsanalyse (s. 2.2.2.3) erfolgte mit Hilfe des Taqman Gerätes ABI PRISM™ 7000 Detection System. Ausgewählt wurden Gene, die bei der Hämatopoese, bzw. der Angiogenese eine zentrale Rolle spielen. Zudem wurden Gene untersucht, deren Proteine Einfluss auf die Selbsterneuerung, sowie auf den Zellzyklus der HSC nehmen (s. Einleitung). Als Haushaltsgen wurde  $\beta$ -Aktin gewählt. Die Ermittlung der Ratio des untersuchten Gens erfolgte nach der unter 2.2.2.4.3 aufgeführten Formel. Aus vier Messungen wurden die Mittelwerte sowie der standard error of mean für jeden Versuch bestimmt (s. Anhang). Diese Mittelwerte wiederum wurden den, in Tab. 3.1 dargestellten Werten, zugeordnet.

Tab. 3.1 Graduierung der relativen Expressionsänderungen zur Darstellung einer Hoch- und Runterregulation von Genen (vgl. Abschnitt 2.2.2.4.3)

Relative Expressionsänderung	Numerische Gradzuordnung der Hoch- bzw. Runterregulation eines Gens
2,01 – 4,0	0,5
4,01 – 6,0	1,0
6,01 – 8,0	1,5
8,01 – 10,0	2,0
10,01 – 12,0	2,5
12,01 – 14,0	3,0
14,01 – 16,0	3,5
16,01 – 18,0	4,0
18,01 – 20,0	4,5
$\geq 20,01$	5,0

#### 3.1.1 Expressionsverlauf der untersuchten Gene über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei unterschiedlicher Stimulationsdauer mit IL-6, IL-3 sowie SCF

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind im Folgenden für jedes Gen einzeln in zwei Diagrammen festgehalten. Das jeweils erste Diagramm stellt die Genregulation unter einer 30-tägigen kontinuierlichen Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF dar. Diese wurde an Tag 6+0 begonnen und über den gesamten Zeitraum von 30 Tagen fortgeführt. Die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR erfolgten an den, auf der horizontalen Achse gekennzeichneten, Versuchstagen, primär an Tag 6+5. Das zweite Diagramm zeigt die Genregulation unter einer punktuellen Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF, die jeweils an den, auf der horizontalen Achse gekennzeichneten, Versuchstagen für 48h- bzw. 72h durchgeführt wurde. Die erste Stimulation erfolgte hier an Tag 6+0 für 48- bzw. 72h mit anschließender Ernte und Expressionsanalyse der Zellen. Die unterschiedliche Dauer der punktuellen Stimulation wurde farblich hervorgehoben (zum Ablauf der Experimente siehe auch s. 2.2.2.6). Die Stimulation der Zellen beider Versuchsreihen erfolgte mit gleicher Konzentration der Zytokine IL-6, IL-3 sowie SCF

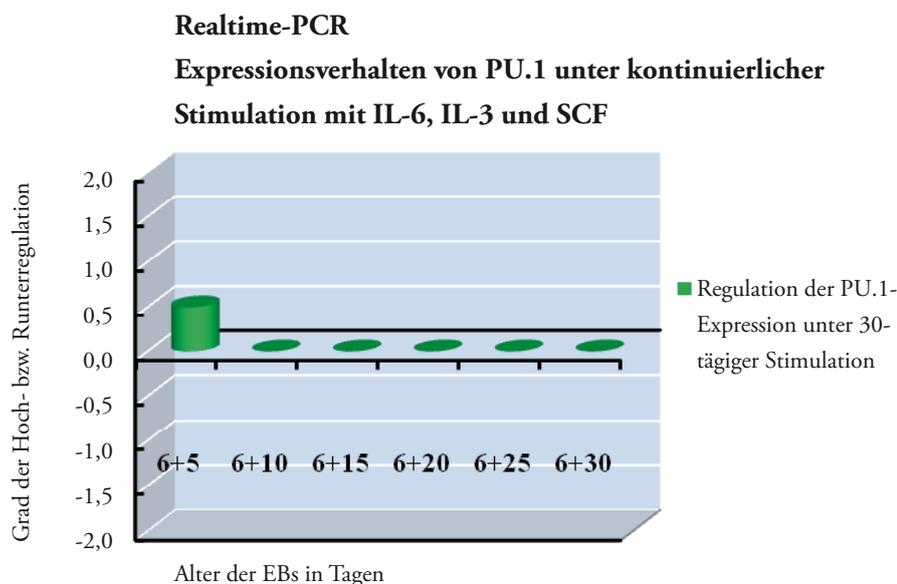
(s. 2.2.2.5). Dargestellt sind die, den Mittelwerten der ermittelten Ratio, zugeordneten Werte der Hoch- bzw. Runterregulation (s. Tab. 3.1). In nachstehenden Diagrammen (Abb.3.1.1-3.1.10) sind diese als positive (Hochregulation) und negative (Runterregulation) Zahlenwerte aufgeführt. Einen Überblick über die gesamten untersuchten Gene gibt Abb. 3.1.1.10. Da hier die punktuellen Stimulationen in separaten Diagrammen dargestellt sind, wird nicht das Alter der EBs, wie unter Abb. 3.1.1.1-3.1.1.9, gegen die Werte der Hoch- bzw. Runterregulation aufgetragen, sondern die Erntezeitpunkte im Versuchsverlauf.

### 3.1.1.1 PU.1

zu Beginn des Versuchs führt eine Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF zu einer Hochregulation von PU.1

#### 3.1.1.1.1 Expressionsverhalten von PU.1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Wie in Abb. 3.1.1.1 dargestellt, führt eine kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen, lediglich an Tag 6+5 zu einer Hochregulation von PU.1, im weiteren Verlauf konnte kein Einfluss der Stimulation nachgewiesen werden.



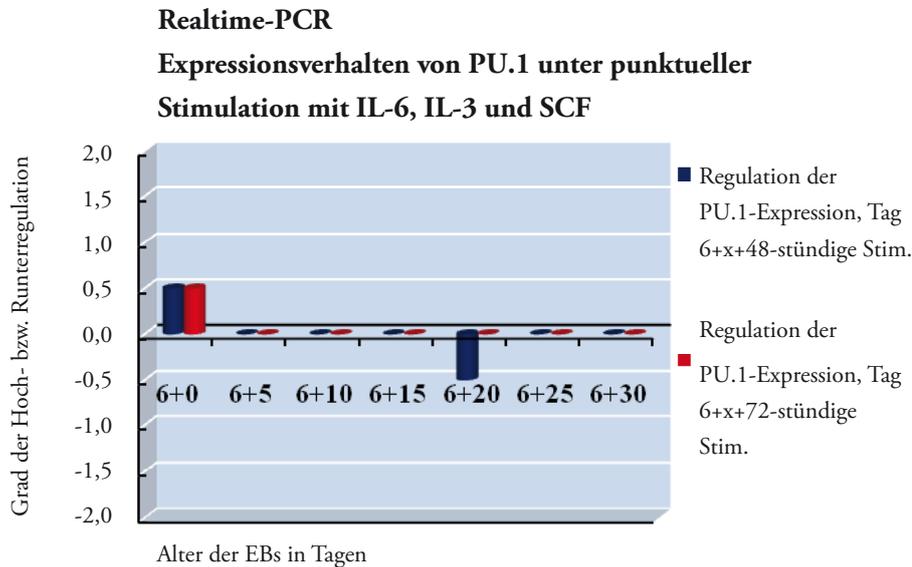
**Abb. 3.1.1.1.1 Übersicht der PU.1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 ( nicht dargestellt) und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten.

In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufs-darstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.1.2 Expressionsverhalten von PU.1 bei punktueller Stimulation (48-bzw. 72h)

Sowohl bei einer punktuellen Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- als auch über 72h an Tag 6+0 kommt es zu einer Hochregulation der PU.1-Expression. Eine Runterregulation kann lediglich durch eine 48- stündige Stimulation an Tag 6+20 der Differenzierung erreicht werden.



**Abb. 3.1.1.1.2 Übersicht der PU.1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

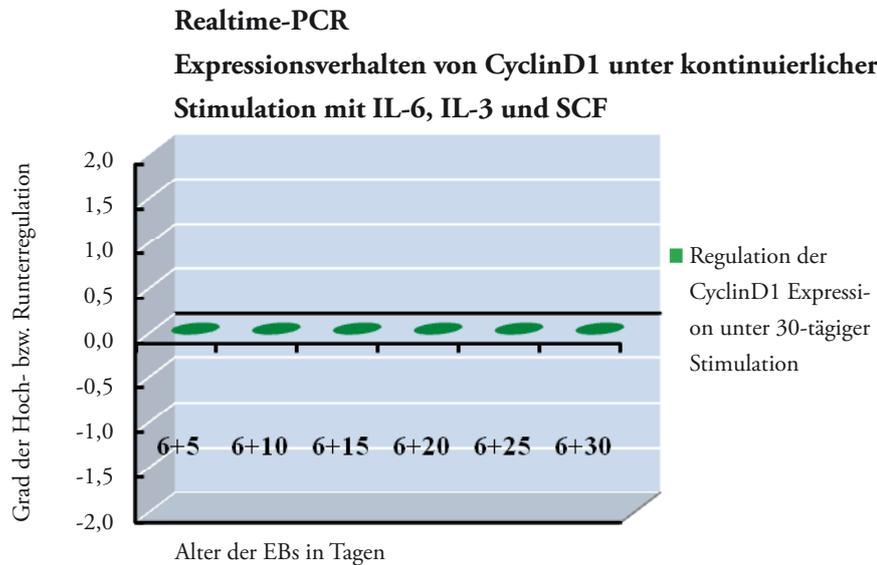
Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (nach 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.2 CyclinD1

lediglich eine 72-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF an Tag 6+5 der Differenzierung nimmt Einfluss auf die Expressionshöhe von CyclinD1

#### 3.1.1.2.1 Expressionsverhalten von CyclinD1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Die kontinuierliche Stimulation über 30 Tage nimmt keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von CyclinD1.

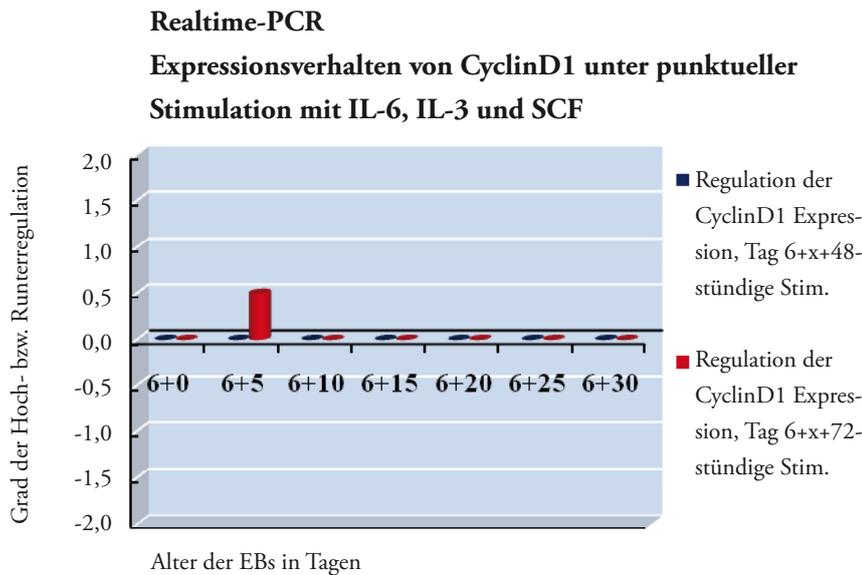


**Abb. 3.1.1.2.1** Übersicht der CyclinD1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 (nicht dargestellt) und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

#### 3.1.1.2.2 Expressionsverhalten von CyclinD1 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h)

Eine 72-stündige Stimulation an Tag 6+5 führt einmalig zu einer Hochregulation von CyclinD1. An allen übrigen Zeitpunkten der Differenzierung bewirkt weder die 48- noch die 72-stündige Stimulation eine Änderung der CyclinD1-Expression.



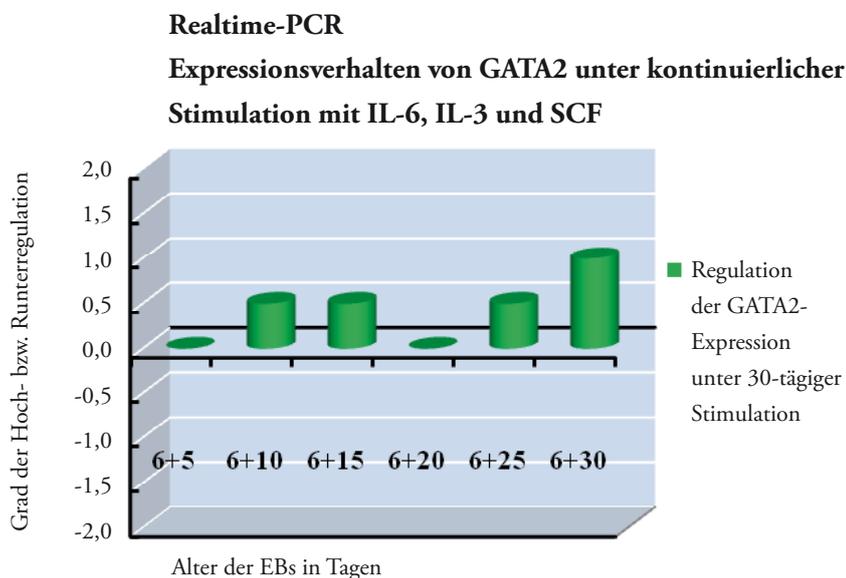
**Abb. 3.1.1.2.2** Übersicht der Cyclin D1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR. Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (über 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.3 GATA2

die kontinuierliche Stimulation führt zu einer Hochregulation von GATA2, wohingegen die punktuelle Stimulation eine Runterregulation derselben bewirkt

#### 3.1.1.3.1 Expressionsverhalten von GATA2 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Das Diagramm zeigt den Einfluss einer kontinuierlichen Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3 und SCF auf die GATA2 Expression. So kommt es an den Tagen 6+10, 6+15, 6+25 sowie 6+30 der Differenzierung zu einer Hochregulation, mit einem maximalen Wert am Ende des Versuchs.

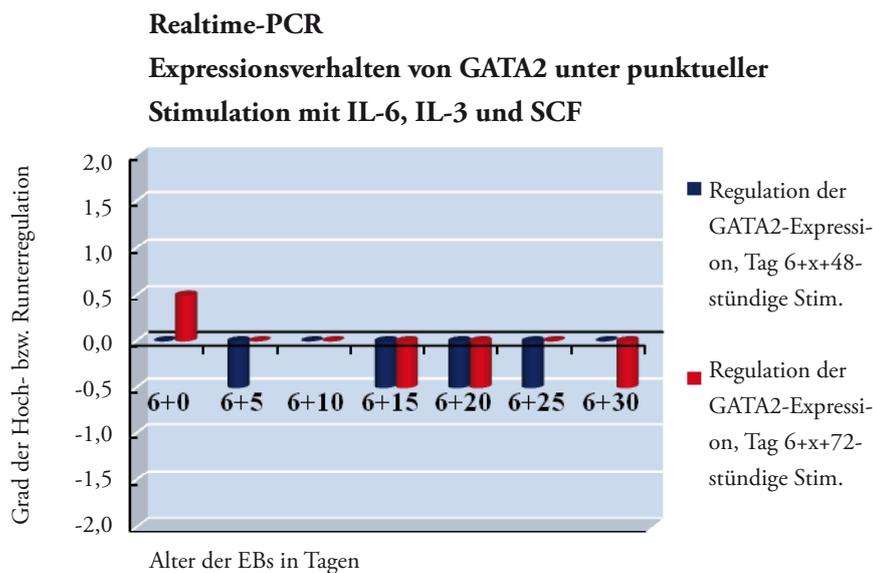


**Abb. 3.1.1.3.1 Übersicht der GATA2-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

**3.1.1.3.2 Expressionsverhalten von GATA2 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h)**

Die punktuelle Stimulation über 48- bzw. 72h führt insbesondere mit zunehmender Differenzierung der EBs zu einer Runterregulation der GATA2- Expression. An den Tagen 6+15 und 6+20 kommt es sowohl bei einer 48-stündigen als auch bei einer 72-stündigen Stimulation zu einer Runterregulation. Eine 48-stündige Stimulation bewirkt zusätzlich an den Tagen 6+5 und 6+25 der Differenzierung eine Runterregulation, sowie eine 72-stündige Stimulation zusätzlich an Tag 6+30 eine Runterregulation erzielt. Zu einer Hochregulation der GATA2-Expression führt lediglich eine 72-stündige Stimulation zu Beginn der Differenzierung (Tag 6+0).



**Abb. 3.1.1.3.2 Übersicht der GATA2-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

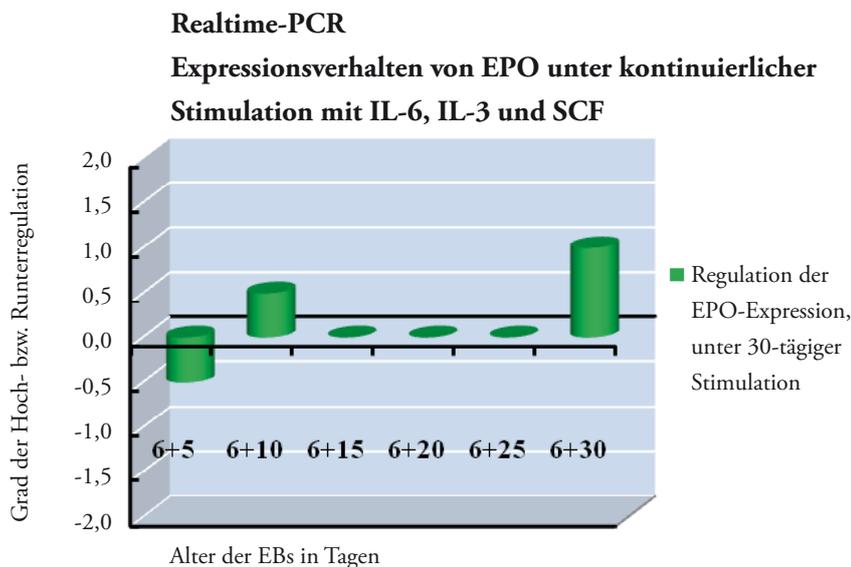
Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (nach 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.4 EPO

*EPO wird in seiner Expression am stärksten durch die kontinuierliche Stimulation beeinflusst*

#### 3.1.1.4.1 Expressionsverhalten von EPO bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Eine kontinuierliche Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3 und SCF bewirkt zu Beginn der Differenzierung (Tag 6+5) eine Runterregulation des, für EPO kodierenden, Gens. Im weiteren Verlauf kommt es an Tag 6+10 sowie zum Ende des Versuchs (Tag 6+30) zu einer Hochregulation.

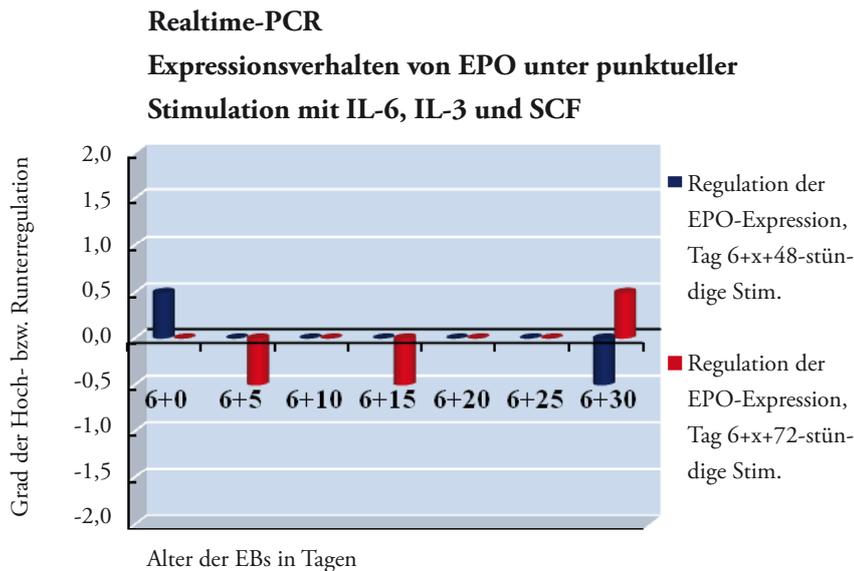


**Abb. 3.1.1.4.1 Übersicht der EPO-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

#### 3.1.1.4.2 Expressionsverhalten von EPO bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h)

Die punktuellen Stimulationen über 48- bzw. 72h führen zu einer geringeren Beeinflussung des EPO-Expressionsverhaltens als die kontinuierliche Stimulation. So zeigt sich unter 48-stündiger Stimulation nur zu Beginn der Differenzierung, an Tag 6+0, eine Hochregulation, sowie zum Ende des Versuchs, an Tag 6+30 eine Runterregulation der EPO-Expression. Die 72-stündige Stimulation bewirkt eine leichte Runterregulation an Tag 6+5, sowie an Tag 6+15. Im Gegensatz zu dem Effekt den eine 48-stündige Stimulation an einem späten Differenzierungspunkt (Tag 6+30) hat, führt die 72-stündige Stimulation an diesem Punkt zu einer Hochregulation.



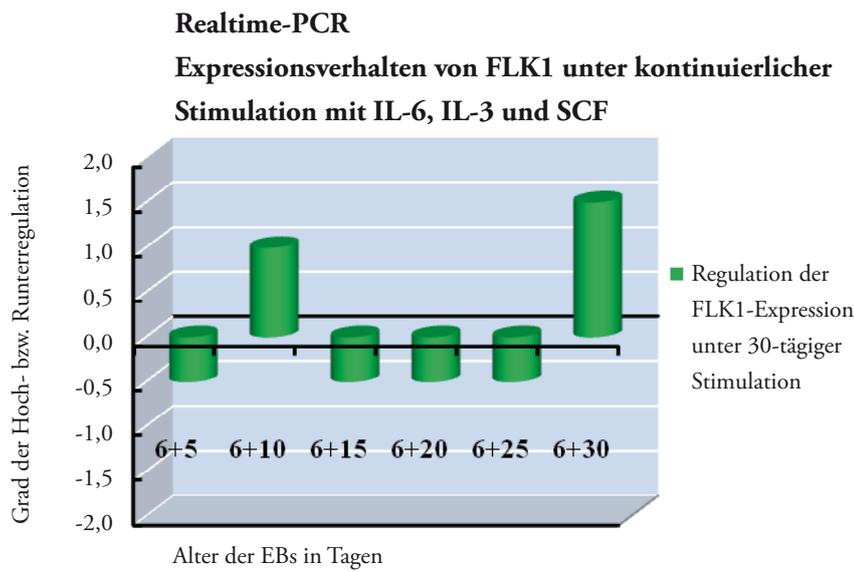
**Abb. 3.1.1.4.2 Übersicht der EPO-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**  
Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (nach 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EB's aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.5 FLK1

*IL-6, IL-3 und SCF beeinflussen die FLK1-Expression am stärksten von allen untersuchten Transkriptionsfaktoren*

#### 3.1.1.5.1 Expressionsverhalten von FLK1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Unter der kontinuierlichen Stimulation kommt es während des gesamten Differenzierungszeitraumes zu einer Regulationsänderung der FLK1-Expression. Wie im Diagramm deutlich wird, überwiegt eine Runterregulation der Expression, welche jedoch in geringerem Ausmaß erfolgt als die nachgewiesene Hochregulation (Tag 6+10 sowie 6+30).



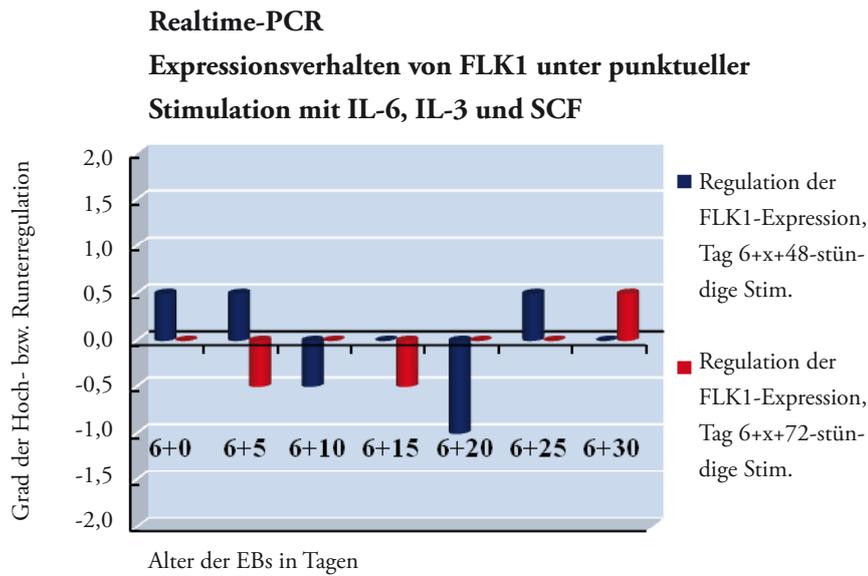
**Abb. 3.1.1.5.1** Übersicht der FLK1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

#### 3.1.1.5.2 Expressionsverhalten von FLK1 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h)

Im Gegensatz zu der anfänglichen Runterregulation der Genexpression bei kontinuierlicher Stimulation findet sich bei einer punktuellen Stimulation über 48h an Tag 6+0, sowie an Tag 6+5 eine Hochregulation. Eine Stimulation der gleichen Dauer führt im weiteren Verlauf der Differenzierung zu einer Runterregulation, mit der stärksten Ausprägung an Tag 6+20. An Tag 6+25 bewirkt die Stimulation dann wiederum eine Hochregulation.

Wie die Diagramme (Abb. 3.1.1.5.1-2) verdeutlichen, hat die 72-stündige Stimulation einen geringeren Einfluss auf die FLK1-Expression als die kontinuierliche- bzw. die 48-stündige Stimulation. An Tag 6+5 sowie an Tag 6+15 bewirkt die 72-stündige Stimulation eine Runterregulation, an Tag 6+30 eine leichte Hochregulation.



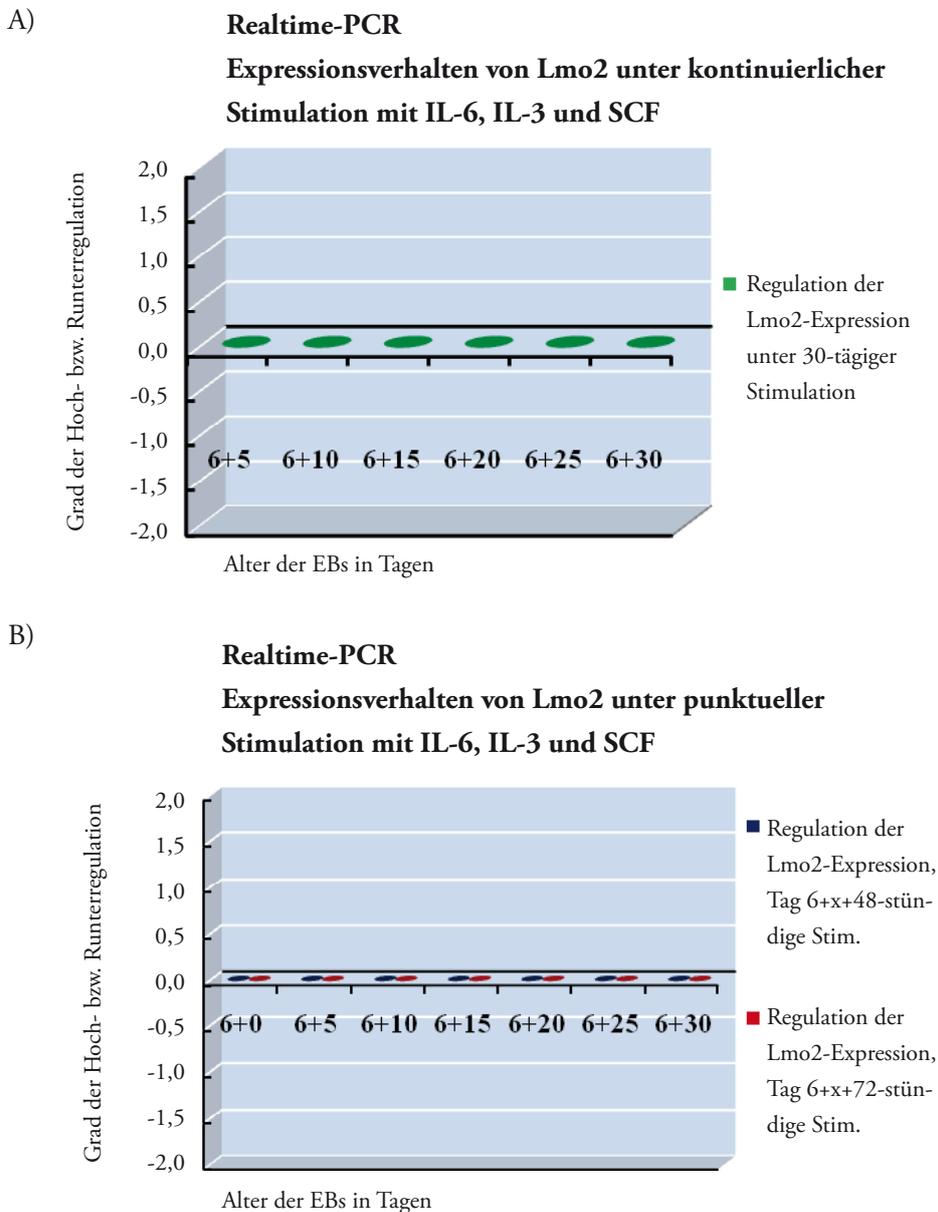
**Abb. 3.1.1.5.2 Übersicht der FLK1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (nach 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.6 Lmo2

*IL-6, IL-3 und SCF haben keinen Einfluss auf die Lmo2- Expression*

Weder die kontinuierliche Stimulation über 30 Tage, noch die punktuellen Stimulationen über 48- bzw. 72h führen zu einer Änderung im Expressionsverhalten des, für Lmo2 kodierenden, Gens.



