

# Funktionelle Untersuchung der Zellschicksalsdeterminante numb

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von  
Gregor von Levetzow  
aus Köln  
Juni 2008

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Müschen  
Koreferent: Prof. Prof *h.c.* Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2008

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Stammzellen</b> .....	1
<b>1.2 Hämatopoietische Stammzellen und Hämatopoiese</b> .....	2
1.2.1 Der embryonale Ursprung der HSZ.....	2
1.2.2 Hämatopoietische Stammzellen.....	2
1.2.3 Der Phänotyp humaner Stamm- und Vorläuferzellen.....	4
1.2.4 HSZ Quellen.....	5
<b>1.3 Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen</b> ..	5
1.3.2 Stammzellnische.....	6
1.3.3 Asymmetrische Zellteilung in hämatopoietischen Stammzellen.....	7
1.3.3 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoiese.....	8
<b>1.4 Der Notch-Signalweg in der Hämatopoiese</b> .....	10
<b>1.6 Die Zellschicksalsdeterminate numb</b> .....	13
<b>1.7 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	17
<b>2.1 Methoden der Zellkultur</b> .....	17
2.1.1 Zellkulturmedien.....	17
2.1.2 Zelllinien.....	19
2.1.3 Isolation von CD34 <sup>+</sup> -Zellen aus Nabelschnurrestblut.....	20
2.1.4 Transfektion primärer CD34 <sup>+</sup> -Zellen aus Nabelschnurrestblut durch Nucleofection.....	22
2.1.5 Virusproduktion.....	22
2.1.6 Transduktion von humanen CD34 <sup>+</sup> -Zellen.....	24
2.1.7 Präparation der AFT024 Platten für LTC-IC Analysen.....	24
<b>2.2 Funktionelle Analysen in der Zellkultur</b> .....	25
2.2.1 Colony-Forming-Unit (CFU-)GEMM Ansatz.....	25
2.2.2 Der LTC-IC Ansatz.....	26
<b>2.3 Methoden der Durchflusszytometrie</b> .....	27
2.3.1 Färben von Zellen mit konjugierten Antikörpern.....	28
<b>2.4 Molekularbiologische Methoden</b> .....	29
2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.4.2 Standard PCR.....	29
2.4.3 Advantage Taq.....	29
2.4.4 Phusion Taq.....	29
2.4.5 Kolonien PCR.....	30
2.4.6 Quantitative PCR.....	30
2.4.7 Gelelektrophorese.....	32
2.4.8 Aufreinigung und Klonierung von PCR-Produkten.....	32
2.4.8.1 T4-DNA-Polymerase und Polynukleotid-Kinase Behandlung.....	32
2.4.8.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten bzw. enzymatisch gespaltener DNA aus Agarosegelen.....	33
2.4.8.3 Ligation von DNA Fragmenten.....	33
2.4.9 Transformation elektrokompenter Zellen.....	33
2.4.10 Kulturverfahren für Escherichia coli.....	34
2.4.11 Isolierung von Plasmid DNA (Minipräparation).....	34
2.4.12 Isolierung von Plasmid DNA (Maxipräparation).....	34
2.4.13 Enzymatische Sequenzierung.....	35
2.4.14 Enzymatische Spaltung von Plasmid DNA.....	35
2.4.15 Phenol-Chloroform Extraktion.....	35
2.4.16 Dephosphorylierung geschnittener Plasmide.....	35

2.4.17 Isolation von Gesamt-RNA mit TRIzol .....	36
2.4.18 Isolation von Gesamt-RNA mit NucleoSpin RNA II .....	36
2.4.19 Entfernen von genomischer DNA durch DNase Reaktion .....	37
2.4.20 Reverse Transkription .....	37
2.4.22 DNA und RNA Oligonukleotide .....	38
2.6 Material und Chemikalien .....	41
3 Ergebnisse .....	42
3.1 Komplexe Genexpressionsanalysen und Suche nach Kandidatengenomen .....	42
3.1.1 Verifizierung der komplexen Genexpressionsanalysen .....	44
3.1.2 Klonierung von Kandidatengenomen in Expressionsvektor pIRES-EGFP .....	46
3.2 Etablierung und Optimierung der Nucleofectionsprotokolls für frisch isolierte CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	48
3.3 Überexpression der klonierten Kandidatengene in frisch isolierten CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	50
3.3.1 Auswirkungen der Überexpression der klonierten Kandidatengene auf das Zellschicksal später Vorläuferzellen .....	51
3.3.2 Auswirkungen der Überexpression der klonierten Kandidatengene auf das Zellschicksal früher Vorläuferzellen .....	54
3.3.3 Etablierung eines lentiviralen Gentransfers zur Überexpression der klonierten Kandidatengene in CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	56
3.4 Untersuchung der Zellschicksalsdeterminante numb in CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	59
3.4.1 Nachweis der Expression von numb sowie Komponenten des Notch-Signalwegs in CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	59
3.4.2 Nachweis von Numb-Protein in humanen CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	62
3.4.3 Lokalisation der verschiedenen numb-Isoformen in CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	64
3.4.4 Überexpression von numb in CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	65
3.4.5 Auswirkung der Überexpression von numb und Notch auf späte Progenitoren .....	66
3.4.6 Auswirkung der Überexpression von numb und Notch auf frühe Progenitoren .....	69
3.4.7 Ausschalten der numb Funktion mittels RNAi .....	70
3.4.8 Ausschalten der numb Funktion in CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	71
3.4.5 Auswirkung der von numb RNAi auf späte Progenitoren .....	73
3.4.5 Interaktion von numb und Notch .....	77
4 Diskussion .....	79
4.1 Verwendete Techniken .....	79
4.2 Funktionelle Analyse stammzellspezifisch exprimierter Faktoren .....	83
4.3 Funktionelle Analyse der Zellschicksalsdeterminante numb .....	88
5 Zusammenfassung .....	94
6 Literatur .....	96
7 Anhang .....	107
7.1 Numb isoformspezifische PCRs .....	107
7.2 Plasmidkarten .....	107
8. Lebenslauf .....	107
9 Danksagung .....	107

# 1 Einleitung

## 1.1 Stammzellen

Stammzellen werden als undifferenzierte Zellen, die sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, jedoch auch in der Lage sind Vorläuferzellen hervorzubringen, die sich anschließend in hoch spezialisierte Zellen weiterentwickeln, definiert. Prinzipiell lassen sich Stammzellen in zwei Kategorien einteilen: die embryonalen Stammzellen, sowie die somatischen bzw. adulten Stammzellen. Bei den embryonalen Stammzellen (ESZ) handelt es sich um Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste des frühen Säugerembryos entnommen werden. Diese können unter definierten Bedingungen über viele Passagen *in vitro* kultiviert und in Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden (Evans und Kaufman 1981; Thomson et al. 1998; Amit et al. 2000; Kurosawa 2007). Die ESZ stellen somit ontogenetisch sehr frühe Zelltypen dar, die jedoch in der normalen Entwicklung eines Organismus nur über einen sehr kurzen Zeitraum vorhanden sind. Somit spielen ESZ in der späteren Entwicklung bzw. bei der Aufrechterhaltung der Homöostase eines adulten Organismus keine Rolle mehr.

Ein multizellulärer Organismus muss jedoch über seine gesamte Lebensspanne in der Lage sein, hoch spezialisierte Zellen, die auf Grund von Alterung oder aufgrund pathogener Einflüsse verloren gegangen sind, in verschiedenen Geweben zu ersetzen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellverluste von somatischen Stammzellen kompensiert werden, die durch Zellteilung spezifizierte Vorläuferzellen hervorbringen und somit das Gewebe regenerieren. Verringert sich der Gehalt von Stammzellen innerhalb eines Gewebes, wie z.B. während der Alterung, so wird dessen Fähigkeit zur Regeneration reduziert, und kann somit im Extremfall zur vollständigen Degeneration des Gewebes führen (Taupin und Gage 2002; Anversa 2005; Wagers und Conboy 2005; Kamminga und de Haan 2006). Jedoch zeigt auch eine unkontrollierte Expansion von Stammzellen ähnlich dramatische Auswirkungen auf das Überleben des Organismus. So mehren sich die Hinweise, dass bestimmte Krebserkrankungen auf die unkontrollierte Expansion stammzellartiger Zellen zurückzuführen sind (Reya et al. 2001; Beachy et al. 2004; Al-Hajj 2007). Hieraus ergibt sich eine fundamentale Frage in der Stammzellbiologie: Welche Mechanismen regulieren die Häufigkeit der Teilung von Stammzellen und wie wird das weitere Zellschicksal der entstehenden Tochterzellen im Weiteren spezifiziert?

## 1.2 Hämatopoietische Stammzellen und Hämatopoiese

### 1.2.1 Der embryonale Ursprung der HSZ

Während der embryonalen Entwicklung werden die ersten nachweisbaren hämatopoietischen Zellen in Blutinseln innerhalb des Dottersacks (Moore und Metcalf 1970), sowie in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) -Region (Medvinsky et al. 1993; Medvinsky und Dzierzak 1996; Dzierzak 2005) gebildet. Im Zuge der Entwicklung wandern diese Zellen in die fötale Leber sowie in die Plazenta (Dzierzak 2005; Mikkola et al. 2005), den Hauptorten der pränatalen Hämatopoiese, ein. Erst kurz vor der Geburt besiedeln die Zellen schließlich das Knochenmark, den Ort der adulten Hämatopoiese (Durand und Dzierzak 2005).

### 1.2.2 Hämatopoietische Stammzellen

Hämatopoietische Stammzellen (HSZ) sind gewebespezifische, adulte Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sämtliche Zellen des blutbildenden Systems hervorzubringen (Weissman 2000; Kondo et al. 2003; Bellantuono 2004). Bereits in den 1950er Jahren konnte gezeigt werden, dass bestrahlte Mäuse durch Knochenmarktransplantationen überleben konnten (Jacobson 1951; Lorenz et al. 1951). Die ersten Hinweise auf multipotente, hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen klonogenen Ursprungs innerhalb der Zellen des Knochenmarks wurden schließlich in den 1960er Jahren erbracht, indem durch die Injektion von Knochenmarkzellen in die Milz lethal bestrahlter Mäuse die Bildung von myelo-erythroiden Kolonien (*spleen colony forming unit*, CFU-S) induziert werden konnte (Till und Mc 1961; Becker et al. 1963). Weitere Versuche zeigten, dass sich manche der gebildeten Kolonien sekundär transplantieren ließen (Siminovitch et al. 1963). In den folgenden Jahren konnte durch verbesserte Transplantationsmodelle schließlich der Phänotyp der murinen HSZ weitestgehend charakterisiert werden (Spangrude et al. 1988; Spangrude und Scollay 1990; Morrison und Weissman 1994; Kondo et al. 2003).

Da im humanen System derartige Transplantationsversuche aus ethischen Gründen undenkbar sind, wurden verschiedene Surrogat-Analyseverfahren entwickelt, die eine Beurteilung des Stammzellpotentials verschiedener humaner hämatopoietischer Zellfraktionen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ermöglichen.

Um das Stammzellpotential *in vivo* analysieren zu können, werden xeno-Transplantationen in verschiedenen Tiermodellen benutzt. Es zeigte sich, dass humane HSZ auch im Tiermodell in der Lage sind, vom peripheren Blut aus in das Knochenmark des Empfängertieres einzuwandern und von dort aus Aspekte eines humanen hämatopoietischen Systems ausbilden (Kamel-Reid und Dick 1988; Lapidot et al. 1992; Zanjani et al. 1992; Larochelle et al. 1996; Dick et al. 1997; Iscove und Nawa 1997). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte Zellen des humanen Knochenmarks die Fähigkeit besitzen, das Knochenmark bestrahlter immundefizienter NOD/SCID (*nonobese-diabetes/severe-combined-immunedeficiency*) Mäuse zu besiedeln und dort große Mengen von Vorläufer- sowie ausdifferenzierten Blutzellen zu produzieren (Larochelle et al. 1996). In NOD/SCID transplantierte humane HSZ sind anschließend in der Lage, in dem Empfängerorganismus zu expandieren und lassen sich im Weiteren sequenziell transplantieren (Iscove und Nawa 1997).

Für *in vitro* Analysen des Stammzellpotentials wurden verschiedene Zellkultursysteme entwickelt. Ein gängiges Analysesystem, um die Linienspezifizierung später myeloischer Vorläuferzellen, zu untersuchen, ist der CFU-GEMM Ansatz. Hierfür wird eine definierte Menge hämatopoietischer Zellen in ein semisolid Medium überführt und über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen kultiviert. Anschließend wird die Frequenz sowie der Typ der gebildeten Kolonien bestimmt.

Um *in vitro* retrospektiv den Gehalt an frühen myeloischen Vorläuferzellen innerhalb einer Zellpopulation bestimmen zu können, wird in der Regel der LTC-IC (*long term culture-initiating cell*) Ansatz verwendet. Hiefür werden die zu untersuchenden Zellen auf einer unterstützenden Stromazelllinie über fünf Wochen kultiviert. Danach wird durch die Zugabe von Zytokinen die myeloische Differenzierung der Zellen angeregt und die Frequenz der entstanden Kolonien bestimmt (Sutherland et al. 1990). Beide beschriebenen Methoden beschränken sich jedoch nur auf das myeloische Entwicklungspotential der untersuchten Zellen. Für die Untersuchung des lymphoiden Entwicklungspotentials existiert der NK-IC (*natural killer-initiating cell*). Hierbei werden Zellen in Gegenwart von Zytokinen kultiviert, die die Entwicklung von Natürlichen Killerzellen stimulieren. Zellen, die über die Kulturzeit ein lymphoides Schicksal behielten, bilden Kolonien, die aus NK-Zellen bestehen (Miller et al. 1992; Miller et al. 1994; Punzel et al. 1999).

Eine Kombination aus LTC-IC und NK-IC bildet der ML-IC (*myeloid-lymphoid initiating cell*) Ansatz, mit dessen Hilfe sich bislang die frühesten hämatopoietischen Zellen *in vitro* detektieren lassen (Punzel et al. 1999; Giebel et al. 2006).

### 1.2.3 Der Phänotyp humaner Stamm- und Vorläuferzellen

Analysen verschiedener hämatopoietischer Zellpopulationen ergaben, dass der überwiegende Anteil der Zellen, die nach einer xenogenen Transplantation in das Knochenmark des Empfängertiers einwandern, den Oberflächenmarker CD34 exprimieren. Diese Zellen zeigen außerdem keinerlei Expression linienspezifischer Oberflächenmarker (*lineage negativ*,  $lin^-$ ) und sind negativ bzw. nur gering positiv bezüglich der Expression des Oberflächenmarkers CD38 (Civin et al. 1996; Bhatia et al. 1997). Der Phänotyp dieser Zellen ist also  $lin^-CD34^+CD38^{low/-}$ . Hierbei handelt es sich jedoch um eine sehr kleine Zellpopulation innerhalb der  $CD34^+$  Zellen, die wiederum selbst auch eine große Heterogenität bezüglich ihres Zellschicksals zeigt nur ein geringer Teil dieser Zellen weist tatsächlich Stammzellcharakter auf. Kürzlich konnte diese Population durch die Analyse zusätzlicher Oberflächenmarker (CD90 sowie CD45RA) weiter bezüglich ihres Entwicklungspotentials unterteilt werden (Majeti et al. 2007).

Ein großer Teil der  $CD34^+$  Zellen ist außerdem positiv für das Oberflächenmolekül CD133 (Yin et al. 1997). CD133 wird auch von einer Vielzahl anderer gewebespezifischer Stammzellen exprimiert (Shmelkov et al. 2005). Durch Transplantationsexperimente konnte gezeigt werden, dass  $CD34^+CD133^+$ -Zellen im Gegensatz zu  $CD34^+CD133^-$ -Zellen die Fähigkeit besitzen in NOD/SCID-Mäusen ein hämatopoietisches System über einen längeren Zeitraum zu rekonstituieren (Gallacher et al. 2000).

Trotz der Tatsache, dass HSZ mittlerweile seit fast sechzig Jahren Gegenstand der Forschung sind und sie bislang die einzigen Stammzellen darstellen, die routinemäßig in der Medizin eingesetzt werden, bleiben viele Fragen bis *dato* ungeklärt. So ist es bis heute nicht möglich, humane hämatopoietische Stammzellen als solche zu isolieren und über einen längeren Zeitraum undifferenziert zu kultivieren, da ihr Phänotyp und die Bedingungen, die einen Stammzellerhalt ermöglichen, noch nicht eindeutig aufgeklärt sind.

### 1.2.4 HSZ-Quellen

Lange Zeit stand ausschließlich Knochenmark als Quelle für hämatopoietische Stammzellen zur Verfügung, da die unter normalen Bedingungen im peripheren Blut vorhandenen HSZ für therapeutische Anwendungen nicht ausreichend waren. Durch Applikation von *Granulozyten Kolonie stimulierendem Faktor* (G-CSF – *granulocyte colony stimulating factor*) können HSZ veranlasst werden aus dem Knochenmark ins periphere Blut zu wandern (Duhrsen et al. 1988; Nervi et al. 2006). Diese Zellen können nun mittels Apherese aus dem peripheren Blut gesammelt und für medizinische Zwecke benutzt werden. Des Weiteren lassen sich HSZ auch aus Nabelschnurrestblut von Neugeborenen gewinnen. Der recht hohe Anteil primitiver hämatopoietischer Zellen (CD34<sup>+</sup>-Zellen) im Nabelschnurrestblut von bis zu 2% ist wahrscheinlich auf die Migration der HSZ von der fötalen Leber, ins Knochenmark zum Zeitpunkt der Geburt zurückzuführen (Durand und Dzierzak 2005). Zwar ist die Anzahl der HSZ im Nabelschnurrestblut im Vergleich zu Knochenmark oder Apheresat relativ begrenzt (Hofmeister et al. 2007), jedoch zeigen HSZ aus Nabelschnurrestblut im Vergleich zu den ontogenetisch älteren Quellen eine gesteigerte Aktivität und höhere Immunverträglichkeit (Lewis und Verfaillie 2000; Hofmeister et al. 2007).

Alle aufgeführten Quellen eignen sich für den klinischen Einsatz und können Patienten, deren hämatopoietisches System durch myeloablative Therapie zerstört wurde, rekonstituieren (Korbling und Anderlini 2001).

Heutzutage werden HSZ meist mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD34 (Civin et al. 1984; Katz et al. 1985; Andrews et al. 1986) angereichert. Hierbei handelt es sich jedoch, wie bereits oben erwähnt, um eine sehr heterogene Zellpopulation, die vor allem Vorläuferzellen, mit eingeschränktem Entwicklungs- wie Repopulationspotential, enthält. Deshalb umschreibt der Marker CD34 eher eine Population von primitiven hämatopoietischen Zellen, die sowohl aus Stamm- als auch Vorläuferzellen besteht.

Weitere Quellen aus denen sich HSZ isolieren lassen, sind die fötale Leber sowie die Plazenta (Dzierzak 2005; Mikkola et al. 2005).

### 1.3 Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen

Prinzipiell gibt es unterschiedliche Strategien, mit denen sich die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung steuern lässt. In einem Extremfall könnten

Stammzellen durch invariante asymmetrische Zellteilungen eine Tochterzelle hervorbringen, die weiter spezifiziert ist, während die andere Tochterzelle die Stammzeleigenschaften beibehält (Wodarz und Huttner 2003). Solche Teilungsmechanismen würden ausschließlich durch intrinsische Faktoren gesteuert. In einem anderen Extremfall könnten sich alle Stammzellen symmetrisch teilen. Die Entscheidung, ob sich die Tochterzellen als Stammzellen erhalten oder zu weiter spezifizierten Vorläuferzellen entwickeln, hinge ausschließlich von äußeren, regulativen Faktoren ab. Sind für den Stammzellerhalt bestimmte Signal-Kombinationen erforderlich, die räumlich begrenzt vorkommen, bezeichnet man entsprechende Orte als Stammzellnischen (Ohlstein et al. 2004).

Unabhängig davon, ob das Zellschicksal von Stammzellen und ihren Tochterzellen durch intrinsische oder extrinsische Faktoren oder aus einer Kombination von beiden gesteuert wird, lässt sich postulieren, dass diese Mechanismen u. a. die Aktivität von Transkriptionsfaktoren modulieren, die in Abhängig ihrer Aktivität wiederum essentiell das Zellschicksal von Stammzellen und ihren Abkömmlingen beeinflussen.

### 1.3.2 Stammzellnische

Da HSZ, wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, *in vivo* die Fähigkeit zur Expansion besitzen, wurden verschiedene Versuche unternommen, HSZ auch *in vitro* zu vermehren. Es zeigte sich jedoch, dass primitive hämatopoietische Zellen zwar in Stromazell-freien Kulturen zunächst geringfügig expandieren können, jedoch mit weiterer Kultivierung ihre Stammzellcharakteristika verlieren (Bhatia et al. 1997; Conneally et al. 1997). Kultiviert man HSZ hingegen auf bestrahlten Stromazellen, wie in Abschnitt 1.2.2 erörtert, so behalten sie über einen längeren Zeitraum ihren primitiven Zustand bei (Moore et al. 1997; Punzel et al. 1999; Shih et al. 1999). Hieraus wird ersichtlich, dass anscheinend die Umgebung, in der sich die HSZ befinden, eine entscheidende Rolle für den Stammzellerhalt spielt.

Bereits 1978 wurde von Raymond Schofield die HSZ-Nische postuliert (Schofield 1978). Die meisten Erkenntnisse, die über Stammzellnischen bislang erlangt wurden, gehen auf Untersuchungen der Entwicklung der Keimbahnstammzellen des Germariums von *Drosophila melanogaster* zurück. Hierbei sind direkte physikalische Interaktionen der Zellen mit der Nische für das Zellschicksal späterer Zellschicksale verantwortlich. Auf Grund des geringen Platzes ist immer nur eine Zelle in direktem Kontakt mit der Nische und wird durch Signale dieser an der Differenzierung gehindert. Teilt sich die Stammzelle,

so verliert eine Tochterzelle den Kontakt zu der Nische und beginnt sich zu differenzieren, da sie nun nicht mehr die stammzellerhaltenden Signale aus der Nische erhält (Spradling et al. 2001; Lin 2002). In den vergangenen Jahren konnte tatsächlich die Existenz von HSZ-Nischen im Endosteum des Knochenmarks, dem Knochenmark selbst, sowie auch in der Umgebung der sinusoidalen Endothelzellen in der Milz nachgewiesen werden (Calvi et al. 2003; Zhang et al. 2003; Kiel et al. 2005). Es zeigte sich, dass die Aktivierung der Rezeptortyrosin-Kinase Tie2 durch das von Osteoblasten gebildete Angiopoietin-1 sowie die Aktivierung des Notch-Signalwegs in den HSZ entscheidend für den Stammzellerhalt in der Nische sind (Calvi et al. 2003; Arai et al. 2004; Arai et al. 2005; Calvi 2006).

### 1.3.3 Asymmetrische Zellteilung in hämatopoietischen Stammzellen

Erste Hinweise, dass sich primitive hämatopoietische Zellen asymmetrisch teilen können, ergaben Versuche, die von der Gruppe um Makio Ogawa unternommen wurden. In den durchgeführten Versuchen wurden primitive hämatopoietische Zellen direkt nach ihrer Teilung durch Mikromanipulation voneinander getrennt und anschließend unter gleichen Bedingungen weiterkultiviert. Hierbei zeigte es sich, dass diese Zellen teilweise Kolonien unterschiedlicher Größe und Linienzusammensetzung hervorbringen konnten, was damals als Resultat von stochastischen Entscheidungsprozessen interpretiert wurde (Suda et al. 1984; Suda et al. 1984; Leary et al. 1985). Später konnten Mayani et al. zeigen, dass sich Tochterzellen einer Zellpopulation, in der multipotente Vorläuferzellen stark angereichert sind, unterschiedliche Zellschicksale unabhängig von den im Medium bereitgestellten Zytokinen realisieren können. Die Autoren interpretierten dies auch als eine Folge von stochastisch gesteuerten, asymmetrischen Zellteilungen (Mayani et al. 1993). Brummendorf und Kollegen konnten schließlich zeigen, dass sich die Proliferationskinetik der Zellen innerhalb der  $lin^-CD34^+CD38^{low/-}$ -Population in sich langsam teilende und sich schnell teilende Zellen aufspalten ließ. Es zeigte sich, dass Zellen mit einer langsameren Zellteilungsrate ein primitiveres Zellschicksal aufweisen, als Zellen mit einer hohen Proliferationskinetik. Des Weiteren konnten sich auch die Nachkommen einer einzelnen  $CD34^+CD38^{low/-}$ -Zelle bezüglich ihrer Proliferationskinetik voneinander unterscheiden (Brummendorf et al. 1998). Da die Kultivierungsbedingungen in den Versuchen konstant gehalten wurden, folgerten die Autoren, dass das unterschiedliche Zellschicksal auf die unterschiedliche Verteilung von intrinsischen Determinanten zurückzuführen ist, ähnlich wie bei asymmetrischen Zellteilungen in Modellorganismen (z.B. *Drosophila melanogaster*) (Brummendorf et al. 1998). In weiteren Versuchen wurde die Proliferation

von  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen aus verschiedenen HSZ-Quellen untersucht. Für die Experimente wurde der Farbstoff PKH2, der in die Zellmembran interkaliert und bei Zellteilungen gleichmäßig auf Tochterzellen verteilt wird, benutzt. Hierdurch konnten Huang et al. zeigen, dass die erste Zellteilung in Abhängigkeit der verwendeten Zytokine in einem Zeitraum zwischen 36-38 bzw. 48-50 Stunden lag. Die daraus resultierenden Tochterzellen konnten sich wiederum bezüglich ihrer Proliferationskinetik unterscheiden, was auch hier als das Resultat von asymmetrischen Zellteilungen, bei denen intrinsische Determinanten unterschiedlich auf die Tochterzellen verteilt werden, gedeutet wurde (Huang et al. 1999). In weiterführenden Versuchen wurden die Zellschicksale von  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$  nach der initialen Zellteilung auf Einzelzellebene untersucht. Hierbei zeigte es sich, dass primitivere hämatopoietische Zellen unabhängig von den verwendeten Zytokinen eine langsame Teilungskinetik sowie eine höhere Anzahl asynchroner Zellteilungen aufweisen als reifere Zellen (Punzel et al. 2002). In darauf aufbauenden Experimenten konnte schließlich gezeigt werden, dass 80% der primitivsten *in vitro* detektierbaren hämatopoietischen Zellen, die sowohl myeloische als auch lymphoide Zellen hervorbringen können, unterschiedlich spezifizierte Tochterzellen hervorbringen (Giebel et al. 2006). Von den als ML-IC bezeichneten Zellen übernahm jeweils nur eine Tochterzelle das gesamte ursprüngliche Entwicklungspotential, während die andere Tochterzelle nur einen Teil dessen realisieren konnte. Dies könnte einerseits aus einer asymmetrischen Zellteilung resultieren, jedoch kann dieser Unterschied auch durch das Phänomen der lateralen Inhibition, erklärt werden. Hierbei hindert die eine Zelle durch ein Signal, z.B. durch die Aktivierung eines Rezeptors, die andere Zelle ein bestimmtes Zellschicksal zu realisieren (Lewis 1998).

### 1.3.3 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese

Viele der heute bekannten Transkriptionsfaktoren, die an der Spezifizierung bzw. der Selbsterneuerung von primitiven hämatopoietischen Zellen, also hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt sind, wurden zunächst in verschiedenen Leukämien als Proteine identifiziert, deren abberante Expression (häufig bedingt durch chromosomale Translokationen), wesentlich zur Leukämieentstehung beitragen. Hierzu zählen die Transkriptionsfaktoren SCL/Tal-1 (Lecuyer und Hoang 2004), Runx1/AML1 (Yamagata et al. 2005), GATA-2 (Wieser et al. 2000), Evi-1 (Jolkowska und Witt 2000), sowie

verschiedene Mitglieder der Hox-Familie (Abramovich und Humphries 2005; Abramovich et al. 2005).

SCL besitzt eine wichtige Rolle in der frühen Hämatopoiese. SCL/TAL-1 *Knock out*-Mäuse sind bereits embryonal lethal und weisen keinerlei primitive hämatopoietische Zellen auf (Robb et al. 1995; Shivdasani et al. 1995; Robb et al. 1996). Auch wenn diese Versuche auf eine essentielle Funktion von SCL in der Hämatopoiese bzw. der Entwicklung eines hämatopoietischen Systems hinweisen, so ist die eigentliche Funktion noch nicht eindeutig aufgelärt.

Ursprünglich wurde Runx/AML1 als Gen identifiziert, welches nach einer Translokation akute myeloische Leukämie hervorruft (Miyoshi et al. 1991; Ohki 1993). Weitere Studien zeigten, dass Runx/AML1 entscheidend für die endgültige Hämatopoiese ist. So sind Runx/AML1 defiziente Mäuse embryonal lethal und weisen keinerlei Hämatopoiese in der fötalen Leber auf (Okuda et al. 1996; Wang et al. 1996). Im Gegensatz dazu ist die primitive Hämatopoiese in Runx/AML1 defizienten Tieren nicht betroffen (Okuda et al. 1996). Im späteren Verlauf der Hämatopoiese ist Runx/AML1 an der Differenzierung von T-Zellen beteiligt (Hayashi et al. 2000; Hayashi et al. 2001).