**Abb. 3.1.1.6 A, B) Übersicht der LMO2-Expression über einen Zeitraum von 25- bzw. 30 Tagen bei kontinuierlicher (30 Tage) sowie punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

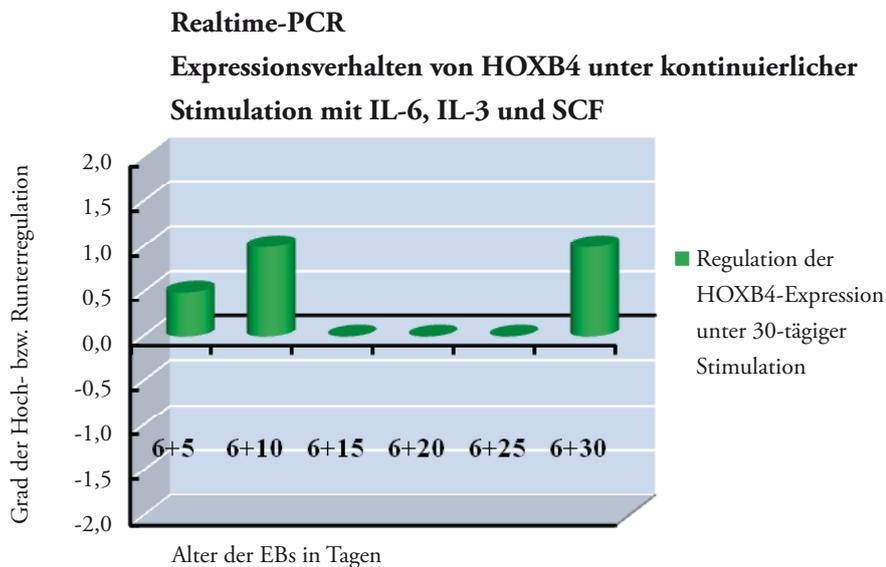
Die kontinuierliche Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen wurde an Tag 6+0 begonnen und über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) erfolgte die Ernte der EBs. Die punktuelle Stimulation wurde an den auf der horizontalen Achse aufgeführten Versuchszeitpunkten für 48- bzw. 72h durchgeführt und die EBs im Anschluß gemessen. Die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR fand im Anschluß an die Ernte statt, nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.7 HOXB4

eine Stimulation mit den Zytokinen IL-6, IL-3 und SCF führt überwiegend zu einer Hochregulation der HOXB4-Genexpression

#### 3.1.1.7.1 Expressionsverhalten von HOXB4 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Eine kontinuierliche Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen führt, insbesondere an Tag 6+10 und Tag 6+30, zu einer Hochregulation der HOXB4-Expression.

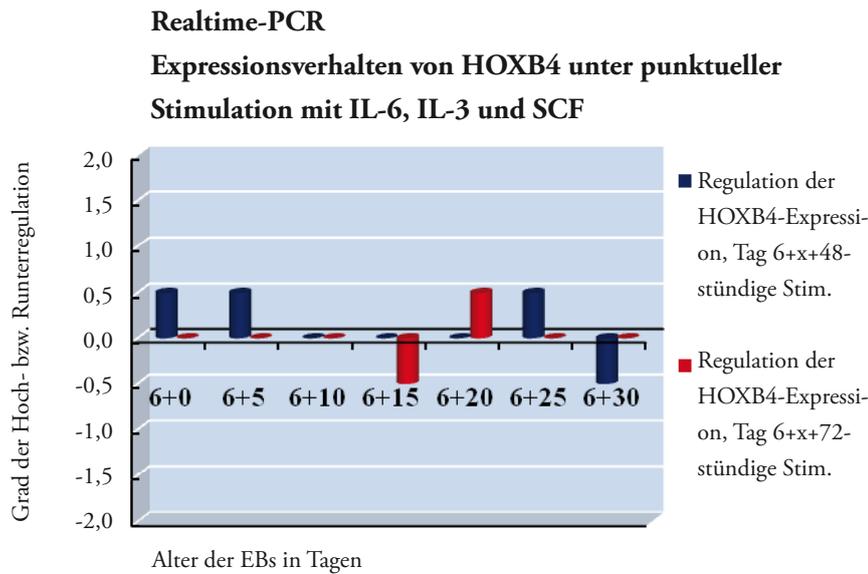


**Abb. 3.1.1.7.1 Übersicht der HOXB4-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 (nicht dargestellt) und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufscharakterisierung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

#### 3.1.1.7.2 Expressionsverhalten von HOXB4 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h)

Eine punktuelle Stimulation über 48h an den Tagen 6+0, Tag 6+5, sowie an Tag 6+25 führt zu einer Hochregulation von HOXB4. Eine 48-stündige Stimulation im fortgeschrittenen Stadium der Differenzierung (Tag 6+30) bewirkt im Gegensatz zur kontinuierlichen Stimulation eine Runterregulation. Eine Stimulation über 72h erreicht lediglich in der Mitte des Versuchs, an den Tagen 6+15 sowie 6+20, eine Änderung des Expressionsverhaltens.



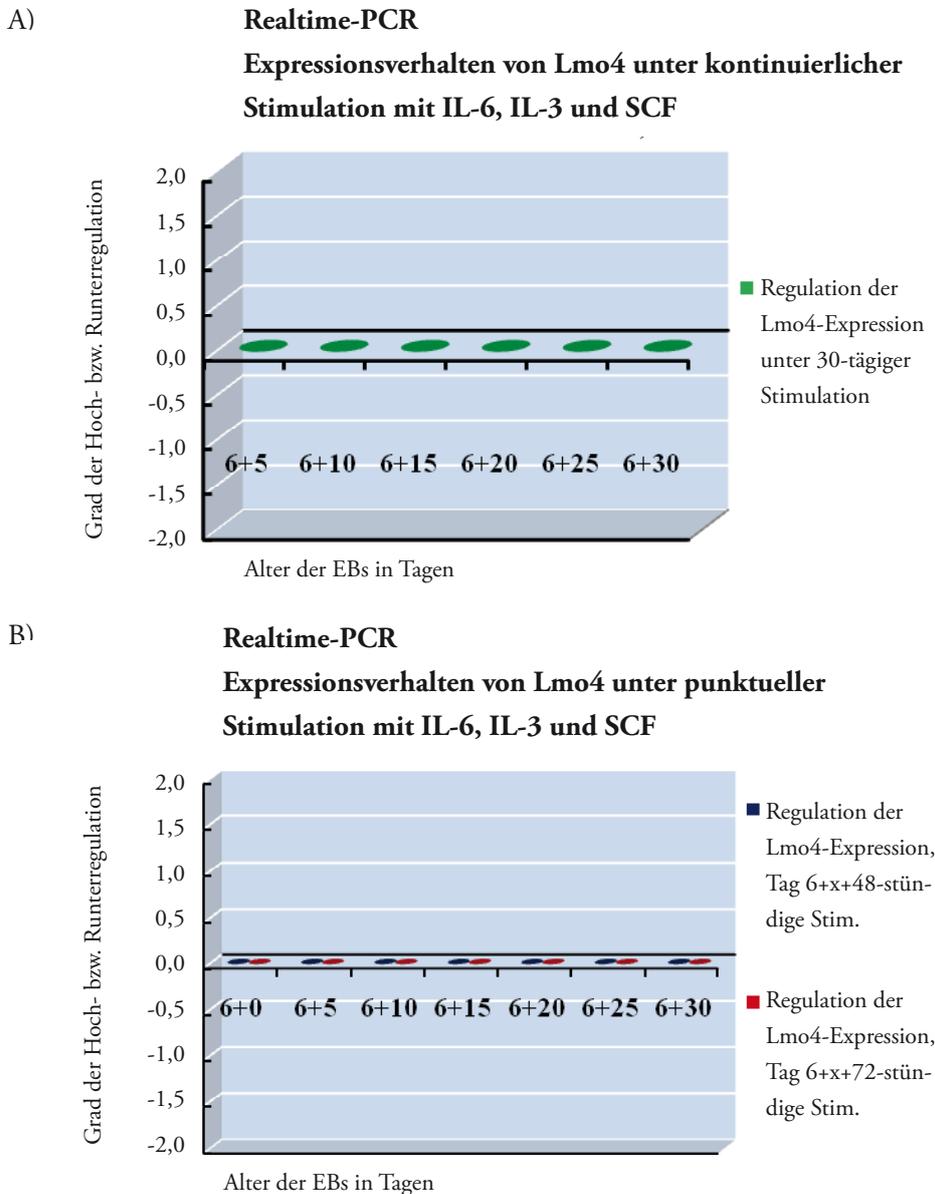
**Abb. 3.1.1.7.2 Übersicht der HOXB4-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (nach 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.8 Lmo4

eine Stimulation der EBs mit IL-6, IL-3 und SCF nimmt auf die Lmo4-Genexpression keinen Einfluss

Weder die kontinuierliche Stimulation über 30 Tage noch die punktuelle Stimulation über 48- bzw. 72h führen zu einer Expressionsänderung des, für Lmo4 kodierenden, Gens.



**Abb. 3.1.1.8 A, B) Übersicht der Lmo4-Expression über einen Zeitraum von 25- bzw. 30 Tagen bei kontinuierlicher (30 Tage) sowie punktueller Stimulation (48- bzw. 72h) mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

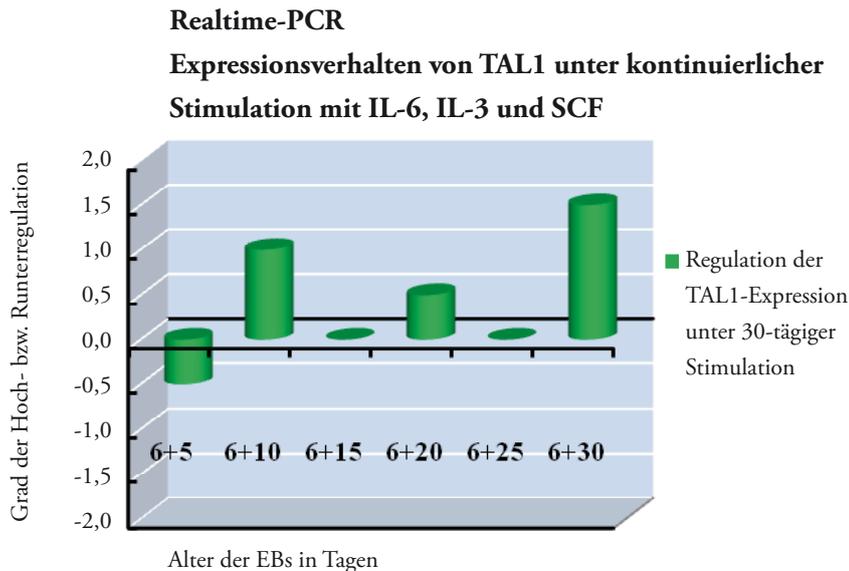
Die kontinuierliche Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen wurde an Tag 6+0 begonnen und über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) erfolgte die Ernte der EBs. Die punktuelle Stimulation wurde an den auf der horizontalen Achse aufgeführten Versuchszeitpunkten für 48- bzw. 72h durchgeführt und die EBs im Anschluß gemessen. Die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR fand im Anschluß an die Ernte statt, nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.9 TAL1

die TAL1 Expression wird, ähnlich der Expression der meisten untersuchten Gene, am stärksten durch die kontinuierliche Stimulation über 30 Tage beeinflusst

#### 3.1.1.9.1 Expressionsverhalten von TAL1 bei kontinuierlicher Stimulation (30 Tage)

Zu Beginn des Versuchs wird, durch die kontinuierliche Stimulation, eine Runterregulation der TAL1-Expression erreicht (Tag 6+5). Im weiteren Verlauf der Differenzierung hingegen wird TAL1 hochreguliert. Dies zeigt sich insbesondere an Tag 6+10 sowie nach einer Stimulation über die gesamten 30 Tage (Tag 6+30).

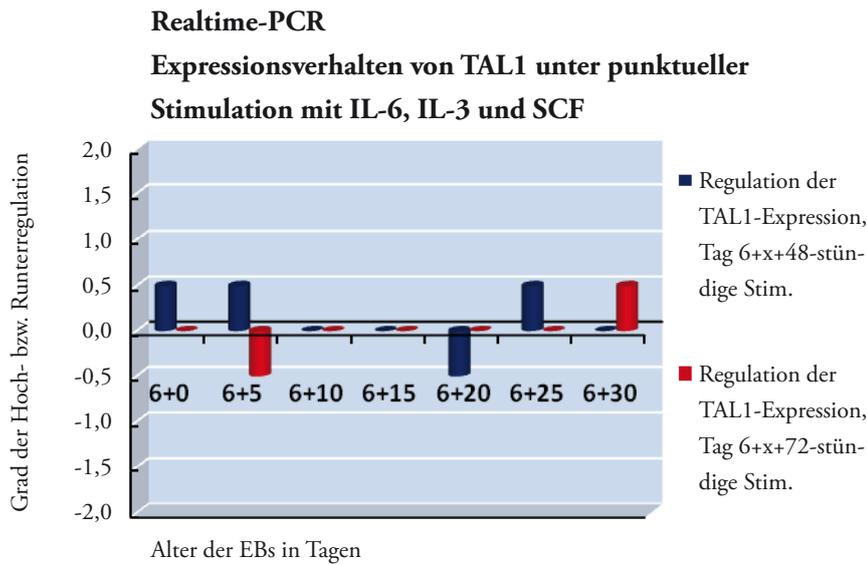


**Abb. 3.1.1.9.1** Übersicht der TAL1-Expression über einen Zeitraum von 25 Tagen bei kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR

Die primäre Stimulation der EBs mit den oben genannten Zytokinen erfolgte an Tag 6+0 (nicht dargestellt) und wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten. In 5-Tagesabständen (s. x-Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

#### 3.1.1.9.2 Expressionsverhalten von TAL1 bei punktueller Stimulation (48- bzw. 72h)

Eine punktuelle Stimulation über 48h an den Tagen 6+0, sowie 6+5 führt zu einer Hochregulation, im Gegensatz zu dem Effekt, den eine kontinuierliche Stimulation zu diesen Zeitpunkten der Differenzierung begünstigt (s.o.). Diese gegensätzliche Beeinflussung spiegelt sich auch im Ergebnis der Messung an Tag 6+20+48h wieder, hier erfolgt eine Runterregulation, wohingegen eine kontinuierliche Stimulation (s.o.) zu diesem Zeitpunkt eine Hochregulation bewirkt. Die punktuelle Stimulation über 72h konnte lediglich an zwei Zeitpunkten des Versuchs eine Änderung im Expressionsverhalten erzielen. So zeigte sich durch die Stimulation über 72h an Tag 6+5 eine Runterregulation sowie an Tag 6+30 eine Hochregulation der TAL1-Genexpression.



**Abb. 3.1.1.9.2 Übersicht der TAL1-Expression über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen bei punktueller Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48- bzw. 72h, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die im Diagramm aufgeführten Differenzierungszeitpunkte (s. x-Achse) kennzeichnen den jeweiligen Beginn einer punktuellen Stimulation über 48- bzw. 72h mit den oben genannten Zytokinen. Nach Abschluss der Stimulation (nach 48- bzw. 72h) erfolgte die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hilfe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.1.10 Zusammenfassung

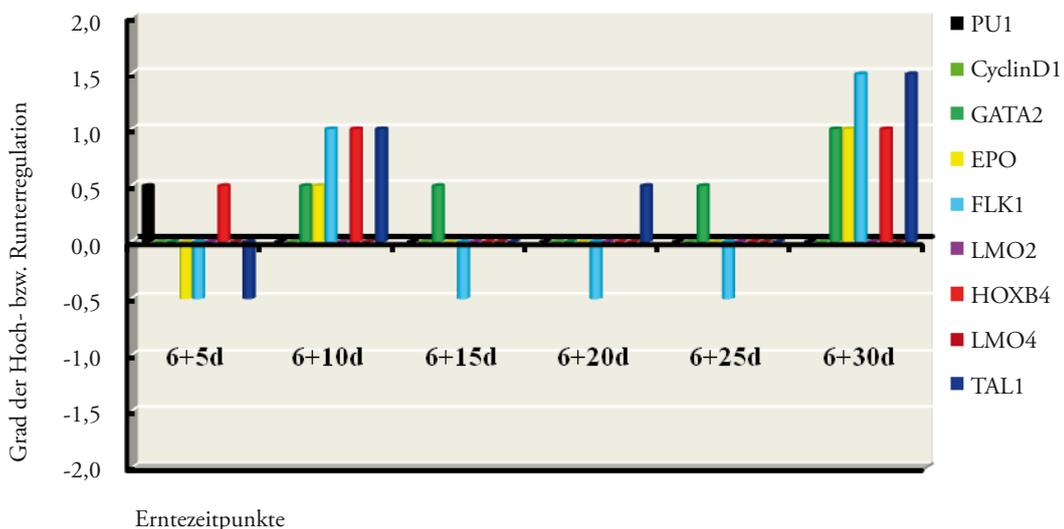
Den stärksten Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene hat die **kontinuierliche Stimulation** mit IL-6, IL-3 und SCF (Abb. 3.1.10, A). Insbesondere wird eine Hochregulation mit fortschreitender Differenzierung beobachtet. GATA2, EPO, FLK1, HOXB4 sowie TAL1 werden an den Tagen 6+0, 6+10, sowie 6+30 zu ähnlichen Graden hoch- bzw. runterreguliert. Das für FLK1 kodierende Gen wird über den gesamten Differenzierungsverlauf in seinem Expressionsverhalten, überwiegend im Sinne einer Runterregulation, beeinflusst. Das Expressionsverhalten von Cyclin D1, Lmo2 und Lmo4 wird durch die kontinuierliche Stimulation nicht geändert. Die **punktueller Stimulation über 48 h** (Abb. 3.1.10, B) führt zu einem frühen Differenzierungsstadium der EBs, an den Tagen 6+0 und 6+5, überwiegend zu einer Hochregulation der Gene. Sofern eine 48-stündige im fortgeschrittenen Stadium der Differenzierung zu einer Expressionsänderung der untersuchten Gene führt, so wird überwiegend eine Runterregulation beobachtet. Eine Ausnahme stellt die 48-stündige Stimulation an Tag 6+25 dar, die zu einer Hochregulation führt. Generell werden die gleichen Gene wie unter kontinuierlicher Stimulation beeinflusst, jedoch seltener und in geringerer Ausprägung. Die **punktueller Stimulation über 72 h** (Abb. 3.1.10, C) zeigt den geringsten Einfluss auf die Genexpression. Zum frühesten Zeitpunkt der Differenzierung, sowie ganz am Ende des Versuchs wird überwiegend eine Hoch-, an den übrigen Tagen eher eine Runterregulation, begünstigt. Einmalig, an Tag 6+5, wird durch die 72-stündige Stimulation eine Änderung im Expressionsverhalten von CyclinD1 beobachtet, dies konnte weder durch die kontinuierliche- noch durch die 48-stündige Stimulation erreicht werden. Eine Änderung im Expressionsverhalten von Lmo2 sowie Lmo4 konnte auch bei dieser Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden.

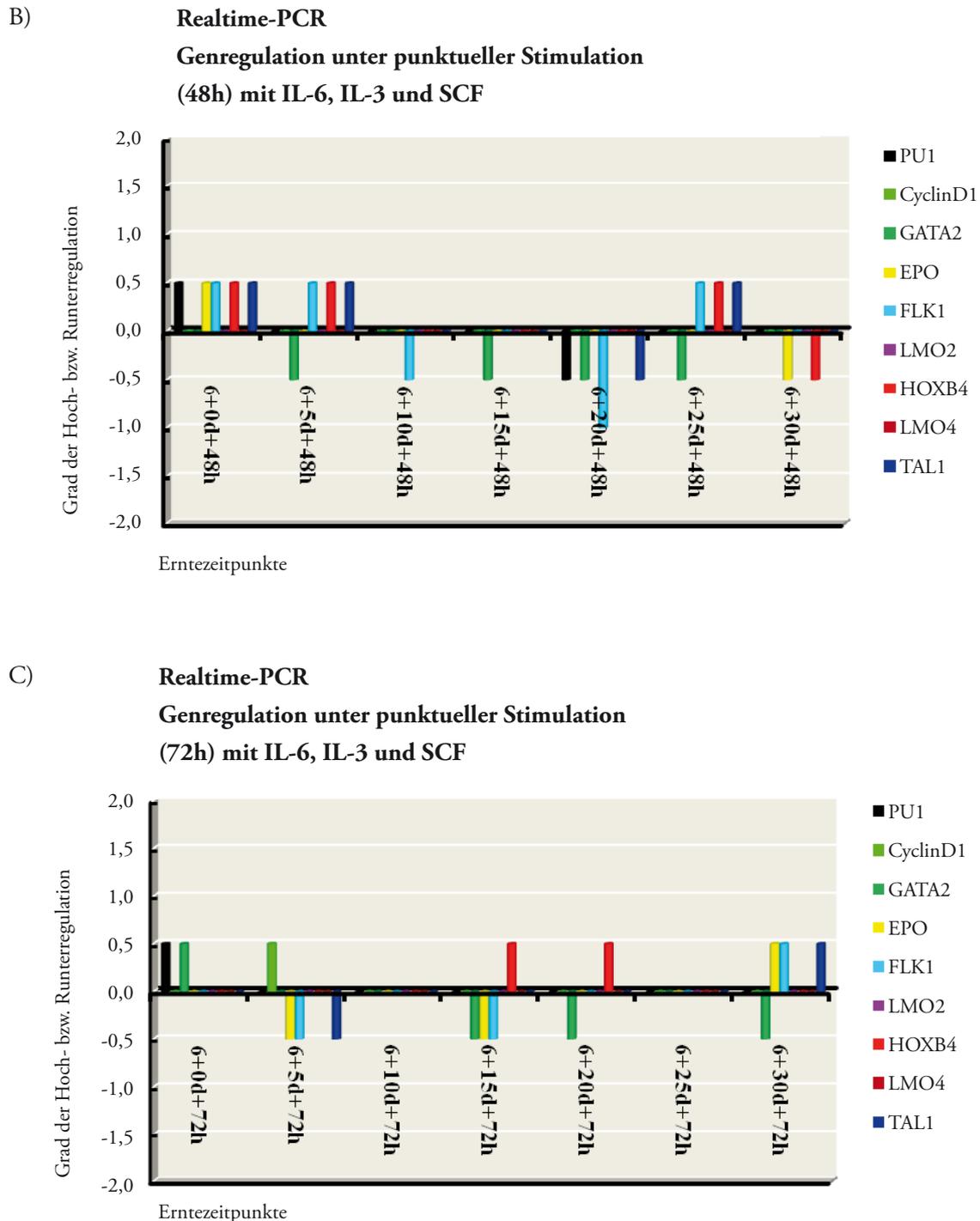
A)

#### Realtime-PCR

#### Genregulation unter kontinuierlicher Stimulation

(30 Tage) mit IL-6, IL-3 und SCF





**Abb.3.1.1.10: Übersicht des Expressionsverhaltens der untersuchten Gene im Zeitverlauf in Abhängigkeit der Stimulationsdauer mit IL-6, IL-3 und SCF**

Dargestellt ist das Expressionsverhalten der untersuchten Gene in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer als Zusammenfassung der vorangegangenen Diagramme. **Diagramm A** stellt die Regulation der Genexpression unter kontinuierlicher Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF dar. Tag 6+0, der im Diagramm nicht dargestellt ist, stellt hier den Beginn der Stimulation mit den oben genannten Zytokinen dar, die über einen Zeitraum von 30 Tagen kontinuierlich aufrechterhalten wurde. An den, im Diagramm (s. x-Achse) gekennzeichneten, Versuchszeitpunkten erfolgte die Ernte, sowie die Messung mithilfe der Realtime-PCR (s.u.). **Diagramm B und C** geben einen Überblick über die Genregulation unter 48- bzw. 72-stündiger Stimulation. In 5-Tages-Abständen wurden EBs isoliert, für 48- bzw. 72h mit IL-6, IL-3 und SCF stimuliert. Im Anschluss erfolgte an den, auf der x-Achse gekennzeichneten, Erntezeitpunkten die Ernte sowie die Expressionsanalyse. Diese wurde mit Hil-

fe der Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen die Erntezeitpunkte aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2 Expressionsverlauf der untersuchten Gene über einen Differenzierungszeitraum von 26 Tagen bei Einzelstimulation mit Flt3 bzw. SCF sowie bei Kombinationsstimulation mit Flt3 und SCF

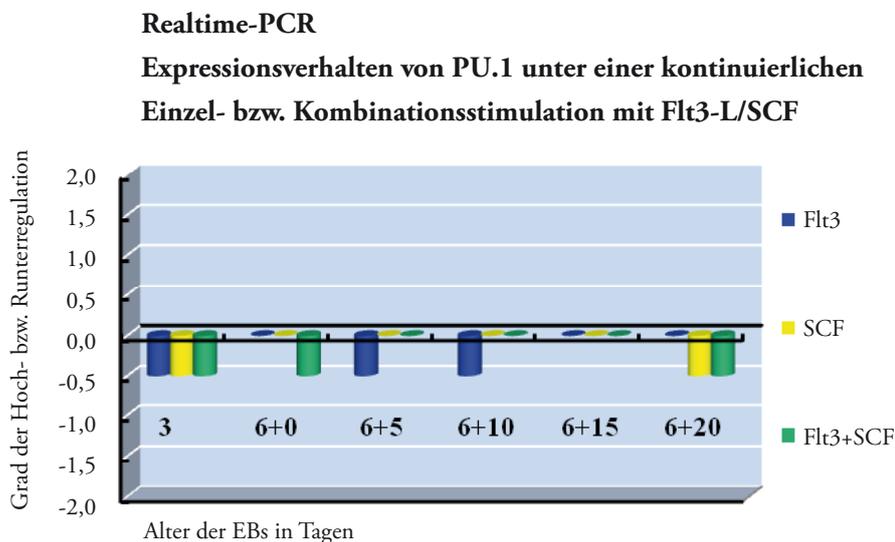
Die Ergebnisse der Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR sind im Folgenden für jedes Gen separat in einem Diagramm aufgeführt. Tag 3 (3d) kennzeichnet den dritten Tag der Kultivierung sowie den dritten Tag, an dem die Zellen mit Flt3, SCF bzw. der Kombination aus beiden stimuliert wurden. Ab Tag 6+0 befinden sich die EBs auf 6-Well-Platten, alle folgenden Tage werden als 6+x bezeichnet. Die Ernte sowie die Expressionsanalyse erfolgte an den, auf der x-Achse gekennzeichneten, Versuchstagen, primär an Tag 3 (3d). Die Ergebnisse der verschiedenen Zytokine sind farblich hervorgehoben (zum Ablauf der Versuchsreihen siehe auch 2.2.2.6). Die Stimulation der Zellen erfolgte mit gleichbleibender Konzentration der Zytokine, Flt3, SCF bzw. einer Kombination der beiden, kontinuierlich über den gesamten Versuchsablauf (s.2.2.2.5). Dargestellt sind die, der mathematisch ermittelten Ratio, zugeordneten Werte der Hoch- bzw. Runterregulation (s. Tab.3.1). In den folgenden Diagrammen (Abb.3.1.2.1-3.1.2.9) sind diese als positive (Hochregulation) und negative (Runterregulation) Zahlenwerte aufgeführt.

#### 3.1.2.1 PU.1

die PU.1 Expression wird durch eine Stimulation mit Flt3, SCF bzw. deren Kombination runterreguliert

##### 3.1.2.1.1 Expressionsverhalten von PU.1 bei kontinuierlicher Stimulation (26 Tage) mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Eine 3-tägige Stimulation mit Flt3, SCF oder deren Kombination bewirkt eine Runterregulation der PU.1 Expression. Dies zeigt sich auch im weiteren Verlauf, insbesondere durch Flt3 bzw. durch Flt3 und SCF in Kombination.



**Abb.3.1.2.1 Übersicht der PU1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Real-

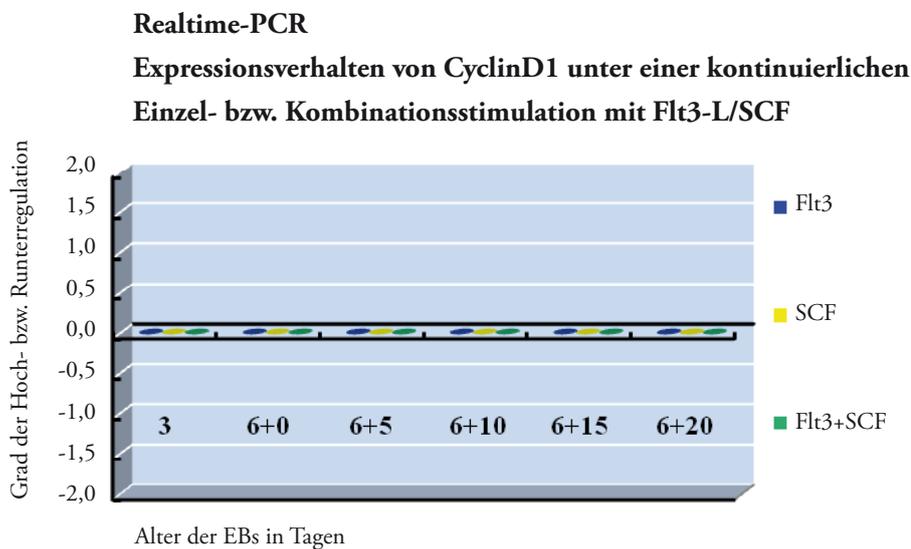
time-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufs- darstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hoch- regulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2.2 CyclinD1

*die CyclinD1 Expression wird durch Stimulation mit Flt3, SCF bzw. deren Kombination nicht beeinflusst*

#### 3.1.2.2.1 Expressionsverhalten von CyclinD1 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Durch die gewählten Zytokine kann während des gesamten Kultivierungszeitraumes keine Expressionsän- derung des, für CyclinD1 kodierenden Gens, erreicht werden.



**Abb.3.1.2.2 Übersicht der CyclinD1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

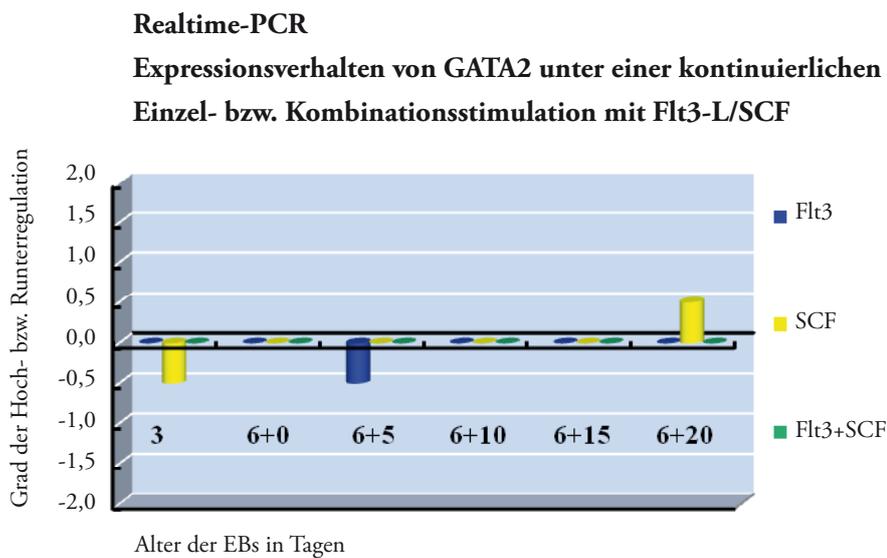
Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufs- darstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hoch- regulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2.3 GATA2

zu Beginn und zum Ende der Kultivierung führt eine Stimulation der ES-Zellen mit SCF zu einer Änderung der GATA2-Expression, die Kombinationsstimulation zeigt hingegen keinen Einfluss

#### 3.1.2.3.1 Expressionsverhalten von GATA2 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

SCF führt nach einer 3-tägigen Stimulation zu einer Runterregulation, sowie am Ende des Differenzierungszeitraumes (Tag 6+20) zu einer Hochregulation der GATA2-Expression. Flt3 bewirkt nur einmalig eine Änderung der Expression. So kommt es nach 11-tägiger Stimulation (Tag 6+5) zu einer Runterregulation. Die Stimulation der ES-Zellen mit einer Kombination aus Flt3 und SCF zeigt keinen Einfluss auf die Expression.



**Abb. 3.2.1.3 Übersicht der GATA2-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

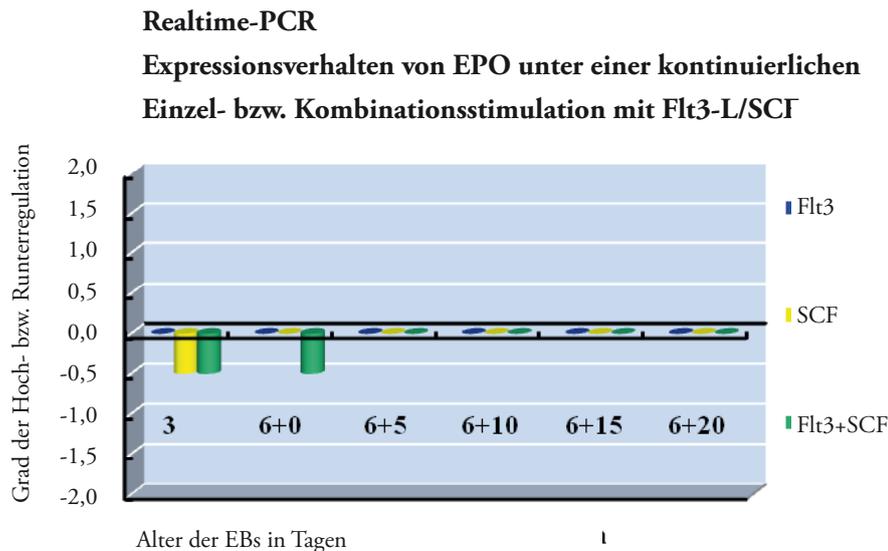
Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2.4 EPO

lediglich zu Beginn der Kultivierung zeigt sich eine Änderung der EPO-Expression

#### 3.1.2.4.1 Expressionsverhalten von EPO unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Eine Änderung der GATA2- Expression wird lediglich durch eine Stimulation zu Beginn der Differenzierung erzielt. So zeigt sich nach 3-tägiger Stimulation und Kultivierung eine Runterregulation des, für EPO kodierenden Gens, bei den ES-Zellen, die mit Flt3 oder SCF stimuliert wurden. Durch die Kombinationsstimulation konnte zu keinem Zeitpunkt eine Änderung im Expressionsverhalten erzielt werden.



**Abb. 3.1.2.4 Übersicht der EPO-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

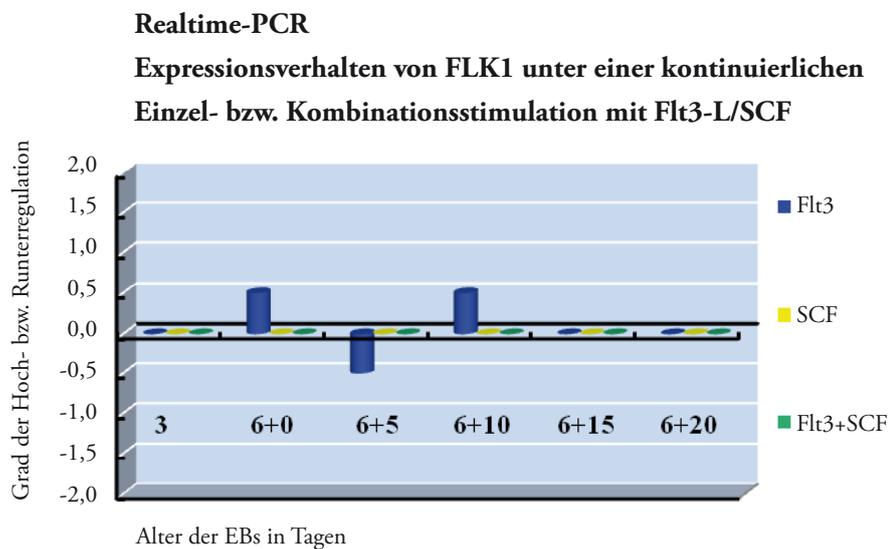
Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2.5 FLK1

eine Stimulation mit Flt3 nimmt in den ersten Tagen der Differenzierung Einfluss auf die FLK1-Expression, SCF sowie Flt3 und SCF in Kombination bewirken hingegen zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung eine Änderung des Expressionsverhaltens

#### 3.1.2.5.1 Expressionsverhalten von FLK1 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Während der ersten Tage der Kultivierung führt eine Stimulation der ES-Zellen mit Flt3, SCF sowie Flt3+SCF zu keiner Änderung der FLK1 Expression. Erst nach Formation der EBs zeigt sich unter dem Einfluss von Flt3 eine Hoch- (Tag 6+0, Tag 6+10), bzw. Runterregulation (Tag 6+5). Im weiteren Verlauf der Differenzierung kann jedoch kein Effekt von Flt3 mehr nachgewiesen werden. Die Stimulation mit SCF sowie der Kombination aus Flt3 und SCF hat über den gesamten Kultivierungszeitraum keinen Effekt auf die FLK1-Expression.



**Abb. 3.1.2.5 Übersicht der FLK1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

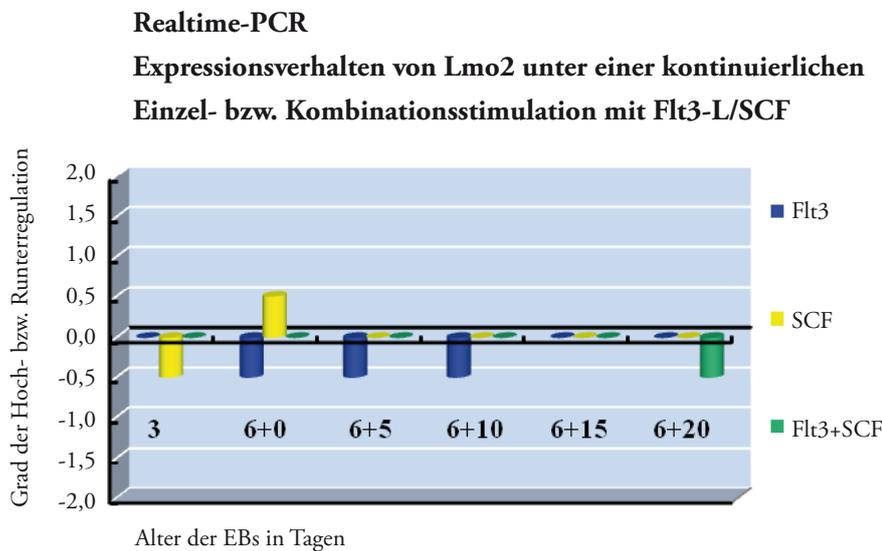
### 3.1.2.6 Lmo2

insbesondere in den ersten Tagen der Kultivierung kann die Lmo2 Expression durch eine Einzelstimulation mit Flt3 oder SCF verändert werden

#### 3.1.2.6.1 Expressionsverhalten von Lmo2 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Noch während der Bildung der EBs führt eine Stimulation der ES-Zellen mit SCF zu einer Runterregulation der Expression (Tag 3), die dann, nach 3 weiteren Kultivierungstagen, in eine Hochregulation der LMO2-Expression (Tag 6+0) übergeht. Im weiteren Verlauf nimmt SCF keinen weiteren Einfluss auf die LMO2-Expression.

Den stärksten Effekt, im Sinne einer Runterregulation, erzielt eine Einzelstimulation mit Flt3. So kommt es in den Tagen 6+0-6+10 zu einer Runterregulation des, für LMO2 kodierenden, Gens. Auch hier bleibt der Effekt auf die frühen Zeitpunkte beschränkt. Lediglich die Kombinationsstimulation führt am Ende der Differenzierung zu einer Runterregulation der Expression. Im übrigen Verlauf bewirkt die Kombination aus Flt3 und SCF keine Änderung im Expressionsverhalten.



**Abb. 3.1.2.6 Übersicht der Lmo2-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

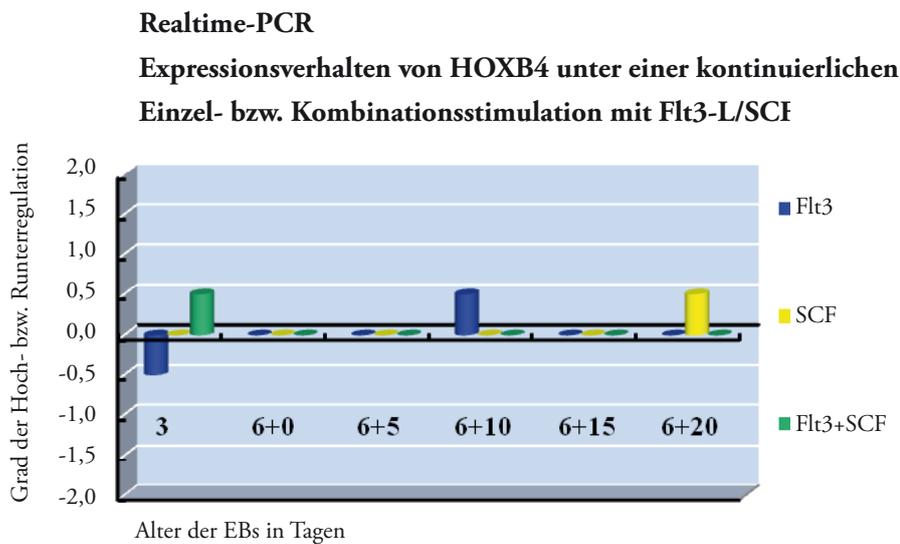
Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2.7 HOXB4

die HOXB4-Expression wird, im Gegensatz zu der Expression der anderen untersuchten Gene, überwiegend im Sinne einer Hochregulation geändert

#### 3.1.2.7.1 Expressionsverhalten von HOXB4 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Noch bevor die ES-Zellen zur weiteren Differenzierung auf die 6-Well-Platten gegeben werden, bewirkt die Stimulation mit Flt3 eine Runterregulation der HOXB4-Expression (Tag 3). Im Gegensatz dazu führt die Kombinationsstimulation aus Flt3 sowie SCF über 3 Tage zu einer Hochregulation der HOXB4-Expression. Im weiteren Verlauf nimmt lediglich die Einzelstimulation mit Flt3 bzw. SCF Einfluss. So zeigt sich unter Flt3 an Tag 6+10, sowie unter SCF an Tag 6+20 eine Hochregulation.



**Abb. 3.1.2.7 Übersicht der HOXB4-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

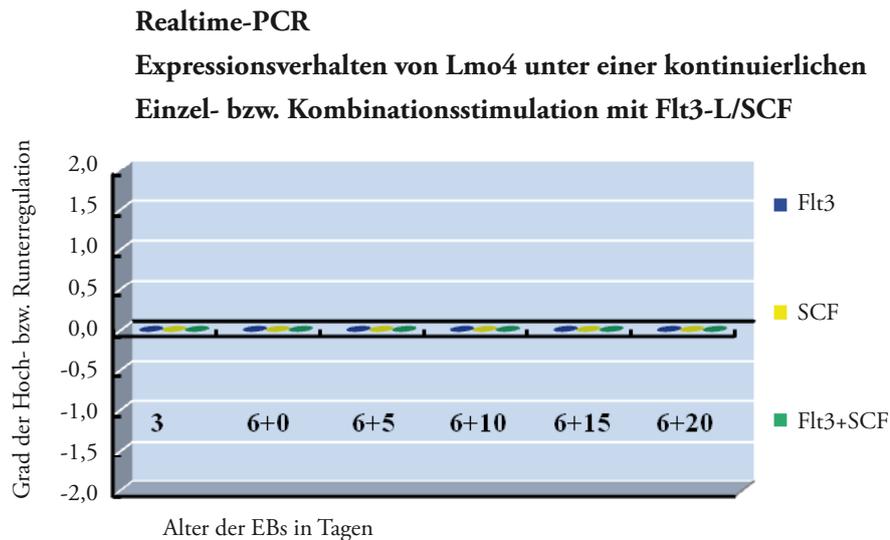
Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch-bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch-bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

### 3.1.2.8 Lmo4

eine Stimulation mit Flt3, SCF sowie der Kombination aus beiden führt weder zu einer Hoch-, noch zu einer Runterregulation der Lmo4-Expression

#### 3.1.2.8.1 Expressionsverhalten von Lmo4 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung kann die Lmo4-Expression der ES-Zellen durch die Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination beeinflusst werden.



**Abb. 3.1.2.8 Übersicht der LMO4-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

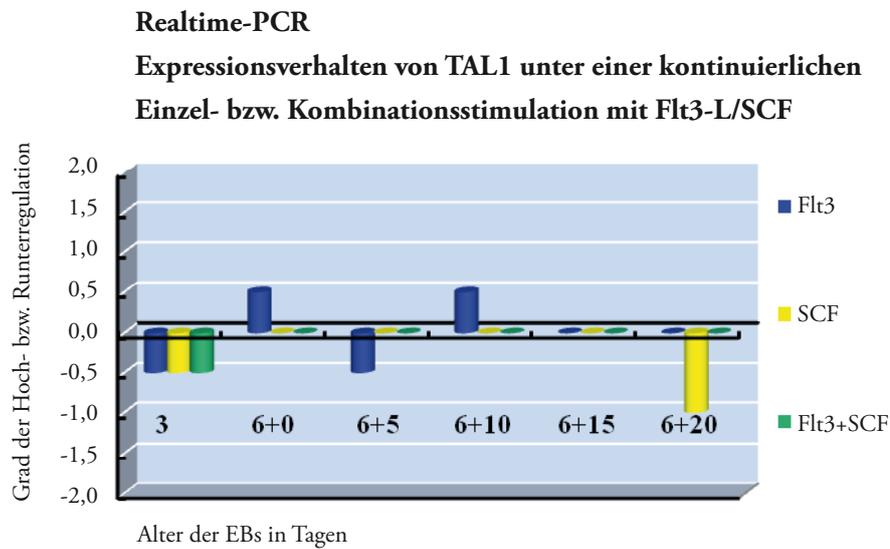
### 3.1.2.9 TAL1

die TAL1-Expression wird am stärksten von allen untersuchten Genen durch Flt3, SCF sowie der Kombination aus beiden beeinflusst

#### 3.1.2.9.1 Expressionsverhalten von TAL1 unter kontinuierlicher Stimulation über 26 Tage mit Flt3, SCF sowie deren Kombination

Eine Stimulation der ES-Zellen mit Flt3 führt in der gesamten ersten Zeit der Kultivierung (Tag 3- Tag 6+10) zu einer Expressionsänderung. So konnte an Tag 6+0 und an Tag 6+10 eine Hochregulation, sowie an Tag 3 und Tag 6+5 eine Runterregulation der TAL1-Expression nachgewiesen werden. Die Stimulation mit SCF hat zu Beginn und zum Ende der Kultivierung eine Runterregulation der TAL1-Expression

zur Folge, hier wurde der stärkste Effekt im fortgeschrittenen Stadium der Differenzierung (Tag 6+20) beobachtet. Unter der Kombinationsstimulation mit Flt3 und SCF zeigte sich lediglich zu Beginn der Kultivierung ein Effekt, hier wurde eine Runterregulation der TAL1-Expression beobachtet.



**Abb. 3.1.2.9 Übersicht der TAL1-Expression über einen Zeitraum von 23 Tagen unter kontinuierlicher Stimulation mit Flt3, SCF sowie deren Kombination, gemessen mit Hilfe der Realtime-PCR**

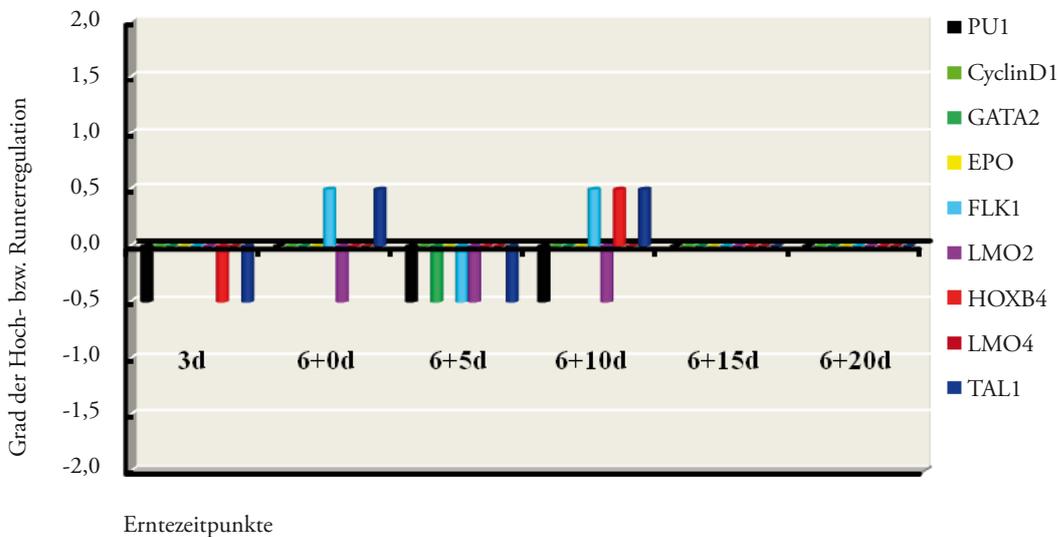
Die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen wurde an Tag 1 (auf der Abb. nicht dargestellt) begonnen und ab Tag 6+0 (s. Abb.) auf 6-well Platten fortgeführt. Die primäre Stimulation der EBs mit Flt3, SCF sowie deren Kombination erfolgte in Petrischalen an Tag 1 und wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 26 Tagen kontinuierlich durchgeführt. In 3- bzw. 5-Tagesabständen (s. horizontale Achse) wurde die Ernte sowie die Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte, sowie der standard error of mean berechnet. Zur graphischen Verlaufscharakterisierung wurden die absoluten Ergebnismittelwerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen das Alter der EBs aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

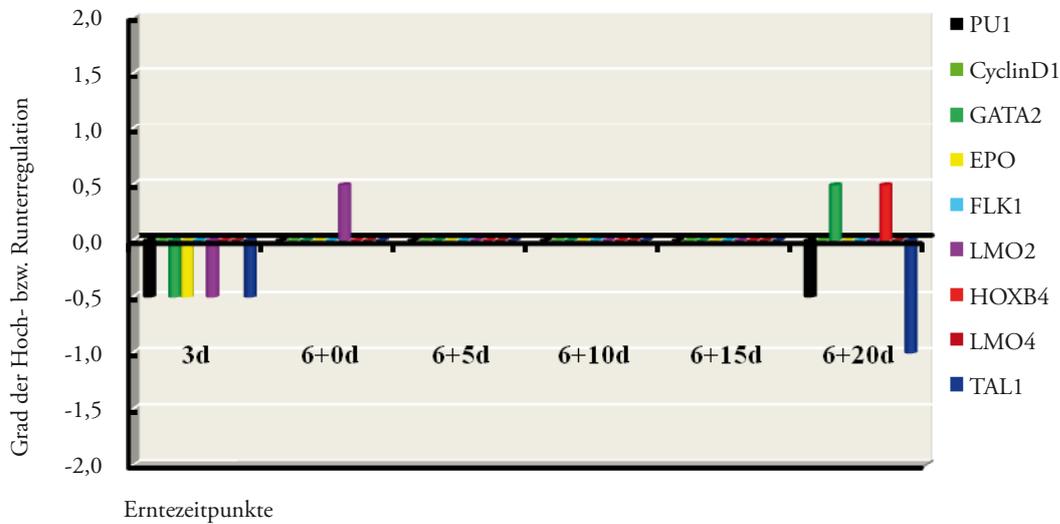
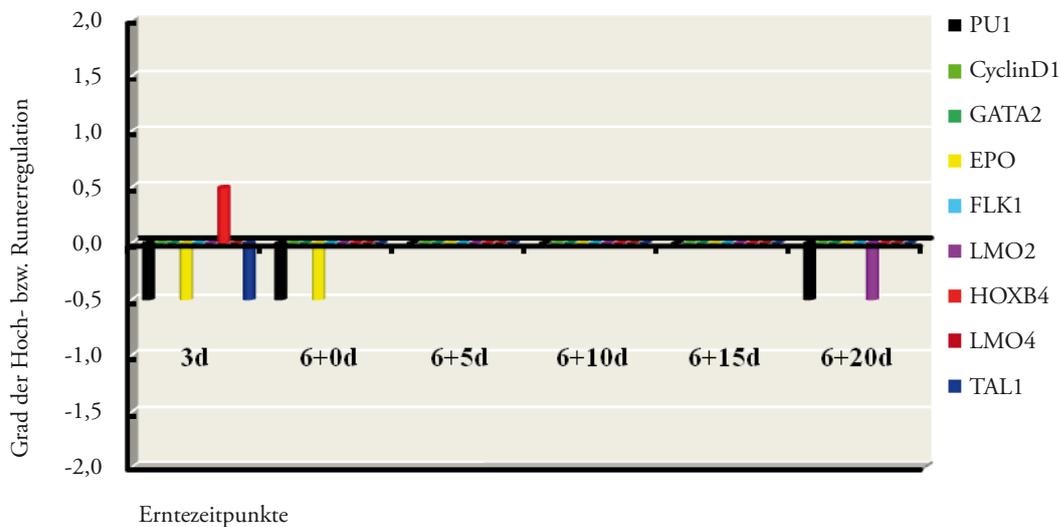
### 3.1.2.10 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Einzelstimulation mit Flt3 die Expression der untersuchten Gene nur bis zum Tag 6+10, bzw. nicht mehr ab Tag 6+15, zu beeinflussen scheint. In diesen ersten Tagen kommt es hingegen bei der Mehrzahl der untersuchten Gene zu einer Expressionsänderung, überwiegend im Sinne einer Runterregulation. Durch den Nachweis einer Genregulation unter Flt3 an mehreren Tagen in Folge, wie dies überwiegend der Fall ist, kann von einer kontinuierlichen Änderung der Genexpression ausgegangen werden. Die Einzelstimulation mit SCF hingegen nimmt in der vorliegenden Arbeit mit einer Ausnahme (Hochreg. Tag 6+0, s. Abb. 3.1.2.6, LMO2) nur nach Formation der EBs und somit vor Beginn der Differenzierung aus den embryonalen Keimblättern (Tag 3) sowie am Ende der Kultivierung (Tag 6+20) Einfluss auf das Expressionsverhalten der untersuchten Gene. Ähnlich der Einzelstimulation mit SCF kann eine Kombinationsstimulation aus Flt3 und SCF die Expression der untersuchten Gene nur zu Beginn der Kultivierung (Tag 3, Tag 6+0) sowie zum Ende der Kultivierung (Tag 6+20), überwiegend im Sinne einer Runterregulation, beeinflussen. Insbesondere an Tag 3 und somit vor Beginn der mesodermalen Differenzierung scheinen die Zellen sensibel für die gewählten Zytokine. CyclinD1 und LMO4 werden weder durch die Einzel- noch durch die Kombinationsstimulation mit Flt3, bzw. SCF in ihrer Expression beeinflusst.