Außer SCL/TAL-1 erfüllt auch GATA-2 grundlegende Funktionen beim Erhalt der hämatopoietischen Stammzellen. So konnten Göttgens *et al.* zeigen, dass im Enhancerbereich des SCL/TAL-1 Gens mehrere Bindestellen für GATA-2 vorhanden sind, die essentiell für die Expression von SCL sind. Zusammen mit anderen, für die Hämatopoiese relevanten, Transkriptionsfaktoren, Fli-1 und Elf-1, stimuliert GATA-2 die SCL-Expression in frühen hämatopoietischen Zellen und etabliert somit ein transkriptionelles Programm, dass für die HSC Entwicklung essentiell ist (Gottgens et al. 2002). Weitere Hinweise darauf, dass GATA-2 eine wichtige Aufgabe im hämatopoietischen System spielt, zeigen Versuche an *knock out* Mäusen. GATA-2 *knock out* Mäuse sind wie auch SCL/TAL-1 *knock out* Mäuse bereits embryonal lethal und weisen Anämien auf (Tsai et al. 1994).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, Evi-1, wurde zunächst als Locus einer retroviralen Integrationsstelle identifiziert, die bei Mäusen myeloide Tumoren hervorruft (Mucenski et al. 1988). In hämatopoietischen Zellen wird Evi-1 schwach in frühen myelischen Zellen exprimiert, jedoch ist die Expression im promyeloischen Stadium stark erhöht (Lopingco und Perkins 1996). Eine verstärkte Expression von Evi-1 verhindert die terminale Differenzierung von Progenitoren zu Granulozyten (Morishita et al. 1992) und Erythrozyten (Kreider et al. 1993).

Eine wichtige Funktion in der Hämatopoiese spielen außerdem Transkriptionsfaktoren der Hox-Familie. Hox-Gene bilden eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in der Evolution hoch konserviert sind (Deschamps und van Nes 2005; Hoegg und Meyer 2005). Sie sind maßgeblich an der Musterbildung und Organogenese im Embryo beteiligt (McGinnis und Krumlauf 1992; Wolpert 1994). Es existieren 39 verschiedene Hox-Gene im Menschen, die in vier Clustern (A,B,C,D) im Genom angeordnet sind (Hoegg und Meyer 2005). Während der Embryogenese werden die Hox-Gene in einer räumlich und zeitlich festgelegten Reihenfolge exprimiert, die ihrer relativen Anordnung auf den Chromosomen entspricht (Kmita und Duboule 2003). Eine Beteiligung der Hox-Gene an der Hämatopoiese konnte durch Studien erbracht werden, die zeigten, dass die Expression verschiedener Hox-Gene während der Entwicklung der hämatopoietischen Stammzellen variiert (Zhu et al. 2003). Auch mehren sich die Hinweise, dass in bestimmten Leukämieformen verschiedene Hox-Gene abberant exprimiert werden (Abramovich und Humphries 2005; Abramovich et al. 2005). Für HoxB4 wurde als erstes der Hox-Gene gezeigt, dass eine Überexpression zu einer Expansion der Stammzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führt (Sauvageau et al. 1995). Die Expression von HoxB4 verschwindet mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zellen. Es konnte im Weiteren gezeigt werden, dass Zellen, die HoxB4 überexprimieren, in Transplantationsexperimenten gegenüber Wildtypzellen einen Vorteil bezüglich ihres Repopulationsverhaltens haben (Thorsteinsdottir et al. 1999). Außer HoxB4 konnten noch für HoxA9 und HoxA10 wichtige Funktionen bei Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen gezeigt werden (Ferrell et al. 2005). Die Expression der Hox-Gene bzw. die Aktivierung und Reprimierung der verschiedenen HOX-Cluster wird u.a. durch Polycomb und Trithorax-Gene reguliert (Saha et al. 1998; Deschamps et al. 1999). Es zeigte sich, dass häufig durch Translokationen abberant exprimierte Mitglieder der beiden Familien, insbesondere das zur Trithorax-Familie gehörende MLL-Gen, zu schweren Leukämien führen (Saha et al. 1998; Ono et al. 2005).

#### **1.4 Der Notch-Signalweg in der Hämatopoiese**

Ein wichtiger Regulator in der Entwicklung und Spezifizierung von Geweben ist der Notch-Signalweg. Notch steuert eine Vielzahl verschiedener Aspekte zellulärer Differenzierung in multizellulären Organismen (Lai 2004). Ursprünglich wurde Notch als Mutation in *Drosophila*, die sich als Einkerbung im Flügelrand äußerte, beschrieben. Analysen in

*Drosophila* ergaben schließlich, dass Notch sowohl das Zellschicksal, aber auch die Proliferation sowie das Zellüberleben beeinflusst (Maillard et al. 2005). Die vielfältigen Funktionen von Notch werden durch einen in der Evolution hoch konservierten Signalweg realisiert, in dem Notch selbst als Transmembranrezeptor und Transkriptionsaktivator fungiert. In Säugern gibt es anders als in *Drosophila* vier verschiedene Notch-Paraloge (Maillard et al. 2005). Alle Notch-Rezeptoren enthalten konservierte Proteinregionen: so besteht die extrazelluläre Region aus einer Vielzahl von EGF-Wiederholungen (EGF: *epidermal growth factor*), an die die Notch-Liganden, in *Drosophila* Delta und Serrate in Säugern die drei Delta-like Paraloge (DII1, DII2, DII3) sowie Jagged1 und Jagged2, binden (Maillard et al. 2005). Des Weiteren enthält sie drei LIN12/NOTCH-Motive, die eine ligandenunabhängige Aktivierung des Signalwegs verhindern. Die intrazelluläre Domäne von Notch dient der Signalweiterleitung. Sie besteht u.a. aus einer RAM-Domäne sowie mehreren Ankyrin-Wiederholungen. Wird der Notch-Rezeptor durch die Bindung eines Liganden aktiviert, führt dies zu zwei proteolytischen Schnitten des Notch-Proteins. Ein Schnitt erfolgt in der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Der zweite Schnitt wird durch den  $\gamma$ -Secretasekomplex Presenilin innerhalb der Transmembranregion durchgeführt, wodurch die intrazelluläre Region (Notch<sup>intra</sup>) des Rezeptors in den Zellkern wandern kann, und dort zusammen mit anderen Kofaktoren, besonders RBPj $\kappa$ , die Transkription verschiedener Zielgene, u.a. Gene der *hairy enhancer of split* Familie, aktiviert (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Martinez Arias et al. 2002; Portin 2002). Der Notch-Signalweg kann durch extrazelluläre, zytoplasmatische wie auch Kernproteine moduliert werden. Glykosyltransferasen der Fringe-Familie verändern auf extrazellulärer Seite die Ligandenspezifität des Notch-Rezeptors (Moloney et al. 2000). Auf zytoplasmatischer Seite sei vor allem die Zellschicksalsdeterminante Numb erwähnt, die antagonistisch zu Notch wirkt und im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird (Spana und Doe 1996).

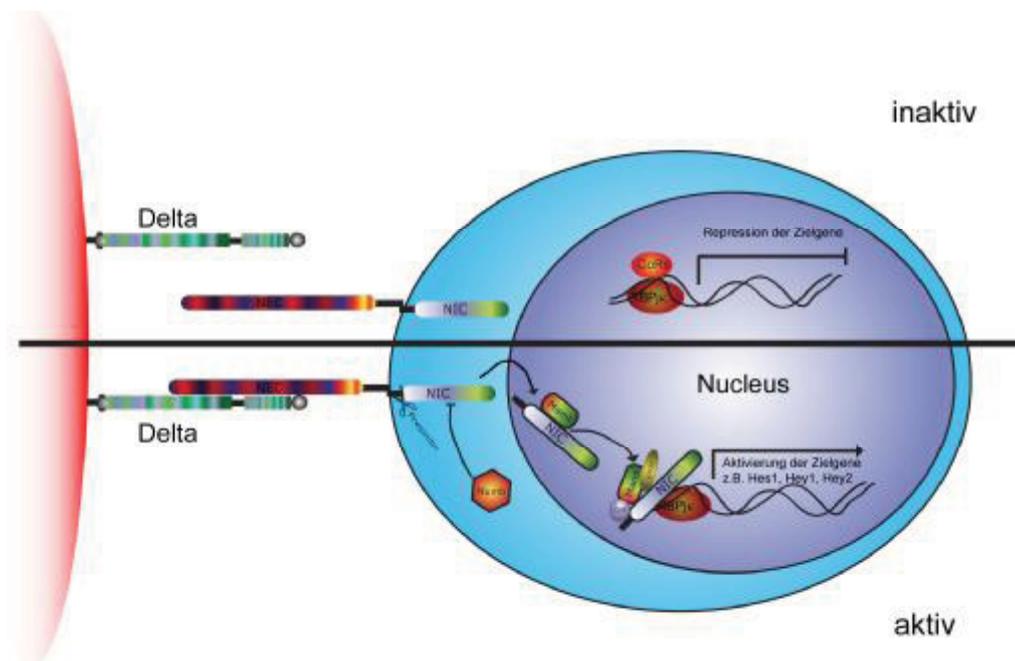


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Notch-Signalweges. Die obere Hälfte der Abbildung stellt die Situation in Zellen dar, in denen der Notch-Signalweg nicht aktiviert wurde. Hier fungiert RBPjk als Repressor, der die Transkription von Notch-Zielgenen verhindert. Die untere Hälfte zeigt die Aktivierung des Notch-Signalweges. Durch die Bindung eines Notch-Liganden (z.B. Delta) an die extrazelluläre Domäne des Notchrezeptors (NEC) wird dieser aktiviert. Durch die Aktivierung kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des Notch-Rezeptors durch die Metalloprotease Persenilin. Dies führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne (NIC) des Notch-Rezeptors, die dadurch in den Zellkern wandert und den RBPjk-Repressorkomplex in einen Aktivator-Komplex umwandelt. Zusammen mit weiteren Faktoren wird so die Transkription verschiedener Zielgene gesteuert. (Abbildung verändert von Maillard *et al.* 2005)

In der Hämatopoese ist der Notch-Signalweg besonders an Zellschicksalsentscheidungen in der Lymphopoese beteiligt (Maillard *et al.* 2005). Notch steuert hier maßgeblich die Entwicklung von T-Zellen. Wie erstmals von Radtke *et al.* beschrieben, führt der Verlust von Notch-1 in Mäusen zu einer enormen Verkleinerung des Thymus, dem Fehlen von T-Zellen sowie einer Expansion von B-Zellen (Radtke *et al.* 1999). Umgekehrt führt die Expression einer konstitutiv aktiven Variante von Notch-1 zu T-Zellentwicklung außerhalb des Thymus sowie einer Suppression der B-Zellentwicklung (Pui *et al.* 1999). Auch in der späteren T-Zellentwicklung, der Reifung der T-Zellrezeptoren ( $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$ ), scheint Notch eine entscheidende Funktion zu haben (Washburn *et al.* 1997). Diese Beispiele zeigen, dass Notch häufig an binären Entscheidungsprozessen beteiligt ist. In dem ersten Fall spezifiziert das vorhandene Notch-Signal z.B. die Vorläuferzelle zur T-Zelle.

Auch in hämatopoietischen Stammzellen scheint Notch eine wichtige Funktion innerhalb der Selbsterneuerung der Stammzellen auszuüben. So exprimieren primitive hämatopoietische Zellen (CD34<sup>+</sup>-Zellen), Notch-1 und Notch-2 sowie die Notch-Liganden Delta-like1 und Delta-like4 (Milner *et al.* 1994; Ohishi *et al.* 2000; Karanu *et al.* 2003). Hinweise auf eine direkte Beteiligung des Notch-Signalwegs an der Aufrechterhaltung primitiver Zellschicksale innerhalb des hämatopoietischen Kompartiments wurden bereits

durch eine Vielzahl von Experimenten erbracht. So führt die Stimulation des Notch-Signalwegs durch die Zugabe von löslichen Liganden bzw. die Expression von konstitutiv aktiven Formen der intrazellulären Domäne von Notch zu einer Stammzellexpansion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Varnum-Finney et al. 2000; Stier et al. 2002; Varnum-Finney et al. 2003). Des Weiteren wurde unlängst gezeigt, wie bereits in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs durch Osteoblasten einen stammzellerhaltenden Effekt bewirkt (Calvi et al. 2003). Trotz aller Hinweise auf eine Beteiligung des Notch-Signalwegs in der Erhaltung von HSZ, gibt es immer noch Ungereimtheiten. So zeigt der konditionale *knock out* von Notch oder RBPjk im Knochenmark von Mäusen keinen Effekt auf den Gehalt an hämatopoietischen Stammzellen (Radtke et al. 1999; Han et al. 2002).

### 1.6 Die Zellschicksalsdeterminate Numb

Numb ist ein Schlüsselprotein bei der Realisierung binärer Zellschicksale, sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben (Betschinger und Knoblich 2004; Roegiers und Jan 2004). Ursprünglich wurde numb als Regulator in der Entwicklung der sensorischen Organe in *Drosophila* identifiziert (Uemura et al. 1989). Hier teilen sich die Sinnesorganmutterzellen (SMC) nach einem stereotypen Muster zweimal asymmetrisch, wodurch ein aus vier Zellen bestehendes äußeres Sinnesorgan entsteht (Hartenstein und Posakony 1989). Während beider Zellteilungen kommt es zu einer Ungleichverteilung des Proteins numb (Uemura et al. 1989; Rhyu et al. 1994; Bellaiche et al. 2001). Numb wirkt wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt antagonistisch zu Notch (Spana und Doe 1996). Die Zelle, die nach der ersten Teilung das Numb Protein erhält, wird als IIb-Zelle bezeichnet. Numb bindet wahrscheinlich in dieser Zelle an Notch wodurch die Translokation von Notch<sup>intra</sup> in den Kern nach der Aktivierung des Signalwegs durch Delta oder Serrate verhindert wird (Guo et al. 1996). Zellen, die hingegen kein Numb enthalten und mit IIa bezeichnet werden, sind in der Lage das Notch-Signal weiterzuleiten und realisieren somit ein anderes Zellschicksal. Aus der IIa Zelle gehen durch eine weitere Teilung die beiden äußeren Zellen des Sinnesorgans hervor. Die Nachkommen der IIb Zelle entwickeln sich schließlich zu den inneren Zellen des Sinnesorgans. Während der zweiten Zellteilung wird erneut in beiden Zellen (IIa und IIb) Numb asymmetrisch verteilt, wodurch wiederum jeweils nur eine Tochterzelle in der Lage ist ein Notch-Signal zu transduzieren (Frise et al. 1996; Guo et al. 1996; Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Hieraus

wird ersichtlich, dass *numb* als intrinsische Determinante durch eine asymmetrische Verteilung während der Mitose das Zellschicksal der resultierenden Tochterzellen entscheidend beeinflusst.

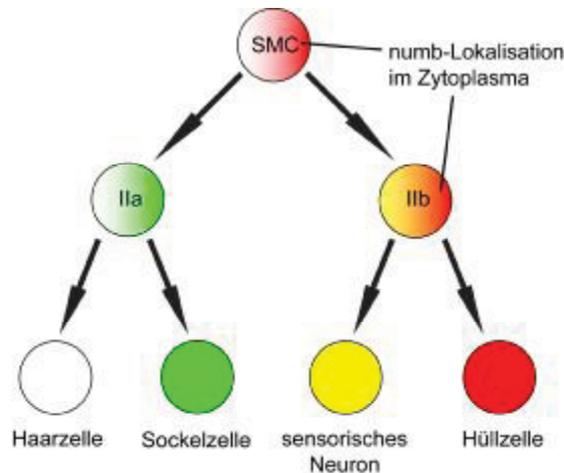


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung der sensorischen Borsten in *Drosophila melanogaster*. In der Sinnesorganmutterzelle (SMC) wird *numb*-Protein an einem Pol der Zelle angereichert und nach der Teilung nur an eine der beiden Tochterzellen (Ilb) vererbt. Diese Zelle ist nun nicht in der Lage, den Notchsignalweg zu transduzieren und realisiert ein anderes Zellschicksal als die Tochterzelle Ila. (Abbildung verändert aus Wolpert: Principles of Development 1994)

Numb ist ein evolutiv konserviertes Protein und findet sich auch in Vertebraten. Es handelt sich um ein Adaptorprotein, das in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird und für eine normale Entwicklung essentiell ist. So zeigen *numb knock out* Mäuse starke Defekte in der Angiogenese sowie beim Verschließen des Neuralrohrs. Außerdem fehlen diesen Mäusen verschiedene neuronale Zelltypen (Zhong et al. 2000; Zilian et al. 2001). Eine asymmetrische Verteilung von Numb-Protein in Mitosen wurde in Zellen der ventrikulären Zone wie in Vorläuferzellen der Retina sowie in corticalen Vorläuferzellen beschrieben, was auf eine konservierte Funktion von *numb* bei asymmetrischen Zellteilungen wie auch bei der Determinierung von Zellschicksalen hindeutet (Zhong et al. 1996; Cayouette et al. 2001; Shen et al. 2002). In Säugern existieren vier verschiedene Isoformen von *numb*, denen unterschiedliche Funktionen in der Neurogenese zugeschrieben werden (Verdi et al. 1996; Dho et al. 1999; Verdi et al. 1999; Bani-Yaghoub et al. 2007). Alle *numb*-Isoformen enthalten eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB), die der Interaktion mit verschiedenen Proteinen dient. So scheint die PTB-Domäne von großer Bedeutung für die Inhibition des Notch-Signalwegs sowie der Ubiquitynylierung von Notch<sup>intra</sup> zu sein (McGill und McGlade 2003). Zwei Isoformen, Numb3 und Numb4 besitzen eine kürzere Variante der PTB Domäne (PTBS), während Numb1 und Numb2 eine längere Variante aufweisen (PTBL). Die Insertion innerhalb der PTB-Domäne scheint unter anderem für die Interaktion

mit der E3-Ubiquitinligase LNX, die die Ubiquitylierung von numb und damit dessen Degradation vermittelt, wichtig zu sein (Nie et al. 2004).

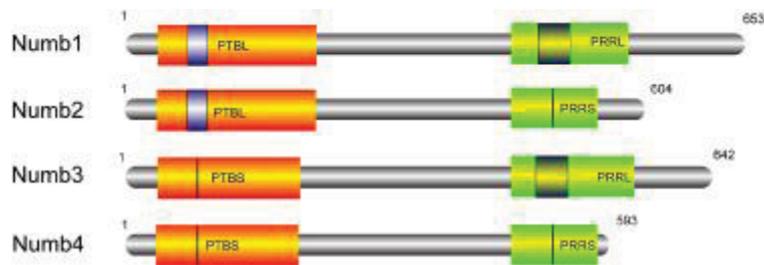


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier verschiedenen humanen Numb-Isoformen. Numb1 und Numb2 enthalten die große Variante der PTB-Domäne, PTBL. Numb3 und Numb4 enthalten die kleinere Variante PTBS. Der C-Terminus der vier Isoformen unterscheidet sich bezüglich der Länge der PRR-Domäne, Numb1 und Numb3 besitzen Insertion von 48 Aminosäuren (PRRL). (Abbildung verändert aus Verdi et al. 1996)

Außerdem enthalten zwei der Isoformen, Numb2 und Numb4, eine kürzere Variante einer Prolin-reichen-Region (PRRS) am C-Terminus des Proteins. Die PRR-Domäne enthält mehrere potentielle SH3-Bindemotive (PXXP), ein Eps15- sowie ein  $\alpha$ -Adaptin-Bindemotiv (Smith et al. 2004). Es scheint, dass Numb-Isoformen mit der größeren PRR-Domäne eher die Zellproliferation zumindest in neuronalen Geweben beeinflussen, während die Überexpression der Varianten mit der verkürzten PRR-Domäne zu einer Differenzierung der Zellen führt (Verdi et al. 1999). Um die Funktion der unterschiedlichen PRR-Varianten weiter zu untersuchen, wurden die humanen Numb-Isoformen 3 und 4 in *Drosophila* misexpremiert. Die Isoform mit der kürzeren PRR-Domäne zeigt eine stärkere Homologie zu *Drosophila* Numb, und ihre Misexpression im larvalen Gehirn von *Drosophila* führt zu einer stärkeren Reduktion von nuklearem Notch (Toriya et al. 2006).

Neuere Veröffentlichungen deuten auf eine Funktion von Numb in der Endozytose hin (Berdnik et al. 2002; Shen und Temple 2002; Huang et al. 2005; Tang et al. 2005). So bindet Numb verschiedene mit Endozytose assoziierte Proteine wie  $\alpha$ -Adaptin oder Eps15 (Salcini et al. 1997; Santolini et al. 2000). Da die Endozytose auch eine wichtige Rolle für den Notch-Signalweg spielt (Vaccari und Bilder 2005), scheint es wahrscheinlich, dass Numb auch durch einen endozytotischen Mechanismus Notch inhibiert, jedoch zeigte es sich, dass diese Modulation zumindest in der *Drosophila* Endozytose unabhängig ist (Tang et al. 2005). Vielmehr scheint die endozytotische Funktion von Numb mit dem Recyclen von Proteinen, wie Integrinen, assoziiert zu sein (Nishimura und Kaibuchi 2007).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue Transkriptionsfaktoren, die an den Prozessen Selbsterneuerung oder Differenzierung von primitiven hämatopoietischen Zellen beteiligt sind, zu identifizieren und diese anschließend funktionell zu untersuchen. Für diese Fragestellung wurden im Vorfeld komplexe Genexpressionsprofile unterschiedlicher hämatopoietischer Zellpopulationen verschiedener Stammzellquellen angefertigt (Bracker et al. 2006). Transkriptionsfaktoren, die eine höhere Expression in der als primitivsten betrachteten Zellfraktion aller untersuchten Quellen aufwiesen, sollten im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Funktion innerhalb der humanen Hämatopoiese hin untersucht werden. Hierfür wurden zunächst die Expressionen der identifizierten Transkriptionsfaktoren durch quantitative PCR-Analysen verifiziert. Um die Funktion der identifizierten Transkriptionsfaktoren in der humanen Hämatopoiese untersuchen zu können, wurden diese in Expressionsvektoren kloniert und in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen überexprimiert. Der Einfluss auf der Überexpression auf das Entwicklungspotential von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde anschließend in verschiedenen Zellkultursystemen untersucht.

Des Weiteren wurde mit Unterstützung des Diplomanden Jan Spanholtz die Funktion der Zellschicksalsdeterminante Numb in der humanen Hämatopoiese untersucht. Zunächst wurde durch RT-PCR-Analysen untersucht welche Numb-Isoformen in primitiven hämatopoietischen Zellen exprimiert werden. Anschließend wurden alle vier verschiedenen Isoformen in CD34<sup>+</sup>-Zellen zur Überexpression gebracht, und in verschiedenen Zellkultursystemen auf ihr Entwicklungspotential hin untersucht. Im Vergleich hierzu werden konstitutiv aktive Varianten von Notch-1 und Notch-2 in CD34<sup>+</sup>-Zellen zur Überexpression gebracht und das Entwicklungspotential der Zellen analysiert. Weiterführend wurden auch die Effekte eines RNAi vermittelten Gen *knock out* der Gene numb und Numb-like auf das Entwicklungspotential von humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.1.1 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien werden unter sterilen Bedingungen hergestellt, gelagert und angewendet. Zur Herstellung werden die einzelnen Komponenten unter einer Sterilbank gemischt und mit einer Vakuumpumpe durch einen 0,20 µm Flaschenaufsatz-Filter in Schott-Flaschen steril filtriert. Medienreste werden vor erneutem Gebrauch spätestens eine Woche nach Herstellung erneut steril filtriert und mit den entsprechenden Mengen L-Glutamin (100 U/ml Gibco BRL, Rockville, MD, USA) und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Pen/Strep Gibco BRL, Rockville, MD, USA) versetzt. Der pH-abhängige Farbindikator Phenolrot lässt auf den Zustand der Zellen im Medium schließen. Bei rötlicher Färbung bestehen optimale Bedingungen für die Zellen. Bei zu geringem CO<sub>2</sub>-Gehalt färbt sich das Medium pink gelbes Medium ist ein Indiz für erhöhte Stoffwechselaktivität, ausgelöst durch starkes Zellwachstum oder auch Bakterienkontamination.

#### **DMEM 10% FCS**

Für 100ml werden benötigt:

90 ml DMEM (Gibco)

10 ml FCS (Biochrom)

100 U/ml L-Glutamin (200 mM (100x); Gibco)

100 U/ ml Pen/Strep (1000 U/ml; Gibco)

#### **Iscoves 20 (I20):**

Für 100 ml wird benötigt:

80 ml IMDM (Gibco)

20ml FCS (Biochrom)

100 U/ml L-Glutamin (200 MM (100x); Gibco)

100 U/ml Pen/Strep (10000 U/ml; Gibco)

**I20 mit EAC (early acting cytokines):**

I20

+ FLT3L 10 ng/ml

+ TPO 10 ng/ml

+ SCF 10 ng/ml

**LTC-IC- Medium:**

Für 200ml werden benötigt:

150ml Iscoves

25ml HS (Horse Serum, StemCell Technology)

25ml FCS (für LTC, StemCell technologies)

2ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; Gibco)

2ml L-Glu (200 MM (100x); Gibco)

**GEMM-Medium:**

Für 100 ml werden benötigt:

20 ml IMDM (Gibco)

60 ml FCS for CFC (StemCell Technology)

20 ml Überstand 5637

100 U/ml L-Glutamin (200 MM (100x); Gibco)

100 U/ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; Gibco)

**AFT-Medium:**

Für 100 ml werden benötigt:

80 ml DMEM (low Glucose) (Gibco)

20 ml FCS (Biochrom)

100 U/ml L-Glutamin (200 MM (100x); Gibco)

100 U/ml Pen/Strep (10000 U/ml; Gibco)

**Methylcellulose-GEMM-Medium zum Überschichten von Langzeitkulturen:**

Zunächst werden 28 mg Methylzellulose autoklaviert. Es wird IMDM-Pulver (Gibco) für 1 l Lösung mit 500 ml destilliertem Wasser vermischt und so 2-fach konzentriertes Iscoves-Medium hergestellt. Dieses wird mit 3 g NaHCO<sub>3</sub> versetzt. Anschließend wird die Lösung steril filtriert und auf 37°C erwärmt. Die zuvor in 600 ml kochendem Wasser gelöste Methylzellulose wird für 10 min gekocht und dann langsam unter fließendem Wasser abgekühlt. Unter kräftigem Rühren wird das 2fach-konzentrierte Iscoves-Medium zugeben und solange bei 4°C gerührt, bis das Methylzellulosemedium fest ist. Das Methylzellulosemedium wird in 20 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Um das zur klonogenen Koloniebildung anregende Medium herzustellen, werden pro Aliquot Methylzellulosemedium 25 ml des GEMM-Mediums hinzugegeben. Die Komponenten werden gründlich vermischt. Danach lässt man das Gemisch ruhen um Luftblasen entweichen zu lassen. Daraufhin kann das Methylcellulose-Medium zum Überschichten der LTC-IC-Platten verwendet.

**2.1.2 Zelllinien****Die Zelllinie AFT024**

Die AFT024 ist eine Stromazelllinie aus der fötalen Leber von Mäusen, die von Moore 1997 isoliert wurde (Moore et al. 1997). Mit der Kokultivierung von konfluentem AFT024-Stroma können HSZ und Vorläuferzellen *in vitro* mehr als sieben Wochen erhalten werden (Moore et al. 1997; Punzel et al. 1999). Somit eignen sich die Kulturbedingungen zur Identifizierung von Stammzellen mit Hilfe von LTC-IC-, ML-IC- oder NK-IC-Versuchen. Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinie erfolgt in Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80% - 90%. Die Zellen werden trypsiniert und im Verhältnis von 1:5 – 1:6 gesplittet. Nach ca. 8 Wochen sollte eine neue Charge der Zellen in Kultur genommen

werden, da unter anderem das Proliferationspotenzial der Zellen nachlässt. Die Zellen werden bei 33°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **HEK293T**

HEK293T-Zellen, die mit dem Adenovirus Type 5 immortalisiert wurden, sind von der humanen embryonalen Nierenzellenlinie HEK293 abgeleitet. Zusätzlich exprimieren diese Zellen stabil das large-tumor-antigen des Simian Virus 40 (SV40), wodurch Plasmide mit einem SV40ori besser abgelesen werden können (DuBridge et al. 1987). HEK293T-Zellen werden in DMEM 10% FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 60-90% werden die Zellen trypsinisiert und 1:10 gesplitted.