#### A) Realtime-PCR

##### Genregulation unter kontinuierlicher Stimulation (26 Tage) mit Flt3



B) **Realtime-PCR****Genregulation unter kontinuierlicher Stimulation  
(26 Tage) mit SCF**C) **Realtime-PCR****Genregulation unter kontinuierlicher Stimulation  
(26 Tage) mit Flt3 und SCF**

**Abb.3.1.2.10 A-C: Übersicht des Expressionsverhaltens der untersuchten Gene unter kontinuierlicher Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit Flt3 und SCF im Zeitverlauf**

Dargestellt ist das Expressionsverhalten der untersuchten Gene unter kontinuierlicher Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit Flt3 und SCF als Zusammenfassung der vorangegangenen Diagramme. **Diagramm A und B** stellen die Regulation der Genexpression unter kontinuierlicher Einzelstimulation mit Flt3 bzw. SCF über 26 Tage im Überblick dar. **Diagramm C** zeigt die Änderung der Genexpression unter kontinuierlicher Kombinationsstimulation mit Flt3 und SCF über einen Zeitraum von 6 Tagen. An Tag 0, der im Diagramm nicht dargestellt ist, wurde die Stimulation begonnen. An den, im Diagramm (s. x-Achse) gekennzeichneten, Versuchszeitpunkten erfolgte die Ernte, sowie die Expressionsanalyse nach Isolierung der RNS und anschließender cDNS-Synthese mithilfe der Realtime-PCR (s.u.). Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt. Zur graphischen Verlaufsdarstellung wurden die absoluten Ergebniswerte konstanten Graden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet (siehe Tab.3.1). Diese Grade der Hoch- bzw. Runterregulation sind im Diagramm gegen die Erntezeitpunkte aufgetragen. Eine Hochregulation ist durch einen positiven Wert, eine Runterregulation durch einen negativen Wert im Diagramm dargestellt.

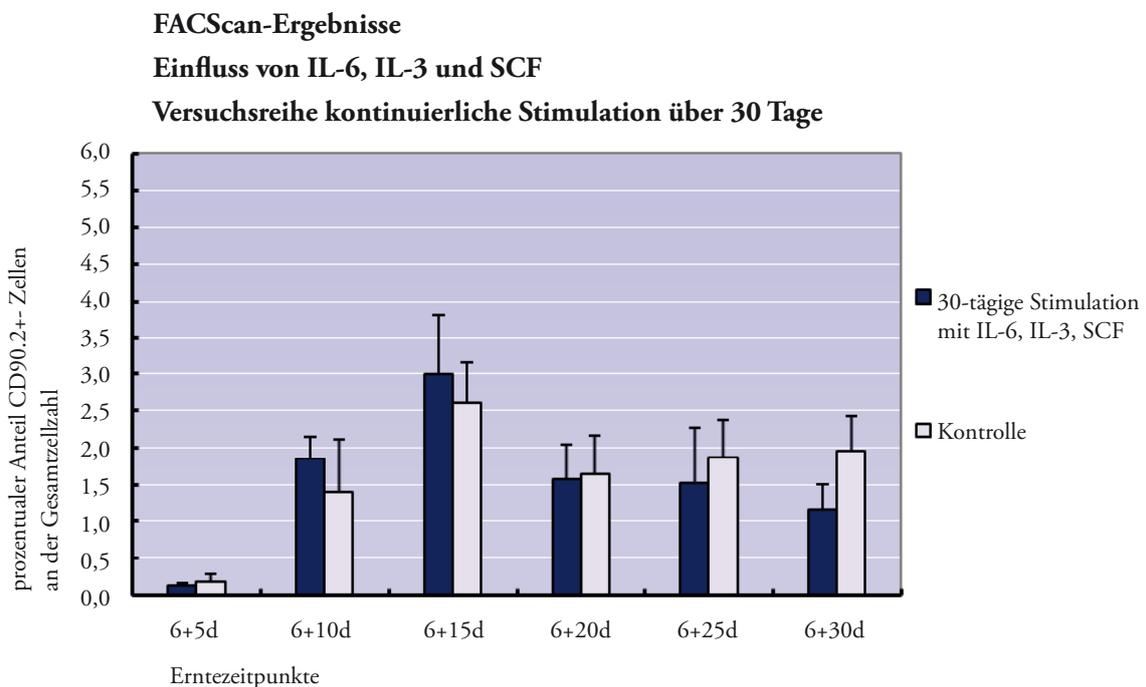
## 3.2 Ergebnis der Fluorescence-Activated-Cell-Sorter-Analyse muriner ES-Zellen

### 3.2.1 Einfluss von IL-6, IL-3 sowie SCF auf die Bildung CD90.2<sup>+</sup> Zellen

Ziel der durchflusszytometrischen Analyse muriner ES-Zellen dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss von IL-6, IL-3 sowie SCF bei unterschiedlicher Stimulationsdauer auf die Bildung früher hämatopoetischer Zellen, zu untersuchen. Zur Erkennung dieses frühen Differenzierungszeitpunktes diente der Oberflächenmarker CD90.2, der mit dem Antikörper FITC CD90.2 (Thy-1.2) rat – anti mouse für die FACS-Analyse markiert wurde. CD90.2 wird vor allem auf frühen hämatopoetischen, sehr unreifen CD34-positiven oder CD34-negativen, CD3- und CD4-positiven Zellen exprimiert. Zum Ablauf der durchflusszytometrischen Messung siehe 2.2.1.12, 13.

#### 3.2.1.1 Einfluss einer 30-tägigen Stimulation muriner ES-Zellen mit IL-6, IL-3 und SCF auf die Differenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzellen (CD90.2<sup>+</sup> Zellen)

Wie in Abb. 3.2.1.1 zu erkennen, nimmt die Anzahl CD90.2 positiver Zellen, sowohl bei den stimulierten EBs als auch bei den EBs der Kontrolle, kontinuierlich bis zum Tag 6+15 des Differenzierungszeitraumes zu. Anschließend erfolgt ein kontinuierlicher Abfall des Anteils CD90+ Zellen an der stimulierten Gesamtzellzahl, bei der Kontrolle hingegen kommt es zum Ende des Versuchs zu einem erneuten Anstieg. Die Ergebnisse zeigen, dass eine kontinuierliche Stimulation mit IL6, IL-3 und SCF die Anzahl CD-90.2 positiver Zellen nur an Tag 6+10, sowie 6+15 steigern konnte.



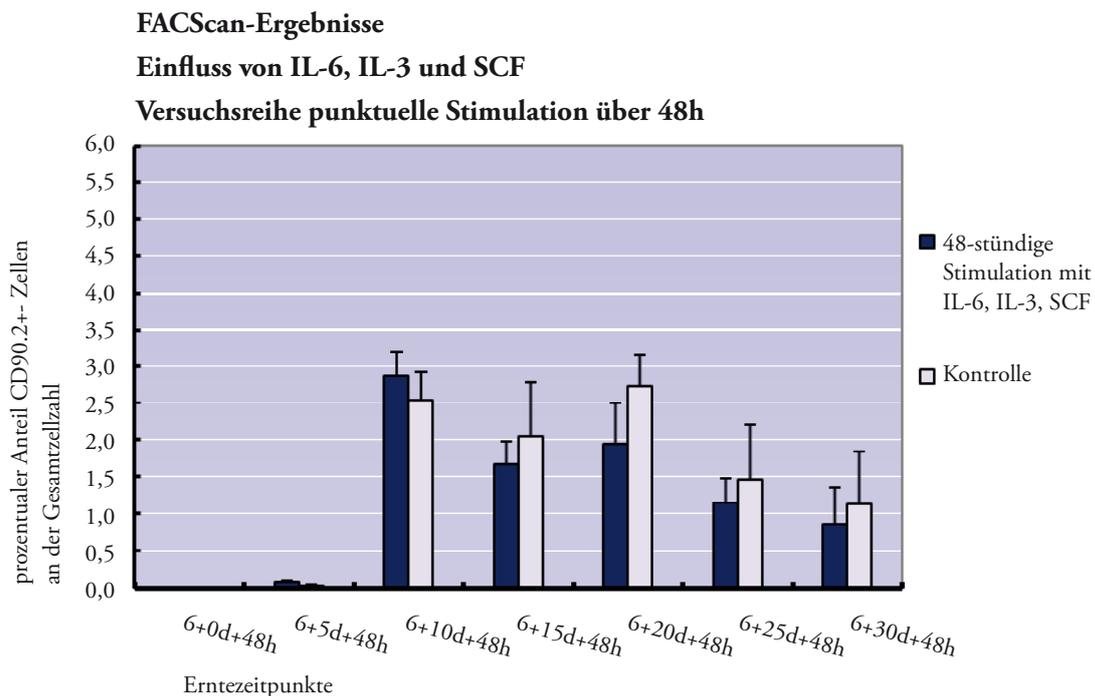
**Abb.3.2.1.1 Nachweis CD90.2<sup>+</sup> Zellen mithilfe der FACScan-Analyse -Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation über 30 Tage mit IL-6, IL-3 und SCF**

Dargestellt ist eine Übersicht des prozentualen Anteils CD90.2 positiver Zellen an der stimulierten Gesamtzellzahl (s. Tab. 3.2.1.1) im Vergleich mit dem prozentualen Anteil CD90.2 positiver Zellen der Kontrolle (s. Tab. 3.2.1.1). Tag 6+0 kennzeichnet den Beginn der EB-Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF (Konz. s.2.2.2.5), die kontinuierlich über die gesamten 30 Versuchstage fortgeführt wurde. An den, auf der horizontalen Achse, aufgeführten Punkten erfolgte die Ernte sowie die durchflusszytomet-

rische Analyse nach CD90.2-FITC Antikörper Markierung. Der prozentuale Wert der CD90.2 positiven Zellen, aufgetragen gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs, ist der Mittelwert aus vier Messungen, angegeben mit dem Standard error of mean.

### 3.2.1.2 Einfluss einer 48-stündigen Stimulation muriner ES-Zellen mit IL-6, IL-3 und SCF auf die Differenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzellen (CD90.2<sup>+</sup> Zellen)

Der erste signifikante Nachweis CD90.2 positiver Zellen gelang durch eine 48-stündige Stimulation an Tag 6+10 der Differenzierung (Abb. 3.2.1.2). Dies ist auch der einzige Zeitpunkt des Versuchs, an dem ein positiver Einfluss der Zytokine auf die Bildung CD90.2<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen wurde. Eine Stimulation über 48h an den restlichen Versuchstagen führt zu einer geringeren Ausbildung CD90.2<sup>+</sup> Zellen. Zum Ende des Versuchs zeigt sich sowohl bei den stimulierten als auch bei den EBs der Kontrolle eine kontinuierlich abfallende Tendenz des Anteils CD90.2<sup>+</sup> Zellen.



**Abb. 3.2.1.2 Ermittlung CD90.2 positiver Zellen mithilfe der FACScan-Analyse - Versuchsreihe 48-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF im 5 Tages-Rhythmus über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen**

Die Abbildung stellt die prozentualen Anteile CD90 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (s. Tab. 3.2.1.2) im Vergleich (stimulierte EBs vs. Kontroll-EBs) dar. Tag 6+0 kennzeichnet den Beginn einer über 30 Tage fortlaufenden Differenzierung der EBs. Im Abstand von 5 Tagen (mit Beginn an Tag 6+0) wurden EBs isoliert, für 48h mit IL-6, IL-3 sowie SCF versetzt, anschließend geerntet sowie nach Markierung mit einem CD90.2-FITC Antikörper mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der prozentuale Wert der CD90.2 positiven Zellen, aufgetragen gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs, ist der Mittelwert aus vier Messungen, angegeben mit dem Standard error of mean.

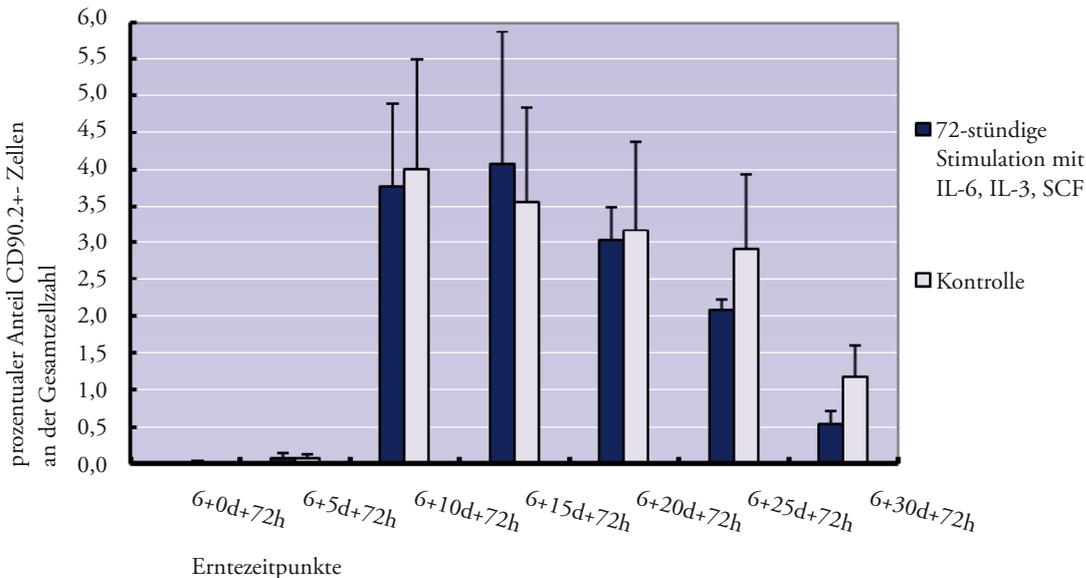
### 3.2.1.3 Einfluss einer 72-stündigen Stimulation muriner ES-Zellen mit IL-6, IL-3 und SCF auf die Differenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzellen (CD90.2+ Zellen)

Wie in Abb. 3.2.1.3 zu erkennen, führt eine punktuelle Stimulation der EBs über 72h lediglich am 15. Tag der Differenzierung zu einer Steigerung der Anzahl CD90.2 positiver Zellen. Generell der höchste Anteil (an der Gesamtzellzahl stimulierter- sowie unstimulierter EBs) konnte nach 10 -bzw. 15 Tagen der Differenzierung nachgewiesen werden, im Anschluss kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme derselben.

#### FACScan-Ergebnisse

#### Einfluss von IL-6, IL-3 und SCF

#### Versuchsreihe punktuelle Stimulation über 72h



**Abb. 3.2.1.3 Ermittlung CD90.2 positiver Zellen mithilfe der FACScan-Analyse - Versuchsreihe 72-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF im 5 Tages-Rhythmus über einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen**

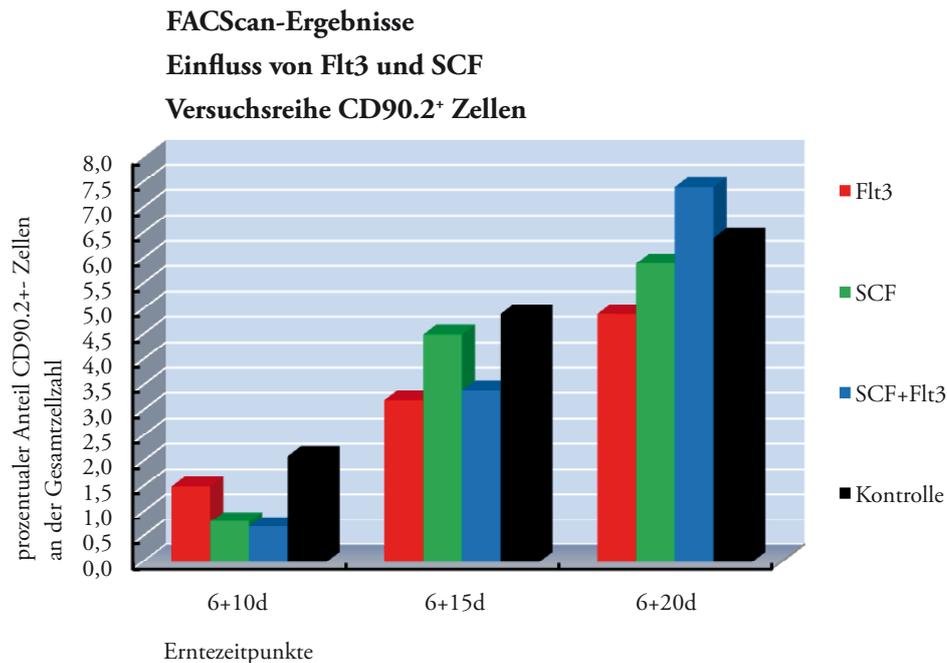
Die Abbildung stellt die prozentualen Anteile CD90 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (s. Tab. 3.2.1.2) im Vergleich (stimulierte EBs vs. Kontroll-EBs) dar. Tag 6+0 kennzeichnet den Beginn einer über 30 Tage fortlaufenden Differenzierung. Im Abstand von 5 Tagen (mit Beginn an Tag 6+0) wurden EBs isoliert, für 72h mit IL-6, IL-3 sowie SCF versetzt, anschließend geerntet sowie nach Markierung mit einem CD90.2-FITC Antikörper mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der prozentuale Wert der CD90.2 positiven Zellen, aufgetragen gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs, ist der Mittelwert aus vier Messungen, angegeben mit dem Standard error of mean.

### 3.2.2 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD90.2, CD34, CD117 sowie CD135 positiver Zellen

Ziel der durchflusszytometrischen Analyse muriner ES- Zellen dieser Versuchsreihen war es, den Einfluss von Flt3 und SCF auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (CD90.2, CD34, CD117 sowie CD135) zu untersuchen. Zum Ablauf der durchflusszytometrischen Messung siehe 2.2.1.12, 13.

#### 3.2.2.1 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD90.2<sup>+</sup> Zellen

CD90.2 wird vor allem von frühen hämatopoetischen, sehr unreifen CD34-positiven oder CD34-negativen, CD3- und CD4-positiven Zellen exprimiert.

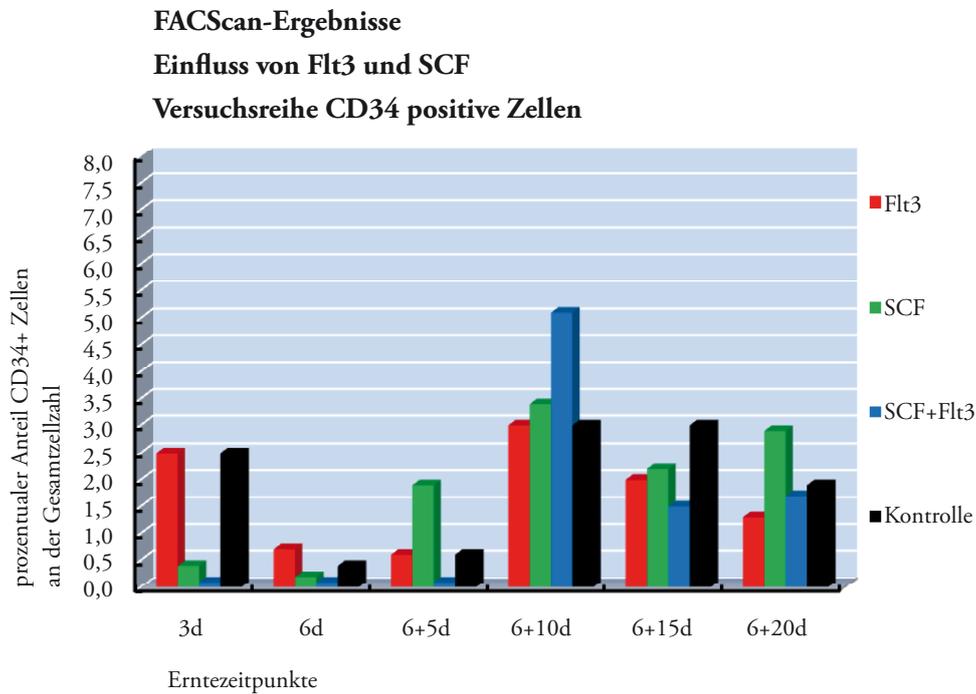


**Abb. 3.2.2.1 Ermittlung des Einflusses von Flt3 und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD90.2<sup>+</sup> Zellen**

Die Abbildung stellt die prozentualen Anteile CD90.2 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei Stimulation mit Flt3 und SCF sowie deren Kombination dar. Die Zellen wurden von Tag 0 an kultiviert und mit dem jeweiligen Zytokin stimuliert. Ab Tag 6+0 erfolgte dies auf 6-Well-Platten, zuvor in Form hängender Tropfen. An den, auf der x-Achse aufgeführten Versuchszeitpunkten, primär an Tag 6+10 (6+10d), erfolgte die Ernte sowie die durchflusszytometrische Analyse, nach Markierung mit einem CD90.2-FITC Antikörper. Der prozentuale Wert der CD90.2 positiven Zellen wurde hier gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs aufgetragen.

### 3.2.2.2 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD34 positiver Zellen

CD34 ist ein Oberflächenmolekül, das von frühen lymphohämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, vaskulären Endothelzellen, einigen embryonalen Fibroblasten sowie von Leukämiezellen exprimiert wird.

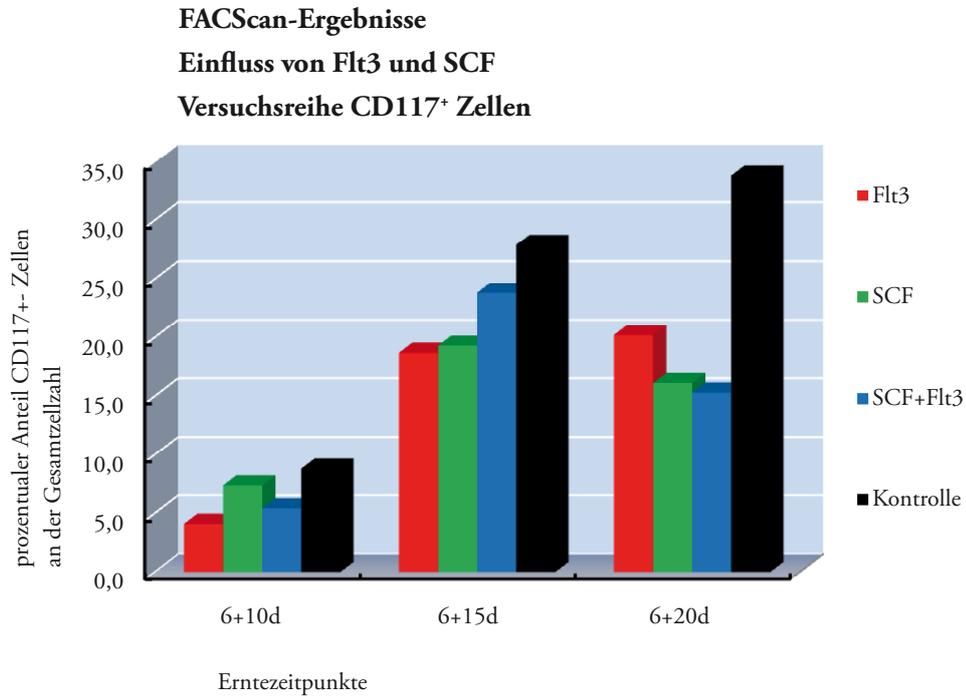


**Abb. 3.2.2.2 Ermittlung des Einflusses von Flt3 und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD34 positive Zellen**

Die Abbildung stellt die prozentualen Anteile CD34 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei Stimulation mit Flt3 und SCF sowie deren Kombination dar. Tag 3 (3d) kennzeichnet den dritten Tag der Kultivierung sowie den dritten Tag, an dem die Zellen mit dem jeweiligen Zytokin bzw. der Kombination stimuliert wurden. Ab Tag 6 (6d) erfolgt dies auf 6-Well-Platten, alle folgenden Tage werden als 6+x bezeichnet. An den, auf der x-Achse, aufgeführten Versuchszeitpunkten erfolgte die Ernte sowie die durchflusszytometrische Analyse, nach Markierung mit einem anti-CD34-Antikörper. Der prozentuale Wert der CD34 positiven Zellen wurde hier gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs aufgetragen.

### 3.2.2.3 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD117 positiver Zellen

Das c-kit proto-onkogen CD 117, bei dem es sich um den Rezeptor für SCF handelt, wird sowohl von hämatopoetischen Zellen der myeloischen als auch der lymphatischen Zelllinie, einschließlich der erythroiden, granulomonozytären sowie megakaryozytären Progenitorzellen, exprimiert.

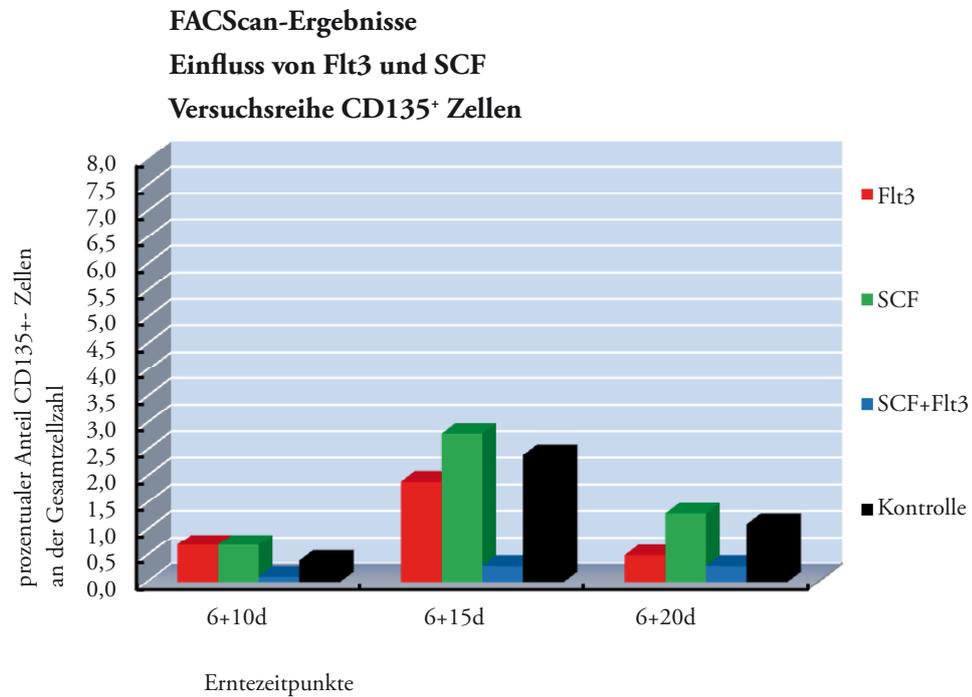


**Abb. 3.2.2.3 Ermittlung des Einflusses von Flt3 und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD117<sup>+</sup> Zellen**

Die Abbildung stellt die prozentualen Anteile CD117 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei Stimulation mit Flt3 und SCF sowie deren Kombination dar. Die Zellen wurden von Tag 0 an kultiviert und mit dem jeweiligen Zytokin stimuliert. Ab Tag 6+0 erfolgte dies auf 6-Well-Platten, zuvor in Form hängender Tropfen. An den, auf der x-Achse aufgeführten Versuchszeitpunkten, primär an Tag 6+10 (6+10d), erfolgte die Ernte sowie die durchflusszytometrische Analyse, nach Markierung mit einem anti-CD117-Antikörper. Der prozentuale Wert der CD117 positiven Zellen wurde hier gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs aufgetragen.

### 3.2.2.4 Einfluss von Flt3 und SCF auf die Bildung CD135 positiver Zellen

CD135, der Rezeptor für Flt3L sowie Flk2, wird von verschiedenen Progenitorzellen im Laufe der lymphatischen und myeloischen Entwicklung exprimiert<sup>159, 153, 105</sup>. Mit zunehmender Differenzierung nimmt die Expression des CD135 ab<sup>21</sup>.



**Abb. 3.2.2.4 Ermittlung des Einflusses von Flt3 und SCF mithilfe der FACScan-Analyse- Versuchsreihe CD135<sup>+</sup> Zellen**

Die Abbildung stellt die prozentualen Anteile CD135 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bei Stimulation mit Flt3 und SCF sowie deren Kombination dar. Die Zellen wurden von Tag 0 an kultiviert und mit dem jeweiligen Zytokin stimuliert. Ab Tag 6+0 erfolgte dies auf 6-Well-Platten, zuvor in Form hängender Tropfen. An den, auf der x-Achse aufgeführten Versuchszeitpunkten, primär an Tag 6+10 (6+10d), erfolgte die Ernte sowie die durchflusszytometrische Analyse, nach Markierung mit einem anti-CD135-Antikörper. Der prozentuale Wert der CD135 positiven Zellen wurde hier gegen die Erntezeitpunkte des Versuchs aufgetragen.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird sowohl an gezielten Genen als auch an spezifischen Oberflächenmarkern die Wirkung der Zytokine IL-6, IL-3 und SCF sowie SCF und Flt3-L beschrieben. Im Vorfeld konnte die Gruppe unter Kombinationsgabe von SCF und Flt3-L nicht nur ex vivo eine morphologisch erfolgreiche Expansion muriner adulter KM-Zellen sondern auch in vivo eine Erhaltung der Repopulationskapazität im kompetitiven Transplantationsassay nachweisen<sup>10,32,148,149</sup>. Die hierbei zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Um diese Fragestellung eingehender zu klären wurden sowohl geno- als auch phänotypische Veränderungen in murinen hämatopoetischen Stammzellen im in vivo ähnlichen System der ESC unter einer kontinuierlich bzw. punktuell durchgeführten Kombinationsstimulation aus IL-6, IL-3 und SCF sowie unter einer kontinuierlich durchgeführten Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit SCF und Flt3-L untersucht. Hierzu wurde zum Einen direkt die m-RNS ausgewählter hämatopoese-spezifischer Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Hormone sowie anderer relevanter Proteine der Hämatopoese mit Hilfe der Realtime-PCR sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen. Zum Anderen wurden vier verschiedene Oberflächenmoleküle (CD34, CD90.2, CD135, CD117), die in definierter Weise von hämatopoetischen Zellen unterschiedlicher Reife exprimiert werden, mittels FACScan-Analyse dargestellt.

## 4.1 Phänotypische Veränderungen durch Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF bzw. mit Flt3-L und SCF

### 4.1.1 Einfluss einer kontinuierlichen vs punktuellen Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF sowie einer kontinuierlichen Stimulation mit Flt3-L und SCF auf die CD90.2-Expression

Der früheste Zeitpunkt, an dem in der Maus eine hämatopoetische Aktivität, in Form von Blutinseln im Dottersack, nachgewiesen werden konnte, ist an Tag 7,5 p.c.<sup>112,202</sup>. In vitro, d.h. in den Zellen der EBs, findet diese Entwicklung an Tag 9,5 statt, welcher in der vorliegenden Arbeit als Tag 6+3,5 gekennzeichnet ist. Dementsprechend repräsentieren Zellen der EBs diesen Alters die Zellen, die in vivo während des primären Auftretens einer hämatopoetischen Aktivität an Tag 7,5p.c. nachgewiesen werden können. Miller und Lipton waren im Jahre 1983 die ersten, die den CD90.2 Rezeptor auf murinen hämatopoetischen Zellen nachweisen konnten, womit sie die Basis für die Identifikation der CD90.2 positiven Subpopulation schafften. Hierbei handelt es sich um hämatopoetische Zellen früher Differenzierungsstadien, die CD34<sup>+</sup> oder CD34<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup> sind<sup>124,125</sup>, wie die Granulozyten-/Makrophagen-Zellgruppen (CFU-GMs) sowie die Erythrozyten-Vorstufen (BFU-Es) (s. Abb.1.3). Auf Makrophagen-Vorläuferzellen (CFU-Ms) sowie auf bereits weiter in der Differenzierung fortgeschrittenen Erythrozyten- Zellgruppen (CFU-Es) konnte eine CD90.2 Expression nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen, unabhängig von der Zytokinstimulation, den in vivo Abläufen insofern, als dass die Anzahl der CD90.2<sup>+</sup> Zellen ab Tag 6+5 rapide zunimmt. An Tag 6+5 gibt es noch sehr wenige CD90.2<sup>+</sup> Zellen, deren Anzahl jedoch relativ zu Tag 6+0 schon gestiegen ist. Zwischen den Tagen 6+5 und 6+10 kommt es dann, entsprechend der zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Hämatopoese, zu einem starken Anstieg der CD90.2<sup>+</sup> Zellen. Schmitt et al. zeigten 1991, dass die Expression von CD90.2 stetig zunimmt, mit einem Maximum an Tag 20 sowie an Tag 24<sup>172</sup>. Dies kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hier wird insbesondere, im Anschluss an einen sprunghaften Anstieg CD90.2<sup>+</sup> Zellen in der Zeit zwischen Tag 6+5 und 6+10 ein Maximum in der Mitte des Versuchs beobachtet. Nach Tag 6+20 kommt es, entsprechend der weiteren Differenzierung, zu einer Abnahme CD90.2<sup>+</sup> Zellen (s. unten). Auch die Ergebnisse von Ling und Neben, die erst ab Tag 6+7 der Zellkultivierung CD90.2<sup>+</sup> Zellen nachweisen konnten, entsprechen nicht den Beobachtungen dieser Arbeit, da hier bereits an Tag 6+0 sowie an Tag 6+5 der Kultivierung CD90.2<sup>+</sup> Zellen in den EB's gefunden wurden<sup>97</sup>.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt IL-6 eine Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Kolonien (s.1.5.3). Suda et al konnten im Mausmodell für IL-6 einen direkten Effekt auf das Wachstum und die Entwicklung reifer Granulozyten-Makrophagen Progenitorzellen sowie einen deutlichen Effekt auf multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen nachweisen<sup>184</sup>. Ikebuchi et al zeigten ebenfalls, dass IL-6 eine proliferationssteigernde Wirkung auf primitive hämatopoetische Progenitorzellen aufweist<sup>72</sup>. Insbesondere jedoch die Stimulation mit einer Zytokinkombination aus IL-6 und IL-3 übte einen synergistischen Effekt auf die Proliferation multipotenter Progenitorzellen aus. Der erzielte Anstieg von Blasten unter der Kombinationsstimulation war relativ höher als unter der jeweiligen Einzelstimulation<sup>72</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem eine kontinuierliche Stimulation sowie eine punktuelle Stimulation über 48- bzw. 72h mit IL-6, IL-3 sowie SCF durchgeführt. Diese Versuchsabläufe basieren auf der Arbeit von Diehl et al, der im in vitro Modell anhand muriner adulter Knochenmarkszellen unter anderem den Einfluss einer 48- bzw. 72-stündigen Stimulation mit Il-6, Il-3, Il-11 und SCF auf die Expansion sowie die Fähigkeit nach ex-vivo Expansion das Knochenmark wieder zu repopularisieren,

untersuchte<sup>32</sup>.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder durch eine kontinuierliche noch durch eine punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF ein signifikanter Unterschied in der Anzahl CD90.2<sup>+</sup> Zellen gegenüber der Kontrollpopulation erreicht werden konnte. Dennoch ist bemerkenswert, dass im ersten Teil der Versuche (einschl. Tag 6+15), unabhängig von der Stimulationsdauer, überwiegend mehr CD90.2<sup>+</sup> Zellen in der stimulierten Population zu finden waren als in der Kontrollpopulation. Mit steigender Differenzierung, die, wie oben erwähnt, durch IL-6 sowie IL-3 gefördert wird, kommt es entsprechend zu einer Abnahme CD90.2<sup>+</sup> Zellen. So dass im zweiten Teil der Versuche, entsprechend nach Tag 6+15 durchgehend weniger CD90.2<sup>+</sup> Zellen in der stimulierten Population als in der Kontrollpopulation zu finden waren, was sich genauso, mit einer Ausnahme durch die Kombinationsstimulation an Tag 6+20, in der Versuchsreihe mit SCF und Flt3-L zeigt. Bezüglich der Expansionsdaten muriner adulter Stammzellen, die zeigten, dass eine Stimulation mit SCF und Flt3-L zu einem funktionellen Erhalt der Repopulationsfähigkeit geführt hat<sup>32</sup>, lässt sich in der vorliegenden Dissertation lediglich feststellen, dass die Stimulation mit den unterschiedlichen Zytokinen keine signifikanten quantitativen Unterschiede der ESC-Population zur Folge hat (s. Abb. 3.2.2.1-3.2.2.4). Auf die funktionellen Unterschiede die dem zu Grunde liegen wird in folgenden Arbeiten eingegangen werden.

Eine allgemeine Aussage, unabhängig von der Zytokinstimulation, kann über den Verlauf der CD90.2 Positivität während der Kultivierung getroffen werden (s. Abb. 3.2.1.1-3.2.1.3). So liegt das Maximum der CD90.2<sup>+</sup> ES-Zellen an den Tagen 6+13 (6+10+72h) sowie 6+18 (6+15+72h) (s. Abb. 3.2.1.3) und wird somit durch die Messungen während der kontinuierlichen Stimulation nicht erfasst. Das dieser Unterschied nicht durch die 72-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF bedingt war, kann durch den nahezu gleichen Anstieg der CD90.2<sup>+</sup> Zellen in der Kontrollpopulation belegt werden. Diese Daten zeigen, dass bereits kurze zeitliche Unterschiede im Differenzierungszeitraum zu deutlichen Änderungen in der Zusammensetzung der Zellpopulationen führt. Des weiteren ist stets zu beachten, dass es sich bei den Daten der vorliegenden Arbeit um die Analyse eines biologischen Systems handelt, indem es aufgrund einer hohen Sensitivität stets zu leichten Verschiebungen kommen kann.

#### **4.1.2 Einfluss einer Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit Flt3-L und SCF auf die Expression der Oberflächenmarker CD34, CD135, CD117**

##### **4.1.2.1 CD34**

Die Expression von **CD34** erfolgt durch relativ frühe HSCs, die im Laufe ihrer Differenzierung zu ausgereiften hämatopoetischen Zellen diesen Marker verlieren<sup>5</sup> (s. Abb. 1.3). So ist z.B. eine Differenzierung unreifer Progenitorzellen von Zellen späterer Entwicklungsstadien u. a. mit Hilfe des durchflusszytometrischen Nachweises CD34<sup>+</sup> Zellen realisierbar. Ogawa et al. konnten 2001 zeigen, dass der Übergang von einer proliferativen fetalen HSC zu einer ruhenden, zur Selbsterneuerung befähigten Stammzelle insbesondere durch eine Runterregulation des CD34 Oberflächenmoleküls gekennzeichnet ist<sup>136</sup>. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass zu Beginn der Messungen, an Tag 3 (3d) die Anzahl CD34<sup>+</sup> Zellen hoch ist, diese in den folgenden Tagen aufgrund der Differenzierung abnimmt und dann mit zunehmender hämatopoetischer Aktivität und einem verstärktem Vorkommen proliferativer HSCs wieder zunimmt (s. Abb. 3.2.2.2). Dieser Verlauf wird durch den, in der Literatur beschriebenen Verlauf der CD34-Positivität, unterstützt.

Die vorliegenden Daten bestätigen weiterhin den stammzellerhaltenden Effekt der SCF-Einzelstimulation<sup>121</sup>, da nach Beginn der Hämatopoese an fast jedem Erntezeitpunkt eine höhere Anzahl CD34<sup>+</sup> Zellen in der mit SCF stimulierten Population als in der Kontroll-Population nachzuweisen sind (s. Abb. 3.2.2.2).

Olga Tura et al konnten 2007 anhand humaner Proben zeigen, dass eine Einzel- bzw. Kombinationsstimulation mit Flt3-L und SCF zu einer Anreicherung CD34<sup>+</sup> Zellen führt. Im Gegensatz zu den vorliegenden Resultaten dieser Arbeit (s. Abb. 3.2.2.2), wurden in der Arbeit von Tura et al die höchsten Werte CD34<sup>+</sup> Zellen unter der Kombinationsstimulation beobachtet<sup>195</sup>. Womit insbesondere die synergistische Wirkung von Flt3-L und SCF belegt wurde. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich an Tag 6+10 unter Beweis gestellt werden. An den übrigen Erntezeitpunkten wurde unter der Kombinationsstimulation stets eine Reduktion CD34<sup>+</sup> Zellen beobachtet. Bei der Einzelstimulation konnten Tura et al einen stärkeren Effekt für Flt3-L als für SCF nachweisen<sup>195</sup>. Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu Beginn der Kultivierung überein (3d, 6d), spätestens ab Tag 6+5 überwiegt allerdings die Anzahl CD34<sup>+</sup> Zellen unter SCF gegenüber denen unter Flt3-L.

#### 4.1.2.2 CD135

**CD135**, der Rezeptor des Flt3-Liganden, wird sowohl von lymphoiden als auch von myeloiden Zellen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung exprimiert<sup>159</sup> (s. Abb. 1.3). Bei einer der frühesten CD135<sup>+</sup> Population handelt es sich um multipotente Progenitorzellen und zwar, wie Irene Rappold et al 1997 zeigen konnten, um primitive multipotente Progenitorzellen der myelomonozytären Zelllinie (CFU-GM)<sup>85,152</sup>. Die CD135-Expression nimmt mit steigender Spezialisierung der Zellen ab<sup>21</sup>, es kommt im Laufe der B-Zell-Differenzierung, wie auch während der Granulopoese im Anschluss an das CFU-GM Stadium zu einer Runterregulation der CD135-Expression<sup>152</sup>. Dies konnte anhand der vorliegenden Arbeit insofern bestätigt werden, als dass die CD135<sup>+</sup> Population von Tag 6+10 (6+10d) zu Tag 6+15 (6+15d) entsprechend der sich zu diesem Zeitpunkt etablierenden Hämatopoese zunimmt und dann mit fortschreitender Differenzierung wieder abnimmt (s. Abb. 3.2.2.4). Trotz der geringen Anzahl an Meßzeitpunkten können die vorliegenden Ergebnisse auf das System der embryonalen Stammzelle übertragen werden.

Wie in Abb. 3.2.2.4 zu sehen, konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass die CD135-Expression ihren höchsten Wert an Tag 6+15 der Kultivierung erreicht. Zudem konnte zuvor nachgewiesen werden, dass bei der Mehrheit CD34<sup>+</sup> Zellen gleichzeitig eine Positivität für CD135 besteht<sup>152</sup>. Diese Aussage konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit insofern unterstützt werden, als dass ein Anstieg der CD34<sup>+</sup> Zellen einhergeht mit einem Anstieg der CD135<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 3.2.2.2, Abb. 3.2.2.4) und sich somit vermuten lässt, dass ein Teil der Zellen für beide Marker positiv ist, was in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde.

Entsprechend des stammzellerhaltenden Effektes einer Stimulation mit SCF, kommt es relativ zur Kontrollpopulation zu einem Anstieg der CD135<sup>+</sup> Zellpopulation unter dieser Einzelstimulation. Ein Anstieg dieser Population unter der Einzelstimulation mit Flt3-L lässt sich im murinen ES-Zellsystem nicht darstellen.

Die Kombinationsstimulation führt zu der stärksten Abnahme CD135<sup>+</sup> Zellen, wodurch ein synergistischer Effekt des Flt3-L und SCF im Sinne einer Stammzellerhaltung nicht nachgewiesen werden

konnte.

#### 4.1.2.3 CD117 (c-kit)

**CD117** findet sich auf der Mehrzahl CD34<sup>+</sup> Zellen, d.h. auf sehr unreifen hämatopoetischen Zellen, einschließlich der HSCs und insbesondere den determinierten erythroiden Progenitorzellen (BFU-Es), sowie auf bereits differenzierten, CD34<sup>-</sup> negativen Mastzellen und eosinophilen Granulozyten<sup>33,139</sup> (s.Abb.1.3). Im Laufe der Differenzierung granulözytärer, monozytärer sowie erythrozytärer Zellen wird CD117 runterreguliert<sup>33</sup>, lediglich die Mastzellen weisen auch noch im reifen Stadium die Expression auf<sup>36</sup>. Der Großteil der B- und T-Progenitorzellen ist CD117<sup>-</sup><sup>33</sup>. Im in vivo ähnlichen System der vorliegenden Arbeit, konnte primär gezeigt werden, dass es nach Beginn der Hämatopoese, ungefähr um den Tag 6+3,5 (6+3,5d), wie unter einer Zunahme hämatopoetischer Zellen erwartet, zu einem steten Anstieg der CD117-Expression kommt (s. Kontrollpopulation Abb. 3.2.2.3). Eine Stimulation mit Flt3-L, SCF bzw. deren Kombination führt in unterschiedlichem Ausmaß zu einer Runterregulation der CD117<sup>+</sup> Zellen. Die Runterregulation unter der SCF-Stimulation, die die stärkste Ausprägung am Ende der Kultivierung aufweist, lässt sich durch den, für dieses Zytokin beschriebenen differenzierungsfördernden Effekt, erklären. Ein stammzellerhaltender Effekt der gewählten Zytokine konnte bezüglich des Rezeptors CD117 in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

## 4.2 Genotypische Veränderungen durch eine Stimulation der EBs mit IL-6,

## IL-3 und SCF sowie durch eine Stimulation mit Flt3-L und SCF

Ein wesentlicher Unterschied der Untersuchungen mit IL-6, IL-3 und SCF auf der einen sowie mit dem Flt3-L und SCF auf der anderen Seite, liegt im Beginn der Stimulation und dem Zeitpunkt der ersten Messung. So wurde die Stimulation der, mit IL-6, IL-3 und SCF, stimulierten murinen ESC an Tag 6+0, nachdem die EBs auf die 6-well-Platten verteilt wurden, begonnen. Die erste Messung erfolgte an Tag 6+5 bzw. an Tag 6+0+48h und 6+0+72h. Die Stimulation der mit dem Flt3-L und SCF stimulierten ES-Zellen wurde hingegen an Tag 1, dem Beginn der Kultivierung, begonnen. An Tag 3 wurde die erste Messung vorgenommen.

### 4.2.1 Beeinflussung der Expression hämatopoese-spezifischer Gene unter einer kontinuierlichen vs. punktuellen Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF

Für alle 3 Zytokine ist nachgewiesen, dass sie das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen fördern<sup>34,117,162,181,207</sup>. Orlic et al konnten im Jahre 1995 nachweisen, dass HSCs sowie CFU-S Rezeptoren für IL-6, IL-3 und SCF exprimieren<sup>142</sup>. Was darauf hinweist, dass diese Faktoren zusammen zu einer verstärkten Proliferation der jeweiligen Populationen führen.

Die Ergebnisse der kontinuierlichen Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF bestätigen diese Wirkung. So konnten die, mit Hilfe der Realtime-PCR ermittelten Ergebnisse, belegen, dass es sowohl zu einer Hochregulation stammzellerhaltender Gene, durch die proliferationssteigernde Wirkung der Zytokine, als auch zu einer Hochregulation von Genen, die mit einer Reifung von Zellen einhergeht (z.B. EPO), bedingt durch die differenzierungsfördernde Wirkung der Zytokine, kommt. Zu den hier angesprochenen, unter der Zytokinkombination hochregulierten, stammzellerhaltenden Genen gehören Flk1, SCL/ TAL-1, GATA2 sowie HOXB4 (s.Abb.3.1.1.10, A). Interessant ist, dass diese Gene, mit Ausnahme vereinzelter Regulationen in der Zwischenzeit, gemeinsam an Tag 6+10 sowie an Tag 6+30, hochreguliert werden und das insbesondere zum Ende der Kultivierungszeit (Tag 6+30), somit nach einer 30-tägigen Stimulation, die Zytokine den stärksten Effekt erzielen. Die punktuelle Stimulation über 24 Stunden führt zu einem prinzipiell ähnlichen Ergebnis der Gen-Regulation. Auch hier ist zu sehen, dass vor allem die Expression von SCL/TAL1, Flk1, GATA2, HOXB4 und Erythropoietin beeinflusst wird. Der Unterschied zu der kontinuierlichen Stimulation liegt allerdings in der Tatsache, dass die Regulation zu einem früheren Zeitpunkt der Kultivierung auftritt. Waren es unter der kontinuierlichen Stimulation insbesondere die Tage 6+10 und 6+30, an denen eine Regulation erfolgte, so sind es unter der 48-stündigen Stimulation die Tage 6+0+48h, 6+5+48h und 6+25+48h. Ein weiterer interessanter Unterschied liegt in der Regulation der GATA2-Expression, die, unter kontinuierlicher Stimulation, im Sinne einer Hochregulation erfolgte. Eine **punktuelle Stimulation über 48 Stunden** fördert hingegen eine Runterregulation, es konnte zu keinem Zeitpunkt eine Hochregulation der Expression nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Funktion von GATA2 (s.4.2.1.4) könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die kontinuierliche Stimulation auf der Genebene einen stammzellerhaltenden Effekt aufweist und die punktuelle Stimulation präferentiell die Differenzierung der Zellen fördert. Die **72-stündige Stimulation**, die in der Arbeit von Diehl et al mit murinen adulten SC als effektiver beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit keine wesentlichen Ergebnisse erzielen<sup>32</sup>. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich, anders als bei der Arbeit von Diehl et al, bei der vorliegenden Arbeit um Forschungen an murinen ESC handelt<sup>32</sup>.

Allgemein kann man anhand der vorliegenden Ergebnisse festhalten, dass die punktuelle Stimulation über 48h prinzipiell die Regulation der untersuchten Gene anstoßen kann, die kontinuierliche Stimulation diese jedoch im Ausmaß der Regulation übertrifft.

#### 4.2.1.1 Flk1

D'Souza et al konnten 2005 zeigen, dass eine **Flk1-Expression**, bzw. die Expression der VEGF-bindenden Rezeptor-Tyrosin Kinase, die durch dieses Gen kodiert wird, bereits auf blast colony-forming cells (BL-CFCs) nachgewiesen werden kann<sup>38</sup>. Hierbei handelt es sich um eine, zu Beginn der Hämatopoese auftretende mesodermale Vorläuferzelle, die das in-vitro Äquivalent des in vivo auftretenden Hämangioblasten darstellt<sup>26</sup>. An der Differenzierung der BL-CFCs zu hämatopoetischen, endothelialen und vaskulären Zellen ist die Flk1-Expression wesentlich beteiligt<sup>65</sup>. Eine vermehrte Expression dieses Gens unter der kontinuierlichen Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, wie in der vorliegenden Arbeit an Tag 6+10 und Tag 6+30, nachgewiesen (s. Abb.3.1.1.10 A) ist gleichbedeutend mit einem Anstieg der Flk1-positiven Zellpopulation und weist somit auf einen stammzellerhaltenden Effekt der Zytokinkombination hin. Die 48-stündige Stimulation (s. Abb.3.1.1.10 B) bewirkt zwar zu einem früheren Zeitpunkt eine Hochregulation, hat aber prinzipiell den gleichen Effekt. So wird zu Beginn und zum Ende eine Erhaltung der Flk1-positiven Population erreicht, in der Zwischenzeit wird präferentiell die Differenzierung der Zellen gefördert.

Zudem kann das Resultat der Flk1-Hochregulation an Tag 6+10 anhand der, mittels FACScan analysierten, Zelloberflächen-Expression des CD90.2 Markers beurteilt werden. CD90.2 wird von hämatopoetischen Zellen früher Differenzierungsstadien an der Oberfläche exprimiert<sup>124,125</sup>. Der relative Anstieg dieser Zellen in der stimulierten Population an Tag 6+10 sowie Tag 6+15 deutet somit zumindest teilweise an, dass dies durch die Flk1-Hochregulation mitbedingt ist (Abb.3.2.1.1). Da eine weitere Differenzierung, über den Tag 6+30 hinaus, zu keinen eindeutigen weiteren Ergebnissen führt, das System somit limitiert ist, bleibt das Resultat der zum Ende der Kultivierung (Tag 6+30) beobachteten erneuten Hochregulation der Flk1-Expression offen. Anzunehmen ist jedoch, dass es auch hier zu einem erneuten Anstieg der CD90.2<sup>+</sup> Population gekommen wäre. Auch die Realtime-PCR-Ergebnisse der 48-stündigen Stimulation korrelieren mit der CD90.2-Expression. So kommt es im Anschluss an die Flk1-Hochregulation an den Tagen 6+0+48h und 6+5+48h zu einem sprunghaften Anstieg der CD90.2<sup>+</sup> Population an Tag 6+10+48h (s. Abb. 3.1.1.10.B, Abb. 3.2.1.2)

Des Weiteren wird sowohl die unter kontinuierlicher als auch punktueller Stimulation beobachtete Runterregulation der Flk1-Expression in den mittleren Tagen der Kultivierung durch die FACScan-Daten bestätigt, da, im Anschluss an Tag 6+15 bzw. Tag 6+10+48h, relativ zu der Kontroll-Population, stets weniger CD90.2<sup>+</sup> Zellen in der stimulierten als in der unstimulierten Population zu finden sind. Dieses Ergebnis kann dadurch bedingt sein, dass die Zytokinkombination auch die Differenzierung der Zellen vorantreibt, was mit einer Abnahme der Flk1-Expression bzw. mit einer Abnahme der CD90.2<sup>+</sup> Zell-Population einhergeht.

#### 4.2.1.2 SCL/TAL-1

Ein weiteres Gen, welches zusammen mit Flk1 unter kontinuierlicher Stimulation an Tag 6+10 sowie insbesondere an Tag 6+30 (s.Abb.3.1.1.10 A) bzw. unter punktueller Stimulation über 48h an den Tagen 6+0+48h, 6+5+48h und 6+25+48h (s.Abb.3.1.1.10 B) hochreguliert wird, kodiert für den, während

primitiver und definitiver Hämatopoese essentiellen, Transkriptionsfaktor **SCL/TAL-1**<sup>157</sup>. D'Souza et al konnten 2005 nachweisen, dass die Expression von TAL1 essentiell für die Differenzierung der BL-CFCs zu hämatopoetischen Zelllinien ist<sup>38</sup>. Eine Hochregulation desselben, wie er in der vorliegenden Arbeit unter der kontinuierlichen Stimulation und der punktuellen Stimulation über 48h mit IL-6, IL-3 und SCF beobachtet wurde, geht somit mit einem Anstieg der, zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Hämatopoese auftretenden, Zellpopulationen einher (s. Abb.3.1.1.10 A, B). Ähnlich des Nachweises der Flk1-Expression, bestätigt sich hiermit eine stammzellerhaltende Funktion der Zytokine. Im Gegensatz zu der Regulation des Flk1-Gens wird SCL/TAL1 unter kontinuierlicher Stimulation auch zwischen den oben genannten Zeitpunkten hochreguliert, was bedeutet, dass die kontinuierliche Stimulation eine konstante Aufrechterhaltung dieser frühen Populationen fördert, da eine weitere Differenzierung der Zellen mit einer Runterregulation der SCL-Expression einhergehen würde<sup>90</sup>. Ein Effekt auf die Anzahl CD90.2<sup>+</sup> Zellen durch die Hochregulation an Tag 6+20 unter kontinuierlicher Stimulation konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, was durch die konstante Runterregulation von Flk1 in dieser Zeit bedingt sein könnte. Der relative Anstieg der CD90.2<sup>+</sup> Zellen an Tag 6+10 und Tag 6+15 bzw. Tag 6+10+48h ist zumindest mitbedingt durch die Hochregulation von SCL/TAL-1 an Tag 6+10 bzw. Tag 6+0+48h und Tag 6+5+48h. Wodurch die stammzellerhaltende Funktion der Zytokinkombination unterstrichen wird.

#### 4.2.1.3 HOXB4

1995 konnten Sauvageau et al anhand in vivo Studien einer retroviral vermittelten HOXB4-Überexpression im murinen Knochenmark zeigen, dass diese das proliferative Potential der primitiven hämatopoetischen Zellen verstärkt ohne die Zahl reiferer Zellstadien zu verändern<sup>168</sup>.

Mit fortschreitender Differenzierung scheint HOXB4 runterreguliert zu werden, da in reiferen Zellstadien niedrigere Expressionslevel als in den primitiven Zellstadien gefunden wurden<sup>167</sup>. Dies würde HOXB4 eine proliferations- nicht differenzierungsfördernde Rolle zukommen lassen. Eine Hochregulation der HOXB4-Expression, wie in der vorliegenden Arbeit an den Tagen 6+5, 6+10 und 6+30 bzw. an den Tagen 6+0+48h, 6+5+48h und 6+25+48h beobachtet, geht, laut Antoschuk et al mit einer Wachstumsförderderung primitiver hämatopoetischer Zellen einher, dieser Effekt wird wahrscheinlich durch Steigerung der Selbsterneuerungskapazität erzielt ohne dabei die Homeostase des HSC-Pools oder deren Differenzierung zu reifen Zellen zu stören<sup>6</sup>. Dies wird durch die Ergebnisse der FACScan-Analyse bestätigt. So wird der Anstieg der CD90.2<sup>+</sup> Zellen an Tag 6+10 bzw. 6+10+48h zumindest teilweise durch die Hochregulation der HOXB4-Expression zu Beginn der Kultivierung bedingt sein.