### **5637 Zellen**

Die Zelllinie 5637 ist eine humane Blasenkarzinomzelllinie und produziert eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (z.B. IL-6, G-CSF, GM-CSF, SCF u.a.). Diese Zytokine regen humane Vorläuferzellen zur Koloniebildung an (McNiece et al. 1989). Aus diesem Grund wird der Kulturüberstand dieser Zelllinie zur Herstellung von klonogenem Methyzellulosemedium verwendet, welches für das Ausleseverfahren des LTC-IC benötigt wird. Für die Gewinnung des Überstands werden 5637 Zellen bis zur völligen Konfluenz in DMEM 10% FCS kultiviert. Anschließend wird das Medium durch IMDM mit 20% FCS für CFC (StemCell Technology) ausgetauscht und für weitere vier Tage kultiviert. Das konditionierte Medium wird schliesslich abgenommen und durch einen 0,20 µm Flaschenaufsatz-Filter in Schott-Flaschen steril filtriert. Der gereinigte Überstand wird nun aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.1.3 Isolation von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurrestblut**

Die Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgt über zwei verschiedene Techniken. Zunächst werden die mononukleären Zellen (MNZ) durch eine Dichtezentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Anschließend werden die CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen CD34, an den ferromagnetische Partikel gekoppelt sind, durch ein säulenbasiertes Verfahren aufgereinigt.

Zur Gewinnung der MNZ-Fraktion wird das Volumen des Nabelschnurblutes bestimmt und 15 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1.077, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) in 50 ml-Röhrchen, jeweils mit gleichen Mengen Blut überschichtet und in einer Hettich Rotixa/P bei 2000

U/min (entspricht ca. 600 x g) 20 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Am Ende der Zentrifugation können mehrere sauber getrennte Schichten unterschieden werden. In der untersten Phase befinden sich die pelletierten Erythrozyten, denen eine dünne Schicht Granulozyten aufgelagert ist. Darüber befindet sich die Ficoll-Lösung, in der sich teilweise Granulozyten befinden. Die oberste Phase bildet schließlich das Blutserum. Zwischen Serum und der Ficoll-Lösung befindet sich eine Interphase, die aus Leukozyten/MNZ besteht. Diese Schicht (MNZ) wird nun vorsichtig mit einer Pipette in ein neues 50ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wird das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und 7 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation verworfen, die Zellen in 15ml 0.83%er Ammoniumchloridlösung (Apotheke Universitätsklinik Düsseldorf) resuspendiert und für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Hierdurch werden noch vorhandene Erythrozyten eliminiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion mit kaltem MACS-Puffer (PBS + 2mM EDTA + 0,5% BSA) gestoppt und die Zellen wieder sieben Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und auf 50ml aufgefüllt. Hiervon werden nun 500µl entnommen, um die Zellzahl wie den Gehalt an CD34<sup>+</sup>-Zellen zu bestimmen.

Aus geeigneten Bluten werden die CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels eines magneto-bead-markierten Antikörpers (Direct MBC CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Deutschland) angereichert. Hierfür werden zunächst die Zellen erneut zentrifugiert (7', 400 x g), der Überstand vorsichtig dekantiert und 100µl F<sub>c</sub>-Rezeptor Blockingreagenz in die Zellsuspension gegeben. Schließlich werden pro 1\*10<sup>8</sup>-Zellen 40µl anti-CD34-Antikörper (Direct MBC CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Deutschland) zu den Zellen pipettiert und die Zellen für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und in 2ml frischem MACS-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wird über einen Zellseparationsfilter (Pre-Separationfilter, Miltenyi Biotec, Deutschland) auf eine mit MACS-Puffer equilibrierte Separationssäule im Magneten gegeben. Die Säule wird anschliessend 2-3 mit 7ml MACS-Puffer gespült. Unmarkierte Zellen werden hierdurch von der Säule gespült, während markierte Zellen (also CD34<sup>+</sup>-Zellen) durch das starke Magnetfeld auf der Säule verbleiben. Nach dem Waschen wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die CD34<sup>+</sup>-Zellen mit zwei Säulenvolumina eluiert.

Sowohl vom Durchfluss als auch von den eluierten Zellen werden Proben für weitere Analysen (Zellzahl und CD34<sup>+</sup>-Gehalt) entnommen.

### 2.1.4 Transfektion primärer CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurrestblut durch Nucleofektion

Nach der Aufreinigung der CD34<sup>+</sup>-Zellen können diese für Transfektionsexperimente verwendet werden. Hierzu wird die Methode der Nucleofektion von AMAXA verwendet. Entsprechend der Anzahl an Ansätzen werden 15 ml-Röhrchen mit je 5 ml I20 befüllt. Gleichfalls werden in 24-well Platten 2 wells je Ansatz mit 500 µl I20 mit früh agierenden Cytokinen (engl. *early acting cytokines* = EAC) befüllt. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen werden nach der MACS-Separation gezählt und dann bei 2000 U/min 7 min pelletiert.

Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und die Zellen werden in einem, der Transfektionsprobenanzahl entsprechenden Volumen (z.B. 7 Ansätze = 700 µl) Transfektionspuffer gut resuspendiert und die Proben zu je 100µl auf 15 ml Röhrchen verteilt. In die einzelnen Transfektionsansätze werden je 5 µg Plasmid-DNA (isoliert mit Endofree-Plasmid-Maxi-Kit von Qiagen) gegeben und komplett in die AMAXA-Küvette überführt. Nach einer Folge von Elektropulsen (Programm U01 des Nucleofektionsgerätes) wird 1 ml vorgewärmtes I20 in die Küvette gegeben. Die Elektroden werden mit einer Feinspitzen-Pasteurpipette gut gespült, so dass fest haftende Zellen abgelöst werden. Die Zellen werden mit der Pipette in vorbereitete 15 ml-Röhrchen mit I20 überführt. Die transfizierten Zellen werden bei 2000 U/min 5 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen, wobei die Zellen nicht resuspendiert werden dürfen. Die anschließende Inkubation des Zellpellets bei 37°C für 15 min ermöglicht die Regeneration der durch die Elektroporation geschädigten Zellmembranen. Nach der Regenerationsphase werden die Zellen in 1 ml vorgewärmten I20 mit EAC aufgenommen und resuspendiert. Auf jede Vertiefung der beiden vorbereiteten 24- Well-Platten werden je 500 µl der transfizierten Zellen aufgeteilt und im Brutschrank inkubiert.

### 2.1.5 Virusproduktion

#### Transiente Erzeugung virushaltiger Überstände

Bei der transienten Virusproduktion wurden alle, für die Viruspartikelbildung benötigten Gene durch Kotransfektion mit drei Plasmiden in eine Zelle eingebracht. Für alle Versuche wurden HEK293T Zellen zur Virusherstellung verwendet. Als Transfektionsreagenz wurde Polyethylenimin (PEI, hochmolekular, Sigma-Aldrich) verwendet. PEI ist ein kationisches Polymer, das Nukleinsäure bindet und darüber hinaus kondensierende Eigenschaften

besitzt. DNA-Polykationen-Komplexe werden effizient von verschiedenen Zellarten aufgenommen und Polykationen selbst wirken einer intrazellulären Degradierung der DNA entgegen. Am ersten Tag der Transfektion wurden  $6 \times 10^6$  HEK293T Zellen in 6 ml Medium auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am zweiten Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 4 ml DMEM inkl. der Zusätze in der üblichen Konzentration und 15% FCS ersetzt. Pro Transfektionsansatz wurden schließlich 5µg je Plasmid (pCD/NL-BH, pczHFVEM140, sowie pCL1) mit 985µl DMEM in einem 15ml Zentrifugationsgefäß gemischt. In einem zweiten Zentrifugationsgefäß wurden 45µl PEI mit 955µl DMEM gemischt und das Gemisch schnell zu der DNA pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde das PEI-DNA-Gemisch auf die HEK293T-Zellen pipettiert.

Am dritten Tag wurde das alte Medium vom Vortag entfernt und die Zellen einmal mit Medium gewaschen, bevor 5ml frisches 10mM Natriumbutyrat enthaltendes DMEM 10% FCS auf die Zellen gegeben wurde. Nach sechs Stunden wurde das natriumbuty Rathaltige Medium von den HEK293T Zellen abgenommen und durch 5ml frisches DMEM 10% FCS ersetzt. Am vierten Tag, frühestens aber 19 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, wurde der virushaltige Überstand geerntet. Der virushaltige Überstand wurde in einer Spritze aufgezogen und dann mittels eines Spritzenfilters (0,45 µm, Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Durch das Filtrieren wurden die Produzentenzellen und deren Überreste aus dem virushaltigen Überstand entfernt. Das virushaltige Medium wurde entweder frisch verwendet oder bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

### **Konzentration von virushaltigen Überständen**

Virushaltige Überstände mehrerer Platten des gleichen Virus (i.d.R. von 8 Platten) wurden in einem 50 ml Polypropylenröhrchen (BD Falcon™, BD Biosciences) gepoolt. Das Röhrchen wurde bei 4 °C für zwei Stunden und 10.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: J2-21; Rotor JA-12; Beckmann-Coulter GmbH, D-47807 Krefeld). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das nicht sichtbare Virus-Sediment wurde in 1 bis 3 ml frischem Medium resuspendiert. Das Medium wurde entsprechend den Bedürfnissen der Zellen, für die das Virus bestimmt war, ausgewählt.

### 2.1.6 Transduktion von humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen

Die Transduktion der humanen CD34<sup>+</sup> Zellen wurden auf 6-Wellplatten oder 24-Wellplatten durchgeführt, die nach Herstellerangaben mit Retronektin (Takara) beschichtet worden sind.

Hierfür wurde zunächst die Platte mit 0,5-1ml Virusüberstand beladen. Anschließend wurden frisch aus Nabelschnurblut isolierte CD34<sup>+</sup>-Zellen (100.000 Zellen) zum Virusüberstand pipettiert. Zusätzlich wurden noch die Zytokine SCF, TPO und FLT-3 (PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland) in einer Konzentration von 10ng/ml zu den Ansätzen hinzugegeben. Frühestens 16 Stunden (über Nacht) nach der Transduktion wurden die Zellen von der Platte abgenommen mit PBS gewaschen und in frisches Medium, wie oben beschrieben, überführt.

### 2.1.7 Präparation der AFT024 Platten für LTC-IC Analysen

Für die Herstellung von für LTC-IC benötigten AFT024-Platten, wurden zunächst 96-*well*-Zellkulturplatten mit 0,1% Gelatinewasser (StemCell Technology) beschichtet. Hierfür wurden 40µl Gelatinewasser pro *well* mit einer Mehrkanalpipette in die Zellkulturplatte gegeben. Es wurden immer nur 11 *wells* pro Reihe befüllt. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 37°C wurde das Gelatinewasser wieder entfernt und die Zellkulturplatten unter der Sterilbank offen zum Trocknen gestellt.

Die AFT024 Zellen wurden vor der Trypsinierung 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 37°C warmem 1 x Trypsin (5-15ml, Gibco) im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde nach fünf Minuten durch die Zugabe des gleichen Volumens kaltem I20 gestoppt. Die abgelösten Zellen werden in ein neues 50ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 400 x g 7 Minuten lang pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 1ml frischem AFT024 Medium resuspendiert, und in der Neubauerkammer gezählt. Schließlich werden die Zellen auf eine Dichte von  $1 \times 10^5 \text{ Zellen/ml}$  eingestellt und 150µl pro Well ausplattiert. Nach 3-4 Tagen sind die Zellen zur Konfluenz gewachsen und werden durch einen Cäsium-Irradiator mit 35 Gray bestrahlt, so dass eine weitere Zellproliferation verhindert wird. 24 Stunden nach der Bestrahlung wird das Medium in den Platten durch frisches ersetzt.

## 2.2 Funktionelle Analysen in der Zellkultur

Wie bereits in der Einleitung beschrieben stehen verschiedene Analyseverfahren zur Untersuchung primitiver hämatopoietischer Zellen in der Zellkultur zur Verfügung. Für die Untersuchung des Koloniebildungspotentials der späten myeloischen Vorläuferzellen wurde in dieser Arbeit der CFU-GEMM Ansatz gewählt. Das Koloniebildungspotential der frühen myeloischen Kolonien wurde durch die Verwendung des LTC-IC Ansatzes bestimmt. Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz misst über Verdünnungsreihen die Frequenz der Kolonienbildung.

### 2.2.1 Colony-Forming-Unit (CFU-)GEMM Ansatz

Um den Gehalt an determinierten Vorläuferzellen sowie deren Differenzierungspotential zu bestimmen, wurde der CFU-GEMM Ansatz benutzt. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen, bei CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurrestblut i.d.R. 200 Zellen, direkt in 1ml Methylzellulosemedium (MethoCult HF4434, StemCell Technologies) durchflusszytometrisch sortiert, und anschließend in zwei *wells* einer 24-*well*-Platte pipettiert. Die Kulturen werden dann für 12-14 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach der Kultivierung erfolgt die Auswertung. Hierfür wird einerseits die Anzahl der gebildeten Kolonien sowie deren Phänotyp charakterisiert. Es wird zwischen fünf verschiedenen Kolonietypen unterschieden: CFU-E (*colony-forming-unit-Erythroid*), BFU-E (*burst-forming-unit-Erythroid*), CFU-M (*burst-forming-unit-Macrophage*), CFU-G (*burst-forming-unit-Granulocyte*), CFU-GM (*burst-forming-unit-Granulocyte-Macrophage*), CFU-GEMM (*burst-forming-unit-Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte*). Die unreifsten Progenitoren sind die CFU-GM und CFU-GEMM Kolonie bildenden Zellen, wobei die CFU-GEMM-Zellen in der Lage sind, Zellen sämtlicher myeloischer Linien hervorzubringen, wohingegen aus CFU-GM-Zellen nur Leukozyten entstehen. CFU-E- und BFU-E-Kolonie-bildende Zellen sind späte Progenitoren der roten Linie, und die CFU-G- und CFU-M-Kolonie-bildenden Zellen kennzeichnen späte, determinierte Vorläuferzellen der weißen Linie.

### 2.2.2 Der LTC-IC Ansatz

Die Arbeitsgruppe um Sutherland entwickelte Ende der achtziger Jahre den so genannten Long-Term-Culture-Initiating-Cell (LTC-IC)-Ansatz, der wesentlich unreifere und den Stammzellen enger verwandte Progenitoren beschreibt als der CFU-GEMM-Ansatz (Sutherland *et al.*, 1990). Diese Vorläuferzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach mehr als fünf Wochen *in vitro*-Kultur noch in der Lage sind, sekundäre Kolonien aus den primär gebildeten Kolonien zu generieren. Das folgende Protokoll beschreibt die Durchführung des LTC-IC-Ansatzes.

Wird ein LTC-IC-Ansatz mit genetisch manipulierten Zellen durchgeführt, so werden an Tag 2 nach der Transfektion 6000 Zellen der CD34<sup>+</sup>-Zellen für die Kontrolle oder 6000 CD34<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-Zellen direkt in 5 ml LTC-IC-Medium sortiert und bis zum Ausplattieren kühl gehalten. Die Zellen werden in einer Verdünnungsreihe in 96-Well-Platten auf eine Schicht bestrahlter AFT024 ausgesät. Diese fungiert als unterstützendes Stroma, das nach der Bestrahlung (vgl. 2.1.6) selbst nicht mehr zur Proliferation in der Lage ist, aber den Selbsterhalt der hämatopoietischen Zellen unterstützt.

Zunächst werden die gesamten 5 ml Zellsuspension in ein Reagenz-Reservoir gegeben. Zum Ausplattieren wird für exaktes Pipettieren eine RAININ-Multipipette mit speziellen Spitzen benutzt. Pro Reihe werden jeweils nur elf der insgesamt zwölf Vertiefungen der Zellkulturplatte genutzt. In die ersten beiden Reihen der Platte werden jeweils 150 µl/well der unverdünnten Zellsuspension gegeben. Zu der im Reservoir verbliebenen Zellsuspension werden 3,3 ml LTC-IC-Medium gegeben. Die verdünnte Suspension wird sorgfältig gemischt. Die nächsten beiden Reihen werden erneut mit 150 µl/well befüllt. Die nächsten Verdünnungsschritte erfolgen durch Zugabe von 3 ml (Reihe 5+6) und 2,7 ml (Reihe 7+8) LTC-IC-Medium. Durch Befüllen der letzten beiden Reihen wird die verdünnte Zellsuspension vollständig aufgebraucht, so dass alle sortierten Zellen in den Ansatz gelangt sein sollten. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 35 Tage kultiviert. Einmal wöchentlich wird das Medium durch Abnahme von 80 µl und Zugabe von 100 µl frischen LTC-IC-Mediums erneuert, da eine vollständige Abnahme des Mediums nicht möglich ist ohne das Stroma zu verletzen und Zellen zu verlieren. Die Differenz geht im Laufe einer Woche durch Verdunstung verloren. Nach Ablauf der fünfwöchigen Kulturdauer wird das Medium nahezu vollständig abgenommen und die Zellen werden mit Methylcellulose-GEMM-Medium überschichtet. Zu diesem Zeitpunkt haben primitive hämatopoietische Zellen kleine bis mittelgroße primäre Kolonien kleiner, runder Zellen gebildet. Das

Methylcellulose-GEMM-Medium enthält Überstand der Blasenzellkarzinomlinie 5637. In diesem befinden sich Cytokine und Wachstumsfaktoren, die in Zellen, die sich noch in einem primitiven Entwicklungszustand befinden, myeloide Differenzierung induziert. Die Zellen werden nach Überschichten weitere 10-14 Tage kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Platten mikroskopisch ausgewertet. Wells in denen nach dem Überschichten sekundäre myeloide Kolonien entstanden sind, werden positiv ausgewertet. Sie müssen Zellen enthalten haben, die über die gesamte Kulturdauer ihr Proliferationspotenzial und die Fähigkeit zu weiterer Differenzierung erhalten haben. Solche Zellen sind als LTC- IC definiert und ihre Frequenz innerhalb der eingesetzten Zellen konnte anhand der definierten Verdünnungsreihe unter Anwendung von Poisson-Statistik ermittelt werden. Dazu wurde die Kalkulationssoftware LdaStat1 (M.Schubert, Heidelberg) eingesetzt.

### 2.3 Methoden der Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wird für das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom verwendet. Hierfür wird eine Zellsuspension durch eine Kapillare vom Durchflusszytometer aufgesogen und durch hydrodynamische Fokussierung weiter vereinzelt. Die einzelnen Zellen werden in eine Messkammer geleitet, in der sie den Weg eines Laserstrahls kreuzen. Partikel die diesen Strahl passieren, erzeugen Streulicht, das von optischen Sensoren im Gerät aufgefangen wird. Das in der ursprünglichen Bahn des Laserstrahls gestreute Licht (engl. *forward scatter* = FSC) dient als Maß für die Größe der Zelle, wohingegen das seitliche Streulicht (engl. *side scatter* = SSC) als Maß für die Granularität einer Zelle dient. Das Laserlicht ist zudem in der Lage Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen, was genutzt wird, um Zellen mit Fluorochrom markierten Antikörpern hinsichtlich ihrer Antigenexpression zu differenzieren oder hinsichtlich eines Reportergens wie z.B. des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Je nach Verfügbarkeit von Fluorochromen mit ausreichend unterschiedlichen Emissionsspektren und des Anregungsspektrums des/der Laser können gleichzeitig 5 und mehr Fluoreszenzparameter gleichzeitig gemessen werden. Dabei ist es essentiell die, durch die sich teilweise überlagernden Emissionsspektren der Fluorochrome entstehenden Fehler, computergestützt auszugleichen. In diesem als Kompensation bezeichneten Prozess können die Signale in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen gegeneinander abgeglichen werden.

Die zum Durchflusszytometer gehörige Software kann die gemessenen Signale als Histogramme (Anzahl gegen Parameter) oder als Datenpunkte in einem Graphen (engl. *dotblot*), auf dem jede Achse einen anderen Parameter repräsentiert (FSC, SSC oder ein Fluoreszenzsignal) darstellen. In solch einem *dotblot* entstehen so Wolken von Datenpunkten, die der Operator mit Hilfe der Software markieren (engl. *gating*) und isoliert hinsichtlich ihrer Eigenschaften betrachten kann. So können einzelne Zellfraktionen und Subpopulationen gezielt untersucht werden.

Eine spezielle Anwendung der Durchflusszytometrie ist das Sortieren von Zellen. Bei reinen Messanwendungen wird die durchfließende Zellsuspension in einen Abfallbehälter entsorgt. Die Zellen können aber in speziellen Geräten, sogenannten FACS-Sortern (*fluorescence activated cell sort*) auch unmittelbar nach der Messung des Signals physikalisch aufgetrennt und in separaten Gefäßen aufgefangen werden. Hierzu wird der aus der Messzelle austretende Flüssigkeitsstrom kurz elektrisch geladen, in genau dem Moment, zu dem sich die gemessene Zelle in dem letzten am Flüssigkeitsstrom hängenden Tropfen befindet. Die Aufladung des dünnen Wasserfadens muss zeitlich so abgestimmt sein, dass der abreißende Tropfen sowohl die gemessene Zelle enthält und weder der davor noch der danach abreißende Tropfen die Ladung transportiert. Dieser geladene Tropfen passiert fallend zwei ebenfalls geladene Ablenkplatten, die ihn aus dem Hauptstrom von Tropfen ablenken. Der so entstehende Seitenstrahl kann mit einem geeigneten Gefäß aufgefangen werden.

### **2.3.1 Färben von Zellen mit konjugierten Antikörpern**

Für die Markierung von Zelloberflächenmarkern wurden die Zellen in ungefähr 200µl PBS/EDTA oder Medium aufgenommen. Pro Ansatz wurden jeweils 5µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Zellsuspension pipettiert und für 15-30 Minuten auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert. Um einen Verlust der Fluoreszenzaktivität zu verhindern, wurden die Ansätze im Dunkeln gelagert. Nach Inkubation, einem Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation (7min, 400xg, 4 C,) wurden die Zellen in PBS/EDTA resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Mullis et al. 1986; Erlich 1989)

Zur Durchführung der PCR wurden die PCR Maschinen Gene Amp PCR System 9600; 9700; 2400 (alle von Applied Biosystems) verwendet.

### 2.4.2 Standard-PCR

Standard-PCRs wurden je nach dem verwendeten Primersatz mit verschiedenen Annealingtemperaturen gestartet. Der Ansatz (25µl Gesamtvolumen) für eine PCR bestand aus: 2,5µl 10x PCR-Puffer (Qiagen, enthält 15mM MgCl<sub>2</sub>), 0,5µl dNTP (je 5mM), jeweils 0,5µl Primer (10mM), sowie 1U Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland).

### 2.4.3 Advantage Taq

Für die Klonierung von Genen, die später in hämatopoietischen Zellen überexprimiert werden sollten, wurde zunächst Advantage Taq Polymerase HF2 (Clontech), mit *Proof-reading*-(Lesekorrekture-)Aktivität, verwendet. Die Reaktionen wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. In der Regel wurde 1µl der entsprechenden cDNA bzw. 1000x verdünnten Plasmiden als Template eingesetzt.

### 2.4.4 Phusion Taq

Später wurde für die Klonierung von Genen in Expressionsvektoren Phusion-High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland). Diese besitzt wie die zuvor verwendete Advantage Taq auch eine Lesekorrektureaktivität. Auch hier wurden die PCR Reaktionen entsprechend den Herstellerangaben angesetzt.

### 2.4.5 Kolonien PCR

Eine Kolonien PCR dient der Kontrolle, ob ein kloniertes Fragment die richtige Größe besitzt. Hierfür verwendet man einen Primer innerhalb des Vektors (z.B. in der Promotorregion) sowie einen genspezifischen Primer. Die Größe des so amplifizierten Fragments kann anschließend über Gelelektrophorese bestimmt werden. Der Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten: 1µl 10x PCR Puffer (Qiagen), 1µl dNTP (je 5mM), 0,5µl je Primer (z.B. CMV Sequencing fw und genspezifischer Primer rev), 7µl H<sub>2</sub>O sowie 0,1U Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Mittels eines autoklavierten Zahnstochers wurden Bakterienkolonien berührt, und mit diesem dann der PCR-Ansatz angeimpft. Danach wurde mit dem Zahnstocher ein Abdruck auf einer neuen Agarplatte durchgeführt, um den PCR-Ansatz einer bestimmten Kolonie zuordnen zu können.

#### PCR Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5 Minuten	1x
94°C	30 Sekunden	30x
60°C	45 Sekunden	
72°C	10 Sekunden/100bp	
72°C	7 Minuten	1X

### 2.4.6 Quantitative PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (engl. *quantitative realtime PCR* = qRT-PCR) ist eine PCR Anwendung, die es ermöglicht den Verlauf der Amplifikation einer DNA Sequenz von Zyklus zu Zyklus zu verfolgen. Dazu wird ein Fluoreszenzsignal, das mit zunehmender Amplifikatmenge ansteigt, benutzt, um die Menge entstandenen Produkts einschätzen zu können.

In dieser Arbeit wurde als Reporter der interkalierende Farbstoff SYBR-Green (Quiagen) benutzt. Der vom Hersteller gelieferte Reaktionsmix enthält neben dem Farbstoff bereits DNA-Polymerase, Nukleotide und eine geeignete Pufferkonzentration, so dass dem Reaktionsansatz nur noch Primer, *Template* und Wasser hinzugefügt werden müssen. Die Reaktionen wurden in einem ABI-Prism7700-Sequence-Detector durchgeführt.

Die qRT-PCR wurde hier benutzt um nach vorheriger reverser Transkription die relative Menge eines bestimmten Transkripts in der Probe nachzuweisen. Dazu wurde die sogenannte komperative Ct-Methode (auch  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) angewandt. Hierbei werden für jede Probe jeweils für das Transkript von Interesse und eine interne Referenz (GAPDH) Ansätze im Triplet gefahren. Nach vollendetem Lauf stellt die Auswertesoftware (Applied Biosystems Sequence Detection Systems 1.7) die gemessenen Fluoreszenzwerte in einem Graphen gegen die Zyklenanzahl dar. Es wird ein Schwellenwert gesetzt (Ct), der die Kurven der Amplifikationen im frühen exponentiellen Bereich abgreift. Die Zykluszahl, bei der eine Kurve die Ct-Linie schneidet, ergibt den Ct-Wert für den entsprechenden Ansatz. Aus den Ct-Werten der Zielsequenz und der internen Referenz wird der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert gebildet wie folgt gebildet:

$$\text{Ct}_R - \text{Ct}_t = \Delta\text{Ct}_t$$

wobei

$\text{Ct}_R$  = Ct- Wert der endogenen Referenz

$\text{Ct}_t$  = Ct- Wert der Zielsequenz

Dieser wird von dem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert des Kalibrators, einer Probe (-z.B. eine unbehandelte Kontrolle)-, die als Standard zur Angabe der relativen *Template* -Menge im Ansatz verwendet wird, subtrahiert und in folgenden Ausdruck eingesetzt:

$$N_t = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

wobei  $N_t$ = Menge der Zielsequenz normalisiert zu einer endogenen Referenz und relativ zum Kalibrator ist.

Um die komparative Ct- Methode anwenden zu können, muss sichergestellt werden, dass die Effizienz der PCR für die Zielsequenz annähernd gleich der Effizienz der PCR für die endogene Referenz, und beide nahe eins sind.

Der standardisierte Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen
SYBR-Green-Mix	12,5 µl
Primer fw	0,5 µl
Primer rev	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	10,5 µl
Template	1 µl

### 2.4.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird entsprechend den Angaben aus Sambrook und Russell (Sambrook und Russell 2001) durchgeführt. Als DNA-Marker wurde der 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), sowie der 100bp Ladder (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

### 2.4.8 Aufreinigung und Klonierung von PCR-Produkten

#### 2.4.8.1 T4-DNA-Polymerase und Polynukleotid-Kinase Behandlung

Die T4-DNA-Polymerase-Reaktion wird benutzt, um mögliche Überhänge, die bei der PCR-Reaktion entstanden sein könnten, aufzufüllen. Hierfür wird zunächst der PCR-Ansatz mit dem GFX-PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE-Healthcare, München, Deutschland) aufgereinigt und anschließend mit 43µl mit Wasser eluiert, anschließend werden 5µl T4 DNA-Polymerase Puffer, 2µl dNTPs (5mM), sowie 1U T4 Polymerase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) in den Ansatz pipettiert. Dieser wird dann für 20 Minuten bei 12°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion wieder mit dem GFX-Kit aufgereinigt und mit 44µl Wasser eluiert. Anschließend werden die Enden der Amplifikate mittels einer Polynukleotid-Kinase-Reaktion phosphoryliert. Dazu werden 5µl T4 Ligase Puffer (enthält das benötigte ATP) sowie 1U Polynukleotid Kinase (alle Komponenten von NEB) in den vorherigen Ansatz pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgt entweder direkt mittels GFX-Kit oder durch Gelelektrophorese und anschließender -extraktion.