Im Widerspruch zu den Daten von Sauvageau et al sowie den Daten der vorliegenden Arbeit, stehen die Ergebnisse von Helgason et al<sup>61,167,168</sup>. Diese veröffentlichten 1996, dass eine HOXB4-Überexpression die Differenzierung der ES-Zellen zu erythroiden und myeloiden Progenitorzellen sowie definitiven erythroiden Kolonien fördert. Hier konnte kein Effekt für die Differenzierung zu granulozytär/monozytären Zellen nachgewiesen werden<sup>61</sup>.

#### 4.2.1.4 GATA2

GATA2, ein essentieller Transkriptionsfaktor der Hämatopoese, wird in hohem Maße sowohl von ruhenden als auch proliferierenden HSCs sowie von reifen hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert<sup>84,126,142,191</sup>. 2007 konnten Lugas et al nachweisen, dass die GATA2-Expression wesentlich an der Bildung und Differenzierung des Hämangioblasten zu hämatopoetischen Zellen beteiligt ist<sup>64,101,127</sup>.

Eine hohe GATA2-Expression ist für den Erhalt des HSC-Pools insofern notwendig, als dass diese eine Amplifikation und Differenzierung der Zellen hemmt, erst eine Runterregulation derselben scheint die Amplifikation, Differenzierung und Reifung der Zellen zu ermöglichen<sup>147</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF eine annähernd konstante Hochregulation der GATA2-Expression über die gesamte Kultivierungszeit erreicht werden. Durch die zuvor genannte Funktion einer GATA2-Expression wird erneut deutlich, dass die kontinuierliche Zytokinstimulation insbesondere eine Stammzellerhaltung fördert (s. Abb.3.2.1.1, Abb.3.1.1.10 A). Dies könnte den Unterschied in der Anzahl CD90.2<sup>+</sup> Zellen im ersten Teil des Versuches erklären (Tag 6+0-6+15), hingegen scheint in der zweiten Hälfte des Versuchs (Tag 6+15-6+30) die Flk1-Runterregulation die GATA2-Hochregulation in der Auswirkung auf die CD90.2<sup>+</sup> Population zu übertreffen. Wie in Abb. 3.2.1.1 zu sehen, kommt es hier zu einer Abnahme der CD90.2<sup>+</sup> Population. Bei einer separaten Betrachtung der GATA2-Expression wäre ein gegenteiliger Effekt erwartet worden (s. Abb.3.2.1.1, Abb.3.1.1.10 A). Die punktuelle Stimulation über 48h scheint das Gegenteil zu bewirken. So konnte annähernd über den gesamten Kultivierungszeitraum zwischen den Tagen 6+5+48h und 6+25+48h eine Runterregulation der GATA2-Expression erzielt werden, was mit einer Differenzierung und Reifung der HSCs und Progenitorzellen einhergeht und mit der, relativ zu der unstimulierten Population, abnehmenden Anzahl CD90.2<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der Kultivierung korreliert (s. Abb. 3.1.1.10 B, Abb. 3.2.1.2).

#### 4.2.1.5 EPO

**Erythropoietin**, ebenfalls mit den zuvor beschriebenen, stammzellerhaltenen Genen an Tag 6+10 und 6+30 unter kontinuierlicher Stimulation hochreguliert, führt hingegen über eine Interaktion mit seinem Rezeptor zu einer Differenzierung der Progenitorzellen zu Erythrozyten. Dies bestätigt vorausgegangene Studien die anhand von Untersuchungen mit fetalen Leberzellen sowie Knochenmarkszellen Il-3 und SCF eine wichtige Rolle bei der Bildung und Proliferation erythroider Progenitorzellen zuschreiben<sup>181,208</sup>. Dieser Effekt konnte für die punktuelle Stimulation über 48h nicht nachgewiesen werden, hier kam es lediglich an Tag 6+0 zu einer Hochregulation und zum Ende des Versuchs, durch eine 48-stündige Stimulation an Tag 6+30 zu einer Runterregulation der EPO-Expression. Auch hier muss man allerdings darauf hinweisen, dass gewisse Unterschiede auch durch die Tatsache bedingt sein können, dass es sich um in vitro-Untersuchungen handelt.

Die Hochregulation dieses Genes unter der kontinuierlichen Stimulation könnte eine Erklärung für den Abfall der CD90.2<sup>+</sup> Population unter den stimulierten Zellen in der zweiten Hälfte der Kultivierung bedeuten. Zudem korreliert die Hochregulation mit der, ungefähr nach Tag 6+3,5 begonnenen, Hämatopoese.

#### 4.2.1.6 PU.1

Der Transkriptionsfaktor **PU.1** wird von primitiven CD34<sup>+</sup> Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen sowie Erythroblasten in frühen Stadien exprimiert, in denen er, sowohl auf die Proliferation, als auch auf die Differenzierung der einzelnen Zellen Einfluss nimmt<sup>34</sup>. Es handelt sich um einen Regulator der physiologischen Entwicklung myeloider Zellen<sup>158</sup>. Unter einem hohen Level der PU.1-Expression werden präferentiell Monozyten, unter gleichzeitiger Blockade der lymphatischen Differenzierung, gebildet, ein niedriges Level der PU.1 Expression fördert hingegen die Differenzierung zu Granulozyten sowie B-Lymphozyten<sup>30,35</sup>. Eine Runterregulation erfolgt während der

Differenzierung von Progenitorzellen zu erythroiden Zellen sowie der lymphoiden Differenzierung zu T-Zellen, so dass in diesen Zellen keine Expression von PU1 nachgewiesen werden kann<sup>114</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte unter der kontinuierlichen Stimulation mit den genannten Zytokinen lediglich eine Hochregulation der PU1-Expression an Tag 6+5 nachgewiesen werden. Die punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48h (s.Abb.3.1.1.10, B) führte nur an Tag 6+0 zu einer Hochregulation sowie an Tag 6+20 zu einer Runterregulation. Erwartet wurde ein stärkerer Effekt der Zytokinkombination auf die PU1-Expression, da für alle 3 Zytokine ein Einfluss insbesondere auf die myeloide Zellreihe nachgewiesen werden konnte. So wurde unter IL-3 ein rapider Abfall CD34<sup>+</sup> Zellen und konsekutiver Anstieg der neutrophilen, eosinophilen sowie monozytären Zelllinie beobachtet<sup>162</sup>. Wong et al konnten für IL-6 einen direkten Einfluss auf die Proliferation granulozytärer und monozytärer Progenitorzellen zeigen und auch SCF stimuliert die Differenzierung primitiver hämatopoetischer Stammzellen zu myeloiden Zellen<sup>117,207</sup>.

#### 4.2.1.7 Cyclin D1

**Cyclin D1** ermöglicht es den Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase überzutreten, wodurch die Cyclin D1 Expression eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus einnimmt<sup>80</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte eine CyclinD1-Expression über den gesamten Zeitraum der Kultivierung nachgewiesen werden, so dass von einer physiologischen Zellzyklus-Regulation auszugehen ist. Eine Änderung im Expressionsverhalten von CyclinD1 konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt durch eine kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF und durch eine punktuelle Stimulation lediglich an Tag 6+5+72h erreicht werden (s.Abb.3.1.1.2.1/2). Somit ist ein Einfluss der gewählten Zytokinkombination auf den Zellzyklus nahezu auszuschließen.

#### 4.2.1.8 Lmo2

Ein Komplex aus **Lmo2**, SCL/TAL1 und GATA1, der als LIM-Domäne bezeichnet wird, ist essentiell für den Ablauf der embryonalen Erythropoese<sup>177,199</sup>. Lmo2 fungiert in diesem System als ein Brücken-Molekül, in dem es verschiedene DNA-bindende Moleküle zusammenbringt und auf diesem Wege die Transkription reguliert<sup>200</sup>. Die Expression von Lmo2 spielt eine wesentliche Rolle bei der hämatopoetischen Entwicklung<sup>211</sup>. In vorigen Studien konnte gezeigt werden, dass Lmo2 und SCL/TAL co-exprimiert werden und ihre Interaktion sowohl für die Bildung der Hämangioblasten als auch für die Spezifizierung hämatopoetischer Zellen essentiell ist<sup>27</sup>. Während der lymphoiden Zell-Differenzierung kommt es im prä-T-Zell-Stadium zu einer Runterregulation von SCL/TAL1 und Lmo2<sup>62</sup>. Eine gemeinsame Regulation dieser beiden Gene konnte in der vorliegenden Arbeit unter einer Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF nicht nachgewiesen werden. Die Lmo2-Expression weist zu keinem Zeitpunkt der murinen embryonalen Entwicklung, weder durch die kontinuierliche noch durch die punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, eine Änderung im Expressionsverhalten auf (s.Abb.3.1.1.6 A, B). Die SCL/TAL1-Expression wird hingegen an mehreren Zeitpunkten der Kultivierung beeinflusst. Nachweisbar ist die Lmo2-Expression allerdings über den gesamten Versuchsablauf.

#### 4.2.1.9 Lmo4

Die Expression von **Lmo4**, über den gesamten Zeitraum der Kultivierung nachweisbar, konnte durch die Stimulation mit IL-6, IL-3 sowie SCF, unabhängig von der Stimulationsdauer, zu keinem Zeitpunkt

beeinflusst werden (s. Abb. 3.1.1.8 A,B). Da Lmo4 von reifen T-Zellen exprimiert wird<sup>79</sup>, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Bildung von T-Zellen durch die gewählten Zytokine nicht gefördert wird.

#### 4.2.2 Beeinflussung der Expression hämatopoese-spezifischer Gene unter einer Einzelstimulation mit SCF und Flt3-L bzw. unter einer Kombinationsstimulation der beiden Zytokine

##### 4.2.2.1 SCF

**Stem cell factor** stimuliert über seinen Rezeptor CD117 zum einen die Proliferation primitiver hämatopoetischer Stammzellen und reifer Progenitorzellen, und zum anderen die Differenzierung erythrozytärer-, myelozytärer und lymphozytärer Zelllinien<sup>117,121</sup>. In der vorliegenden Arbeit kommen beide Funktionen von SCF zur Geltung (s. Abb. 3.1.2.10 B). So konnte an Tag 3 (3d) eine Runterregulation von SCL/TAL1 und GATA2 beobachtet werden, die unter einer Differenzierung von primitiven Zellstadien erfolgt. Zudem wird PU.1 runterreguliert, dessen Expression für den physiologischen Ablauf der myeloischen Zell-Differenzierung nötig ist und erst während der erythrozytären sowie der lymphozytären Differenzierung runterreguliert wird. Damit läßt sich vermuten, dass die Zytokinkombination die erythrozytäre sowie lymphozytäre Differenzierung der HSC fördert. Eine Hochregulation hingegen erfolgt während der physiologischen myeloischen Differenzierung<sup>114</sup>. Auch die Runterregulation von EPO, welches über eine Interaktion mit seinem Rezeptor zu einer Differenzierung der Progenitorzellen zu Erythrozyten führt, weist auf einen Erhalt der Zellen in primitiven Stadien hin (s. oben). Auch die Regulation am Ende der Kultivierungszeit (6+20d) bestätigt zum einen die stammzellerhaltende Funktion<sup>121</sup>, da es hier zu einer Hochregulation von GATA2 und HOXB4, deren Expression wesentlich an der Proliferation der HSC beteiligt ist, sowie zum anderen die differenzierungsfördernde Funktion einer SCF-Stimulation, da es zu einer starken SCL/TAL1- und PU.1-Runterregulation kommt, die unter einer weiteren Differenzierung beobachtet werden. Bemerkenswert ist, dass eine Einzelstimulation mit SCF mit einer Ausnahme keine Änderung im Expressionsverhalten in der Zeit von Tag 6+0 - 6+15 erzielte. Mittels Facscan-Analyse, die an den Tagen 6+10-6+20 u.a. zum Nachweis der CD117<sup>+</sup> Zellpopulation durchgeführt wurde, konnte zwar im Vergleich zu der Kontrollpopulation weniger CD117<sup>+</sup> Zellen nachweisen, dennoch war eine Expression vorhanden, so dass der ausgebliebene Effekt der SCF-Stimulation wenn nur teilweise durch eine verminderte Rezeptoranzahl begründet sein kann. An Tag 3 (3d) werden die Gene, die reguliert werden, wie auch schon unter Flt3-L beobachtet, runterreguliert. CyclinD1, Lmo4 sowie Flk1 wurden durch eine Einzelstimulation mit SCF in ihrem Expressionsverhalten zu keinem Zeitpunkt beeinflusst.

##### 4.2.2.2 Flt3-L

Bei dem **Flt3-Liganden** handelt es sich um ein Protein, das seine stammzellerhaltende Funktion über den Rezeptor CD135 vermittelt, der sich vor allem auf frühen Progenitorzellen findet und wesentlich für die Gewährleistung einer normalen Proliferation primitiver hämatopoetischer Zellen ist<sup>109,198,201</sup> (s. Abb. 1.3). Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit insofern bestätigt werden, als dass die einzigen Gene, die hochreguliert wurden, eine stammzellerhaltende Funktion aufweisen (s. Abb. 3.1.2.10 A). So konnte an Tag 6+0 sowie an Tag 6+10 gemeinsam mit HOXB4 eine Hochregulation von SCL/TAL1 sowie von Flk1 nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte bei keinem der untersuchten Gene eine Ände-

rung im Expressionsverhalten nach Tag 6+10 (6+10d) beobachtet werden (s. Abb 3.1.2.10A). Mittels FACSscan-Analyse konnten zwar an Tag 6+15 sowie Tag 6+20 CD135<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden, relativ zu der Kontrollpopulation jedoch weniger (s. Abb 3.2.2.4). Dies könnte eine Erklärung für den geringeren Effekt von Flt3-L um diesen Zeitpunkt sein. Allgemein gesehen überwiegt unter der Einzelstimulation mit Flt3-L eine Runterregulation der Genexpression, insbesondere von Lmo2 und PU.1, was wiederum für einen stammzellerhaltenden Effekt des Flt3-L sprechen könnte. CyclinD1, EPO sowie Lmo4 wurden über den gesamten Kultivierungszeitraum unter der Einzelstimulation mit Flt3-L nicht im Expressionsverhalten beeinflusst.

#### 4.2.2.3 SCF und Flt3-L in Kombination

Da Flt3-L seine Funktion hauptsächlich in Kombination mit anderen Zytokinen wie z.B. mit SCF ausübt wurde auch die Auswirkung einer **Kombinationsstimulation von Flt3-L und SCF** getestet<sup>104,105</sup> (s. Abb. 3.1.2.10 C). Hierunter wurden allerdings relativ zu den Einzelstimulationen weniger Genregulationen beobachtet. So zeigte die Expression von CyclinD1, GATA2, Flk1 und Lmo4 keine Änderung im Expressionsverhalten. Am stärksten wurde die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 reguliert. Ähnlich der Einzelstimulation mit SCF fällt hier auf, dass in der mittleren Phase der Kultivierung (6+5d-6+15d) keine Regulation stattfindet.

## 5 Zusammenfassung

Grundlage für die vorliegende Arbeit stellten Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe dar, die anhand von Transplantationsexperimenten mit myeloablatierten Mäusen erstmalig eine Erhaltung der Repopulationskapazität muriner adulter Stammzellen durch *in vitro* Stimulation mit Flt3-L und SCF erreichen konnten. Zudem wurde in diesem Rahmen erneut bestätigt, dass der gleiche Effekt durch eine Stimulation mit Il-6, Il-3, Il-11 sowie SCF nicht erzielt werden kann<sup>32</sup>. Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im zeitlichen Verlauf besser verstehen zu können wurden in dieser Dissertation genotypische Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten hämatopoetischer Stammzellen unter dem Einfluss o.g. Zytokine durchgeführt.

Als Material dienten murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die insofern ein geeignetes, *in-vivo* ähnliches System darstellen, als dass sie *ex vivo* unter optimalen Kultivierungsbedingungen sogenannte embryoid bodies (EBs) bilden, die das Potential haben Zellen aller 3 Keimblätter zu bilden. Zur Identifizierung der hämatopoetischen Zellen erfolgte zum einen der Nachweis stadienspezifischer Oberflächenmoleküle mittels FACScan, zum anderen mittels Realtime PCR eine Expressionsanalyse hämatopoese-spezifischer Gene. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Auswirkungen einer kontinuierlich versus punktuell durchgeführten Stimulation der murinen ESC mit Il-6, Il-3 und SCF bzw. einer Einzel- und Kombinationsstimulation mit Flt3-L und SCF.

Die Stimulation mit Il-6, Il-3 und SCF führte in den ersten Tagen der ES-Zell-Kultivierung zu einer vermehrten Expression stammzellerhaltender Gene, was auf Rezeptorebene die Vergrößerung einer in der Differenzierung noch nicht sehr weit fortgeschrittenen, CD90.2<sup>+</sup> Population zur Folge hatte. Hinsichtlich der Stimulationsdauer wurde der stammzellerhaltende Effekt einer Kombinationsstimulation mit Il-6, Il-3 und SCF insbesondere unter der kontinuierlichen Stimulation sowie unter der punktuellen Stimulation über 48h beobachtet. Die punktuelle Stimulation über 72h konnte in der vorliegenden Arbeit zu keinen wesentlichen Erkenntnissen beitragen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Reifung der Zellen (zweite Hälfte des Kultivierungszeitraumes) Il-6, Il-3 und SCF präferentiell die Differenzierung der Zellen fördern, was auf Genebene durch eine Runterregulation stammzellerhaltender Gene sowie auf Rezeptorebene durch eine relativ zu der unstimulierten Population stets kleinere CD90.2<sup>+</sup> Population zum Ausdruck kommt.

Der stammzellerhaltende Effekt des stem cell factors (SCF) wurde zudem durch eine zur Interpretationserweiterung durchgeführte SCF-Einzelstimulation bestätigt. So wurden mittels FACScan Analyse in den SCF-stimulierten EBs nach Etablierung der Hämatopoese stets mehr CD34<sup>+</sup>- und CD135<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen als in der Kontroll-Population. Eine Korrelation mit den Ergebnissen der Taqman PCR im Sinne einer vermehrten Expression stammzellerhaltender bzw. einer verringerten Expression differenzierungsfördernder Gene konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies könnte allerdings auch an der Tatsache liegen, dass die PCR Daten in 5-Tages-Abständen erfasst wurden und dass wesentliche Regulationen in der Zwischenzeit nicht erfasst werden (s. 1.4.4).

Der in der Literatur beschriebene synergistische Effekt von SCF und Flt3-L zeigt sich in der vorliegenden Arbeit durch eine auf Rezeptorebene ausgeprägte Reduktion und somit eine zu vermutende Differenzierungsförderung der unreifen Populationen. Insbesondere die CD117<sup>+</sup>- sowie CD135<sup>+</sup>-Populationen, die die jeweiligen Rezeptoren für SCF bzw. den Flt3-L exprimieren, nehmen an Größe ab. Dies könnte eine Erklärung für den geringen Effekt der Kombinationsstimulation (SCF/Flt3-L) auf die Expression der untersuchten Gene sein.

Die Interpretation der Daten der vorliegenden Dissertation bezüglich des Repopulationsdefektes bildet die Grundlage für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Funktion von SCF und Flt3-L.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE (2001): Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-) Sca1(+) c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 15(4):659-69
2. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197
3. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D (1990): Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 63(1):235-43
4. Anderson KL, Smith KA, Conners K, McKecher SR, Maki RA, Torbett BE (1998): Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* 91:3702-3710
5. Andrews R, Singer J, Bernstein I. (1989): Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med*. 169: 1721-1731
6. Antontchuk J, Sauvageau G and Humphries RK (2001): HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Experimental Hematology* 29: 1125-1134
7. Bai CM, Zou XY, Zhao YQ, Han SM, Shan YD. (2004): The clinical study of recombinant human thrombopoietin in the treatment of chemotherapy-induced severe thrombocytopenia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 84(5):397-400
8. Balciunaite G, Ceredig R, Massa S, Rolink AG (2005): A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. *Eur J Immunol*. 35: 2019-2030
9. Barreda DR, Belosevic M (2001): Transcriptional regulation of hemopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 25(8-9):763-89
10. Bauermeister KT, Stölting S, Kaczmarek PM, Nadrowitz R, Wagner T, Peters SO. (2004): Hematopoietic progenitor cells residing in muscle engraft into bone marrow following transplantation. *Int J Hematol* 79(5):488-94
11. Becker PS, Nilsson SK, Li Z, Berrios VM, Dooner MS, Cooper CL, Hsieh CC, Quesenberry PJ. (1999): Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. *Exp Hematol*. 27(3):533-41
12. Bertonecello I, Williams B. (2004): Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining. *Methods Mol Biol*. 263:181-200
13. Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O (2001): Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J Biol Chem*. 276(20):16840-7
14. Bienvenu F, Barré B, Giraud S, Avril S and Coqueret O (2005): Transcriptional Regulation by a DNA-associated Form of Cyclin D1. *Molecular Biology of the Cell* 16: 1850-1858
15. Bodine DM, Orlic D, Birkett NC, Seidel NE, Zsebo KM (1992): Stem cell factor increases colony-forming unit-spleen number in vitro in synergy with interleukin-6, and in vivo in Sl/Sld mice as a single factor. *Blood*. 79(4):913-9
16. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Ruggieri L, Li ZH, Lyman SD (1995): Flt3 ligand stimulates/co-stimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol*. (10):1121-9

17. Brun AC, Björnsson JM, Magnusson M, Larsson N, Leveén P, Ehinger M, Nilsson E, Karlsson S (2004): Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood*. 103(11):4126-33
18. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL (2006): Hematopoietic Stem Cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 169 (2): 338-46
19. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003): Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425(6960): 841-6
20. Cannistra SA, Vellenga E, Groshek P, Rambaldi A, Griffin JD (1988): Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and interleukin 3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor-dependent mechanism. *Blood*. 71(3):672-6
21. Ceredig R, Rauch M, Balciunaite G, Rolink AG (2006): Increasing Flt3L availability alters composition of a novel bone marrow lymphoid progenitor compartment. *Blood* 108(4):1216-22
22. Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE, Moreau-Gachelin F, Tenen DG (1995): PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene*. 11(8):1549-60
23. Chen HM, Zhang P, Voso MT, Hohaus S, Gonzalez DA, Glass CK, Zhang DE, Tenen DG (1995): Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* 85: 2918-2928
24. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA (1996): Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood*. 87(2):479-90
25. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL (1999): In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(6):3120-5
26. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G (1998): A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 125(4):725-32
27. Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J and Choi K (2002): Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129 (23): 5511-5520
28. Conley BJ, Trounson AO, Mollard R (2004): Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives. *Fetal Diagn Ther*. 19(3): 218-23
29. Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I (1996): Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*. 86(6): 907-16.
30. Dahl R, Simon MC (2003): The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis*. 31(2):229-33
31. D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GG (1989): Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*. 21;57(2):277-85
32. Diehl A, Stoelting S, Nadrowitz R, Wagner T, Peters SO (2007): Improved hematopoietic stem cell engraftment following ex vivo expansion of murine marrow cells with SCF and Flt3L. *Cytotherapy*. 9(6):532-8
33. De Jong MO, Wagemaker G, Wognum AW. (1995): Separation of myeloid and erythroid progenitors based on expression of CD34 and c-kit. *Blood* 86(11): 4076-85

34. DeKoter RP, Walsh JC and Singh H (1998): PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 17 (15): 4456-4468
35. DeKoter RP, Singh H (2000): Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science.* 288(5470):1439-41
36. Dirnhofer S, Zimpfer A, Went P. (2006): The diagnostic and predictive role of kit (CD117). *Ther Umsch.* 63(4): 273-8
37. Doetschmann TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W and Kemler R (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45
38. D'Souza SL, Elefanty AG, Keller G (2005): SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* 105(10):3862-70
39. Durand C, Dzierzak E (2005): Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica.* 90(1):100-8
40. Dzierzak E, Medvinsky A and de Bruijn M (1998): Qualitative and quantitative aspects of hematopoietic cell development in mammalian embryo. *Immunology Today* 19 (5): 228-236
41. Evans MJ and Kaufmann MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156
42. Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V (2003): Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development.* 130(17):4217-27
43. Ferkowicz MJ, Starr M, Xie X, Li W, Johnson SA, Shelley WC, Morrison PR, Yoder MC (2003): CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development* 130, 4393-4403
44. Ferkowicz MJ, Yoder MC (2005): Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematology* 33(9): 1041-7
45. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT (2002): Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 2002 Feb;1(1):75-87
46. Filippi MD, Porteu F, Le Pesteur F, Rameau P, Nogueira MM, Debili N, Vainchenker W, de Sauvage FJ, Kupperschmitt AD and Sainteny F (2000): Embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells: A model to study the function of various regions of the intracytoplasmatic domain of cytokine receptors in vitro. *Experimental Hematology* 28: 1363-1372
47. Fleischmann K, Hescheler J (2004): Stammzellen und ihr potentieller Einsatz für therapeutische Zwecke. *BioFokus* 68: 1-12
48. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL (1993): Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(8):3760-4
49. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, et al (1995): Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood.* 86(5):1661-70

50. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H (1987): Interferon beta 2/B-cell-stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84(20):7251-5
51. Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH (1987): B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(21):7629-33
52. Gering M, Rodaway AR, Göttgens B, Patient RK, Green AR (1998): The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J*. 15;17(14):4029-45
53. Gilliland DG, Griffin JD (2002): The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 100: 1532-1542
54. Godin I, Cumano A. (2002): The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol*. 2(8): 593-604
55. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H. (1997): Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 3:1337-1344
56. Graham A, Papalopulu N, Lorimer J, McVey JH, Tuddenham EG, Krumlauf R (1988): Characterization of a murine homeo box gene, Hox-2.6, related to the Drosophila Deformed gene. *Genes Dev*. 2(11):1424-38
57. Habibian HK, Peters SO, Hsieh CC, Wu J, Vergilis K, Grimaldi CI, Reilly J, Carlson JE, Frimberger AE, Stewart FM, Quesenberry PJ. (1998): The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit. *J Exp Med*. 188(2):393-8
58. Hannum C, Culpepper J, Campbell D, et al (1994): Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*. 368: 643-648
59. Hansson A, Zetterblad J, van Duren C, Axelson H, Jönsson JI (2007): The Lim-only protein LMO2 acts as a positive regulator of erythroid differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 364(3):675-81
60. Heimfeld S, Hudak S, Weissman I, Rennick D (1991): The in vitro response of phenotypically defined mouse stem cells and myeloerythroid progenitors to single or multiple growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(21):9902-6
61. Helgason CD, Sauvageau G, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK (1996): Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood*. 87(7):2740-9
62. Herblot S, Steff AM, Hugo P, Aplan PD, Hoang T (2000): SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol*. 1(2):138-44
63. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentin, S, Maltsev VA, Rohwedel J., Wobus A.M. and Addicks K (1997): Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovascular Research* 36: 149-162
64. Heyworth C, Gale K, Dexter M, May G, Enver T (1999): A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal. *Genes Dev*. 13(14):1847-60

65. Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A (1999): Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(13):7370-5
66. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al (1986): Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 324(6092):73-6
67. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG (1995): PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 15(10):5830-45
68. Hole N (1999): Embryonic Stem Cell-Derived Haematopoiesis. *Cells Tissues Organs* 165: 181-189
69. Holland PW, Hogan BL (1988): Expression of homeo box genes during mouse development: a review. *Genes Dev.* 2(7):773-82
70. Huang X, Cho S, Spangrude GJ (2007): Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ.* 14(11):1851-9
71. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G (2004): Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature.* 432(7017):625-30
72. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M (1987): Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(24):9035-9
73. Jacobsen SE, Okkenhaug C, Myklebust J, Veiby OP, Lyman SD (1995): 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(4):1357-63
74. Jaffredo T, Bollerot K, Sugiyama D, Gautier R, Drevon C (2005): Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol.* 49(2-3): 269-77
75. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T and Wiles MV (1993): Hematopoietic Commitment during Embryonic Stem Cell Differentiation in Culture. *Molecular and Cellular Biology* 13: 473-486
76. Keller GM (1995): In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 862-869
77. Keller G, Georges, L and Scott R (1999): Development of the hematopoietic system in the mouse. *Experimental Hematology* 27: 777-787
78. Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A (1993): Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood.* 82(8):2340-52
79. Kenny DA, Jurata LW, Saga Y, Gill GN (1998): Identification and characterization of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(19):11257-62
80. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, Sutherland RL, Robertson JF (1999): Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 5(8):2069-76