### 2.4.8.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten bzw. enzymatisch gespaltener DNA aus Agarosegelen

Die gewünschte Bande wurde mittels einer Skalpellklinge aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte für große DNA-Fragmente mit dem Qiagex II Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), für kleine mittels des MinElute Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

### 2.4.8.3 Ligation von DNA Fragmenten

Ein Ligationsansatz bestand aus 10-20ng Vektor, 9µl Fragment, 2µl 10x Ligationspuffer sowie 1U T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland). Dieser wurde dann über Nacht bei 12°C oder 16°C im Wasserbad oder auch 15 Minuten – 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kann die Ligation bei -20°C gelagert werden.

### 2.4.9 Transformation elektrokompetenter Zellen

20ng Ligationsprodukt der Ligation wurden auf 40µl Bakterienaliquots verteilt, eine Minute auf Eis vorinkubiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation elektrokompetenter Zellen wurde mit dem E. coli Pulser (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 2mm Elektroporationsküvetten von Eurogentech verwendet.

Die Bakterien wurden sofort danach in 1ml LB-Medium (Roth) aufgenommen und, um die Ampicillin-Resistenz aufbauen zu können, eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 200µl dieser Bakterienlösung auf LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin (Roth) ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Für alle Versuche wurden der E.coli Stamm TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Genotyp: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Strr) endA1 nupG*

### 2.4.10 Kulturverfahren für *Escherichia coli*

Kulturverfahren für *E. coli* entsprechen vorhandenen Protokollen (Sambrook und Russell 2001).

### 2.4.11 Isolierung von Plasmid DNA (Minipräparation)

Für die Isolierung von Plasmid DNA wurden 1,5ml einer 3ml Übernachtskultur 1 Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; das Pellet in 165µl TELT Puffer (*siehe unten*) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion zunächst für 3 Minuten auf 100°C erhitzt, und danach für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Hierauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 16000 x g). Der durch den Zentrifugationsschritt entstandene Niederschlag wurde mittels eines handelsüblichen, autoklavierten Zahnstochers entfernt und der Lösung zum Fällen der DNA 165µl 2-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugefügt. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 15 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde nun mit 600µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl Wasser gelöst.

#### TELT Puffer:

1M Tris pH 8,0	100µl
0,5M EDTA pH 8,0	260µl
10% Triton	80µl
3,2M LiCl	1560µl
Lysozym (50mg/ml)	200µl
RNaseA (20mg/ml)	50µl

### 2.4.12 Isolierung von Plasmid DNA (Maxipräparation)

Um plasmidische DNA in großen Mengen isolieren zu können, z.B. für die Transfection eukaryotischer Zellen, wurde das EndoFree Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Isolation der DNA wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

### **2.4.13 Enzymatische Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgt mittels eines ABI 3100 Sequencer. Der Ansatz einer Sequenzierreaktion enthielt folgende Komponenten: 1µl der zu sequenzierenden DNA, 2µl Big Dye Terminator Ready Reaction Mix, 2µl Primer sowie 5µl Wasser. Die Cycle Sequencing Reaktion wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.4.14 Enzymatische Spaltung von Plasmid DNA**

Enzymatische Spaltungen von Plasmid DNA wurden entsprechend den Angaben aus Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte entweder über eine Phenol/Chloroform Extraktion oder über eine Gelextraktion.

### **2.4.15 Phenol-Chloroform Extraktion**

Ein dem Restriktionsansatz entsprechendes Volumen Phenol-Chloroform (Verhältnis Phenol : Chloroform = 1 : 1) wurde hinzugefügt. Nach dem Mischen der Phasen (Vortex, 30 Sekunden) wurde 10 Minuten bei  $16000 \times g$  in einer Tischzentrifuge (Modell: 5417C; Eppendorf) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5ml Einmalreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1 Volumen Chloroform hinzugefügt. Nach Mischen der Phasen (Vortex, 30 Sekunden) wurde 10 Minuten bei  $16000 \times g$  zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Um Reste des organischen Lösungsmittels zu entfernen und die DNA in ein kleineres Volumen zu überführen, wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Der Lösung wurde 1/10 Volumen 7,8M Ammoniumacetat und das 2,5fache Volumen Ethanol (100%) hinzugefügt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei  $16000 \times g$  für 20 Minuten. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und noch einmal 1 Minute bei  $13000 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.4.16 Dephosphorylierung geschnittener Plasmide**

Um eine Religation zu verhindern, wurden die Enden von geschnittenen Plasmiden mittels Antarctic Phosphatase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) dephosphoryliert. Ansatz: 60µl

Restriktionsansatz (8-10µg Vektor), 8µl 10x Puffer, 8µl Antarctic Phosphatase, 4µl H<sub>2</sub>O. Der Ansatz wurde dann 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für fünf Minuten gestoppt. Der geschnittene Vektor wurde anschließend über Phenol/Chloroform Extraktion oder mit Hilfe des GFX-Kits (GE Healthcare, München, Deutschland) aufgereinigt.

#### **2.4.17 Isolation von Gesamt-RNA mit TRIzol**

Bei TRIZOL handelt es sich um eine phenolische Lösung, die in der Lage ist eukaryotische Zellen vollständig zu lysieren und die zelleigenen Proteine zu denaturieren. Die Protein- und Lipidfraktion lagern sich in den Zentrifugationsschritten in der Interphase zwischen organischer und wässriger Phase bzw. in der organischen Phase an, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst bleiben.

In PBS gewaschene Zellen werden in einem Volumen von 250µl PBS aufgenommen und mit 750 µl TRIZOL versetzt. Das Gemisch wird gründlich homogenisiert und dann 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 150µl Chloroform wird die Phasentrennung initiiert. Das TRIzol und Chloroform werden gut gemischt (30 Sekunden Vortex) und anschließend in einer Tischzentrifuge 10 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Analog zur Phenol/Chloroform-Extraktion wird die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 16000 x g) wird wiederum die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Schließlich wird die RNA durch die Zugabe des 0,7 x Volumens Isopropanol durch Zentrifugation (30 Minuten, 16000 x g) gefällt. Hiernach erfolgt noch ein Waschschriff mit 70% EtOH (500µl) und ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 16000 x g). Danach wird die isolierte RNA im Heizblock bei 37°C getrocknet. Das getrocknete Pellett wird in einem geringem Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen. Etwaige Reste genomischer DNA werden anschließend durch eine DNase-Reaktion entfernt.

#### **2.4.18 Isolation von Gesamt-RNA mit NucleoSpin RNA II**

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde außerdem mit Hilfe des NucleoSpin RNA II-Kits (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurde das Protokoll nach Herstellerangaben benutzt. Zur Aufkonzentration wurde

je nach RNA-Menge die RNA durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 7.5M Ammoniumacetat sowie dem 0,7 x Volumen Isopropanol und Zentrifugation (16000 x g, 30 Minuten) gefällt. Hiernach wurde das RNA-Präzipitat mit 70% EtOH (500µl) gewaschen und für 10 Minuten (16000 x g) zentrifugiert. Das RNA Präzipitat wurde schließlich getrocknet und in einem geringen Volumen (10-20µl) Rnase-freiem, sterilem Wasser aufgenommen.

#### **2.4.19 Entfernen von genomischer DNA durch DNase Reaktion**

Für bestimmte Anwendungen, wie zum Beispiel den PCR basierten quantitativen Nachweis von Transkripten, ist die Anwesenheit von genomischer DNA in einer RNA-Präparation störend und kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Um dies zu verhindern, kann DNA aus einem RNA/DNA-Gemisch selektiv durch die DNA-spezifische Aktivität von DNasen entfernt werden. Dazu werden 2U DNaseI (NEB) in einen 50 µl Reaktionsansatz mit 1x DNase Puffer gegeben. Dieser wird 10 min. Bei 37° C inkubiert. Im Anschluß werden 10 µl 25mM EDTA zugegeben, um die Stabilität der RNA im folgenden Inaktivierungsschritt von 10 min. Bei 75° C zu erhöhen. Schließlich wurde die RNA analog zu dem beschriebenen Protokoll in 2.4.18 gefällt und in einem geeigneten Volumen aufgenommen.

#### **2.4.20 Reverse Transkription**

Einzelsträngige RNA kann mit Hilfe sogenannter reverser Transkriptasen (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Reverse Transkriptasen stammen ursprünglich aus Retroviren, die ihr RNA-Genom in DNA umschreiben um sie in das Wirtsgenom integrieren zu können. Es handelt sich um RNA abhängige DNA Polymerasen, die gleichzeitig meist eine RNase-H-Aktivität besitzen, die RNA in DNA-RNA Heteroduplexen abbaut. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RT Superscript II von Invitrogen gearbeitet, die eine reduzierte RNase-H-Aktivität besitzt. Alle Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.4.22 DNA und RNA Oligonukleotide

## Verwendete DNA-Oligonukleotide

Primer Name	Sequenz 5' → 3'
2A Oligo fw	GATCCGCACCCGGTGAACAGACTTTGAATTTTACCTTC TCAAGTTGGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCTGGGCCA
2A Oligo rev	CCGGTGGCCCAGGGTTGACTCAACGTCTCCTGCCAAC TTGAGAAGGTCAAATTCAAAGTCTGTTTCACCCGGTGCG
ADNP TaqMan fw	CAGAGGCCAGCCACGTAAGATATA
ADNP TaqMan rev	GCAGCACTCATTGGTTTGCTGCTT
ATF2 TaqMan fw	CAGAAGACATTTCACTGCCGAGTA
ATF2 TaqMan rev	GCCATAACGATCTGTGAAAGAGCA
CBX7 cloning fw	ATGGAGCTGTCAGCCATCGG
CBX7 cloning rev	TCAGAACTCCCACTGCGGTC
CBX7 TaqMan fw	TGCGGAGGAGGTACCCCA
CBX7 TaqMan rev	AGACCTGGTGGCCGAGCT
Primer Name	Sequenz 5' → 3'
CMV Sequencing Primer	ATGGGAGTTTGTTTTGGCAC
DDIT3 Cloning fw	ATGGCAGCTGAGTCATTGCC
DDIT3 Cloning rev	TCATGCTTGGTGCAGATTCAC
DDIT3 TaqMan fw	GCTGAAGAGAATGAACGGCTCAAG
DDIT3 TaqMan rev	CACTAGTGAGAGGGTAGTCAGTAG
FLI-1 TaqMan fw	GACCGAGTCGTCCATGTACAAGTA
FLI-1 TaqMan rev	ACGTTGGGGTTGGGGTAGATTC
GAPDH TaqMan fw	AACAGCGACACCCACTCCTCC
GAPDH TaqMan rev	GGTGGTCCAGGGGTCTTACTC
GAS41 cloning fw	TCAATGCTCGAGGCCACCATGTTCAAGAGAATGGCCGAATTTGGGC
GAS41 cloning rev	TCGAATGGATCCTTATATGTCTTTGCTTGGTCATCTTCTCAAG
GAS41 TaqMan fw	CTGAAACAGGATGGGGTGAATTCG
GAS41 TaqMan rev	CCCAGCATTGCATTGGTGTCTGAT
HES1 Detection Primer fw	TTGCTTTCCTCATTCCCAAC
HES1 Detection Primer rev	AGGCGCAATCCAATATGAAC
Hes1 TaqMan fw	GGCGGCTAAGGTGTTTGGAGG
Hes1 TaqMan rev	CGCTGGAAGGTGACACTGCGT
HHEX cloning fw	TCAATGGAATTCGCCACCATGCAGTACCCGCACCCCGG
HHEX cloning rev	TCGAATGGATCCTCATCCAGCATTAAATAGCTTTTATCGCCC
HHEX TaqMan fw	AACCTGGTTTCAGAATCGACGCG
HHEX TaqMan rev	AAGGTCTTCTGGGAGGCAGG
HOP cloning	ATGTCGGCGGAGACCCGAG
HOP TaqMan fw	GGGAACACATTTCTTCTGAACCTACT
HOP TaqMan rev	CTGTCTTCTGGCCCAACAGGC
ID1 TaqMan fw	ACGTGCTCTGTGGTCTCCC
ID1 TaqMan rev	TGTGCAGAGAGGAGCGCCCT
ID2 TaqMan fw	CAGTCCCGTGAGGTCCGTTAG
ID2 TaqMan rev	TGTTCTGGGGGATGCTGGGCA
KLF10 TaqMan fw	CTGTCCAGACACAGCGAACC
KLF10 TaqMan rev	GGAGCAGGGGTTGGAGGTAGA
KLF2 TaqMan fw	CGCATCTGAAGGCGCATCTGC
KLF2 TaqMan rev	GCCGTTTCATGTGCAGCGCC
MAML3 cloning fw	ATACCCTCGAGATGGGGGATTTTCGAGCCCCC
MAML3 cloning rev	ATACCGGATCCTTAGGGGTTACCAAACAATTCATCAAGCTC
MAML3 TaqMan fw	TTTGGAGAGGAGGCGGCAGG
MAML3 TaqMan rev	CCAGTGGCATCACTCCCCATTT
MEF2a TaqMan fw	GCTCCCCTGTGGACAGTCTGA
MEF2a TaqMan rev	ATCAGCTTGGGAAGCCTTAGGTCAC
MEF2C TaqMan fw	CACATGTCCTGCAAATATGGCCCT
MEF2C TaqMan rev	TCCTGACACACCGGGATTGTTCA
MLL3 2A cloning rev	ATACCCCGGGGATGTTCCAGATGTTCCAGGTAACCTCT

MLLT3 cloning rev	ATACCGGGCCCTCAGGATGTTCCAGATGTTCCAGGTAAC
MLLT3 Primer Walk 1	CCTAAACCCATGTCAAAGAGC
MLLT3 Primer Walk 2	AGTCCTCTGTGGGGTTGTTG
MLLT3 TaqMan fw	CAAGCCCAGTGACCTTACTCGTA
MLLT3 TaqMan rev	GGATACAGCCAAGGACTGGGC
MLLT3+KOZAK fw	AGTCTGAATTCGCCACCATGGCTAGCTCGTGTGCCGTGC
NFIB cloning fw	ATGATGTATTCTCCCATCTGTCTCACTCA
NFIB cloning rev	CTAGCCCAGGTACCAGGACTG
NFIB TaqMan fw	GCCTGAAAAGCCATTGTTTCAGCTC
NFIB TaqMan rev	TGAAGGTGGAGGTGGAGTTCGA
numb cloning fw	GCCACCATGAACAAATTACGGCAAAGTTTTAGGAGAAAGAA
numb cloning IRES	TTAAAGTTCAATTTCAAACGTCTTCTGTAAGTCAC
numb TaqMan fw	GTCCCTGCCCAGTCCTATCCT
numb TaqMan rev	CCTGACCAGGCTGGGTGACT
SFFV U3 Sequencing (pCL1)	GGCCAAACAGGATATCTGCG
ZNF395 TaqMan fw	AGAGCAGTGTGGAAACCACGGT
ZNF395 TaqMan rev	CCCGAGAACAGACACGTGTG
<b>siRNA</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
GFPsi sense	GCAACGUGACCCUGAAGUUCAU
GFPsi antisense	GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG
Numb4 si sense	GAAGACGUUUGAAAUUGAA
Numb4si antisense	UUCAAUUCAAACGUCUUC
Numb6 si sense	CAUAGUUGACCAGACGAUA
Numb6si antisense	UAUCGUCUGGUCAACUAUG
Numb-like si sense	GCACUGACUCCAGGUGAA
Numb-like si antisense	UUCACCUUGGAAGUCAGUGC

## 2.5 Geräte

Die Hersteller der verwendeten Geräte sind, wenn nicht im Folgenden aufgeführt, jeweils an den entsprechenden Stellen erwähnt.

Gerät	Hersteller und Typ
Mikroskope	Zeiss Axioplan 2 imaging + Axiocam HRc Leica DMIRB+ Thermocontrol 37-2 digital + CTI-Controller 3700 digital + Axiocam HRc Leica DMIL
Durchflusszytometer	Coulter EPICS Elite ESP Fluorescence Cytomics FC 500
Sterilbank	Gelaine BSB 4A Clean Air NSF 49 BS 5749
Autoklav	Tuttnauer Systec 3870 EL
Kühlschränke	Liebherr
Zentrifugen	Sorvall RC5B plus (SLA-1500; HB-6) Hettich: Universal 30 RF; Rotixa/P Eppendorf
Gefriertruhen	AEG, Liebherr (-20°); ThermoForma (-80°)
Inkubatoren	Binder WTC (Zellkultur)
Thermocycler	Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 9600; 9700; 2400)
Gelsysteme	Protrans + Biorad Power Pac Basic
Gel-Photodokumentation	Herolab E.A.S.Y 429K + UVT 28M
Pipettierhilfen	Gilson (Pipetman 2-1000 µl), Rainin (12 –Kanal 20-200 µl), Hirschmann (Pipetus Akku)
Waage	Chyo MP300
Heizblock	HLC HBT 130
Mixer	Labinco
Magnetrührer und Heizplatte	Heidolph MR 3002
RealTime-PCR-Cycler	ABI-Prism7700 SequenceDetector
Netzgerät	Consort 300 V – 500 mA E835

## 2.6 Material und Chemikalien

Die Hersteller der verwendeten Chemikalien sind, wenn nicht im Folgenden aufgeführt, jeweils an den entsprechenden Stellen erwähnt.

<b>Material/Chemikalien</b>	<b>Firma und Typ</b>
Pipettenspitzen	Gilson Biorad Biozym
Reaktionsgefäße	Biorad (PCR; 0,5 ml) Eppendorf (0,5-2 ml) Greiner (5 ml, 15 ml und 50 ml Falcon)
Zellkulturflaschen	Greiner
Filter	Miltenyi (Pre-Seperation-Filter 0,2 µm) Corning (Bottle-Top-Filter 0,22µm)
Pipetten	Corning (Stripette 5-25 ml)
Extraktionssysteme	EndoFree Plasmid Maxi-Kit Qiagen, Hilden Deutschland NucleoSpin RNA II Macherey und Nagel, Düren, Deutschland
Zellkulturmedien	Gibco, Cambrex
Seren	Biochrom, Stemcell Technologie
Zusätze zu Zellkulturmedien	Gibco, Sigma, Cambrex
Zellseparation	Miltenyi (Seperation Columns)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Komplexe Genexpressionsanalysen und Suche nach Kandidatengen

Im humanen hämatopoietischen System befinden sich die meisten hämatopoietischen Stammzellen im Kompartiment der CD34<sup>+</sup>-Zellen (Krause et al. 1996). Dieses Kompartiment lässt sich weiter aufteilen in CD34<sup>+</sup>-Zellen, die bereits Differenzierungsmarker für bestimmte hämatopoietische Entwicklungsrichtungen exprimieren und solche, die negativ für diese Marker sind; aus dem Englischen abgeleitet werden letztere als lineage negative (lin<sup>-</sup>) Zellen bezeichnet. Die lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>-Zellen wiederum sind sehr heterogen bezüglich der Expression des Oberflächenantigens CD38 und können in lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>- und lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen unterteilt werden (Terstappen et al. 1991). Experimente an NOD/SCID-Mäusen zeigten, dass Zellen mit dem Potenzial langfristig ein humanes hämatopoietisches System im Knochenmark dieser Mäuse zu initiieren, in der lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellfraktion angereichert sind (Bhatia et al. 1997). Zum gegenwärtigen Stand der Forschung gilt die Aufreinigung von lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen als allgemeiner Standard zur Anreicherung humaner hämatopoietischer Stammzellen.

Mit dem Ziel Gene zu identifizieren, die im humanen hämatopoietischen System spezifisch in Stamm- bzw. sehr frühen Vorläuferzellen exprimiert sind, wurden im Vorfeld dieser Arbeit aus Nabelschnurrestblut, aus Knochenmark bzw. aus peripherem Blut von mit G-CSF behandelten Stammzellspendern lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>- und lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>-Zellen mittels magnetischer Zellseparation und anschließender durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Ihor Lemischka (Princeton University) bzw. mit Jürgen Thomale und Ludger Klein-Hitpass (Universitätsklinikum Essen) wurden komplexe Genexpressionsprofile der isolierten Zellfraktionen erstellt (Bracker et al. 2006). Zusätzlich wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe aus Essen komplexe Expressionsprofile von frisch aus Nabelschnurrestblut isolierten bzw. von kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen ermittelt.

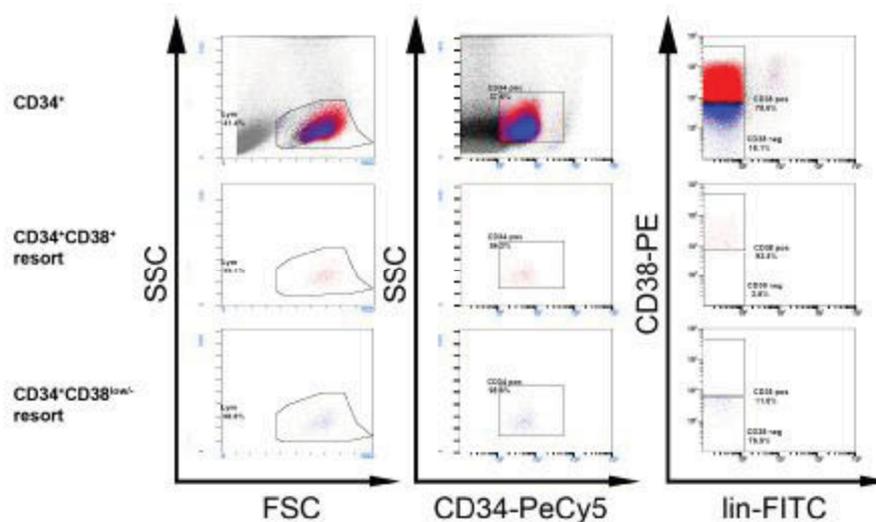


Abbildung 4: Verwendete Sortier-Strategie zur durchflusszytometrischen Anreicherung von  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ - und  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen. Dargestellt sind sowohl die Zellen vor der Sortierung (oben), sowie die durchflusszytometrischen Analysen nach der erfolgreichen Separation der zwei Zellpopulationen. Für die Sortierung wurden folgende Kriterien verwendet: lebend (FSC/SSC);  $\text{CD34}^+$  (CD34-PeCy5/SSC);  $\text{CD38}^{\text{low/-}}$  bzw.  $\text{CD38}^+$  und  $\text{lin}^-$ .

Durch Vergleiche der Expressionsprofile der  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellfraktionen der verschiedenen HSC-Quellen (Nabelschnurblut, peripheres Blut und Knochenmark) sollten stammzellspezifisch exprimierte Schicksalsdeterminanten, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, identifiziert werden können.

Für die Analysen wurden HG\_U95 sowie HG\_U133A GeneChips der Firma Affymetrix verwendet. Von den ungefähr 26000 Probesets auf den HG-U95 Chip repräsentieren ~6200 Proben ca. 2000 Gene, die für Transkriptionsfaktoren oder Transkriptionsmodulatoren kodieren. Bezogen auf die aus Nabelschnurblut stammenden  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen weisen 2046 dieser Probesets (1248 Gene) spezifische Signale auf, bei 314 (291 Gene) sind die Signale mindestens 1,5-mal stärker als in  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen; 132 Probesets (130 Gene) weisen in der  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellpopulation mehr als doppelt so starke Signale wie in der  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellpopulation auf.

Um HSZ-spezifische Transkriptionsfaktoren identifizieren zu können wurden in der AG Giebel Abfragen unter Berücksichtigung aller, für HSZ angereicherten Fraktionen durchgeführt. Als Abfragekriterium wurde nach Transkriptionsfaktoren und -regulatoren gesucht, die in allen  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellfraktionen spezifische Signale aufwiesen, die mindestens 1,3-mal stärker waren als die entsprechenden Signale in der  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellfraktion. Insgesamt erfüllten 101 Probesets (96 verschiedene Gene) diese Kriterien.

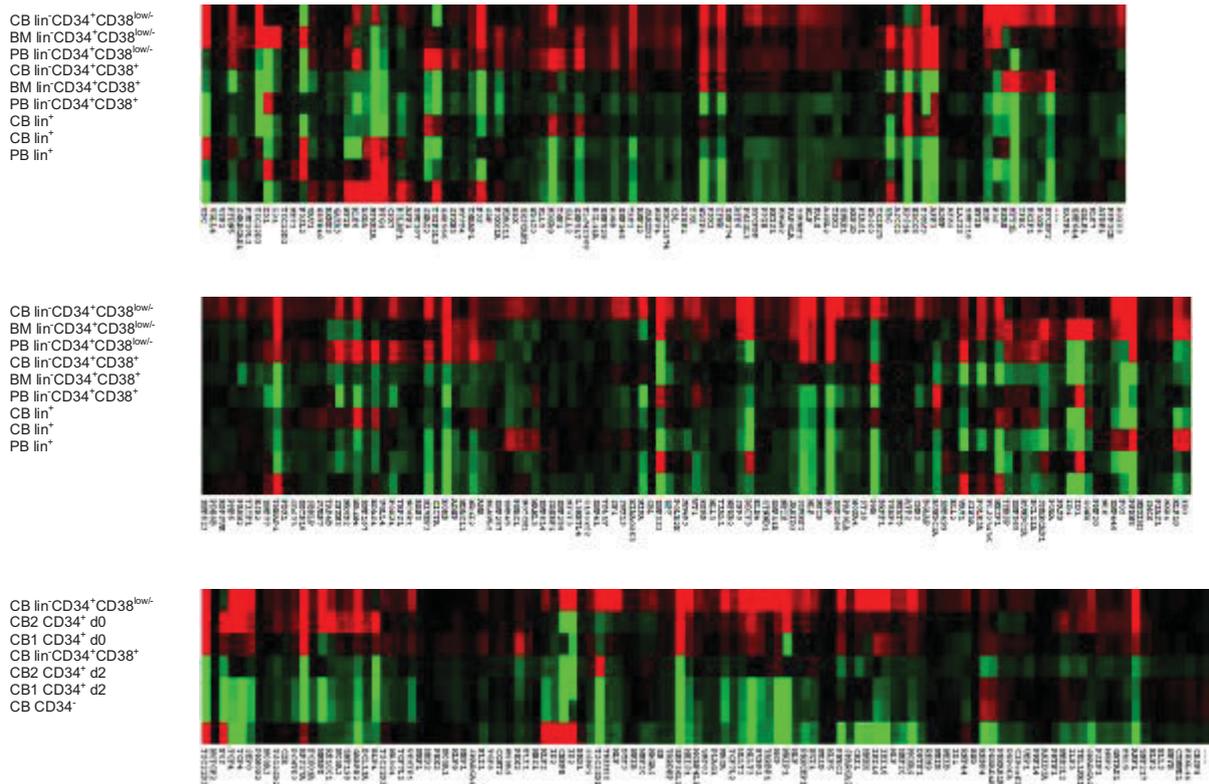


Abbildung 5: Beispiele für Abfragen der Datenbanken, die mit Hilfe der Software von M.B. Eisen graphisch dargestellt werden (Eisen et al., 1998). Schwarz zeigt die durchschnittliche, rot die über- und grün die unterdurchschnittliche Expressionsstärke innerhalb einer Reihe an. Folgende Abfragen bezüglich der Transkriptionsfaktoren und -regulatoren sind abgerufen worden: Plot oben:  $CB\ lin^{-}CD34^{+}CD38^{low/-}$  weist spezifische Signale auf, die mehr als doppelt so stark sind wie entsprechende  $CB\ lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$ -Signale. Plot Mitte:  $CB, BM$  und  $PB\ lin^{-}CD34^{+}CD38^{low/-}$  weisen spezifisches Signal auf und  $lin^{-}CD34^{+}CD38^{low/-}$ -Signale sind mehr als  $1,3^*$  so stark wie die entsprechenden  $lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$ -Signale. Plot unten:  $CB\ lin^{-}CD34^{+}CD38^{low/-}$  weist spezifische Signale auf, die mindestens  $1,68^*$ , ( $2^{0,75}$ ) stärker sind als die entsprechender  $CB\ lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$  Probesets (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Bernd Giebel)

Hierbei fanden sich unter anderem die Gene *inhibitor of DNA binding* (ID) 1 und 2, deren Expression in der  $lin^{-}CD34^{+}CD38^{low/-}$ -Zellfraktion im Vergleich zu der  $lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$  erhöht ist. Die *Inhibitor of DNA binding* Gene codieren für eine Familie von transkriptionell aktiven Proteinen der Helix-Loop-Helix-Klasse (HLH). Proteine dieser Familie regulieren indirekt die Transkription in Zellen, indem sie mit Transkriptionsfaktoren, mit basischen Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH), Heterodimere bilden und somit eine Interaktion der basischen Domäne mit der DNA verhindern (Hasskarl und Munger, 2002). Von ID1 ist bekannt, dass eine Überexpression in embryonalen Stammzellen eine Kultivierung dieser ohne Stromazellen ermöglicht (Ying et al., 2003). Außerdem wurden weitere transkriptionell aktive Gene identifiziert, deren Expression in der  $lin^{-}CD34^{+}CD38^{low/-}$ -Zellfraktion im Vergleich zu der  $lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$  und  $lin^{+}$  erhöht ist. Hierunter fanden sich unter anderem die Gene ZNF395, MLLT3, HOP, KLF10, HEX, MAML3, NFIB, ATF2, NFIB, FLI-1, CBX5 und Gas41, die im Rahmen dieser Arbeit funktionell untersucht wurden.

### 3.1.1 Verifizierung der komplexen Genexpressionsanalysen

Um in den komplexen Genexpressionsanalysen identifizierte Kandidatengene zu verifizieren wurden zunächst  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ - sowie  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen aus Nabelschnurrestblut durchflusszytometrisch nach dem Schema in Abbildung 4 sortiert. Die so angereicherten Zellfraktionen wurden direkt nach dem Sortieren in TRIzol aufgenommen und die Gesamt-RNA extrahiert. Für die Untersuchung der Genexpression wurde nach der Extraktion ein DNase-Verdau durchgeführt, um vorhandene Reste genomischer DNA zu entfernen. Die so behandelte RNA wurde dann in cDNA umgeschrieben und konnte für die Untersuchungen benutzt werden.

Um die relative Expression der einzelnen Gene zwischen den zwei Zellfraktionen vergleichen zu können wurden quantitative PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei diente GAPDH als Referenzgen zur Normalisierung der gemessenen Expressionswerte. Für die einzelnen Zielgene wurden Oligonukleotide gewählt, die alle möglichst in der 3' untranslatierten Region (3' UTR) der jeweiligen mRNA lagen, da alle Nukleotidproben auf den verwendeten Affymetrix-Chips auch in dem Bereich der 3' UTR lagen. Pro Gen wurden jeweils drei einzelne PCR-Reaktionen angesetzt, deren Ct-Werte nach der Messung gemittelt wurden. Aus der Differenz der Ct-Werte der GAPDH-PCR und des Zielgens konnte die Menge des Zieltranskripts innerhalb der  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen relativ zu der Menge in den  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$  angegeben werden. Mittels dieses Schemas wurde die Expression von 13 mit Transkription assoziierten Genen an drei unterschiedlichen Nabelschnurrestbluten ermittelt. Es zeigte sich, dass 6 der gewählten Zielgene (MLLT3, ID1, ID2, NFIB, MAML3, KLF10) eine mehr als viermal so starke Expression in Zellen der  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellfraktion aufwiesen, als in  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen. Vier der untersuchten Zielgene (ZNF395, HHEX, HOP, GAS41) zeigten eine mindestens doppelt erhöhte Expression in  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen, während drei der gewählten Faktoren (ATF2, FLI-1, CBX5) eine verringerte Expression in  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen aufwiesen.

Zielgen	relative Expression	Fehler
MLLT3	4.04	±2.75
ID1	15.96	±10.62
ID2	5.22	±4.47
ATF2	0.32	±0.22
NFIB	5.55	±2.10
ZNF395	2.44	±2.63
MAML3	13.33	±10.63
HHEX	3.06	±3.20
FLI-1	0.39	±0.11
HOP	3.17	±1.36
KLF10	25.40	±37.41
CBX5	0.56	±1,44
GAS41	2.98	±0,73

Tabelle 1: Darstellung der ermittelten Expressionswerte der entsprechenden Zielgene in  $\text{lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen. Die ermittelten Werte spiegeln die Änderung der mRNA-Menge innerhalb der  $\text{lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen zu den ermittelten Werten der  $\text{lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{+}$ -Zellen, die hier als Referenz dienen und deren relative Expression den Wert 1 erhielt, wider. Hieraus ergibt sich, dass z.B. CBX5, FLI-1 sowie ATF2 eine geringere mRNA-Menge in  $\text{lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen aufweisen. Die Expression von ID1, MAML3 und KLF10 ist in  $\text{lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen hingegen stark erhöht.

### 3.1.2 Klonierung von Kandidatengenen in Expressionsvektor pIRES-EGFP

Um die Funktion der verifizierten Kandidatengene in  $\text{CD34}^{+}$ -Zellen charakterisieren zu können wurde versucht, diese aus der cDNA frisch isolierter  $\text{CD34}^{+}$ -Zellen mittels PCR zu klonieren. Als Vektor diente zunächst das Plasmid pIRES-EGFP, das eine transiente Überexpression in Zellen erlaubt. Das Plasmid enthält die kodierende Region von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) als Reporterogen, davor befindet sich eine IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*), die die Translation von zwei Proteinen von einer mRNA ermöglicht. Die cDNA eines Zielgens wird vor die IRES-Sequenz kloniert, und dessen Expression durch einen CMV-Promotor gesteuert.

Im Fall von ID1, ID1' (einer durch alternatives Spleißen verkürzten Variante von ID1), ID2 wurden die kodierenden Regionen von E. Hara freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle drei Gene lagen im Plasmid pCDNA3 (Invitrogen) vor, und konnten durch einen Restriktionsverdau einfach in das Plasmid pIRES-EGFP umkloniert werden. Hiefür wurden ID1 und ID1' mit den Enzymen BamHI und EcoRI geschnitten und über die Restriktionsschnittstellen BglII (BamHI kompatibel) und EcoRI in pIRES-EGFP ligiert. ID2 wurde mit BamHI und XhoI aus pCDNA3 herausgeschnitten und in pIRES-EGFP über BglII und XhoI ligiert.

KLF10 wurde im Vektor pCDNA4/TO (Invitrogen) von T. Spelsberg bereitgestellt. Auch hier konnte die kodierende Region einfach durch einen Restriktionsansatz mit

EcoRI und BamHI aus dem Vektor geschnitten und in pIRES-EGFP in die gleichen Restriktionsschnittstellen ligiert werden.

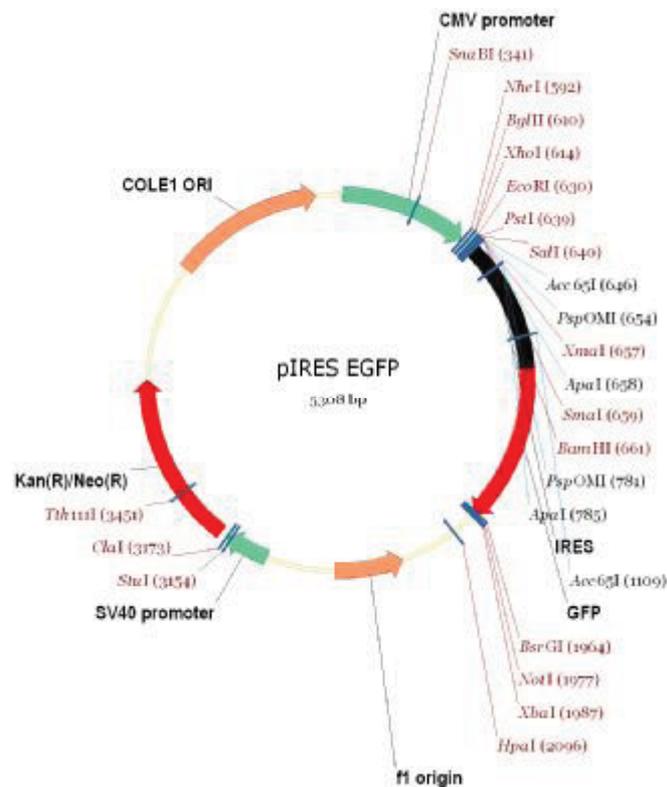


Abbildung 6: Graphische Darstellung des für die transiente Überexpression verwendeten Plasmids pIRES-EGFP. Die *Multiple Cloning Site (MCS)* befindet sich zwischen dem CMV-Promotor und der IRES-Sequenz.

Ein Plasmid, das die mRNA von MLLT3 enthielt wurde ursprünglich vom Deutschen Ressourcen Zentrum erworben (Klon: IRATp970E0533D). Von dem Plasmid wurde die kodierende Region von MLLT3 mittels PCR basierter Techniken (Primer *siehe* 2.4.22) amplifiziert. Für die PCR-Reaktion wurde AdvantageTag HF (ClonTech), die eine Lesekorrekurfunktion besitzt, verwendet. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit EcoRI und XmaI geschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den Vektor pIRES-EGFP ligiert. Positive Klone wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Die Gene CBX5, DDIT3, GAS41, HHEX, HOP sowie SOCS2 wurden alle mittels PCR mit Advatage Taq HF aus cDNA von CD34<sup>+</sup>-Zellen kloniert. Die PCR-Produkte DDIT3 und HOP wurden nach der erfolgreichen PCR mit T4-DNA Polymerase aufgefüllt, mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und anschließend in den mit SmaI geschnittenen Vektor pIRES-EGFP ligiert. CBX5 und HHEX wurden nach erfolgreicher PCR mit EcoRI und BamHI geschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in pIRES-EGFP ligiert. GAS41 wurde über XhoI und BamHI in das Plasmid kloniert und SOCS2 über XhoI EcoRI.

### 3.2 Etablierung und Optimierung der Nucleofectionsprotokolls für frisch isolierte CD34<sup>+</sup>-Zellen

Um CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgreich genetisch manipulieren zu können, musste nach einer effizienten Methode gesucht werden, die dies ermöglichte. Die Nucleofection, eine spezielle Variante der Elektroporation der Firma Amaxa, schien die erforderlichen Kriterien zu erfüllen. Da jedoch das von der Firma empfohlene Protokoll nicht ausreichend für die Verwendung geringer Zellzahlen war, wurde die Methode im Zuge dieser Arbeit und in enger Kollaboration mit dem damaligen Diplomanden Jan Spanholtz weiter optimiert und erfolgreich veröffentlicht (von Levetzow et al. 2006). Für die Optimierung des Protokolls wurden Zellen entweder mit dem Plasmid pEGFP-N1 (4-6µl DNA pro Transfection, Clontech), oder um den Einfluss der Nucleofection auf das Zellschicksal *per se* zu untersuchen ohne DNA transfiziert. Durch Veränderungen am Protokoll (*siehe* 2.1.4) konnte die Überlebensrate mit GFP transfizierter CD34<sup>+</sup>-Zellen zwei Tage nach der Nucleofection auf 50,5% ± 17,5% bei einer Transfectionseffizienz von 85,1% ± 5% gesteigert werden. Da nach erfolgreicher Transfection das Zellschicksal der Zellen in CFU-GEMM und LTC-IC Analysen untersucht werden sollte, wurde außerdem das Entwicklungspotential dieser im Vergleich zu untransfizierten, wie auch Mock-transfizierten (d.h. Transfektion ohne DNA) Zellen untersucht. Hierfür wurden zwei Tage nach der Transfektion die Zellen bezüglich ihrer CD34- sowie GFP-Expression durchflußzytometrisch sortiert. In CFU-GEMM-Versuchen wurde zwar für GFP-transfizierte Zellen eine leichte Reduktion im Koloniebildungspotential ermittelt. Die gebildeten Kolonietypen zeigten jedoch ähnliche prozentuale Verhältnisse, weshalb ein Einfluss der Nucleofection und der Expression von GFP in CD34<sup>+</sup>-Zellen auf das Zellschicksal ausgeschlossen wurde.

	Überlebensrate	Koloniefrequenz	Rote Kolonien	Weißer Kolonien	GEMM-Kolonien
Kontrolle	82,3 ± 6,0%	119,6% ± 64,7%	18,2% ± 11,3%	62,8% ± 14,2%	19,0% ± 11,6 %
Mock	74,2 ± 9,7%	108,6% ± 56,0%	15,3% ± 12,1%	64,0% ± 16,9%	20,8% ± 12,8%
GFP	50,5% ± 17,5%	86,3% ± 76,2%	16,0 ± 10,5%	60,3% ± 15,8%	23,7% ± 20,8%

Tabelle 2: Dargestellt ist die durchschnittliche Überlebensrate von transfizierten wie untransfizierten CD34<sup>+</sup>-Zellen, sowie deren Koloniebildungspotential und die Frequenz der gebildeten Kolonietypen

Die nucleofizierten Zellen wurden zusätzlich in LTC-IC-Analysen bezüglich ihres Entwicklungspotentials untersucht. Hierbei zeigte es sich, dass die Transfection *per se*

kaum einen Effekt auf die LT-IC Frequenz ( $5,1\% \pm 1,5\%$  zu  $4,9\% \pm 0,5\%$  in den Mock-transfizierten Zellen) hat. In GFP transfizierten Zellen hingegen wird das LTC-IC Potential der Zellen anscheinend leicht ( $5,1\% \pm 1,5\%$  zu  $3,4\% \pm 1,3\%$ ) reduziert.

	Überlebensrate	LTC-IC Frequenz
Kontrolle	$79,9\% \pm 7,5\%$	$5,1\% \pm 1,5\%$
Mock	$74,9 \pm 14,3\%$	$4,9\% \pm 0,5\%$
GFP	$53,0\% \pm 23,8\%$	$3,4\% \pm 1,3\%$

Tabelle 3: Durchschnittliche LTC-IC Frequenz in transfizierten wie untransfizierten Zellen, sowie die Überlebensrate der zu den LTC-IC Versuchen korrespondierenden Nabelschnurrestbluten

Die transfizierten Zellen wurden außerdem bezüglich ihrer Morphologie untersucht.  $CD34^+$ -Zellen wachsen innerhalb der ersten zwei Tage unter den in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsbedingungen und erwerben eine definierte Zellpolarität. D.h. sie bilden am vorderen Pol die sog. Leitfront (*leading edge*), sowie am hinteren Ende eine Struktur, die als *Uropod* bezeichnet wird (Giebel et al. 2004). Um den Effekt der Nucleofektion auf die Morphologie von  $CD34^+$ -Zellen zu untersuchen wurden transfizierte, wie nicht-transfizierte  $CD34^+$ -Zellen lichtmikroskopisch untersucht.

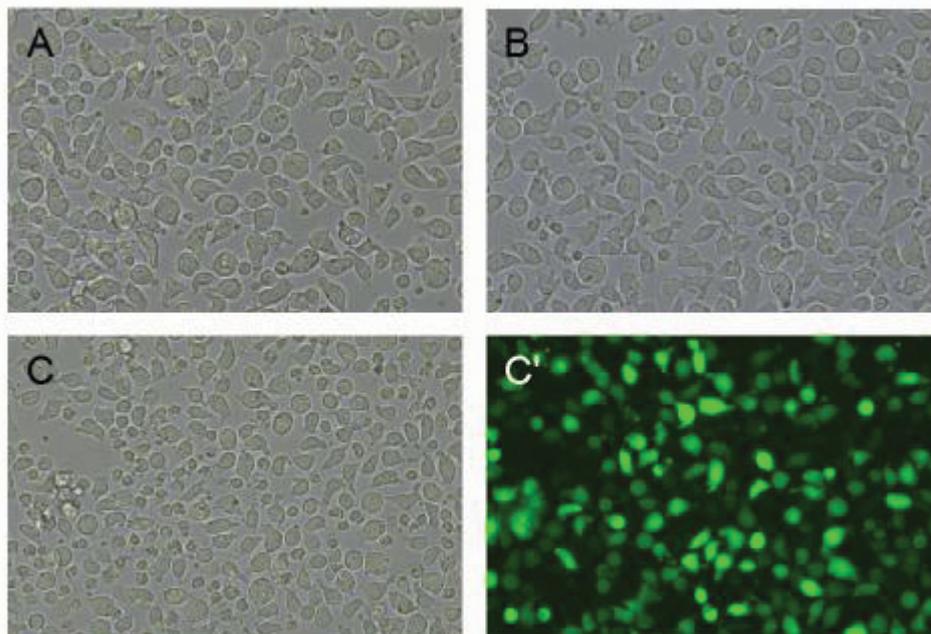


Abbildung 7: Durch die Kultivierung erwerben sowohl nicht-transfizierte als auch mit GFP-Plasmid transfizierte  $CD34^+$ -Zellen eine Polarität. GFP transfizierte Zellen scheinen im Vergleich zu nicht- bzw. Mock-transfizierten  $CD34^+$ -Zellen im Wachstum etwas retardiert zu sein. A: untransfizierte  $CD34^+$ -Zellen nach zweitägiger Kultivierung in I20 + EAC; B: Mock-transfizierte  $CD34^+$ -Zellen nach zweitägiger Kultivierung in I20 + EAC; C und C': GFP-transfizierte  $CD34^+$ -Zellen nach zweitägiger Kultivierung in I20 + EAC. (Abbildung aus von Levetzow et al. 2006)

Es zeigte sich, dass GFP-transfizierte  $CD34^+$ -Zellen wie auch nicht- bzw. Mock-transfizierte Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen eine Polarität erwerben.

Jedoch scheinen GFP-transfizierte Zellen im Vergleich zu den un- bzw. Mock-transfizierten Zellen ein verlangsamtes Zellwachstum zu haben. So erscheinen nucleofizierte Zellen zwei Tage nach der Transfektion in durchflusszytometrischen Analysen kleiner als die Kontrollen. Dieser Größenunterschied ist jedoch drei Tage nach der Transfektion nicht mehr detektierbar.

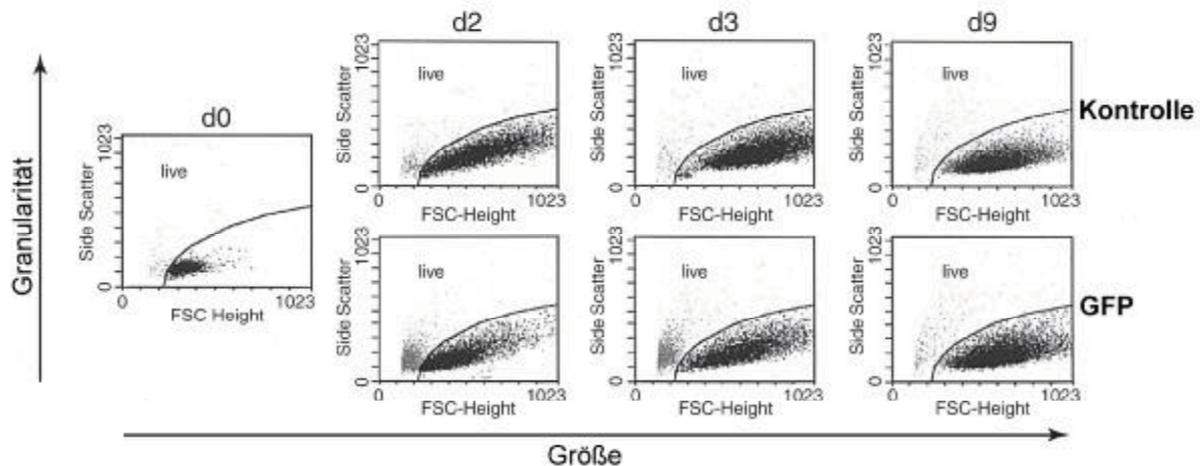


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analysen von untransfizierten (Kontrolle) und GFP-transfizierten CD34<sup>+</sup>-Zellen an vier verschiedenen Zeitpunkten (d0= frisch isolierte Zellen; d2= Zellen nach zwei Tagen Kultur; d3= Zellen an Tag drei; d9= Zellen an Tag neun). Es zeigt sich, dass GFP-transfizierte Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen zunächst im Wachstum retardiert sind (d2). Dieser Größenunterschied ist jedoch schon am dritten Kulturtag nicht mehr zu detektieren.

### 3.3 Überexpression der klonierten Kandidatengene in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen

Um den Einfluss der einzelnen klonierten Kandidatengene auf das Zellschicksal bzw. die Selbsterneuerung und Differenzierung von humanen Stamm- und Vorläuferzellen untersuchen zu können, wurden die einzelnen Faktoren transient in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurrestblut überexprimiert. Hierfür wurden 4-6µg der entsprechenden Plasmid-DNA mittels Nucleofektion in CD34<sup>+</sup>-Zellen transfiziert. Für die einzelnen Transfektionen wurden angereicherte CD34<sup>+</sup>-Zellen eines Nabelschnurrestblutes in einer der Anzahl der Transfektionen entsprechenden Menge Amaxa-Puffer resuspendiert. Die Transfektionen wurden analog dem im 2.1.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden die so transfizierten Zellen für zwei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Hiernach wurden die Zellen bezüglich ihrer CD34- und GFP-Expression durchflusszytometrisch sortiert. Hierbei zeigten sich teils starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Plasmiden bezüglich der Expression des Reporterproteins GFP sowie der jeweiligen

Überlebensrate der Zellen nach der Transfektion. So ergab sich z.B. für Zellen, die mit dem Kontroll-Plasmid pIRES-GFP transfiziert wurden eine mittlere Überlebensrate von  $19,7\% \pm 4,83\%$  bei einer Transfektionseffizienz von  $46,17\% \pm 14,08\%$ . Andere Plasmide, wie KLF10, führten hingegen zu einer deutlicheren Reduktion des Zellüberlebens ( $13,55\% \pm 6,01\%$ ) sowie einer viel schwächeren Expression von EGFP in den Überlebenden Zellen ( $15,85\% \pm 14,35\%$ ). Insgesamt war die Überlebensrate der transfizierten Zellen jedoch auch im Vergleich zu den zuvor nur mit GFP durchgeführten Versuchen zur Etablierung der Methode deutlich verringert.

Transfektion	Überlebensrate	Transfektionseffizienz
<b>Kontrolle</b>	$62,57\% \pm 9,9\%$	
<b>IRES-GFP</b>	$19,7\% \pm 4,83\%$	$46,17\% \pm 14,08\%$
<b>ID1</b>	$21,33\% \pm 5,77\%$	$76,83\% \pm 3,9\%$
<b>ID1'</b>	$23,1\% \pm 2,75\%$	$68,73\% \pm 9,62\%$
<b>ID2</b>	$17,23\% \pm 11,72\%$	$58,73\% \pm 10,95\%$
<b>MLLT3</b>	$12,73\% \pm 5,05\%$	$37,03\% \pm 14,74\%$
<b>SOCS2</b>	$20,65\% \pm 2,9\%$	$49,10\% \pm 4,67\%$
<b>HHEX</b>	$18,10\% \pm 6,51\%$	$42,10\% \pm 15,7\%$
<b>HOP</b>	$24,6\% \pm 6,41\%$	$60,67\% \pm 13,45\%$
<b>GAS41</b>	$14,1\% \pm 7,92\%$	$17,1\% \pm 14,99\%$
<b>CBX5</b>	$14,85\% \pm 1,91\%$	$60,6\% \pm 0,28\%$
<b>DDIT3</b>	$16,7\% \pm 2,69\%$	$56,25\% \pm 15,77\%$
<b>KLF10</b>	$13,55\% \pm 6,01\%$	$15,85\% \pm 14,35\%$

Tabelle 4: Mittlere Überlebensraten und Transfektionseffizienzen von CD34<sup>+</sup>-Zellen nach erfolgreicher Nucleofektion. Die dargestellten Werte wurden zwei Tage nach der Transfektion durchflusszytometrisch ermittelt.

### 3.3.1 Auswirkungen der Überexpression der klonierten Kandidatengene auf das Zellschicksal später Vorläuferzellen

Um den Einfluss der Überexpression der einzelnen klonierten Faktoren auf das Kolonienbildungspotential später myeloischer Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde der CFU-GEMM-Ansatz gewählt. Hierfür wurden 200 CD34<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>-Zellen zwei Tage nach der Transfektion in semisoliden Methylzellulose sortiert.

Nach einer Kultivierungsphase von zwei Wochen wurden die CFU-GEMM Ansätze ausgewertet. Zunächst wurde retrospektiv die Frequenz der gebildeten Kolonien bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Zellzahl bestimmt. Es zeigte sich, dass teilweise die Frequenz der gebildeten Kolonien im Verhältnis zu den Kontrollen (untransfizierte wie GFP-transfizierte Zellen) drastisch reduziert wurde. So wurde für die untransfizierten Kontrollzellen eine mittlere Koloniebildungsrate von  $41,75\% \pm 19,65\%$  sowie für GFP transfizierte Zellen eine Rate von  $52,40\% \pm 12,60\%$  ermittelt.

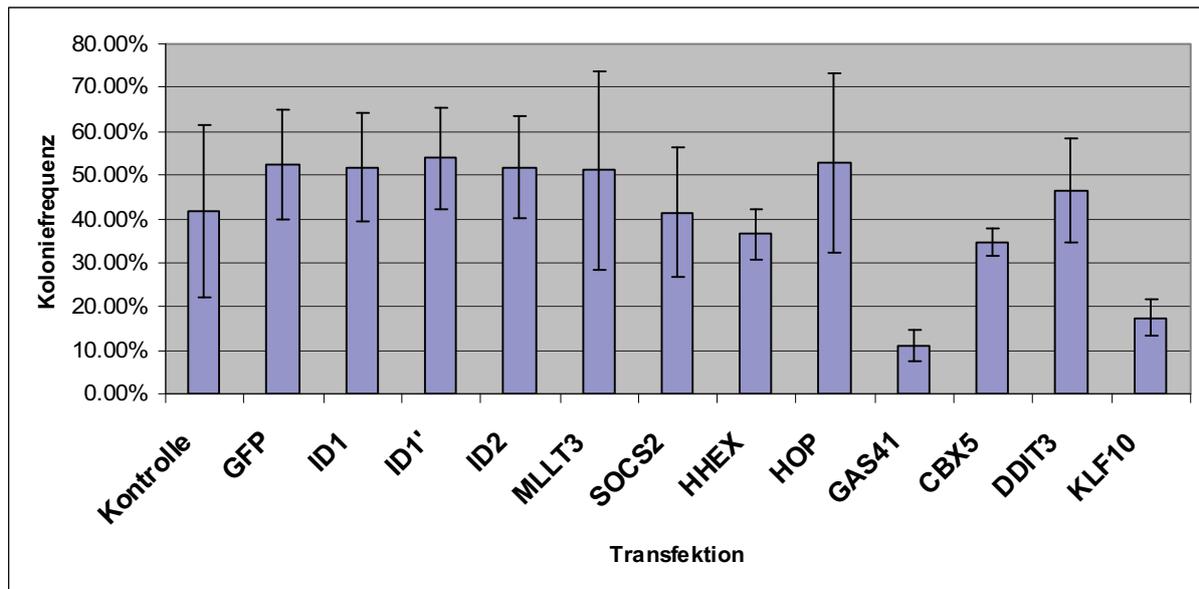


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Kolonienfrequenz in mit verschiedenen Kandidatengeneten transfizierten CD34<sup>+</sup>-Zellen in CFU-GEMM Versuchen.

Eine starke Reduktion im Koloniebildungspotential wurde bei GAS41 und KLF10 transfizierten Zellen beobachtet. Hier verringerte sich der Anteil gebildeter Kolonien auf  $11,00 \pm 3,54\%$  (GAS41) bzw.  $17,50\% \pm 4,24\%$  (KLF10). Ein leichter Rückgang der Kolonienfrequenz zeigte sich nach der Überexpression von CBX5 ( $34,75\% \pm 3,18\%$ ), HHEX ( $36,50\% \pm 5,66\%$ ). Die restlichen Faktoren zeigten eine zu den Kontrollen vergleichbare Kolonieanzahl bei der Auswertung.

Transfektion	Koloniefrequenz
<b>Kontrolle (n=9)</b>	41,75% ± 19,65%
<b>GFP (n=8)</b>	52,40% ± 12,60%
<b>ID1 (n=9)</b>	51,80% ± 12,51%
<b>ID1'(n=8)</b>	53,90% ± 11,65%
<b>ID2 (n=8)</b>	51,80% ± 11,76%
<b>MLLT3 (n=7)</b>	51,08% ± 22,75%
<b>SOCS2 (n=6)</b>	41,50% ± 14,67%
<b>HHEX (n=2)</b>	36,50% ± 5,66%
<b>HOP (n=4)</b>	52,83% ± 20,52%
<b>GAS41 (n=2)</b>	11,00% ± 3,54%
<b>CBX5 (n=2)</b>	34,75% ± 3,18%
<b>DDIT3 (n=4)</b>	46,50% ± 11,72%
<b>KLF10 (n=2)</b>	17,50% ± 4,24%

Tabelle 5: Ermittelte Kolonienbildungsfrequenz in CFU-GEMM Versuchen nach der Überexpression der verschiedenen Kandidatengene in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen.

Außer der Anzahl der gebildeten Kolonien wurden auch die gebildeten Kolonietypen bestimmt. Hierbei zeigte es sich, dass die Kontrollzellen (untransfiziert und GFP transfiziert) der untersuchten Blute ähnliche Frequenzen bezüglich der verschiedenen Kolonietypen in CFU-GEMM Ansätzen bildeten, wie in den zuvor

beschriebenen Versuchen (vgl. 3.1.3). Im Mittel waren  $16,86\% \pm 16,85\%$  der Kolonien untransfizierter  $CD34^+$ -Zellen roten Ursprungs, für GFP transfizierter Zellen ergab sich eine vergleichbare Frequenz von  $13,35\% \pm 12,77\%$ . Eine stark erhöhte Bildung roter Kolonien wurde nach der Überexpression der Faktoren KLF10 ( $24,26\% \pm 0,18\%$ ) sowie GAS41 ( $24,73\% \pm 1,69\%$ ) beobachtet, jedoch wurde durch die Überexpression dieser Faktoren die Frequenz der gebildeten Kolonien *per se* stark reduziert (vgl. Tabelle 4).