81. Kiel MJ, Morrison SJ (2008): Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.* 8(4):290-301
82. Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, van Beveren C, Maki RA (1990): The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61: 113-124
83. Klingmüller U, Wu H, Hsiao JG, Toker A, Duckworth BC, Cantley LC, Lodish HF (1997): Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7):3016-21
84. Koga S, Yamaguchi N, Abe T, Minegishi M, Tsuchiya S, Yamamoto M, Minegishi N (2007): Cell-cycle-dependent oscillation of GATA2 expression in hematopoietic cells. *Blood.* 109(10):4200-8
85. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997): Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 91:661-672
86. Koury MJ, Bondurant MC (1990): Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science.* 248(4953):378-81
87. Kuter DJ. (2007): New thrombopoietic growth factors. *Blood.* 109(11):4607-16
88. Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H (1999): Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool.* 284(1):67-81
89. Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang YC, Clark SC, Ogawa M (1988): Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. *Blood.* 71(6):1759-63
90. Lécuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH, Hoang T (2002): The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood.* 100(7):2430-40
91. Ledbetter JA, Herzenberg LA. (1979): Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev.* 47:63-90
92. Lemoli RM, Gulati SC (1993): Effect of stem cell factor (c-kit ligand), granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 on hematopoietic progenitors in human long-term bone marrow cultures. *Stem Cells.* 11(5):435-44
93. Lemoli RM, Rosti G, Visani G (1996): Concomitant and sequential administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and recombinant human interleukin-3 to accelerate hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma. *J Clin Oncol.* 14:3018-3025
94. Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S (2005): Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica.* 90(3):360-81
95. Li J, Chen H (2008): Mechanisms underlying the expression regulation of HOXB4 transcripton in hematopoietic stem cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 16(4):960-3
96. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Ferkowicz M, Morrison P, Li Y, Yoder MC. (2003): Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood.* 102(13):4345-53
97. Ling V, Neben S (1997): In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells: Immunophenotypic Analysis of Cultured Embryoid Bodies. *Journal Of Cellular Physiology* 171: 104-115

98. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, Oziemlak A, Tsai FY, Orkin SH, Ploemacher R, Hendriks RW, Dzierzak E (2004): GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 200(7):871-82
99. Link H., Hess C.F, Albers P, Schmoll H.J., Reimers H.J., Minckwitz G.v., Nowrouzian M.R., Welte K. (2000): Rationale Therapie mit den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF. *Chemotherapie Journal*, 12. Jahrgang, Heft 1/2003
100. Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA (1988): B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med.* 167(3):1253-8
101. Lugas JJ, Chung YS, Mills JC, Kim SI, Grass J, Kyba M, Doherty JM, Bresnick EH, Choi K (2007): GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development.* 134(2):393-405
102. Luskey BD, Rosenblatt M, Zsebo K, Williams DA. (1992): Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood.* 80(2):396-402
103. Lyman SD, James L, Vanden Bos T (1993): Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell.* 75: 1157-1167
104. Lyman SD, Williams DE (1995): Biology and potential clinical applications of flt3 ligand. *Curr Opin Hematol.* 2: 177-181.
105. Lyman SD, Jacobsen SE (1998): c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 91: 1101-1134
106. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J (1994): Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res.* 75(2):233-44
107. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA (1990): Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell.* 63(1):203-11
108. Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12): 7634-8
109. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR (1991): A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell.* 65(7):1143-52
110. Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL (1990): Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature.* 347(6294):667-9
111. Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H, Xu Mj, Ebihara Y, Ishii T, Sugiyama D, Manabe A, Tanaka R, Ikeda Y, Asano S, Nakahata T (2001): Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood.* 98(1):6-12
112. McClanahan T, Dalrymple S, Barkett M and Lee F (1993): Hematopoietic Growth Factor Receptor Genes as Markers of Lineage Commitment During In Vitro Development of Hematopoietic Cells. *Blood* 81 (11): 2903-2915
113. McGrath KE, Palis J (2005): Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematology* 33(9):1021-8

114. McIvor Z, Hein S, Fiegler H, Schroeder T, Stocking C, Just U, Cross M (2003): Transient expression of PU.1 commits multipotent progenitors to a myeloid fate whereas continued expression favors macrophage over granulocyte differentiation. *Exp Hematol.* 31(1):39-47
115. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al (2000): Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood.* 95: 3489-3497
116. McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D (1997): Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* (1):65-71
117. McNiece IK, Briddell RA, Yan XQ, Hartley CA, Gringeri A, Foote MA, Andrews RG (1994): The role of stem cell factor in mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Leuk Lymphoma.* 15(5-6):405-9
118. Medvinsky AL, Samoylina NL, Müller AM and Dzierzak EA (1993): An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364: 64-66
119. Medvinsky A, Dzierzak E (1996): Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. *Cell* 86: 897-906
120. Migliaccio G, Migliaccio AR, Adamson JW (1991): In vitro differentiation and proliferation of human hematopoietic progenitors: the effects of interleukins 1 and 6 are indirectly mediated by production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3. *Exp Hematol.* 19(1):3-10
121. Migliaccio G, Migliaccio AR, Valinsky J, Langley K, Zsebo K, Visser JW, Adamson JW (1991): Stem cell factor induces proliferation and differentiation of highly enriched murine hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7420-4
122. Mikkola HK, Fujiwara Y, Schlaeger TM, Traver D, Orkin SH (2003): Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* 101(2):508-16
123. Mikkola HK, Orkin SH (2006): The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 133(19): 3733-44
124. Miller BA, Lipton JM (1983): Thy-1 antigen in murine hematopoietic progenitor differentiation. *Prog Clin Biol Res.* 134:389-97
125. Miller BA, Lipton JM, Linch DC, Burakoff SJ, Nathan DG (1985): Thy-1 is a differentiation antigen that characterizes immature murine erythroid and myeloid hematopoietic progenitors *J Cell Physiol.* 123(1): 25-32
126. Minegishi N, Ohta J, Suwabe N, Nakauchi H, Ishihara H, Hayashi N, Yamamoto M (1998): Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem.* 273(6):3625-34
127. Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, Hara T, Miyajima A, Nishikawa S-i and Yamamoto M (2003): Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursors cells in midgestation mouse embryos. *Blood* 102 (3): 896-905
128. Moore KA, Lemischka IR (2006): Stem cells and their niches. *Science.* 311(5769):1880-5
129. Moore MA, Metcalf D (1970): Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol.* 18(3): 279-96

130. Moskowitz CH, Stiff P, Gordon MS (1997): Recombinant methionyl human stem cell factor and filgrastim for peripheral blood progenitor cell mobilization and transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients-results of a phase I/II trial. *Blood*. 89:3136-3147
131. Mummery C (2004): Stem cell research: immortality or a healthy old age? *Eur J Endocrinol*. 151 Suppl 3:U7-12
132. Muraguchi A, Kishimoto T, Miki Y, Kuritani T, Kaieda T, Yoshizaki K, Yamamura Y (1981): T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol*. 127(2):412-6
133. Novielli EM, Ramirez M, Civin CI. (1998): Biology of CD34+ CD38- cells in lymphohematopoiesis. *Leuk Lymphoma*. 31:285-293
134. Ogawa M, Clark SC (1988): Synergistic interaction between interleukin-6 and interleukin-3 in support of stem cell proliferation in culture. *Blood Cells*. 14(2-3):329-37
135. Ogawa M, ten Boekel E, Melchers F (2000): Identification of CD19(-)B220(+)c-Kit(+)Flt3/Flk-2(+) cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow. *Int Immunol*. 12(3):313-24
136. Ogawa M, Tajima F, Ito T, Sato T, Laver JH, Deguchi T (2001): CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations. *Ann N Y Acad Sci*. 938:139-45
137. Ohmura K, Kawamoto H, Lu M, Ikawa T, Ozaki S, Nakao K, Katsura Y (2001): Immature multipotent hemopoietic progenitors lacking long-term bone marrow-reconstituting activity in the aorta-gonad-mesonephros region of murine day 10 fetuses. *J Immunol*. 166(5): 3290-6
138. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. (1991): Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood*. 78(7):1706-12
139. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nakamura M, Miura Y, Suda T (1992): Synergistic effect of IL-3 and IL-6 on highly enriched murine hemopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 20(5):546-51
140. Okada S, Suda T (1992): Function, molecular structure and gene expression of stem cell factor (SCF). *Nippon Rinsho*. 50(8):1872-8
141. Okano A, Suzuki C, Takatsuki F, Akiyama Y, Koike K, Ozawa K, Hirano T, Kishimoto T, Nakahata T, Asano S (1989): In vitro expansion of the murine pluripotent hemopoietic stem cell population in response to interleukin 3 and interleukin 6. Application to bone marrow transplantation. *Transplantation*. 48(3):495-8
142. Orlic D, Anderson S, Biesecker LG, Sorrentino BP, Bodine DM (1995): Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(10):4601-5
143. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996): Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 273(5272):242-5
144. Pahl HL, Scheibe RJ, Zhang DE, Chen HM, Galson DL, Maki RA, Tenen DG (1993): The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem*. 268(7):5014-20

145. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999): Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126 (22): 5073-5084
146. Patchen ML, MacVittie TJ, Williams JL, Schwartz GN, Souza LM (1991): Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. *Blood*. 77(3):472-80
147. Persons DA, Allay JA, Allay ER, Ashmun RA, Orlic D, Jane SM, Cunningham JM, Nienhuis AW (1999): Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood*. 93(2):488-99
148. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. (1995): 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(5):461-9
149. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. (1996): 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(1):30-7
150. Qiu L, Meagher R, Welhausen S, Heye M, Brown R, Herzig RH. (1999): Ex vivo expansion of CD34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines. *J Hematother Stem Cell Res*. 8(6):609-18
151. Rabbitts TH, Bucher K, Chung G, Grutz G, Warren A, Yamada Y. (1999): The effect of chromosomal translocations in acute leukemias: the LMO2 paradigm in transcription and development. *Cancer Res*. 59(7 Suppl):1794s-1798s.
152. Rappold I, Ziegler BL, Köhler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino AC, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Bühring HJ (1997): Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*. 90(1):111-25
153. Rasko JE, Metcalf D, Rossner MT, Begley CG, Nicola NA (1995): The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia*. 9: 2058-2066
154. Rieger M., Schroeder T. (2007): Hämatopoetische Stammzelle. *BioSpektrum*, 13. Jahrgang, 03/07
155. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105–111
156. Reya T (2003): Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent Prog Horm Res*. 58:283-95
157. Robertson SM, Kennedy M, Shannon JM, Keller G (2000): A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development*. 127(11):2447-59
158. Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK (2005): Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol*. 33(2):131-43
159. Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D (1996): Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*. 10(2): 238-48

160. Rothenberg ME, Owen WF Jr, Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL (1988): Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest.* 81(6):1986-92
161. Sabin F. R (2002): Preliminary Note on the Differentiation of Angioblasts and the Method by Which They Produce Blood-Vessels, Blood-Plasma and Red Blood-Cells As Seen in the Living Chick. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* 11(1): 5-7
162. Saeland S, Caux C, Favre C, Aubry JP, Mannoni P, Pebusque MJ, Gentilhomme O, Otsuka T, Yokota T, Arai N, et al (1988): Effects of recombinant human interleukin-3 on CD34-enriched normal hematopoietic progenitors and on myeloblastic leukemia cells. *Blood.* 72(5):1580-8
163. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M (2005): Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(4):1076-81
164. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
165. Sanchez-Garcia J, Torres A, Herrera C, Alvarez MA (2006): Cell cycle kinetic changes induced by interleukin-3 and interleukin-6 during ex vivo expansion of mobilized peripheral blood CD34 cells. *Haematologica.* 91(1):121-4
166. Sato T, Laver JH, Ogawa M (1999): Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 94 (8) 2548-2554
167. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowski WH, Reid DS, Largman C, Lawrence HJ and Humphries RK (1994): Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cell. *Proc Natl Sci USA* 91 (25): 12223-12227
168. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM and Humphries RK (1995): Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & Development* 9: 1753-1765
169. Sawyer ST, Krantz SB, Goldwasser E (1987): Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells. *J Biol Chem.* 262(12):5554-62
170. Schlaeger TM, Schuh A, Flitter S, Fisher A, Mikkola H, Orkin SH, Vyas P, Porcher C (2004): Decoding hematopoietic specificity in the helix-loop-helix domain of the transcription factor SCL/Tal-1. *Mol Cell Biol.* 24(17):7491-502
171. Schlaeger TM, Mikkola HK, Gekas C, Helgadottir HB, Orkin SH (2005): Tie2Cre-mediated gene ablation defines the stem-cell leukemia gene (SCL/tal1)-dependent window during hematopoietic stem-cell development. *Blood.* 105(10):3871-4
172. Schmitt RM, Bruyns E and Snodgrass HR (1991): Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes and Development* 5: 728-740
173. Scott EW, Fisher RC, Olson MC, Kehrl EW, Simon MC, Singh H (1997): PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity.* 6(4):437-47
174. Seifert T, Stoelting S, Wagner T, Peters SO. (2008): Vasculogenic maturation of E14 embryonic stem cells with evidence of early vascular endothelial growth factor independency. *Differentiation.* 76(8):857-67

175. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376(6535):62-6
176. Sharma S, Gurudutta GU, Satija NK, Pati S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, Singh VK, Tripathi RP (2006): Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation and differentiation. *Stem Cells Dev*. 15(6):755-78
177. Shivdasani R and Orkin S (1996): The Transcriptional Control of Hematopoiesis. *Blood* 87 (10): 4025-4039
178. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM, et al (1994): STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(2):459-63
179. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG (1996): PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 88(4):1234-47
180. Socolovsky M, Lodish HF, Daley GQ (1998): Control of hematopoietic differentiation: Lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(12): 6573–6575
181. Sonoda Y, Yang YC, Wong GG, Clark SC, Ogawa M (1988): Analysis in serum-free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor are specific for early developmental stages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(12):4360-4
182. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988): Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241(4861):58-62
183. Spangrude GJ, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J, Weissman IL (1991): Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* 78: 1395
184. Suda T, Yamaguchi Y, Suda J, Miura Y, Okano A, Akiyama Y (1988) : Effect of interleukin 6 (IL-6) on the differentiation and proliferation of murine and human hemopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 16(11):891-5
185. Tajima F, Deguchi T, Laver JH, Zeng H, Ogawa M (2001): Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 97(9): 2618-24
186. Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Herrmann SH (1988): B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 140(2):508-12
187. Terano T, Zhong Y, Toyokuni S, Hiai H, Yamada Y (2005) : Transcriptional control of fetal liver hematopoiesis: dominant negative effect of the overexpression of the LIM domain mutants of LMO2. *Exp Hematol*. 33(6):641-51
188. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK (1999): Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*. 15;94(8):2605-12
189. Till JE, McCulloch EA (1961): A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 14:213-22

190. Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FH, Williams DA (1992): Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(16):7350-4
191. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH (1994): An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 371(6494):221-6
192. Tsai FY, Orkin SH (1997): Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 89(10):3636-43
193. Tse E, Smith AJ, Hunt S, Lavenir I, Forster A, Warren AJ, Grutz G, Feroni L, Carlton MB, Colledge WH, Boehm T, Rabbitts TH (2004): Null mutation of the *Lmo4* gene or a combined null mutation of the *Lmo1/Lmo3* genes causes perinatal lethality, and *Lmo4* controls neural tube development in mice. *Mol Cell Biol*. 24(5):2063-73
194. Tsuji K, Zsebo KM, Ogawa M (1991): Enhancement of murine blast cell colony formation in culture by recombinant rat stem cell factor, ligand for c-kit. *Blood*. 78(5):1223-9
195. Tura O, Barclay GR, Roddie H, Davies J, Turner ML (2007): Optimal ex vivo expansion of neutrophils from PBSC CD34+ cells by a combination of SCF, Flt3-L and G-CSF and its inhibition by further addition of TPO. *J Transl Med*. 30;5:53
196. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K, Nakahata T (2000): Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest*. 105(7):1013-21
197. Vadhan-Raj S. (2000): Clinical experience with recombinant human thrombopoietin in chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 37(2 Suppl 4):28-34
198. Veiby OP, Jacobsen FW, Cui L, Lyman SD, Jacobsen SE (1996): 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(7):2953-60
199. Visvader JE, Mao X, Fujiwara Y, Hahm K and Orkin SH (1997): The LIM-domain binding protein *Ldb1* and its receptor *LMO2* act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13707-13712
200. Wadman IA, Osada H, Grütz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, Rabbitts TH (1997): The LIM-only protein *Lmo2* is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and *Ldb1/NLI* proteins. *EMBO J*. 16(11):3145-57.
201. Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E, Kanz L, Möhle R. (2007): Effect of FLT3 inhibition on normal hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1106: 190-6
202. Weiss MJ, Orkin SH (1996): In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest*. 97(3): 591-595
203. Williams DE, Straneva JE, Cooper S, Shaddock RK, Waheed A, Gillis S, Urdal D, Broxmeyer HE (1987): Interactions between purified murine colony-stimulating factors (natural CSF-1, recombinant GM-CSF, and recombinant IL-3) on the in vitro proliferation of purified murine granulocyte-macrophage progenitor cells. *Exp Hematol*. 15(10):1007-12
204. Wilson A, Trumpp A (2006): Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 6(2): 93-106

- 
205. Wognum AW, de Jong MO, Wagemaker G (1996): Differential expression of receptors for hemopoietic growth factors on subsets of CD34+ hemopoietic cells. *Leuk Lymphoma*. 24(1-2):11-25
206. Wong PM, Chung SW, Chui DH, Eaves CJ (1986): Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83(11): 3851-4
207. Wong GG, Witek-Giannotti JS, Temple PA, Kriz R, Ferenz C, Hewick RM, Clark SC, Ikebuchi K, Ogawa M (1988): Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6. *J Immunol*. 140(9):3040-4
208. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995): Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 83(1):59-67
209. Xu YH, Chen ZW, Ye XY, Lu S. (2008): Evaluation of recombinant human thrombopoietin in the treatment of chemotherapy-induced thrombocytopenia in lung cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 30(9):716-9
210. Xu Z, Huang S, Chang LS, Agulnick AD, Brandt SJ (2003): Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol*. 23(21):7585-99
211. Yamada Y, Warren AJ, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbitts TH (1998): The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7):3890-5
212. Yamada Y, Pannell R, Forster A, Rabbitts TH (2000): The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(1):320-4
213. Yamada Y, Pannell R, Forster A, Rabbitts TH (2002): The LIM-domain protein Lmo2 is a key regulator of tumour angiogenesis: a new anti-angiogenesis drug target. *Oncogene*. 1(9):1309-15
214. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993): flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 118(2): 489-98
215. Ye ZJ, Kluger Y, Lian Z, Weissman SM (2005): Two types of precursor cells in a multipotential hematopoietic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(51):18461-6
216. Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., and Flake, A. W (1995): Retention and multilineage expression of human hematopoietic stem cells in humansheep chimeras. *Stem.Cells*, 13(2), 101-111
217. Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG (1994): The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol*. 14(1):373-81
218. Zheng CL, Zhou B, Lu M (2007): Regulatory role of HOXB4 in self-renewal of hematopoietic stem cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. (3):647-51
219. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR. (1990): Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell*. 63(1):195-201
-

## 7 Anhang

### 7.1 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 30 Tage (s. 3.2.1.1)

**Tab. 7.1.1: Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Stimulierte Population.** (IL-6, IL-3 und SCF). Aufgeführt sind die Einzelwerte der 4 durchgeführten Messungen, die Mittelwerte (MW) sowie der Standard error of mean (SEM).

30-tägige Stimulation	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d	6+25d	6+30d
Einzelwerte, 1. Messung (Vers. IV)	0,20	2,62	1,06	0,81	0,00	2,20
Einzelwerte, 2. Messung (Vers. VIII)	0,06	1,84	4,38	1,92	2,52	1,04
Einzelwerte, 3. Messung (Vers. IX)	0,18	1,24	4,25	2,78	3,08	0,52
Einzelwerte, 4. Messung (Vers. XI)	0,02	1,74	2,32	0,78	0,48	0,78
<b>MW</b> der 4 Messungen	0,12	1,86	3,00	1,57	1,52	1,14
<b>SEM</b>	0,04	0,28	0,80	0,48	0,75	0,37

**Tab. 7.1.2: Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Kontrollpopulation.** Aufgeführt sind die Einzelwerte der 4 durchgeführten Messungen, die Mittelwerte (MW) sowie der Standard error of mean (SEM).

Kontrolle 30-tägige Stimulation	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d	6+25d	6+30d
Einzelwerte, 1. Messung (Vers. IV)	0,50	3,54	1,78	0,52	0,00	2,84
Einzelwerte, 2. Messung (Vers. VIII)	0,10	0,76	3,14	2,36	1,86	1,66
Einzelwerte, 3. Messung (Vers. IX)	0,09	0,65	3,89	2,68	5,56	2,54
Einzelwerte, 4. Messung (Vers. XI)	0,00	0,66	1,66	0,99	0,09	0,80
<b>MW</b> der 4 Messungen	0,17	1,40	2,62	1,64	1,88	1,96
<b>SEM</b>	0,11	0,71	0,54	0,52	0,50	0,46

**Tab. 7.1.3 Gesamtzellzahl der an den Erntezeitpunkten analysierten Proben**

(Angabe in Zellen/ml) Versuchsreihe 30-tägige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF

EE	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d	6+25d	6+30d
<b>stim. Zellen</b>	7,6x10 <sup>6</sup>	7,77 x10 <sup>6</sup>	8,43 x10 <sup>6</sup>	14,44 x10 <sup>6</sup>	15,69 x10 <sup>6</sup>	16,73 x10 <sup>6</sup>
<b>unstim. Zellen (Kontrolle)</b>	6,89 x10 <sup>6</sup>	8,47 x10 <sup>6</sup>	11,67 x10 <sup>6</sup>	12,86 x10 <sup>6</sup>	12,16 x10 <sup>6</sup>	16,46 x10 <sup>6</sup>

**Tab. 7.1.4 Signifikanz der Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 30 Tage**, p=<0,05 wird als signifikant betrachtet

	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d	6+25d	6+30d
<b>p-Werte</b>	0,55	0,41	0,42	0,72	0,65	0,15

## 7.2 Versuchsreihe punktuelle Stimulation über 48h mit IL-6, IL-3 und SCF (s. 3.2.1.2)

**Tab. 7.2.1: Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Stimulierte Population.** (IL-6, IL-3 und SCF). Aufgeführt sind die Einzelwerte der 4 durchgeführten Messungen, die Mittelwerte (MW) sowie der Standard error of mean (SEM).

48-stündige Stimulation	6+0d+48h	6+5d+48h	6+10d+48h	6+15d+48h	6+20d+48h	6+25d+48h	6+30d+48h
Einzelwerte							
1. Messung (Vers. V)	0,00	0,14	2,68	2,40	2,47	1,02	0,00
Einzelwerte							
2. Messung (Vers. VI)	0,00	0,08	2,78	1,30	2,94	0,94	1,78
Einzelwerte							
3. Messung (Vers. VII)	0,00	0,06	3,80	1,30	2,46	2,08	1,66
Einzelwerte							
4. Messung (Vers. X)	0,02	0,05	2,24	2,40	0,44	0,58	0,04
<b>MW</b> der 4 Messungen	0,01	0,08	2,88	1,67	1,95	1,16	0,87
<b>SEM</b>	0,00	0,02	0,33	0,32	0,56	0,32	0,49

**Tab. 7.2.2: Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Kontrollpopulation.** Aufgeführt sind die Einzelwerte der 4 durchgeführten Messungen, die Mittelwerte (MW) sowie der Standard error of mean (SEM).

KTO 48-stündige Stimulation	6+0d+48h	6+5d+48h	6+10d+48h	6+15d+48h	6+20d+48h	6+25d+48h	6+30d+48h
Einzelwerte							
1. Messung (Vers. V)	0,00	0,08	3,64	1,30	2,94	0,56	0,02
Einzelwerte							
2. Messung (Vers. VI)	0,00	0,02	2,08	0,12	2,41	3,68	1,18
Einzelwerte							
3. Messung (Vers. VII)	0,00	0,04	2,54	2,43	3,84	1,01	3,07
Einzelwerte							
4. Messung (Vers. X)	0,00	0,00	1,96	3,60	2,00	0,58	0,28
<b>MW</b> der 4 Messungen	0,00	0,04	2,56	2,05	2,75	1,46	1,14
<b>SEM</b>	0	0,02	0,38	0,75	0,4	0,75	0,70

**Tab. 7.2.3 Gesamtzellzahl der an den Erntezeitpunkten analysierten Proben (Angabe in Zellen/ml)**

Versuchsreihe 48- stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF

	6+0d+48h	6+5d+48h	6+10d+48h	6+15d+48h	6+20d+48h	6+25d+48h	6+30d+48h
<b>stim. Zellen</b>	2,05x10 <sup>6</sup>	10,95x10 <sup>6</sup>	11,08x10 <sup>6</sup>	13,28x10 <sup>6</sup>	13,83x10 <sup>6</sup>	16,24x10 <sup>6</sup>	17,8x10 <sup>6</sup>
<b>unstim. Zellen</b>	2,4x10 <sup>6</sup>	10,54x10 <sup>6</sup>	13,18x10 <sup>6</sup>	14,06 x10 <sup>6</sup>	14,13x10 <sup>6</sup>	14,81x10 <sup>6</sup>	14,48x10 <sup>6</sup>

**Tab. 7.2.4 Signifikanz der Versuchsreihe punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48h,** p=<0,05 wird als signifikant betrachtet

	6+0d+48h	6+5d+48h	6+10d+48h	6+15d+48h	6+20d+48h	6+25d+48h	6+30d+48h
<b>p-Werte</b>	0,39	<b>0,02</b>	0,55	0,99	0,23	0,51	0,58

### 7.3 Versuchsreihe punktuelle Stimulation über 72h mit IL-6, IL-3 und SCF (s. 3.2.1.3)

**Tab. 7.3.1: Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Stimulierte Population mit IL-6, IL-3 und SCF.** Aufgeführt sind die Einzelwerte der 4 durchgeführten Messungen, die Mittelwerte (MW) sowie der Standard error of mean (SEM).

72-stündige Stimulation	6+0d +72h	6+5d +72h	6+10d +72h	6+15d +72h	6+20d +72h	6+25d +72h	6+30d +72h
Einzelwerte							
1. Messung (Vers. V)	0,04	0,00	1,74	1,30	2,46	2,32	0,18
Einzelwerte							
2. Messung (Vers. VI)	0,00	0,00	4,98	7,02	4,34	1,90	0,50
Einzelwerte							
3. Messung (Vers. VII)	0,00	0,06	6,32	7,38	2,74	2,32	0,46
Einzelwerte							
4. Messung (Vers. X)	0,02	0,26	2,02	0,62	2,60	1,80	1,00
<b>MW der 4 Messungen</b>	0,02	0,08	3,77	4,08	3,04	2,09	0,54
<b>SEM</b>	0,00	0,06	1,12	1,80	0,44	0,14	0,17

**Tab. 7.3.2: Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten. Kontrollpopulation.** Aufgeführt sind die Einzelwerte der 4 durchgeführten Messungen, die Mittelwerte (MW) sowie der Standard error of mean (SEM).

KTO 72-stündige Stimulation	6+0d +72h	6+5d +72h	6+10d +72h	6+15d +72h	6+20d +72h	6+25d +72h	6+30d +72h
Einzelwerte							
1. Messung (Vers. V)	0,00	0,04	1,40	2,40	0,44	1,70	0,06
Einzelwerte							
2. Messung (Vers. VI)	0,04	0,02	3,94	6,71	6,28	2,40	1,80
Einzelwerte							
3. Messung (Vers. VII)	0,00	0,00	8,22	4,12	3,02	1,58	1,87
Einzelwerte							
4. Messung (Vers. X)	0,06	0,22	2,36	1,02	2,95	5,96	0,98
<b>MW der 4 Messungen</b>	0,03	0,07	4,00	3,56	3,17	2,91	1,18
<b>SEM</b>	0,02	0,05	1,50	1,27	1,20	1,03	0,42

**Tab. 7.3.3 Gesamtzellzahl der an den Erntezeitpunkten analysierten Proben (Angabe in Zellen/ml)**

Versuchsreihe 72- stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF

	6+0d+72h	6+5d+72h	6+10d+72h	6+15d+72h	6+20d+72h	6+25d+72h	6+30d+72h
<b>stim. Zellen</b>	3,48x10 <sup>6</sup>	11x10 <sup>6</sup>	11,43x10 <sup>6</sup>	11,85x10 <sup>6</sup>	11,87x10 <sup>6</sup>	16,43x10 <sup>6</sup>	17,48x10 <sup>6</sup>
<b>unstim. Zellen</b>	2,95x10 <sup>6</sup>	6,42x10 <sup>6</sup>	10,2x10 <sup>6</sup>	12,38x10 <sup>6</sup>	12,67x10 <sup>6</sup>	13,18x10 <sup>6</sup>	17,73x10 <sup>6</sup>

**Tab. 7.3.4 Signifikanz der Versuchsreihe punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 72h, p=<0,05 wird als signifikant betrachtet**

p-Werte	6+0d+72h	6+5d+72h	6+10d+72h	6+15d+72h	6+20d+72h	6+25d+72h	6+30d+72h
	0,64	0,7	0,75	0,63	0,88	0,52	0,22

## 7.4 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit Flt3 und SCF (Einzel- bzw. Kombinationsstimulation)

**Tab. 7.4.1: Versuchsreihe CD 34, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten.** Aufgeführt sind die prozentualen Anteile CD 34 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl.