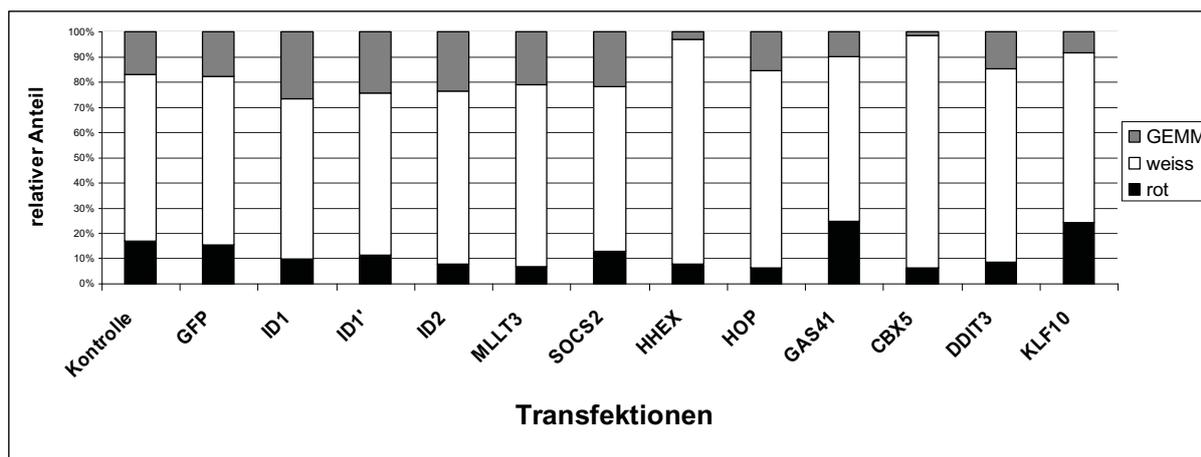


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Effekte der Überexpression der verschiedenen Kandidatengene in  $CD34^+$ -Zellen. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils gebildeten Kolonietypen bezogen auf die Gesamtmenge der gebildeten Kolonien.

Die Überexpression der Faktoren DDIT3 ( $8,53\% \pm 8,4\%$ ), HHEX ( $8,02\% \pm 2,63\%$ ), ID2 ( $7,18\% \pm 7,15\%$ ), MLLT3 ( $6,62\% \pm 10,16\%$ ), CBX5 ( $6,46\% \pm 0,43\%$ ) sowie HOP ( $6,26\% \pm 2,73\%$ ) führte hingegen zu einer Reduktion der gebildeten roten Kolonien.

Kolonietyp Transfektion	Rot	Weiß	GEMM
<b>Kontrolle (n=9)</b>	16,86% $\pm$ 16,85%	66,25% $\pm$ 14,74%	16,89% $\pm$ 10,21%
<b>GFP (n=8)</b>	13,35% $\pm$ 12,77%	58,89% $\pm$ 31,43%	15,26% $\pm$ 13,04%
<b>ID1 (n=9)</b>	10,14% $\pm$ 12,07% (*)	66,41% $\pm$ 21,02%	27,54% $\pm$ 18,58% (*)
<b>ID1' (n=8)</b>	11,42% $\pm$ 6,52%	64,52% $\pm$ 19,90%	24,23% $\pm$ 14,44% (**)
<b>ID2 (n=8)</b>	7,81% $\pm$ 7,15% (*)	68,64% $\pm$ 20,08%	23,55% $\pm$ 17,13% (**)
<b>MLLT3 (n=7)</b>	6,62% $\pm$ 10,16%	72,58% $\pm$ 18,51%	20,81% $\pm$ 15,73% (*)
<b>SOCS2 (n=6)</b>	12,75% $\pm$ 12,44%	65,66% $\pm$ 16,36%	21,59% $\pm$ 13,99%
<b>HHEX (n=2)</b>	8,02% $\pm$ 2,63% (**)	88,90% $\pm$ 7,00%	3,09% $\pm$ 4,36%
<b>HOP (n=4)</b>	6,26% $\pm$ 2,73%	78,39% $\pm$ 5,57% (**)	15,35% $\pm$ 7,65%
<b>GAS41 (n=2)</b>	24,73% $\pm$ 1,69%	65,69% $\pm$ 1,39%	9,59% $\pm$ 3,08%
<b>CBX5 (n=2)</b>	6,46% $\pm$ 0,43%	92,19% $\pm$ 2,34%	1,35% $\pm$ 1,91%
<b>DDIT3 (n=4)</b>	8,53% $\pm$ 8,40%	76,82% $\pm$ 17,57% (**)	14,65% $\pm$ 12,16%
<b>KLF10 (n=2)</b>	24,26% $\pm$ 0,18%	67,41% $\pm$ 2,20%	8,33% $\pm$ 2,02%

Tabelle 6: Dargestellt sind die ermittelten relativen Anteile der verschiedenen Kolonietypen nach erfolgreicher Überexpression der Kandidatengene. Mit \* markierte Werte gelangen in den Bereich der statistischen Signifikanz ( $p < 0,1$ ); mit \*\* markierte Werte sind bereits statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Student's T-Test (zweiseitig) verwendet; als Referenz wurden die Werte GFP-transfizierter Zellen benutzt.

Im Fall von HHEX scheint diese Reduktion bereits bezogen auf GFP-transfizierte Zellen statistisch signifikant zu sein ( $p=0,03$ ). Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student's T-Test verwendet.

Eine leicht erhöhter Anteil gebildeter weißer Kolonien im Vergleich zu den Kontrollen ist nach der Überexpression der Faktoren HOP ( $78,39\% \pm 5,57\%$ ), DDIT3 ( $76,82\% \pm 17,57\%$ ) und MLLT3 ( $72,58\% \pm 18,51\%$ ) zu beobachten. Die Überexpression der Faktoren DDIT3 ( $76,82\% \pm 17,57\%$ ;  $p=0,002$ ) und von HOP ( $78,39\% \pm 5,57\%$ ;  $p=0,03$ ) erhöht im Vergleich zu GFP-transfizierten Zellen ( $58,89\% \pm 31,43\%$ ) signifikant den Anteil der gebildeten weißen Kolonien. Besonders stark im Vergleich zu den Kontrollen erhöht sich der Anteil der gebildeten weißen Kolonien nach der Überexpression der Faktoren HHEX ( $88,90\% \pm 7,00\%$ ) und CBX5 ( $92,19\% \pm 2,34\%$ ), jedoch konnte hier keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden, was jedoch in der geringen Stichprobenanzahl begründet sein dürfte. Die Überexpression der restlichen Faktoren scheint hingegen kaum Einfluss auf die Bildung von weißen Kolonien auszuüben.

Des Weiteren wurden die Frequenzen der gebildeten gemischten (GEMM-) Kolonien bestimmt. Die Überexpression der Faktoren ID1 ( $27,54\% \pm 18,58\%$ ), ID1' ( $24,23\% \pm 14,44\%$ ), ID2 ( $23,55\% \pm 17,13\%$ ), SOCS2 ( $21,59\% \pm 13,99\%$ ) und MLLT3 ( $20,81\% \pm 15,73\%$ ) führt im Vergleich zu den Kontrollen (untransfiziert:  $16,89\% \pm 10,21\%$ ; GFP:  $15,26\% \pm 13,04\%$ ) zu einem höheren Anteil gebildeter GEMM-Kolonien. ID1' ( $p=0,005$ ) und ID2 ( $p=0,01$ ) bilden im Vergleich zu GFP-transfizierten Zellen signifikant mehr GEMM-Kolonien. Eine Reduktion der gebildeten GEMM-Kolonien im Vergleich zu den Kontrollen konnte nach der Überexpression der Faktoren GAS41 ( $9,59\% \pm 3,08\%$ ), KLF10 ( $8,33\% \pm 2,02\%$ ), HHEX ( $3,09\% \pm 4,36\%$ ) sowie CBX5 ( $1,35\% \pm 1,91\%$ ) beobachtet werden. Die Überexpression der Gene HOP ( $15,34 \pm 7,65$ ) sowie von DDIT3 ( $14,65\% \pm 12,16\%$ ) scheint hingegen keinen Einfluss auf die Bildung von gemischten Kolonien zu haben.

### **3.3.2 Auswirkungen der Überexpression der klonierten Kandidatengene auf das Zellschicksal früher Vorläuferzellen**

Neben dem Einfluss der Überexpression der verschiedenen Faktoren auf das Zellschicksal später Vorläuferzellen, wurde auch dieser auf das Zellschicksal der frühen Progenitoren untersucht. Hierbei handelt es sich um Zellen, die auch noch

nach mehrwöchiger *in vitro* Kultivierung in der Lage sind Kolonien auszubilden. Für diese Fragestellung wurde der LTC-IC-Ansatz gewählt.

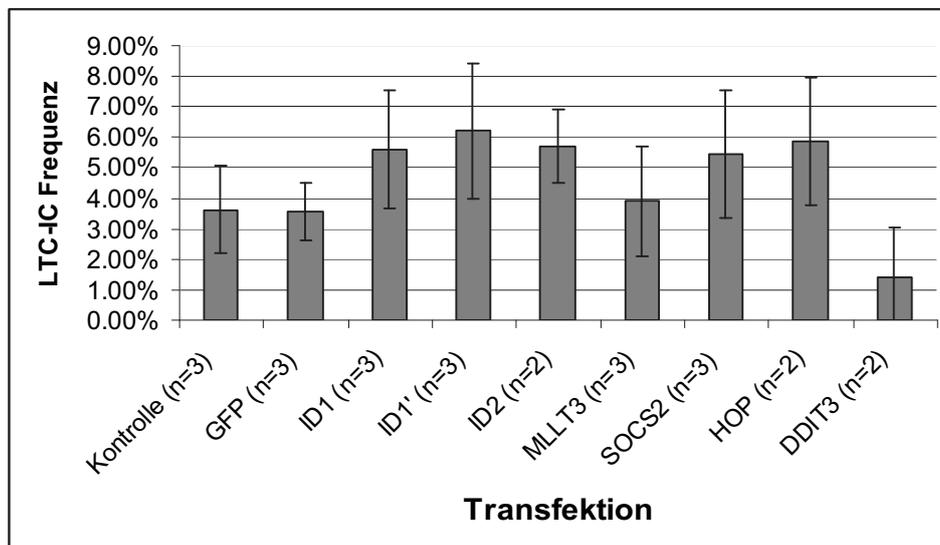


Abbildung 11: Einfluss der Überexpression der verschiedenen Kandidatengene in CD34<sup>+</sup>-Zellen auf die LTC-IC Frequenz. Untransfizierte und GFP-transfizierte Kontrollzellen zeigen vergleichbare LTC-IC Frequenzen (Kontrolle: 3,36% ± 1,44%; GFP 3,55% ± 0,95%). Die Überexpression der Gene ID1 (5,61% ± 1,93%), ID1' (6,22% ± 2,22%), ID2 (5,71% ± 1,20), SOCS2 (5,43% ± 2,09%) und HOP (5,86% ± 2,10%) führt zu einer leichten Erhöhung der LTC-IC Rate. Die Überexpression von MLLT3 (3,90% ± 1,79%) scheint keine Auswirkung auf die LTC-IC Frequenz zu haben. Verstärkte DDIT3 Expression verringert hingegen die Frequenz von frühen Vorläuferzellen (1,43% ± 1,59%).

Die Überexpression der Gene ID1 (5,61% ± 1,93%), ID1' (6,22% ± 2,22%), ID2 (5,71% ± 1,20), SOCS2 (5,43% ± 2,09%) sowie von HOP (5,86% ± 2,10%) scheint im Vergleich zu den Kontrollen zu einer erhöhten LTC-IC Frequenz zu führen. Eine verstärkte Expression von MLLT3 führt zu keiner drastischen Veränderung der LTC-IC Rate im Vergleich zu den Kontrollen. Eine starke Reduktion der LTC-IC Frequenz wird hingegen durch die Überexpression von DDIT3 (1,43% ± 1,59%) hervorgerufen. Für die restlichen Faktoren konnten leider keine LTC-IC Daten ermittelt werden, da nie ausreichend positiv transfizierte Zellen für einen LTC-IC Ansatz sortiert werden konnten.

Transfektion	LTC-IC Frequenz
Kontrolle(n=3)	3.63% ±1.44%
GFP (n=3)	3.55% ±0.96%
ID1 (n=3)	5.61% ±1.93%
ID1' (n=3)	6.22% ±2.22%
ID2 (n=2)	5.71% ±1.20%
MLLT3 (n=3)	3.90% ±1.79%
SOCS2 (n=3)	5.43% ±2.09%
HOP (n=2)	5.86% ±2.10%
DDIT3 (n=2)	1.43% ±1.59%

Tabelle 7: Durchschnittliche ermittelte LTC-IC Frequenz nach erfolgreicher Überexpression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren

### 3.3.3 Adaption eines lentiviralen Gentransfers zur Überexpression der klonierten Kandidatengene in CD34<sup>+</sup>-Zellen

Da anscheinend die Nucleofection nicht ausreichend für die Untersuchung aller Kandidatengene erschien, wurde nach einer schonenderen Methode des Gentransfers in primäre humane CD34<sup>+</sup>-Zellen gesucht. So führte die Nucleofection bei der Vielzahl von Transfektionsansätzen pro aufgereinigtem Nabelschnurrestblut zu einer sehr hohen Zellmortalität, so dass die Überlebensrate der Zellen im Mittel auf weniger als 20% sank (vgl. 3.2). Insbesondere für die Gene Gas41, MLLT3, und KLF10 war es fast unmöglich genügend Zellen für die funktionellen Analysen zu sortieren, da diese Konstrukte das Reporterprotein GFP nicht in ausreichender Menge exprimierten, so dass die Identifikation aller positiv transfizierter Zellen nicht möglich war. In Folge dessen wurden alle klonierten Kandidatengene in ein lentivirales Plasmid (pCL1 new MCS) umkloniert, das uns freundlicherweise von Prof. Helmut Hanenberg (Kinderklinik, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde. Der Großteil der Faktoren konnte durch das Ausschneiden der Expressionskassette, die aus dem jeweiligen Gen sowie IRES und GFP bestand, mit den Enzymen Nhe I und BsrG I in die gleichen Schnittstellen des lentiviralen Vektors umkloniert werden. Für die Umklonierung der Gene MLLT3 und GAS41 wurden die Restriktionsendonukleasen EcoR I und BsrG I verwendet.

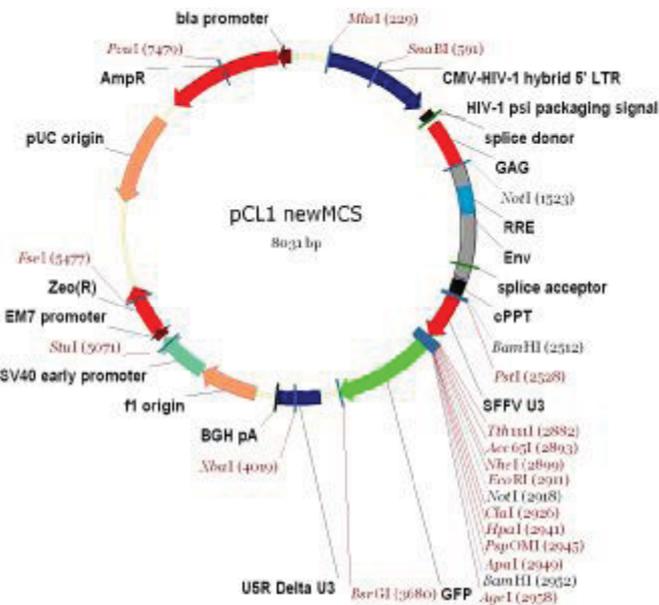


Abbildung 12: Karte des leniviralen Plasmids pCL1 new MCS, freundlicherweise von Prof. Dr. Helmut Hanenberg zur Verfügung gestellt. Das Plasmid wurde für die Klonierungen mit den Restriktionsendonucleasen Nhe I und BsrG I geschnitten. Nur für die Klonierung der Faktoren GAS41 und MLLT3 wurde das Plasmid mit EcoR I und BsrG I geschnitten.

Positive Klone wurden durch Sequenzierungen verifiziert. Die fertigen Plasmide konnten nun, wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben, für die Herstellung von Viruspartikeln verwendet werden. Für die Transduktionen von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden die lentiviralen Vektoren ausschließlich mit foamyviralen Hüllproteinen pseudotypisiert, da diese einen breiten Tropismus aufweisen (Leurs et al., 2003). Für die Bestimmung der Virustiter wurden HT1080-Zellen mit frisch geerntetem und zentrifugiertem Überstand wie in 2.1.5 beschrieben infiziert. Vier Tage nach der Infektion wurde der Virustiter an Hand der GFP-Expression bestimmt.

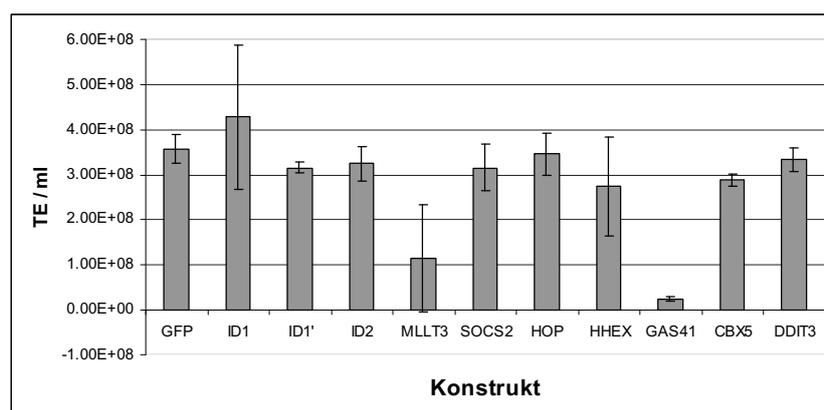


Abbildung 13: Graphische Darstellung der gemessenen Virustiter. Für die Ermittlung der der Virustiter wurden HT1080 Zellen mit den entsprechenden Überständen infiziert. Die GFP-Expression der Zellen wurde vier Tage nach der Infektion durchflusszytometrisch bestimmt.

Um funktionelle Analysen durchführen zu können, wurde, analog zu den zuvor beschriebenen Versuchen, die frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen mit dem jeweiligen Überstand, wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, transduziert. Anschließend wurden

die Zellen weiter in I20 EAC kultiviert. Nach dieser initialen Kultivierung wurden die Zellen wieder durchflusszytometrisch sortiert. Hierbei zeigte es sich, dass die virale Transduktion *per se* zu höheren Zellüberlebensraten bei vergleichbaren Gentransferfrequenzen führte, als die Nucleofektion.

Konstrukt	Überlebensrate	Transduktionseffizienz
Kontrolle	68,32% ± 7,45%	
GFP	41,44% ± 13,52%	85,63% ± 5,44%
ID1	62,38% ± 9,88%	63,53% ± 7,87%
ID1'	54,93% ± 10,81%	68,25% ± 9,75%
ID2	48,37% ± 12,33%	59,99% ± 4,68%
MLLT3	55,67% 16,03%	14,83% ± 12,58%
SOCS2	65,42% ± 6,35%	35,74% ± 8,46%
HOP	57,56% ± 12,11%	70,51% ± 2,37%
HHEX	65,87% ± 10,41%	33,62% ± 9,98%
GAS41	62,66% ± 5,32%	2,31% ± 0,93%
CBX5	65,5% ± 8,34%	25,47% ± 3,33%
DDIT3	64,44% ± 3,22%	41,47% ± 7,38%

Tabelle 8: Überlebensraten und Transduktionseffizienz in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die ermittelte Überlebensrate sowie die mittlere Transduktionseffizienz zwei Tage nach der erfolgreichen Transduktion.

Die transduzierten Zellen wurden, genau wie die nucleofizierten Zellen, in die verschiedenen funktionellen Ansätze (CFU-GEMM und LTC-IC) sortiert. Leider zeigte es sich, dass die Zellen sowohl in CFU-GEMM Ansätzen wie auch in LTC-IC keine Kolonien bildeten.

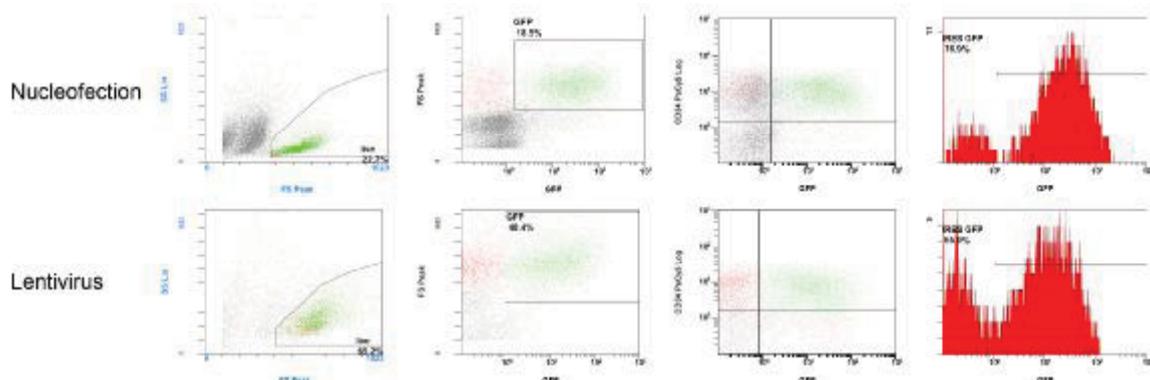


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Überlebensrate von nucleofizierten (obere Reihe) CD34<sup>+</sup>-Zellen und lentiviral transduzierten (untere Reihe) CD34<sup>+</sup>-Zellen an Tag zwei nach dem jeweiligen Gentransfer. Es handelt sich in beiden Ansätzen um das gleiche Konstrukt. Hierbei zeigt sich, dass die virale Transduktion bei vergleichbarer Effizienz sich zwei Tage nach dem Gentransfer nicht so stark auf das Zellüberleben auswirkt wie die Nucleofektion. Außerdem zeigen die Zellen kein verzögertes Wachstum.

### 3.4 Untersuchung der Zellschicksalsdeterminante numb in CD34<sup>+</sup>-Zellen

In dieser Arbeit wurde außer der Funktion neu identifizierter Transkriptionsfaktoren auch in Fortführung der Experimente des ehemaligen Diplomanden Jan Spanholtz (Spanholtz, 2005) die Rolle der Zellschicksalsdeterminante numb in der Hämatopoese untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben handelt es sich bei numb um ein Protein, das in *Drosophila melanogaster* antagonistisch zu Notch wirkt, indem es eine Weiterleitung des Notchsignals in den Zellkern verhindert (Spana und Doe 1996). Da der Notch-Signalweg an verschiedenen Entscheidungsprozessen in der Hämatopoese eine wichtige Funktion ausübt, sollte die Rolle seines Antagonisten in frühen hämatopoietischen Zellen, den CD34<sup>+</sup>-Zellen, untersucht werden.

#### 3.4.1 Nachweis der Expression von numb sowie Komponenten des Notch-Signalwegs in CD34<sup>+</sup>-Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob CD34<sup>+</sup>-Zellen numb bzw. numb-like exprimieren. Hierfür wurde aus frisch isolierten, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten von kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen, total RNA extrahiert. Mögliche Reste von genomischer DNA wurden nach der Extraktion durch eine Dnase-Reaktion entfernt und die aufgereinigte RNA in cDNA umgeschrieben.

Unter der Verwendung der in Abschnitt 2.4.22 aufgeführten Oligonukleotide für numb: numbTaqMan-Primer und numb-like: numb-like: TaqMan Primer, konnte tatsächlich die Expression dieser beiden Komponenten zu verschiedenen Kulturzeitpunkten (frisch isoliert, nach zwei-, drei- und sieben-tägiger Kultivierung) in CD34<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen in I20 EAC ohne jegliche Stromazellen in Kultur genommen.

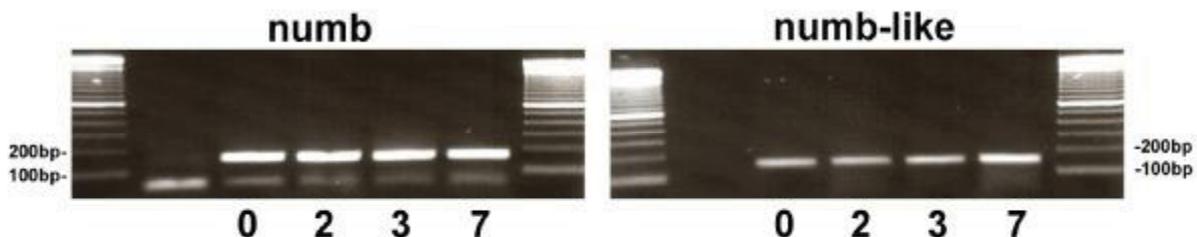


Abbildung 15: Nachweis der Expression von numb und numb-like zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. Für jedes Gen wurde die Expression in frisch isolierten (0) sowie nach zwei- (2), drei- (3) und sieben-tägiger (7) Kultur in I20 EAC nachgewiesen. Die numb-PCR ergab ein Produkt von 159bp, numb-like 145bp.

Außer numb und numb-like sollte auch untersucht werden, welche weiteren Komponenten des Notch-Signalwegs in CD34<sup>+</sup>-Zellen aktiv sind. Für den Nachweis dieser wurden die gleichen cDNAs verwendet, um etwaige Veränderungen in der Expression durch die Kultivierung zu dokumentieren.

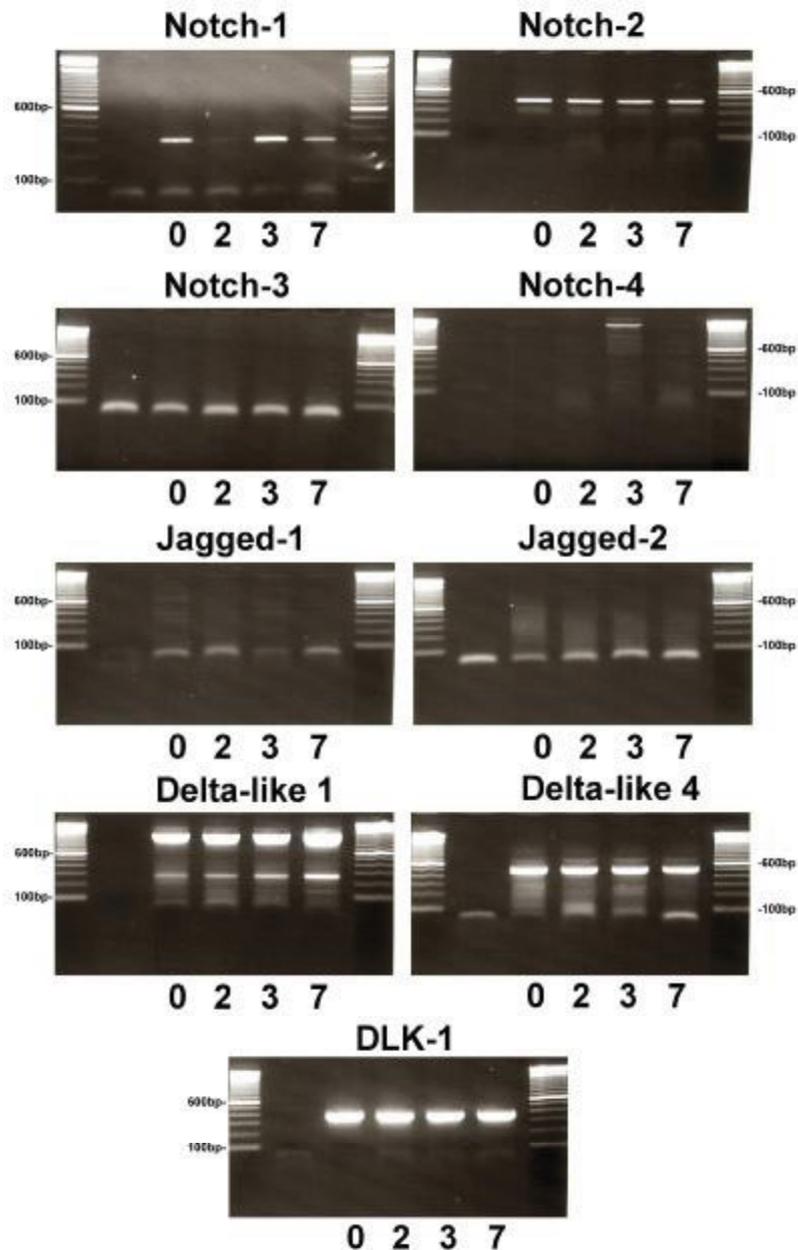


Abbildung 16: Untersuchung der Expression der verschiedenen Notch-Varianten sowie der unterschiedlichen Notch-Liganden in CD34<sup>+</sup>-Zellen an verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimieren sowohl Notch-1 sowie Notch-2 an allen gemessenen Zeitpunkten (0= frisch isoliert; 2= nach zwei-tägiger Kultur; 3= nach drei-tägiger Kultur; 7= nach sieben-tägiger Kultur). Es scheint jedoch, dass die Notch-1 Expression an Tag zwei der Kultivierung leicht reduziert ist. Notch-3 und Notch-4 sowie die Liganden Jagged-1 und Jagged-2 werden zu keinem der gewählten Zeitpunkte in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Die Notch-Liganden Delta-like 1, Delta-like 4 sowie DLK1 weisen jedoch zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Expression in CD34<sup>+</sup>-Zellen auf.

Zunächst wurde die Expression von Notch selbst, sowie von den Liganden Jagged-1, Jagged-2, Delta-like 1, Delta-like 4 sowie von DLK1 untersucht. Hierbei zeigte es sich, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen die Rezeptoren Notch-1 sowie Notch-2 exprimieren, nicht

jedoch Notch-3 oder Notch-4. Des Weiteren scheint die Expression von Notch-1 nach zweitägiger Kultivierung in I20 EAC kurzzeitig verringert zu sein (vgl. Abbildung 16). Notch-2 hingegen ist in allen PCR-Reaktionen mit Banden ähnlicher Intensität vertreten. Die Notch-Liganden Jagged-1 und Jagged-2 werden nicht in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Stattdessen weisen CD34<sup>+</sup>-Zellen mRNA Expression von Delta-like 1, Delta-like 2 sowie von DLK1 an allen untersuchten Zeitpunkten auf.

Da die bloße Expression von Notch-1 und Notch-2 bzw. der Liganden Delta-like 1, Delta-like 4 sowie DLK1 nicht auf einen aktiven Notch-Signalweg schließen lässt, wurden zusätzlich drei ausgewählte Zielgene des Notch-Signalwegs auf PCR-Basis untersucht. Die Analysen ergaben, dass sowohl HES-1 als auch HEY-1 und HEY-1, die als klassische Notch-Zielgene gelten, zu allen untersuchten Zeitpunkten in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert werden.

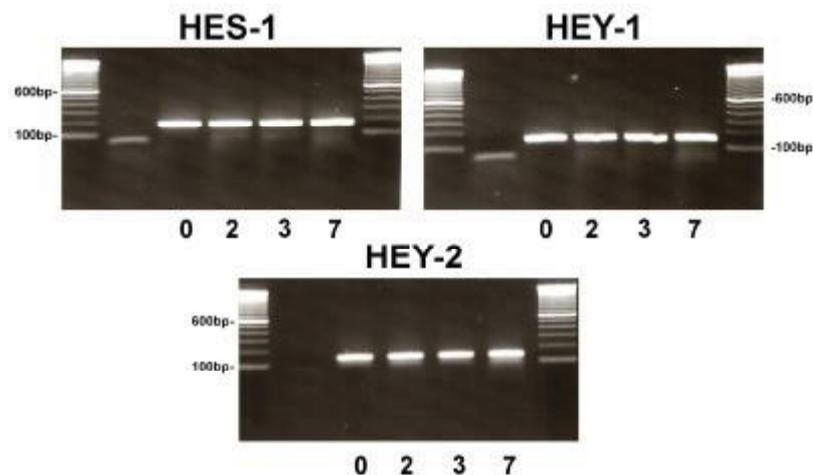


Abbildung 17: PCR-Nachweis der Notch-Zielgene HES-1, HEY-1 und HEY-2 in frisch isolierten (0), zwei-tägig-kultivierten (2), drei-tägig (3) und sieben-tägig kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen. Alle drei verschiedenen Notch-Zielgene lassen sich zu allen untersuchten Zeitpunkten in CD34<sup>+</sup>-Zellen auf mRNA-Ebene detektieren, was auf einen aktiven Notch-Signalweg in CD34<sup>+</sup>-Zellen schließen lässt.

Da die durchgeführten PCR-Analysen klar zeigten, dass sowohl *numb* als auch Komponenten des Notch-Signalwegs in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert werden, war eine weitere interessante Frage, welche Isoformen von *numb* in CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert werden und ob unterschiedliche Isoformen in *lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>*- und *lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>*-Zellen exprimiert werden. Aus diesem Grund wurden PCR-Primer entworfen, die entweder innerhalb der Introns der PTB- bzw. der PRR-Domäne von *numb* (*numb* Intron1 und *numb* Intron2), oder intronüberspannend (*numb* over1 und *numb* over2) lagen. Je nach gewählter Primer-Kombination konnten so die vier Isoformen unterschieden werden. Die PCR-Bedingungen, um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, wurden an Plasmiden, die die vier verschiedenen Isoformen

enthielten, etabliert. Leider zeigte die numb-3 isoformspezifische PCR trotz mehrfacher Optimierung eine schwache Bande mit numb-1 Plasmid als Template. Die Analysen ergaben, dass  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}/-}$  und  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen tatsächlich unterschiedliche Isoformen von numb exprimieren.  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}/-}$ -Zellen exprimieren numb-2 und möglicherweise schwach numb-3, da hier die PCR eine schwache Amplifikation zeigt. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich tatsächlich um eine schwache numb-3 Expression handelt ist relativ hoch, da die numb-3 PCR nur mit numb-1 Plasmid als Template schwach positiv ist,  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}/-}$ -Zellen aber nicht für numb-1 positiv sind.  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen zeigen positive Banden für numb-1 sowie eventuell auch für numb-3, wobei es sich hierbei tatsächlich um ein Artefakt handeln kann, da die numb-3 PCR mit numb-1 Plasmid schwach positiv wird. Zusätzlich exprimieren  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen schwach numb4. Als weitere Kontrollen wurden cDNAs von USSC (*unrestricted somatic stem cell*) sowie von HEK293T verwendet.

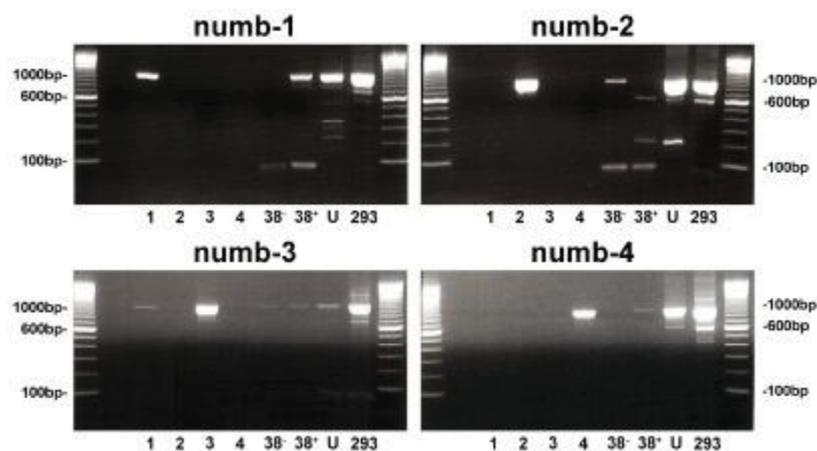


Abbildung 18: Isoformspezifische PCR-Analysen an  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}/-}$  und  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen. Um die Spezifität der gewählten PCR-Bedingungen zu gewährleisten wurde jede Isoform-PCR zur Kontrolle mit den verschiedenen Plasmiden als Template durchgeführt (1,2,3,4). Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}/-}$ -Zellen (38) die Isoform 2 und vielleicht Isoform 3 exprimieren.  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ -Zellen (38<sup>+</sup>) hingegen exprimieren Isoform 1 und schwach Isoform 4 sowie möglicherweise schwach Isoform 3. Als weitere Kontrollen wurden cDNAs von USSC (U) und HEK293T-Zellen (293)

### 3.4.2 Nachweis von Numb-Protein in humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen

Da mittels PCR zwar die Expression von numb in humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte, musste nun untersucht werden, ob numb mRNA auch tatsächlich in numb-Protein in CD34<sup>+</sup>-Zellen translatiert wird. Hierfür wurden immunohistochemische Färbungen durchgeführt, da für Western-Blotting nicht ausreichend Zellen eines Nabelschnurbluts zu Verfügung standen. Für die Färbungen wurden aufgereinigte CD34<sup>+</sup>-Zellen drei Tage in I20 EAC kultiviert, da

CD34<sup>+</sup>-Zellen durch die Kultivierung eine Polarität erwerben und sich der Großteil dieser Zellen zwischen Tag zwei und Tag drei der Kultivierung unter diesen Bedingungen das erste Mal teilt (Giebel et al. 2004).

Für die Färbung mussten die Zellen permeabilisiert werden, um das intrazellulär vorhandene numb-Protein nachweisen zu können. Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-konjugierter Antikörper aus der Ziege verwendet. Zusätzlich zu numb wurde auch CD34-Protein angefärbt. Für die Färbung von CD34 wurde ein monoklonaler Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) aus der Maus benutzt. CD34 wurde anschließend mit Alexa-488 konjugiertem Zweitantikörper aus Ziege nachgefärbt.

CD34 ist gleichmäßig auf der Zellmembran verteilt, und weist keine spezifische Lokalisation auf. Die numb Färbung zeigt, dass auch numb Protein nicht auf einen bestimmten Pol innerhalb der Zelle beschränkt ist. Die Färbung erscheint aber im Gegensatz zu der CD34-Färbung eher punktuell, so als ob numb-Protein in bestimmten Bereichen akkumuliert. Es scheint so, dass numb-Protein etwas stärker im Bereich zwischen Uropod und Zellkern vorhanden ist, und sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch vorliegt.

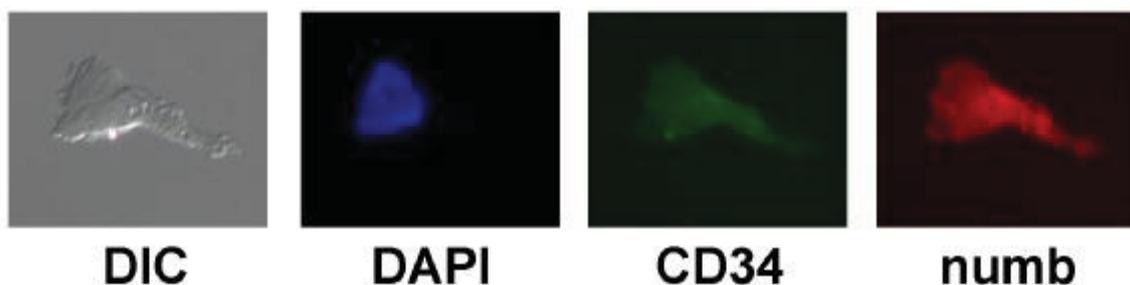


Abbildung 19: Nachweis von numb und CD34 Protein in CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Antikörpern. Gefärbt wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen, die drei Tage in I20 EAC kultiviert worden waren. Die CD34-Antikörperfärbung zeigt eine gleichmäßige Verteilung von CD34 auf der Zelle. Numb-Protein scheint in der Zelle punktuell lokalisiert zu sein, und zeigt keine eindeutige Lokalisation innerhalb der Zelle.

### 3.4.3 Lokalisation der verschiedenen numb-Isoformen in CD34<sup>+</sup>-Zellen

Da der für die immunohistochemischen Färbungen verwendete Antikörper keine Diskriminierung der unterschiedlichen numb-Isoformen ermöglichte, wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen mit numb-EGFP Plasmiden aller vier bekannten Isoformen wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben nucleofiziert. Die Plasmide, die die verschiedenen numb-Isoformen enthielten, wurden von Verdi et al. (Verdi et al. 1999) zur Verfügung gestellt. Die Expression der GFP-Fusionsproteine konnte nur am ersten Tag nach der erfolgreichen Transfektion fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert werden, da bereits am zweiten Tag der Kultur die Fluoreszenz der Fusionsproteine zu schwach war. Um die Lokalisation der verschiedenen Isoformen gut dokumentieren zu können, wurden die Zellen durch Zentrifugation aufkonzentriert und auf Objektträger pipettiert.

Die Untersuchung der transfizierten Zellen ergab, dass es tatsächlich Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen bezüglich der Lokalisation in lebenden Zellen gab. Die Isoformen, die eine lange PTB-Domäne (PTBL, vgl. Abschnitt 1.6) am N-Terminus besaßen, numb1 und numb2, zeigen eine membranständige Lokalisation in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Die numb-Isoformen drei und vier hingegen scheinen im Zytoplasma der Zellen lokalisiert zu sein. Die Größe der PRR-Domäne am C-Terminus von numb scheint hingegen keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle zu haben.

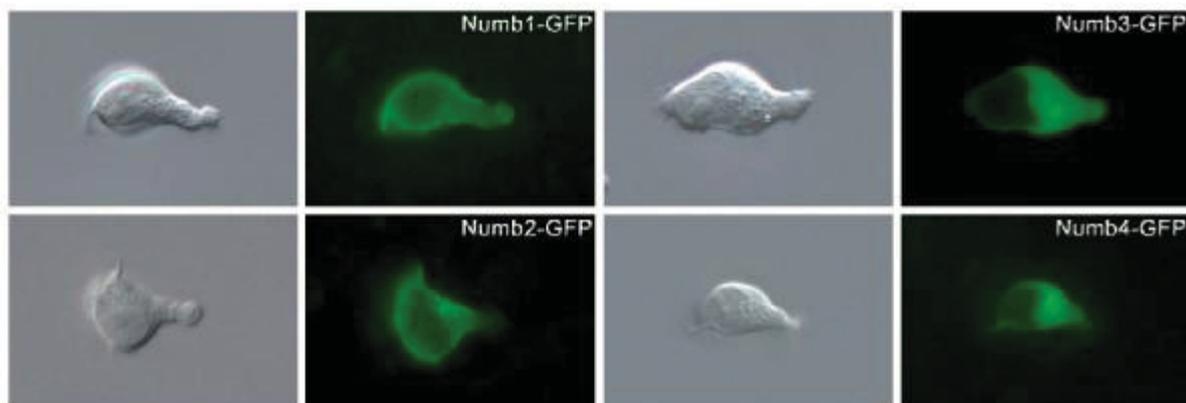


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von den verschiedenen numb-Isoformen in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Numb1-EGFP und numb2-EGFP, Isoformen mit der größeren PTB-Domäne (PTBL), lokalisieren membranständig in CD34<sup>+</sup>. Die Isoformen 3 und 4, die eine verkürzte PTB-Domäne (PTBS) besitzen, befinden sich hingegen im Zytoplasma verteilt. (Abbildung aus Jan Spanholtz 2005)

### 3.4.4 Überexpression von numb in CD34<sup>+</sup>-Zellen

Um die Funktion von numb in Zellschicksalsentscheidungen sowie eine mögliche Rolle von numb bei der Entscheidung von Selbsterneuerung oder Differenzierung von primitiven hämatopoietischen Zellen nachzuweisen, wurden alle bisher bekannten numb-Isoformen sowie auch die transkriptionell aktiven zytoplasmatischen Domänen von Notch-1 (Notch-1<sup>intra</sup>) und Notch-2 (Notch-2<sup>intra</sup>) zur Überexpression in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen gebracht. Da ein Einfluss des GFP-Anteils in den numb-Fusionsproteinen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden zunächst in Zusammenarbeit mit dem Diplomanden Jan Spanholtz alle Isoformen durch PCR-basierte Techniken in pIRES-EGFP (vgl. Abschnitt 3.1.4) kloniert, so dass die jeweilige numb-Isoform getrennt von GFP translatiert wird. Für die Klonierungen wurden Primer mit angefügten Restriktionsschnittstellen (Xho I und EcoR I Primer: numb cloning fw; numb cloning rev) verwendet. Als Template dienten jeweils die vorhandenen numb-GFP-Plasmide. Positive Klone wurden anschließend durch Sequenzieren verifiziert. Die zytoplasmatischen Domänen von Notch-1 und Notch-2 lagen in pCDNA-Vektoren vor und konnten durch das Ausschneiden mit den Restriktionsendonukleasen BamH I und Xho I in pIRES-EGFP geschnitten mit Bgl II und Xho I ligiert werden.

Für die Überexpression der numb Isoformen sowie von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> wurden die Zellen in Zusammenarbeit mit den Diplomanden Jan Spanholtz und Ron-Patrick Cadeddu wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben nukleofiziert, für zwei Tage in I20 EAC kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch sortiert. Hierbei zeigten die nucleofizierten Zellen deutlich bessere Überlebensraten, als nach der Transfektion der Transkriptionsfaktoren (vgl. Abschnitt 3.3). Die Überlebensraten aller transfizierten Konstrukte sind im Mittel vergleichbar und liegen zwischen 40% und 50%. Die Transfektionseffizienzen hingegen unterscheiden sich zwischen den einzelnen Plasmiden, da nicht alle Konstrukte gleichermaßen stark GFP exprimieren, was wahrscheinlich an sekundären RNA-Strukturen, die möglicherweise die IRES-Bindestelle maskieren, liegt. Für den Großteil der Plasmide ergab sich im Mittel eine Transfektionseffizienz von ~40%.

Transfektion	Überlebensrate	Transfektionseffizienz
CTRL	74,36% ± 4,89%	
GFP	50,28% ± 13,30%	40,92% ± 24,76%
numb1	48,42% ± 11,15%	41,35% ± 12,52%
numb2	43,33% ± 9,44%	39,63% ± 12,78%

<b>numb3</b>	48,51% ± 9,78%	37,27% ± 14,14%
<b>numb4</b>	51,19% ± 8,43%	41,60% ± 13,57%
<b>Notch-1</b>	44,30% ± 9,85%	70,73% ± 7,07%
<b>Notch-2</b>	53,55% ± 4,18%	37,15% ± 5,04%

Tabelle 9: Mittlere Überlebensrate und Transfektionseffizienzen von numb bzw. Notch transfizierten Zellen. GFP, numb oder Notch transfizierte Zellen zeigen ähnliche Überlebensraten zwei Tage nach der Nucleofektion. Notch-1<sup>intra</sup> transfizierte Zellen weisen mit 70,73% ± 7,07% eine deutlich höhere Transfektionseffizienz als die anderen verwendeten Konstrukte auf.

### 3.4.5 Auswirkung der Überexpression von numb und Notch auf späte Progenitoren

Um den Einfluss der Überexpression der einzelnen numb-Isoformen sowie von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> auf das Kolonienbildungspotential später myeloischer Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde analog zu den mit Transkriptionsfaktoren durchgeführten Versuchen der CFU-GEMM-Ansatz gewählt. Zunächst wurde retrospektiv die Frequenz der gebildeten Kolonien bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Zellzahl bestimmt. Es zeigte sich, dass die Transfektion mancher Konstrukte das Kolonienbildungspotential verringerte. So wurde für die untransfizierten Kontrollzellen eine mittlere Kolonienbildungsrate von 43,3% ± 15,1% ermittelt. In GFP transfizierte Zellen verringerte sich hingegen die Frequenz der gebildeten Kolonien auf 29,2% ± 14,7%. Die Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen führte

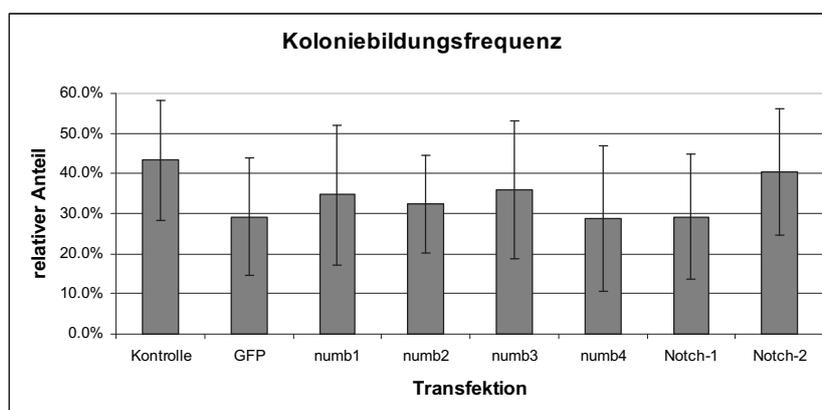


Abbildung 21: Graphische Darstellung der ermittelten Koloniefrequenzen nach erfolgreicher Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen bzw. von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen

zu ähnlichen Koloniefrequenzen (28,8%-35,9%) wie sie für GFP-transfizierte Zellen ermittelt wurden. Auch die Überexpression von Notch-1<sup>intra</sup> führte im Mittel zu einer verringerten Anzahl gebildeter Kolonien (29,2%), wohingegen die Überexpression von Notch-2<sup>intra</sup> die Kolonienbildung im Vergleich mit untransfizierten Zellen nicht zu beeinflussen scheint. Für die Gesamtanzahl an Zellen, die Kolonien bildeten, konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Transfektanten

und mit dem Leervektor transfizierten Zellen, bzw. zwischen numb oder Notch Transfektanten und untransfizierten Zellen festgestellt werden.

Transfektion	Koloniefrequenz
<b>Kontrolle (n=9)</b>	43,3% ± 15,1%
<b>GFP (n=8)</b>	29,2% ± 14,7%
<b>Numb1 (n=8)</b>	34,7% ± 17,5%
<b>Numb2 (n=10)</b>	32,3% ± 12,1%
<b>Numb3 (n=11)</b>	35,9% ± 17,4%
<b>Numb4 (n=8)</b>	28,8% ± 18,0%
<b>Notch-1 (n=9)</b>	29,2% ± 15,5%
<b>Notch-2 (n=10)</b>	40,4% ± 15,7%

Tabelle 10: Ermittelte mittlere Koloniefrequenz nach der Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen bzw. von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> in CFU-GEMM Analysen.

Außer der Gesamtfrequenz der gebildeten Kolonien, wurden wieder die verschiedenen gebildeten Kolonietypen ausgewertet. Hierbei zeigte es sich, dass die Überexpression sämtlicher numb-Isoformen (numb1 p=0,007; numb2 p=0,002; numb3 p=0,0013; numb4 p=0,01) bezogen auf GFP-transfizierte Zellen zu einer signifikant erhöhten Bildung von roten Kolonien in CFU-GEMM Analysen führt. Besonders stark äußert sich dieser Effekt nach der Überexpression der Isoformen 2 und 3, die einen hohen Anteil roter Kolonien mit 33,0% ± 10,6% bzw. 31,6% ± 16,9% im Vergleich zu den Kontrollen 19,3% ± 11,4% (untransfizierte Kontrollzellen) und 12,9% ± 7,9% (GFP-transfizierte Zellen) bildeten. Aber auch bei den beiden anderen numb Isoformen 1 und 4 erhöhte sich die Frequenz der gebildeten roten Kolonien im Vergleich zu den Kontrollen mit 25,0% ± 12,4% (numb1) bzw. 23,1% ± 14,2% (numb4).

Im Gegensatz hierzu führte die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne von Notch-1 bzw. Notch-2 im Vergleich mit den Kontrollzellen zu einer reduzierten Anzahl roter Kolonien (11,5% ± 10,0% und 8,7% ± 7,0%), wobei im Fall von Notch-2 sogar eine statistische Signifikanz bezogen auf GFP-transfizierte Zellen erreicht wurde.

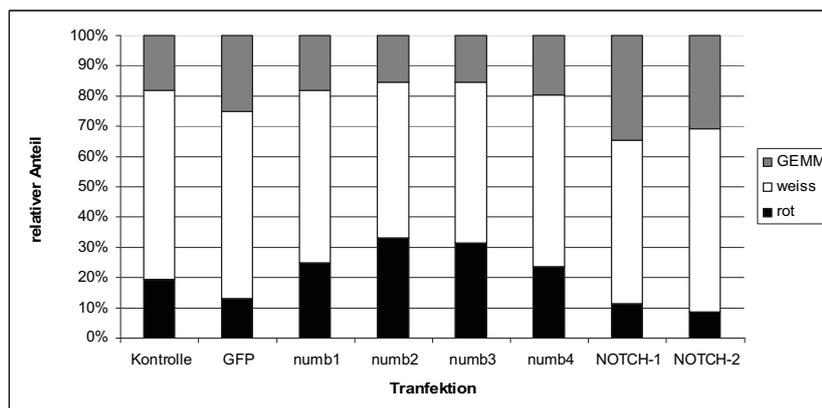


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Effekte der Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen sowie von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils gebildeten Kolonietypen bezogen auf die Gesamtmenge der gebildeten Kolonien.

Die Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen scheint nur zu einer leichten Reduktion der gebildeten weißen Kolonien, bezogen auf die beiden Kontrollgruppen, zu führen (siehe Tabelle 11). Jedoch wird auch die relative Anzahl der gebildeten weißen Kolonien durch die Überexpression von Notch-1<sup>intra</sup> im Vergleich mit den Kontrollen reduziert. Für keinen der untersuchten Faktoren konnte eine statistische Signifikanz bezogen auf die Kontrollen nachgewiesen werden.

Kolonietyp Transfektion	Rot	Weiß	GEMM
<b>Kontrolle (n=15)</b>	19,3% ± 11,4%	62,4% ± 10,9%	18,3% ± 4,8% *
<b>GFP (n=12)</b>	12,9% ± 7,9% *	61,1% ± 8,9%	25,1% ± 9,1%
<b>Numb1 (n=8)</b>	25,0% ± 12,4% *	57,1% ± 8,7%	17,9% ± 9,6% *
<b>Numb2 (n=10)</b>	33,0% ± 10,6% *	51,5% ± 13,1% *	15,5% ± 7,6% *
<b>Numb3 (n=11)</b>	31,6% ± 16,9% *	53,1% ± 14,4%	15,1% ± 8,8% *
<b>Numb4 (n=8)</b>	23,1% ± 14,2% *	55,0% ± 11,6%	19,1% ± 7,7% *
<b>Notch-1 (n=9)</b>	11,5% ± 10,0%	53,9% ± 12,1%	34,8% ± 8,5% *
<b>Notch-2 (n=10)</b>	8,7% ± 7,0% *	60,7% ± 9,7%	30,6% ± 7,8% *

Tabelle 11: Dargestellt sind die ermittelten relativen Anteile der verschiedenen Kolonietypen nach erfolgreicher Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen bzw. von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup>. Mit \* markierte Werte sind im Bereich der statistischen Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Student's T-Test (zweiseitig) verwendet; als Referenz wurden die Werte GFP-transfizierter Zellen benutzt.

Numb-transfizierte Zellen bilden im Vergleich mit GFP-transfizierten Zellen signifikant weniger gemischte (GEMM-) Kolonien. Jedoch zeigt es sich, dass numb-transfizierte Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen eine vergleichbare Anzahl gemischter Kolonien bilden (siehe Tabelle 11). Durch die Überexpression beider Notch Varianten wird im Gegensatz hierzu, die Anzahl der gemischten Kolonien im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen erhöht. Die Überexpression von Notch-1<sup>intra</sup> führt sogar zu einer signifikant erhöhten Bildung gemischter Kolonien ( $p=0,01$ ).

### 3.4.6 Auswirkung der Überexpression von numb und Notch auf frühe Progenitoren

Neben dem Einfluss der Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen sowie von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> auf das Entwicklungspotential später Vorläuferzellen, wurde auch dieser auf das Zellschicksal der frühen Progenitoren untersucht. Als frühe Progenitoren werden Zellen bezeichnet, die auch noch nach mehrwöchiger *in vitro* Kultivierung in der Lage sind hämatopoietische Kolonien auszubilden. Für diese Fragestellung wurde, analog zu den Versuchen in denen Transkriptionsfaktoren überexprimiert wurden, der LTC-IC-Ansatz gewählt. Hierfür wurden zwei Tage nach der Transfektion 6000 Zellen wie zuvor beschrieben in LTC-IC Medium sortiert und anschließend wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben ausplattiert und kultiviert.

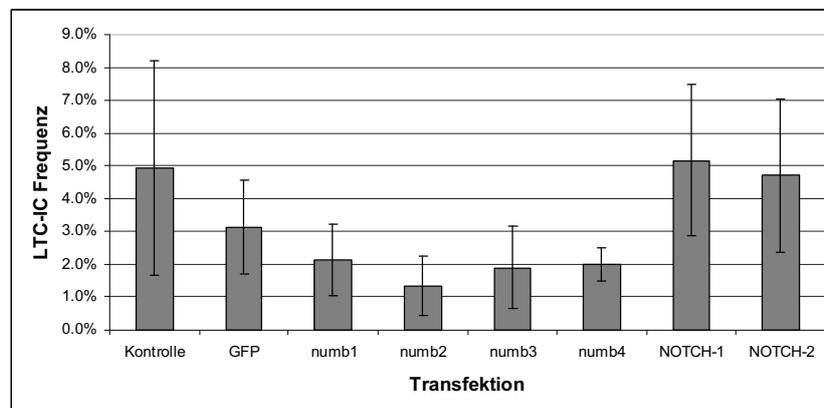


Abbildung 22: Einfluss der Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen sowie von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup> in CD34<sup>+</sup>-Zellen auf die LTC-IC Frequenz

Die Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen in CD34<sup>+</sup>-Zellen führt im Vergleich zu den Kontrollen (untransfiziert und GFP transfiziert) zu einer Reduktion der frühen Vorläuferzellen. Zwar verringert sich die Anzahl der LTC-IC auch in GFP-transfizierten Zellen leicht im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Kontrolle: 4,9% ± 3,3%; GFP: 3,1% ± 1,4%), jedoch wirkt sich die Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen deutlich stärker auf die LTC-IC Frequenz aus (numb1: 2,2% ± 1,1%, numb2: 1,3% ± 0,9%; numb3: 1,9% ± 1,2%; numb4: 2,0% ± 0,5%). Im Gegensatz hier zu führt die Überexpression von der beiden zytoplasmatischen Domänen von Notch-1 (5,2% ± 2,3%) und Notch-2 (4,7% ± 2,3%) zu einer leichten Erhöhung der LTC-IC Rate im Vergleich zu GFP-transfizierten Zellen.