CD34+ Zellen	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
Flt3	2,5	0,7	0,6	3	2	1,3
SCF	0,4	0,2	1,9	3,4	2,2	2,9
Flt3+SCF	0,1	0,1	0,1	5,1	1,5	1,7
Kontrolle	2,5	0,4	0,6	3	3	1,9

**Tab. 7.4.2 Versuchsreihe CD117, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten.** Aufgeführt sind die prozentualen Anteile CD117 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl.

CD117+ Zellen	6+10d	6+15d	6+20d
Flt3	4,1	18,7	20,2
SCF	7,4	19,3	16,1
Flt3+SCF	5,4	23,8	15,3
Kontrolle	8,8	27,9	33,8

**Tab. 7.4.3: Versuchsreihe CD135, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten.** Aufgeführt sind die prozentualen Anteile CD135 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl.

CD135+ Zellen	6+10d	6+15d	6+20d
Flt3	0,7	1,9	0,5
SCF	0,7	2,8	1,3
Flt3+SCF	0,1	0,3	0,3
Kontrolle	0,4	2,4	1,1

**Tab. 7.4.4: Versuchsreihe CD90.2, Übersicht der mittels FACScan ermittelten Daten.** Aufgeführt sind die prozentualen Anteile CD 90.2 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl.

CD90.2+ Zellen	6+10d	6+15d	6+20d
Flt3	1,5	3,2	4,9
SCF	0,8	4,5	5,9
Flt3+SCF	0,7	3,4	7,4
Kontrolle	2,1	4,9	6,4

## 7.5 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 30 Tage (s. 3.1.1.1.1-3.1.1.9.1) Realtime-PCR-Daten

Tab. 7.5.1 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, Hochregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (IV, VIII, IX, XI), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).

MW + Stabw. aller 4 Versuche, kontin.Stim. Hochreg.	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d	6+25d	6+30d
MW PU1	2,31	1,08	0,95	0,87	1,49	1,21
Stabw. PU1	1,74	0,42	0,38	0,53	0,48	0,33
MW CyclinD1	1,13	1,11	0,99	1,05	1,38	1,26
Stabw. CyclinD1	0,28	0,19	0,13	0,80	0,27	0,25
MW GATA2	1,77	2,75	2,16	1,17	2,02	4,83
Stabw. GATA2	1,36	3,07	1,19	0,47	0,90	0,86
MW Epo	1,30	3,77	1,16	1,71	1,56	4,04
Stabw. Epo	1,08	3,18	0,81	1,38	1,13	0,49
MW FLK1	0,38	4,64	1,67	1,56	0,67	7,05
Stabw. FLK1	0,23	3,78	2,10	1,59	0,34	3,22
MW LMO2	1,16	1,36	1,24	1,90	0,96	1,05
Stabw. LMO2	0,50	0,30	0,16	1,13	0,17	0,16
MW Hox B4	2,58	4,12	1,68	1,69	0,81	4,81
Stabw. Hox B4	3,15	3,25	1,89	1,25	0,28	0,61
MW LMO4	1,29	1,34	1,01	1,04	1,56	0,99
Stabw. LMO4	0,52	0,51	0,41	0,29	0,27	0,15
MW Tal1	0,57	5,18	1,66	2,15	0,89	7,55
Stabw. Tal1	3,94	4,27	1,53	1,34	0,35	2,16

Tab. 7.5.2 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF, Runterregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (IV, VIII, IX, XI), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).

MW + Stabw. aller 4 Versuche, kontin.Stim., Runterreg.	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d	6+25d	6+30d
MW PU1	0,92	1,21	1,21	1,75	0,82	0,89
Stabw. PU1	0,81	0,72	0,31	1,03	0,17	0,24
MW CyclinD1	1,28	0,94	1,11	1,78	0,73	0,79
Stabw. CyclinD1	0,84	0,17	0,21	0,85	0,14	0,20
MW GATA2	1,46	1,57	0,73	1,17	0,69	0,21
Stabw. GATA2	1,03	1,25	0,49	0,43	0,29	0,04
MW Epo	2,29	0,43	0,92	1,00	1,14	0,25
Stabw. Epo	2,59	0,36	0,32	0,31	0,78	0,03
MW FLK1	2,49	0,60	3,06	2,84	2,28	0,30
Stabw. FLK1	1,65	0,49	2,42	2,70	0,84	0,04
MW LMO2	1,10	0,79	0,78	0,83	1,01	0,97
Stabw. LMO2	0,34	0,16	0,14	0,58	0,29	0,14
MW Hox B4	1,67	0,72	1,40	1,26	1,69	0,77
Stabw. Hox B4	1,68	0,70	0,77	0,83	0,49	0,59
MW LMO4	1,02	0,85	1,22	1,09	0,75	0,44
Stabw. LMO4	0,47	0,26	0,38	0,29	0,10	0,43
MW Tal1	2,39	0,98	1,44	1,20	1,51	0,14
Stabw. Tal1	2,29	1,10	0,74	0,68	0,72	0,05

## 7.6 Versuchsreihe punktuelle Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF über 48h bzw. 72 h (s. 3.1.1.1.2 -3.1.1.9.2)

**Tab. 7.6.1 Versuchsreihe 48-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF**, Hochregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).

MW + Stabw. der 4 Versuche 48-stündige Stim., Hochreg.	6+0d +48h	6+5d +48h	6+10d +48h	6+15d +48h	6+20d +48h	6+25d +48h	6+30d +48h
<b>PU1</b> MW	2,10	1,20	1,45	1,26	0,51	1,06	0,89
PU1 Stabw.	1,61	0,74	0,65	0,50	0,10	0,35	0,20
<b>CyclinD1</b> MW	1,17	0,86	1,23	1,00	1,02	0,78	1,20
CyclinD1 Stabw.	0,36	0,09	0,22	0,27	0,04	0,07	0,36
<b>GATA2</b> MW	1,03	0,98	0,80	0,52	0,72	0,48	1,26
GATA2 Stabw.	0,28	0,81	0,28	0,22	0,50	0,28	1,03
<b>Epo</b> MW	3,13	1,07	1,58	1,35	0,89	1,24	0,99
Epo Stabw.	2,75	0,65	1,57	0,46	0,49	0,49	0,92
<b>FLK1</b> MW	2,05	2,92	0,45	0,83	0,25	2,21	1,19
FLK1 Stabw.	2,05	2,92	0,45	0,83	0,25	2,21	1,19
<b>LMO2</b> MW	1,40	0,73	1,20	1,40	0,91	1,15	0,79
LMO2 Stabw.	1,40	0,73	1,20	1,40	0,91	1,15	0,79
<b>Hox B4</b> MW	2,14	2,89	0,70	1,20	0,56	2,61	1,88
Hox B4 Stabw.	1,89	2,08	0,32	0,60	0,43	1,36	1,77
<b>LMO4</b> MW	1,21	1,24	1,03	1,00	1,08	1,06	1,03
LMO4 Stabw.	0,25	0,20	0,16	0,23	0,08	0,20	0,23
<b>Tal1</b> MW	2,08	3,22	0,93	1,95	0,59	2,34	1,23
Tal1 Stabw.	1,24	2,83	0,23	1,52	0,31	1,77	0,91

**Tab. 7.6.2 Versuchsreihe 48-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF**, Runterregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).

MW + Stabw. der 4 Versuche 48-stündige Stim., Runterreg.	6+0d +48h	6+5d +48h	6+10d +48h	6+15d +48h	6+20d +48h	6+25d +48h	6+30d +48h
<b>PU1</b> MW	0,79	1,14	0,91	1,05	2,03	1,14	1,20
PU1 Stabw.	0,78	0,52	0,44	0,54	0,38	0,42	0,24
<b>CyclinD1</b> MW	1,20	1,18	0,93	1,12	0,99	1,40	1,07
CyclinD1 Stabw.	0,49	0,14	0,08	0,42	0,04	0,29	0,48
<b>GATA2</b> MW	1,22	3,57	1,42	2,38	2,73	2,68	1,59
GATA2 Stabw.	0,37	3,13	0,34	0,82	1,87	1,01	0,91
<b>Epo</b> MW	0,87	1,60	1,81	0,99	1,72	1,01	2,43
Epo Stabw.	0,78	0,98	0,46	0,31	0,80	0,48	1,90
<b>FLK1</b> MW	1,62	0,63	3,25	1,85	4,92	1,42	1,93
FLK1 Stabw.	1,64	0,38	1,67	0,83	2,49	1,14	1,41
<b>LMO2</b> MW	1,02	1,41	0,87	0,76	1,13	1,09	1,45
LMO2 Stabw.	0,58	0,22	0,13	0,14	0,18	0,47	0,55
<b>Hox B4</b> MW	1,65	0,50	1,96	1,21	1,03	0,65	2,37
Hox B4 Stabw.	1,59	0,23	0,92	0,64	0,00	0,44	1,99
<b>LMO4</b> MW	0,88	0,84	1,00	1,08	0,94	1,01	1,03
LMO4 Stabw.	0,21	0,13	0,15	0,27	0,06	0,19	0,23
<b>Tal1</b> MW	0,89	0,57	1,67	0,92	2,38	0,95	1,86
Tal1 Stabw.	0,76	0,36	0,82	0,52	1,23	0,69	1,42

**Tab. 7.6.3 Versuchsreihe 72-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF**, Hochregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).

MW + Stabw. der 4 Versuche	6+0d +72h	6+5d +72h	6+10d +72h	6+15d +72h	6+20d +72h	6+25d +72h	6+30d +72h
72-stündige Stim., Hochreg.							
<b>PU1</b> MW	2,05	1,20	0,99	0,80	0,64	1,57	1,65
PU1 Stabw.	0,89	0,56	0,45	0,20	0,04	0,39	0,65
<b>CyclinD1</b> MW	0,90	3,35	0,89	1,17	0,77	1,61	0,81
CyclinD1 Stabw.	0,32	4,20	0,15	0,38	0,28	0,58	0,17
<b>GATA2</b> MW	0,98	1,54	0,82	0,73	0,62	2,07	1,14
GATA2 Stabw.	0,45	1,51	0,38	0,27	0,05	2,57	0,77
<b>Epo</b> MW	1,56	0,46	0,97	0,95	1,31	1,04	2,30
Epo Stabw.	0,67	0,15	0,18	0,62	0,72	0,35	2,04
<b>FLK1</b> MW	1,31	0,65	1,26	1,09	0,84	1,56	3,22
FLK1 Stabw.	0,41	0,20	0,85	0,74	0,28	1,21	2,33
<b>LMO2</b> MW	1,38	1,06	0,92	1,05	0,81	1,13	1,00
LMO2 Stabw.	0,34	0,39	0,21	0,20	0,17	0,47	0,37
<b>Hox B4</b> MW	1,54	0,95	1,43	1,53	2,32	0,89	1,92
Hox B4 Stabw.	0,78	0,55	0,73	0,69	1,84	0,12	1,72
<b>LMO4</b> MW	0,99	0,86	0,97	0,75	1,01	1,19	1,25
LMO4 Stabw.	0,15	0,13	0,23	0,20	0,13	0,08	0,44
<b>Tal1</b> MW	1,25	0,81	1,40	1,17	1,62	1,15	3,57
Tal1 Stabw.	0,50	0,33	0,50	0,60	0,77	0,44	2,38

**Tab. 7.6.4 Versuchsreihe 72-stündige Stimulation mit IL-6, IL-3 und SCF**, Runterregulation, aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der 4 Versuche (V, VI, VII, X), Realtime-PCR (s. 2.2.2.4).

MW + Stabw. der 4 Versuche	6+0d +72h	6+5d +72h	6+10d +72h	6+15d +72h	6+20d +72h	6+25d +72h	6+30d +72h
72-stündige Stim., Runterreg.							
<b>PU1</b> MW	0,50	1,16	1,27	1,15	1,71	0,72	0,78
PU1 Stabw.	0,37	0,96	0,56	0,20	0,11	0,16	0,27
<b>CyclinD1</b> MW	1,38	1,41	1,21	1,00	1,07	0,89	1,37
CyclinD1 Stabw.	0,54	0,70	0,11	0,10	0,07	0,19	0,25
<b>GATA2</b> MW	1,28	1,28	1,91	2,04	2,31	1,41	2,50
GATA2 Stabw.	0,54	0,67	1,50	1,32	1,05	0,78	2,69
<b>Epo</b> MW	1,02	2,55	1,24	2,10	1,32	1,33	0,92
Epo Stabw.	0,63	0,29	0,28	0,99	0,71	0,25	0,36
<b>FLK1</b> MW	1,12	2,22	1,76	3,11	1,52	1,18	0,86
FLK1 Stabw.	0,56	0,88	0,82	2,51	0,40	0,38	0,48
<b>LMO2</b> MW	0,83	1,39	1,19	1,00	1,57	1,11	1,26
LMO2 Stabw.	0,21	0,86	0,36	0,19	0,63	0,45	0,68
<b>Hox B4</b> MW	1,11	1,91	1,09	2,67	1,32	1,31	1,12
Hox B4 Stabw.	0,52	0,73	0,51	2,87	1,01	0,22	0,60
<b>LMO4</b> MW	1,04	1,21	1,13	1,45	1,24	0,86	0,94
LMO4 Stabw.	0,15	0,19	0,35	0,49	0,19	0,05	0,30
<b>Tal1</b> MW	1,13	2,07	1,07	1,80	1,48	1,08	0,57
Tal1 Stabw.	0,53	0,71	0,39	1,32	1,34	0,41	0,39

## 7.7 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit Flt3-L (s. 3.1.2.1-3.1.2.9)

**Tab. 7.7.1 Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse**

(s. 2.2.2.4), **Hochregulation.** Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.

Hochreg., kontinuierliche Stim. mit Flt3-L	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
<b>PU1 MW</b>	0,29	1,31	0,44	0,53	1,07	0,64
PU1 Stabw.	0,05	0,18	0,20	0,19	0,58	0,12
<b>CyclinD1 MW</b>	1,21	0,92	0,84	1,03	1,02	1,10
CyclinD1 Stabw.	0,09	0,07	0,00	0,05	0,27	0,07
<b>GATA2 MW</b>	0,97	0,69	0,44	0,88	1,93	1,02
GATA2 Stabw.	0,04	0,01	0,12	0,04	1,01	0,26
<b>EPO MW</b>	0,64	1,59	0,61	1,64	0,64	1,45
EPO Stabw.	0,29	0,47	0,15	0,25	0,29	0,44
<b>Flk1 MW</b>	0,59	2,12	0,30	2,71	1,33	1,61
Flk1 Stabw.	0,14	0,21	0,02	0,16	0,28	0,58
<b>Lmo2 MW</b>	1,32	0,33	0,38	0,48	0,85	0,72
Lmo2 Stabw.	0,02	0,04	0,01	0,08	0,06	0,08
<b>HOXB4 MW</b>	0,40	1,88	0,58	2,68	0,79	1,21
HOXB4 Stabw.	0,14	0,07	0,19	0,04	0,09	0,31
<b>Lmo4 MW</b>	1,04	0,66	0,66	1,06	1,10	0,74
Lmo4 Stabw.	0,03	0,10	0,03	0,05	0,02	0,01
<b>TAL1 MW</b>	0,33	2,09	0,58	2,50	1,03	1,28
TAL1 Stabw.	0,06	0,27	0,32	0,39	0,33	0,14

**Tab. 7.7.2 Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse** (s. 2.2.2.4), **Runterregulation.** Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung

Runterreg., kont. Stim. mit Flt3-L	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
<b>PU1 MW</b>	3,55	0,78	2,84	2,19	1,34	1,62
PU1 Stabw.	0,65	0,11	1,27	0,80	0,73	0,29
<b>CyclinD1 MW</b>	0,83	1,09	1,19	0,97	1,06	0,92
CyclinD1 Stabw.	0,06	0,08	0,00	0,05	0,28	0,06
<b>GATA2 MW</b>	1,03	1,44	2,43	1,13	0,71	1,05
GATA2 Stabw.	0,96	0,27	0,24	0,18	0,37	0,13
<b>EPO MW</b>	1,99	0,69	1,74	0,63	1,97	0,76
EPO Stabw.	0,91	0,20	0,42	0,10	0,89	0,23
<b>Flk1 MW</b>	1,81	0,48	3,30	0,37	0,79	0,71
Flk1 Stabw.	0,44	0,05	0,23	0,02	0,17	0,26
<b>Lmo2 MW</b>	0,76	3,05	2,63	2,14	1,18	1,40
Lmo2 Stabw.	0,01	0,36	0,06	0,36	0,09	0,15
<b>HOXB4 MW</b>	2,84	0,53	1,95	0,37	1,27	0,88
HOXB4 Stabw.	0,97	0,02	0,65	0,01	0,14	0,23
<b>Lmo4 MW</b>	0,96	1,55	1,51	0,95	0,91	1,35
Lmo4 Stabw.	0,03	0,22	0,08	0,05	0,01	0,01
<b>TAL1 MW</b>	3,10	0,49	2,46	0,41	1,08	0,79
TAL1 Stabw.	0,55	0,06	1,35	0,06	0,35	0,08

## 7.8 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit SCF (s. 3.1.2.1-3.1.2.9)

**Tab. 7.8.1 Versuchsreihe kont. Stim. mit SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse**

(s.2.2.2.4), **Hochregulation.** Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.

Hochreg., kont. Stim. mit SCF	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
<b>PU1</b> MW	0,41	1,15	0,78		1,31	0,36
PU1 Stabw.	0,10	0,09	0,22		0,15	0,12
<b>CyclinD1</b> MW	1,00	0,72	0,91		1,00	0,83
CyclinD1 Stabw.	0,02	0,03	0,01		0,02	0,09
<b>GATA2</b> MW	0,33	1,17	1,52		0,88	2,04
GATA2 Stabw.	0,01	0,06	0,44		0,02	0,30
<b>EPO</b> MW	0,55	0,84	0,59		0,79	0,59
EPO Stabw.	0,33	0,06	0,03		0,12	0,20
<b>Flk1</b> MW	0,62	1,07	1,67		0,57	0,57
Flk1 Stabw.	5,11	5,04	4,92		5,29	5,25
<b>Lmo2</b> MW	0,47	2,13	0,67		1,15	0,67
Lmo2 Stabw.	0,02	0,06	0,04		0,03	0,10
<b>HOXB4</b> MW	0,56	0,67	0,82		0,79	0,28
HOXB4 Stabw.	0,04	0,07	0,08		0,19	0,07
<b>Lmo4</b> MW	1,16	0,83	0,73		1,05	0,75
Lmo4 Stabw.	0,03	0,10	0,09		0,13	0,09
<b>TAL1</b> MW	0,47	0,81	0,73		1,16	0,23
TAL1 Stabw.	0,02	0,39	0,30		0,61	0,09

**Tab. 7.8.2 Versuchsreihe kont. Stim. mit SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse**

(s. 2.2.2.4), **Runterregulation.** Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.

Runterreg., kont. Stim. mit SCF	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
<b>PU1</b> MW	2,62	0,87	1,39		0,77	3,11
PU1 Stabw.	0,65	0,07	0,39		0,09	1,01
<b>CyclinD1</b> MW	1,00	1,38	1,10		1,00	1,22
CyclinD1 Stabw.	0,02	0,05	0,02		0,02	0,13
<b>GATA2</b> MW	3,02	0,86	0,72		1,13	0,50
GATA2 Stabw.	0,12	0,04	0,21		0,03	0,07
<b>EPO</b> MW	2,83	1,20	1,70		1,29	1,91
EPO Stabw.	1,70	0,09	0,08		0,20	0,64
<b>Flk1</b> MW	1,74	0,95	0,66		1,89	1,77
Flk1 Stabw.	0,45	0,13	0,20		0,50	0,23
<b>Lmo2</b> MW	2,15	0,47	1,50		0,87	1,53
Lmo2 Stabw.	0,08	0,01	0,10		0,02	0,23
<b>HOXB4</b> MW	1,78	1,51	1,22		1,35	3,87
HOXB4 Stabw.	0,14	0,16	0,11		0,32	0,96
<b>Lmo4</b> MW	0,86	1,22	1,39		0,97	1,36
Lmo4 Stabw.	0,02	0,15	0,17		0,12	0,16
<b>TAL1</b> MW	2,15	1,59	1,65		1,18	5,27
TAL1 Stabw.	0,10	0,76	0,68		0,62	2,09

## 7.9 Versuchsreihe kontinuierliche Stimulation mit Flt3-L und SCF (s. 3.1.2.1-3.1.2.9)

**Tab. 7.9.1 Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L und SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse** (s. 2.2.2.4), **Hochregulation.** Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung.

Hochreg., kont. Stim. mit Flt3- L+SCF	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
<b>PU1</b> MW	0,27	0,47	0,87	0,62	1,11	0,44
PU1 Stabw.	0,05	0,01	0,05	0,12	0,03	0,13
<b>CyclinD1</b> MW	1,63	1,13	1,12	0,82	1,29	0,68
CyclinD1 Stabw.	0,05	0,04	0,03	0,02	0,10	0,07
<b>GATA2</b> MW	0,89	0,92	0,78	1,48	1,88	0,77
GATA2 Stabw.	0,13	0,07	0,06	0,05	0,65	0,02
<b>EPO</b> MW	0,47	0,58	0,87	1,10	1,07	0,90
EPO Stabw.	0,02	0,19	0,13	0,35	0,25	0,28
<b>Flk1</b> MW	0,84	0,95	1,15	0,67	0,90	0,96
Flk1 Stabw.	0,11	0,03	0,05	0,05	0,04	0,22
<b>Lmo2</b> MW	0,95	0,62	0,62	0,61	0,99	0,42
Lmo2 Stabw.	0,05	0,10	0,05	0,15	0,10	0,02
<b>HOXB4</b> MW	0,39	0,79	1,01	0,99	1,14	0,98
HOXB4 Stabw.	0,03	0,08	0,11	0,08	0,08	0,02
<b>Lmo4</b> MW	1,13	0,68	0,74	0,86	1,08	0,71
Lmo4 Stabw.	0,07	0,06	0,20	0,03	0,01	0,17
<b>TAL1</b> MW	0,32	0,83	0,89	1,35	1,00	0,99
TAL1 Stabw.	0,01	0,01	0,23	0,47	0,03	0,15

**Tab. 7.9.2 Versuchsreihe kont. Stim. mit Flt3-L und SCF, Übersicht der mittels Taqman ermittelten Ergebnisse** (s. 2.2.2.4), **Runterregulation.** Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Runterreg., kont. Stim. mit Flt3- L+SCF	3d	6+0d	6+5d	6+10d	6+15d	6+20d
<b>PU1</b> MW	3,82	2,14	1,15	1,67	0,90	2,46
PU1 Stabw.	0,74	0,05	0,07	0,32	0,02	0,70
<b>CyclinD1</b> MW	0,62	0,89	0,89	1,21	0,78	1,49
CyclinD1 Stabw.	0,02	0,03	0,03	0,03	0,06	0,14
<b>GATA2</b> MW	1,15	1,09	1,30	0,68	0,61	1,30
GATA2 Stabw.	0,17	0,08	0,10	0,02	0,21	0,04
<b>EPO</b> MW	2,03	2,58	1,37	1,34	0,66	0,85
EPO Stabw.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
<b>Flk1</b> MW	1,21	1,06	0,87	1,50	1,12	1,10
Flk1 Stabw.	0,16	0,03	0,04	0,10	0,05	0,25
<b>Lmo2</b> MW	1,06	1,65	1,64	1,75	1,02	2,41
Lmo2 Stabw.	0,05	0,27	0,13	0,44	0,10	0,12
<b>HOXB4</b> MW	2,58	1,28	1,00	1,02	0,88	1,02
HOXB4 Stabw.	0,19	0,13	0,11	0,08	0,06	0,02
<b>Lmo4</b> MW	0,89	1,49	1,46	1,17	0,93	1,48
Lmo4 Stabw.	0,06	0,14	0,40	0,04	0,01	0,35
<b>TAL1</b> MW	3,09	1,21	1,20	0,85	1,00	1,04
TAL1 Stabw.	0,10	0,01	0,31	0,29	0,03	0,15

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. S. Peters, hämatologische Abteilung der Medizinischen Klinik I, Universität Lübeck, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die wertvolle Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit sowie für die Überlassung des interessanten Themas.

Prof. Dr. T. Wagner für die Bereitstellung der Räumlichkeiten sowie der Labormaterialien.

Frau Dr. rer. nat. S. Stölting, der ich zutiefst dafür dankbar bin, dass sie diese Zeit zu einer erfahrungsreichen, persönlich prägenden und unvergesslichen Zeit hat werden lassen. Es war mir eine Ehre unter ihrer motivierenden und stetig unterstützenden Anleitung arbeiten zu dürfen.

Allen Labormitgliedern für die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Hilfestellungen. Insbesondere möchte ich hier Frau Kauderer und Frau Albrecht erwähnen, die mir jederzeit geduldig und konstruktiv bei meiner alltäglichen Laborarbeit zur Seite standen und im Speziellen bei der Entstehung der Taqman Daten wertvolle Arbeit geleistet haben.

Meinen Freunden Lena Dörries, Fernando Ruiz und Cora Nickels für die geduldige, verlässliche Begleitung in dieser Zeit.

Meiner Familie für die stete Unterstützung und Ermutigung über die Jahre.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Mareike Middeke  
Geburtsdatum: 09.01.1982  
Geburtsort: Herdecke  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1988-1992 Grundschole, Kachtenhausen  
1992-1998 Gymnasium, Lage  
1998-2001 Marianne-Weber Gymnasium, Lemgo  
2001 Abitur

### Hochschulbildung

Okt. 2001-Sept. 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Rostock  
Okt. 2003-Juni 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
  
Sept. 2003 Ärztliche Vorprüfung  
Mai 2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Studienbegleitende Tätigkeiten

#### Krankenpflegepraktikum

März 2002 Klinikum Lippe-Lemgo  
Aug. 2002 Weston Park Hospital, Sheffield, England  
Sept. 2002 St. Luke's Hospice, Sheffield, England

#### Famulaturen

März 2004 Innere Medizin, Klinikum Donauwörth  
Juli/Aug. 2004 Petermac Callum Cancer Center, Melbourne/Australien  
März 2005 Kardiologische Praxis, Lübeck  
Sept. 2005 Chirurgische Ambulanz, Universitätsklinikum Lübeck  
März 2006 Unfallchirurgie, Klinikum Lippe-Detmold

**Praktisches Jahr**

Aug.-Dez. 2006 Gynäkologie, Universitätsklinikum Lübeck  
Dez.-März 2007 Chirurgie, St. Helier Hospital, Lehrkrankenhaus der St. George  
Universität, London/England  
April-Juli 2007 Innere Medizin, Universitätsklinikum Reykjavik/Island

**Ärztliche Tätigkeiten**

seit Juli 2008 Assistenzärztin, Hämatologie/ Onkologie, Med. Klinik II  
Klinikum Lippe Lemgo

**Fremdsprachen**

Englisch fließend  
Spanisch gut  
Französisch ausreichend

**Zertifikat**

IPOKRATES-Seminar „Internal Medicine“, Innsbruck/Österreich,  
Juli 2006

**Promotion**

Experimentelle Durchführung: Nov. 2004 bis Dez. 2005  
Betreuung: PD Dr. med. S.O. Peters, Medizinische Klinik I,  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck  
Thema: Einfluss hämatopoetischer Zytokine auf die Genregulation  
muriner embryonaler E14 Stammzellen