Die Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen beeinflusste tatsächlich das Entwicklungspotential früher hämatopoietischer Vorläuferzellen. In Zellen in denen eine der numb-Isoformen überexprimiert wurde, reduziert sich die LTC-IC Frequenz deutlich. Besonders stark im Vergleich zu untransfizierten Zellen (4,9% ± 3,3%) wie auch GFP-transfizierten Zellen (3,1% ± 1,4%) wird die Frequenz durch die Überexpression von numb-2 (1,3% ± 0,9%) verringert. Diese Reduktion ist sowohl bezogen auf untransfizierte wie auch auf GFP-transfizierte statistisch signifikant ( $p=0,001$  untransfiziert;  $p=0,01$  GFP-transfiziert). Auch die Überexpression der drei anderen Isoformen senkt signifikant den Anteil an frühen Vorläuferzellen im Vergleich zu den Kontrollen; 2,2% ± 1,1,% der numb1-transfizierten Zellen bilden LTC-IC

( $p=0,01$  zu untransfiziert;  $p=0,03$  zu GFP-transfiziert);  $1,9\% \pm 1,2\%$  der numb3-transfizierten Zellen bilden LTC-IC ( $p=0,0008$  zu untransfiziert;  $p=0,01$  zu GFP-transfiziert);  $2,0\% \pm 0,5\%$  der numb4-transfizierten Zellen bilden LTC-IC ( $p=0,02$  zu untransfiziert; keine statistische Signifikanz zu GFP-transfizierten Zellen).

Transfektion	LTC-IC Frequenz
Kontrolle (n=11)	$4,9\% \pm 3,3\%$
GFP (n=10)	$3,1\% \pm 1,4\%$
Numb1 (n=8)	$2,2\% \pm 1,1\%$
Numb2 (n=7)	$1,3\% \pm 0,9\%$
Numb3 (n=11)	$1,9\% \pm 1,2\%$
Numb4 (n=4)	$2,0\% \pm 0,5\%$
Notch-1 (n=9)	$5,2\% \pm 2,3\%$
Notch-2 (n=6)	$4,7\% \pm 2,3\%$

Tabelle 12: Dargestellt sind die mittleren LTC-IC Frequenzen nach erfolgreicher Überexpression der verschiedenen numb-Isoformen sowie von Notch-1<sup>intra</sup> und Notch-2<sup>intra</sup>.

Die Überexpression von Notch-1<sup>intra</sup> resultiert im Vergleich untransfizierten Zellen in einem geringen Anstieg der LTC-IC Rate ( $5,2\% \pm 2,3\%$ ). Notch-2<sup>intra</sup> transfizierte Zellen zeigen hingegen im Vergleich zu der untransfizierten Kontrolle eine leichte Reduktion der LTC-IC Frequenz ( $4,7\% \pm 2,3\%$ ). Im Vergleich mit GFP-transfizierten Zellen ist die LTC-IC Rate von Notch-1<sup>intra</sup> wie auch Notch-2<sup>intra</sup> jedoch deutlich erhöht.

### 3.4.7 Ausschalten der numb Funktion mittels RNAi

Um die Funktion von numb in primitiven hämatopoietischen Zellen weiter aufklären zu können, wurde zusätzlich zu den durchgeführten Überexpressionsversuchen auch die Genfunktion von numb mittels RNA vermittelter Interferenz (RNAi) ausgeschaltet. Zunächst galt es die Funktion der verwendeten siRNAs zu testen. Hiefür wurden zunächst 293T Zellen mit numb-GFP Fusionskonstrukten und einer siRNA gegen MAP Kinase als Kontrolle sowie mit numb-GFP Fusionskonstrukten und eine numb siRNA transfiziert. Die Transfektionen wurden in 6-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Pro Transfektion wurden  $3\mu\text{g}$  DNA und  $1\mu\text{g}$  siRNA verwendet. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für zwei Tage kultiviert und dann durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei zeigte es sich, dass Zellen, die mit numb-EGFP-Plasmid und MAP Kinase siRNA transfiziert wurden zu  $91,1\%$  positiv für GFP-Expression sind, d.h. die Expression und Translation von numb-EGFP wird durch die Anwesenheit der MAP Kinase siRNA nicht beeinflusst. Im Gegensatz hierzu wird die Expression/Translation von numb-EGFP in Anwesenheit von numb siRNA auf  $60\%$

abgeschwächt. Diese Abschwächung erscheint auf den ersten Blick relativ gering, wenn man jedoch die Intensität der gemessenen EGFP-Signale weiter unterteilt, sieht man, dass die Anwesenheit der numb siRNA zu einer nahezu völligen Reduktion der stark GFP-positiven Zellen (18,9% zu 0,6%) führt. Hieraus wird also ersichtlich, dass die Anwesenheit der numb siRNA im Gegensatz zu der MAP Kinase siRNA die vorhandene numb-RNA-Menge beeinflusst.

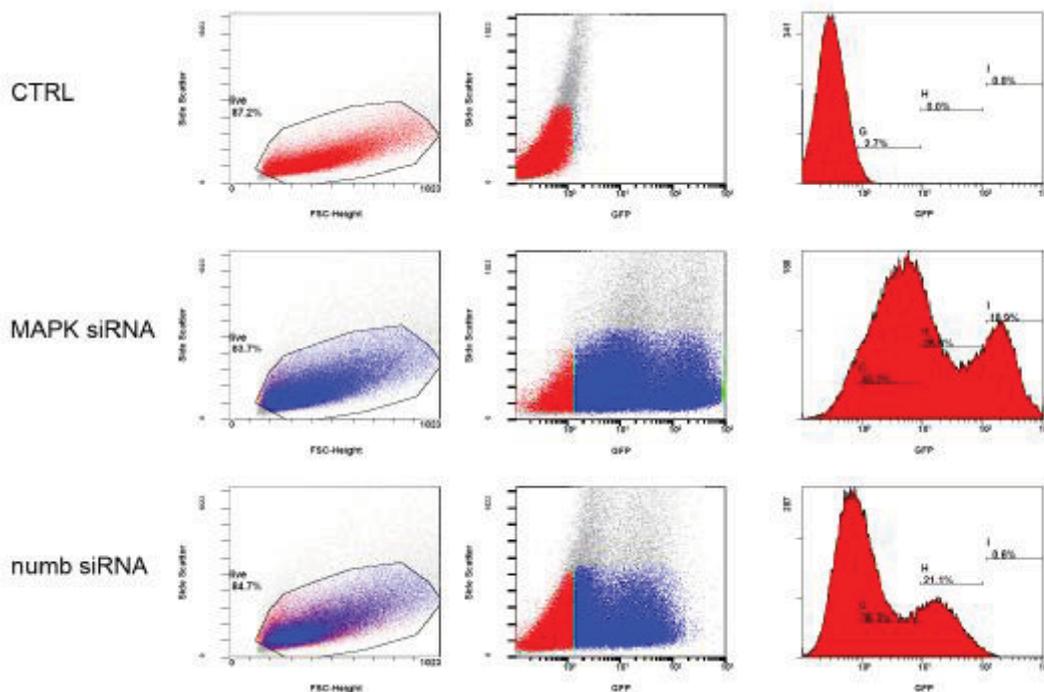


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analysen von HEK293T Zellen. Oben sind untransfizierte Kontrollzellen abgebildet. Diese weisen mit 2,7% eine leichte Autofluoreszenz auf. Die GFP-Intensität, und damit die vorhandene numb-RNA, wurde in den Histogrammen bestimmt, die dann in schwach (G), mittel (H) und stark (I) fluoreszent unterteilt wurden. Diese Unterteilung zeigt eindeutig, dass die Anwesenheit der numb siRNA im Gegensatz zu der Anwesenheit von MAP Kinase siRNA zu einer drastischen Reduktion der stark GFP-positiven Zellen führt.

### 3.4.8 Ausschalten der numb Funktion in CD34<sup>+</sup>-Zellen

Da die numb RNA Interferenz anscheinend in HEK293T-Zellen gut funktionierte, wurde die folgenden Versuche an frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit je 1-1,5µg siRNA transfiziert. Der Gentransfer erfolgte wiederum per Nucleofection wie in Abschnitt 2.4 beschrieben. Als Kontrolle wurde einerseits die mit ALEXA-488 konjugierte, nicht mit humanen Zellen interferierende, siRNA AllStars (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt, mit dessen Hilfe am Tag der Nucleofection die Transfektionseffizienz bestimmt wurde, da alle anderen benutzten siRNAs nicht mit fluoreszenten Farbstoffen markiert waren. Als zweite Kontrolle wurde eine gegen GFP gerichtete siRNA verwendet, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die ALEXA-Markierung einen Einfluss auf das Zellschicksal

früher hämatopoietischer Zellen hat. Es wurden zwei verschiedene siRNAs, die gegen numb gerichtet waren (Hs\_NUMB\_4 HP siRNA und Hs\_NUMB\_6 HP siRNA), sowie eine gegen numb-like (Hs\_NUMBL\_4 HP siRNA) gerichtete siRNA, verwendet. Frisch isolierte CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit jeder siRNA einzeln, jedoch auch um eine redundante Wirkung von numb-like ausschließen zu können, in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die Transfektionsrate wurde ca. zwei Stunden nach der Nucleofection an Hand der ALEXA488 positiven Zellen bestimmt, da durch die Nucleofection der ALEXA-Farbstoff zerstört wird und bereits einen Tag nach der Transfektion nicht mehr detektierbar ist. Im Mittel wurden Transfektionsraten von 94,1% ± 3,94% erreicht. Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden analog zu den Überexpressionsversuchen nach zwei Tagen Kultivierung in I20 EAC bezüglich ihrer CD34-Expression durchflusszytometrisch sortiert.

Transfektion	Überlebensrate
Kontrolle	76,44% ± 8,23%
AllStars	66,40% ± 6,47%
GFP si	69,80% ± 9,48%
Numb4 si	67,85% ± 9,69%
Numb6 si	66,94% ± 7,26%
Numb-like si	67,12% ± 6,70%
Numb4 + numb6 si	68,70% ± 7,92%
Numb4 + numb-like si	66,65% ± 4,31%
Numb6 + numb-like si	61,03% ± 7,58%
3 x siRNA	62,40% ± 2,12%

Tabelle 13: Mittlere Überlebensraten von siRNA-transfizierten CD34<sup>+</sup>-Zellen. Es zeigt sich, dass sich die Transfektion von siRNAs schonender auf CD34<sup>+</sup>-Zellen auswirkt. Die mittlere Überlebensrate ist deutlich im Vergleich zu den mit DNA transfizierten Zellen erhöht. Jedoch sinkt auch hier mit steigender RNA-Konzentration die Überlebensrate der Zellen.

Es zeigte sich, dass die Transfektion mit siRNAs deutlich weniger Zellmortalität hervorrief, als die Transfektion von Plasmiden. Die mittlere Überlebensrate lag bei allen verwendeten siRNA-Kombinationen zwischen 61% und 70%. Um den RNAi Effekt auch in CD34<sup>+</sup>-Zellen nachweisen zu können, wurde aus den transfizierten Zellen RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. An diesen cDNAs wurden im Anschluss quantitative PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte es sich, dass die Menge an numb-mRNA in den Zellen zwei Tage nach der Transfektion tatsächlich deutlich verringert worden war. So führte zwar auch die Transfektion mit GFP siRNA mit 72,2% im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen zu einer geringen Absenkung der numb mRNA-Menge, jedoch zeigte sich eine deutlich stärkere Reduktion der numb mRNA in numb4 si RNA bzw. numb4, numb6, numb-like siRNA (3 x siRNA) transfizierten Zellen. Hier wurde die Menge an numb mRNA auf 12,7% bzw. 9,47% im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen reduziert.

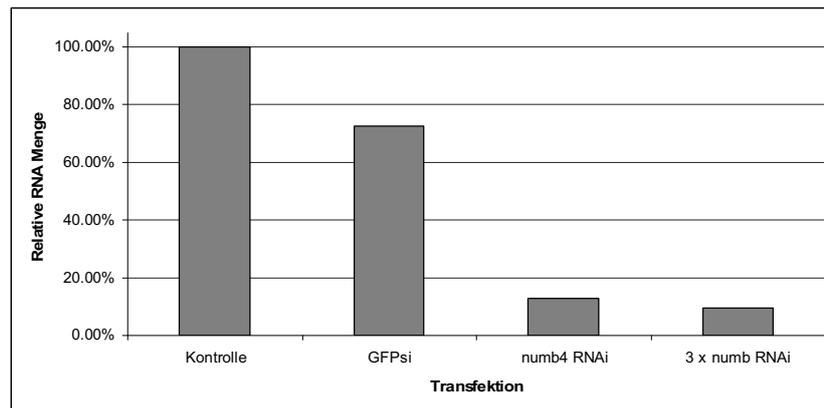


Abbildung 25: Quantitative PCR Analyse nach erfolgreicher Transfektion von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit numb siRNA. Die Analysen ergaben, dass in GFP siRNA transfizierten Zellen die numb mRNA-Menge im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen geringfügig reduziert wird (72,2%). Die Transfektion mit numb siRNA führt hingegen zu einer deutlich reduzierten mRNA-Menge, von 12,7% in mit numb4 si RNA transfizierten Zellen bzw. von 9,47% in numb4, numb6 und numb-like siRNA transfizierten Zellen.

### 3.4.5 Auswirkung der von numb RNAi auf späte Progenitoren

Um den Einfluss der numb-RNAi auf das Zellschicksal später Progenitoren untersuchen zu können, wurden wie in den vorangegangenen Versuchen die Zellen zwei Tage nach der Nucleofektion in CFU-GEMM Ansätze sortiert. Zunächst wurde retrospektiv die Frequenz der gebildeten Kolonien bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Zellzahl bestimmt. Es zeigte sich, dass die Transfektion mancher Konstrukte das Koloniebildungspotential verringerte. So wurde für die untransfizierten Kontrollzellen eine mittlere Koloniebildungsrate von 47,3% ± 9,3% ermittelt.

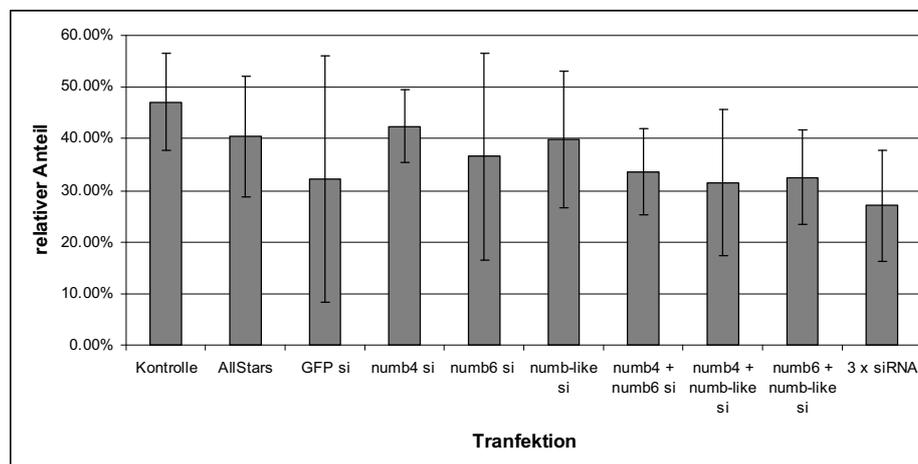


Abbildung 26: Graphische Darstellung der ermittelten Kooniefrequenzen in mit verschiedenen siRNAs transfizierten CD34<sup>+</sup>-Zellen.

Unerwarteterweise reduzierte sich die Koloniefrequenz von GFP siRNA im Vergleich zu der untransfizierten Kontrolle mit 32,25% ± 23,80% beträchtlich. Jedoch zeigt die recht hohe Standardabweichung, dass die Koloniefrequenz in GFP siRNA transfizierten CD34<sup>+</sup>-Zellen zwischen den verschiedenen Nabelschnurrestbluten stark variierte. Am stärksten wurde das Koloniebildungspotential durch die

Transfektion mit drei siRNAs (numb4, numb6 und numb-like siRNA) reduziert, hier wurde retrospektiv nur noch eine Koloniefrequenz von  $27,00\% \pm 10,76\%$  erreicht. Die Transfektion der anderen siRNA-Kombinationen wirkte sich nicht so stark auf die Frequenz der gebildeten Kolonien aus, und lag im Mittel zwischen 31% und 42%.

Transfektion	Koloniefrequenz
Kontrolle	$47,3\% \pm 9,33\%$
AllStars	$40,44\% \pm 11,71\%$
GFP si	$32,25\% \pm 23,80\%$
Numb4 si	$42,50\% \pm 7,00\%$
Numb6 si	$36,50\% \pm 20,00\%$
Numb-like si	$39,83\% \pm 13,17\%$
Numb4 + numb6 si	$33,60\% \pm 8,32\%$
Numb4 + numb-like si	$31,42\% \pm 14,13\%$
Numb6 + numb-like si	$32,50\% \pm 9,11\%$
3 x siRNA	$27,00\% \pm 10,76\%$

Tabelle 14: Ermittelte Kolonien-Frequenz nach Transfektion frisch isolierter CD34<sup>+</sup>-Zellen mit verschiedenen siRNAs.

Außer der Anzahl der gebildeten Kolonien wurden auch die gebildeten Kolonietypen bestimmt. Hierbei zeigte es sich, dass das Ausschalten der numb-Funktion mit jeder benutzten siRNA-Kombination in CD34<sup>+</sup>-Zellen zu einer verstärkten Bildung von gemischten (GEMM-) Kolonien führt. Dieser Effekt ist bereits für folgende Kombinationen verglichen zu GFP siRNA transfizierten Zellen statistisch signifikant, numb4 siRNA allein ( $p=0,01$ ), numb6 siRNA allein ( $0,02$ ), numb-like siRNA allein ( $p=0,006$ ), sowie numb4 zusammen mit numb-like siRNA ( $p=0,02$ ) und alle drei siRNAs zusammen ( $p=0,04$ ).

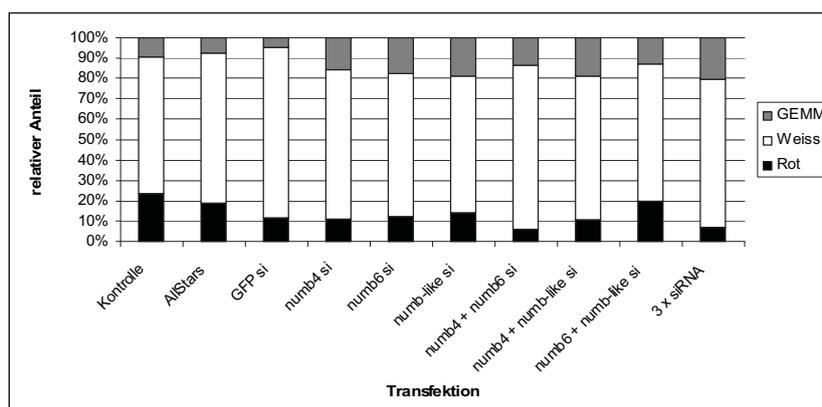


Abbildung 27: Graphische Darstellung der relativen Anteile der verschiedenen gebildeten Kolonietypen in CFU-GEMM Ansätzen nach erfolgreichem Ausschalten der numb-Genfunktion in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Die Abbildung zeigt, dass das Ausschalten der numb-Funktion in CD34<sup>+</sup>-Zellen zu einer Reduktion der roten Kolonien zu Gunsten der gemischten Kolonien kommt.

Die Transfektion von gegen numb oder numb-like gerichteter siRNAs scheint einen schwachen Effekt auf die Anzahl der gebildeten roten Kolonien zu haben, jedoch scheint dies nicht für alle benutzten siRNA Kombinationen gleichermaßen zu gelten, da die Kombinationen numb-like siRNA sowie noch prominenter numb6 zusammen mit numb-like siRNA, im Vergleich zu GFP siRNA, den relativen Anteil an roten Kolonien nicht reduzieren.

Kolonietyp Transfektion	Rot	Weiß	GEMM
Kontrolle (n=8)	23,41% ± 11,99%	67,48% ± 13,40%	9,11% ± 4,94%
AllStars (n=9)	19,31% ± 9,68%	76,13% ± 15,42%	7,62% ± 6,43%
GFP si (n=6)	11,92% ± 14,54%	83,25% ± 16,64%	4,83% ± 5,34%
Numb4 si (n=6)	11,12% ± 4,06%	72,94% ± 8,31%	15,89% ± 8,03% *
Numb6 si (n=8)	12,04% ± 5,49%	70,20% ± 12,57%	17,76% ± 9,95% *
Numb-like si (n=9)	14,11% ± 9,79%	67,32% ± 13,81%	18,57% ± 9,48% *
Numb4 + numb6 si (n=4)	5,70% ± 4,00%	80,91% ± 10,42%	13,39% ± 6,56%
Numb4 + numb-like si (n=6)	10,38% ± 4,41%	71,08% ± 16,91%	18,55% ± 13,87% *
Numb6 + numb-like si (n=8)	19,64% ± 17,15%	67,58% ± 21,51%	12,78% ± 6,81%
3 x siRNA (n=5)	7,11% ± 8,55%	72,17% ± 19,03%	20,73% ± 15,17% *

Tabelle 15: Dargestellt sind die ermittelten relativen Anteile der verschiedenen Kolonietypen nach erfolgreicher Transfektion von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von numb und numb-like siRNAs. Mit \* markierte Werte sind im Bereich der statistischen Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Student's T-Test (zweiseitig) verwendet; als Referenz wurden die Werte GFP siRNA-transfizierter Zellen benutzt. Es zeigte sich, dass die Transfektion fast aller numb und numb-like siRNA Kombinationen signifikant zu einer verstärkten Bildung gemischter (GEMM-) Kolonien führt.

Auf die Bildung von weißen Kolonien scheint das Ausschalten der numb-Genfunktion keinen Einfluss zu haben. Die ermittelten Werte für die in Kontrollgruppen gebildeten weißen Kolonien liegen zwischen 67,48% (untransfiziert) und 83% (GFP siRNA), und zeigen somit einen relativ starken Schwankungsbereich. Die Anzahl der gebildeten weißen Kolonien in numb siRNA transfizierten Zellen liegt im Mittel um 70% und liegt somit im Schwankungsbereich der Kontrollen.

### 3.4.5 Auswirkung von numb RNAi auf frühe Progenitoren

Im Weiteren wurde auch untersucht, wie sich der Verlust der numb-Funktion auf die Frequenz der vorhandenen frühen Vorläuferzellen (LTC-IC) auswirkt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden die Zellen analog zu den vorangegangenen Experimenten in LTC-IC Ansätze gegeben.

Hierbei zeigte es sich, dass die Transfektion der gegen numb bzw. numb-like gerichteten siRNAs zu einer leichten Erhöhung der LTC-IC Frequenz im Vergleich zu den Kontrollen führte. Numb6 siRNA transfizierte Zellen bilden hier die Ausnahmen, da diese im Mittel mit  $3,77\% \pm 0,57\%$  LTC-IC kaum von den in den Kontrollen ermittelten Werten abwichen. Es zeigte sich außerdem, dass eine Kombination von numb und numb-like RNAi die LTC-IC Frequenz stärker veränderte, als die Transfektion der einzelnen siRNAs.

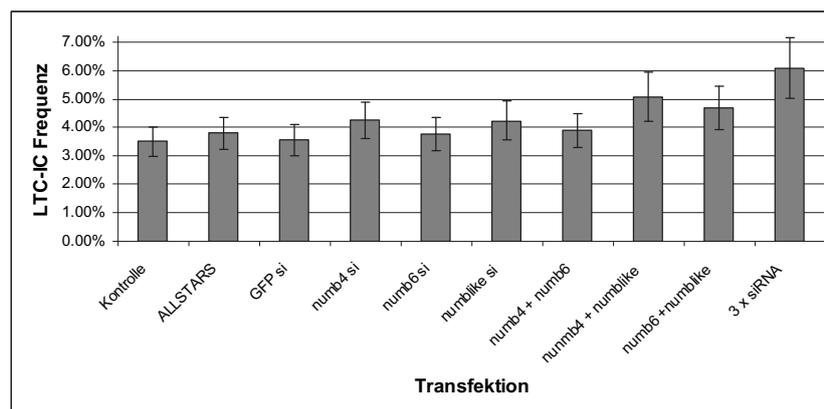


Abbildung 28: Graphische Darstellung der gemittelten LTC-IC Raten, nach erfolgreicher Transfektion mit numb und numb-like siRNAs. Im Mittel führt das Ausschalten der numb bzw. der numb-like Genfunktion zu einer leichten Erhöhung der LTC-IC Frequenz im Vergleich zu den Kontrollen. Die Transfektion mit numb6 siRNA allein hingegen scheint keinen Effekt auf die Frequenz der LTC-IC auszuüben.

Insgesamt wurde die LTC-IC Rate durch das gleichzeitige Ausschalten von numb und numb-like wesentlich stärker erhöht, als wenn nur numb allein ausgeschaltet wurde. Die Transfektion aller drei siRNAs zusammen erhöht signifikant die LTC-IC Frequenz im Vergleich zu GFP siRNA transfizierten Zellen ( $p=0,02$ ).

Transfektion	LTC-IC Frequenz
Kontrolle (n=6)	3,50% ± 0,53%
AllStars (n=6)	3,80% ± 0,56%
GFP si (n=3)	3,56% ± 0,53%
Numb4 si (n=3)	4,25% ± 0,64%
Numb6 si (n=6)	3,77% ± 0,57%
Numb-like si (n=6)	4,24% ± 0,69%
Numb4 + numb6 s (n=3)	3,89% ± 0,59%
Numb4 + numb-like si (n=3)	5,08% ± 0,86%
Numb6 + numb-like si (n=6)	4,69% ± 0,74%
3 x siRNA (n=3)	6,09% ± 1,08% *

Tabelle 16: Ermittelte LTC-IC Frequenz nach erfolgreichem Ausschalten der numb bzw. numb-like Funktion in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Durch die Transfektion fast aller gegen numb bzw. numb-like gerichteter siRNAs erhöht sich die LTC-IC Rate im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser Effekt ist besonders stark, wenn alle drei siRNAs in die Zellen nucleofiziert werden. Für diese Kombination konnte sogar in Bezug auf mit GFP siRNA transfizierte Zellen eine statistische Signifikanz ermittelt werden ( $p=0,02$ ). Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Student's T-Test (zweiseitig) verwendet; als Referenz wurden die Werte GFP siRNA-transfizierter Zellen benutzt.

### 3.4.5 Interaktion von numb und Notch

Da die vorangegangenen Versuche keine Aussage über eine Interaktion von numb und Notch, wie sie in *Drosophila melanogaster* besteht, zuließen, wurde versucht, mittels eines Reporterkonstrukts die Aktivität von Notch bzw. deren mögliche Reduktion in numb-transfizierten in Zellen nachzuweisen.

Wie in der Einleitung beschrieben, führt die Aktivierung des Notch-Rezeptors zu einer proteolytischen Spaltung und der Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne von Notch. Diese wird in den Kern transportiert und realisiert dort zusammen mit RBPjk die Aktivierung verschiedener Zielgene. RBPjk selbst fungiert in Abwesenheit eines Notch-Signals als Repressor und verhindert die Transkription der Notch-Zielgene. In dem Plasmid wurde die Expression von GFP als Reporter für Notch-Aktivität benutzt. Die Transkription von GFP wurde durch einen Promotor gesteuert, der 12 RBPjk-Bindestellen enthielt. Um die Funktionalität des Konstrukts zu testen, wurden HEK293T-Zellen lentiviral mit diesem Konstrukt transduziert. Von den transduzierten Zellen wurden im Anschluss Einzelklone bezüglich ihrer GFP-Expression sortiert, die dann im Folgenden für die durchgeführten Versuche benutzt wurden.

Für die eigentlichen Versuche wurden diese HEK293T-Zellen mit Plasmiden, die Numb ohne Reporter (ohne GFP) überexprimierten bzw. mit Notch-1<sup>intra</sup> enthaltenden Plasmiden transfiziert. Entsprechende Plasmide wurden von Herrn Ron-Patrick Cadeddu im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt (Cadeddu, Diplomarbeit HHU-Düsseldorf 2007).

In den Experimenten wurde deshalb der Vektor pCDNA3.1 (Invitrogen) verwendet. Es zeigte sich, dass durch die Transfektion mit Notch-1<sup>intra</sup> die Anzahl der GFP-positiven Zellen, sowie die Intensität der GFP-Expression, deutlich erhöht wurde. Im Gegensatz hierzu zeigte die Transfektion aller vier numb-Isoformen keinerlei Reduktion der GFP-Intensität bzw. der Anzahl GFP-positiver Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. Insofern ließ sich nicht mit Bestimmtheit eine Interaktion von numb und Notch nachweisen.

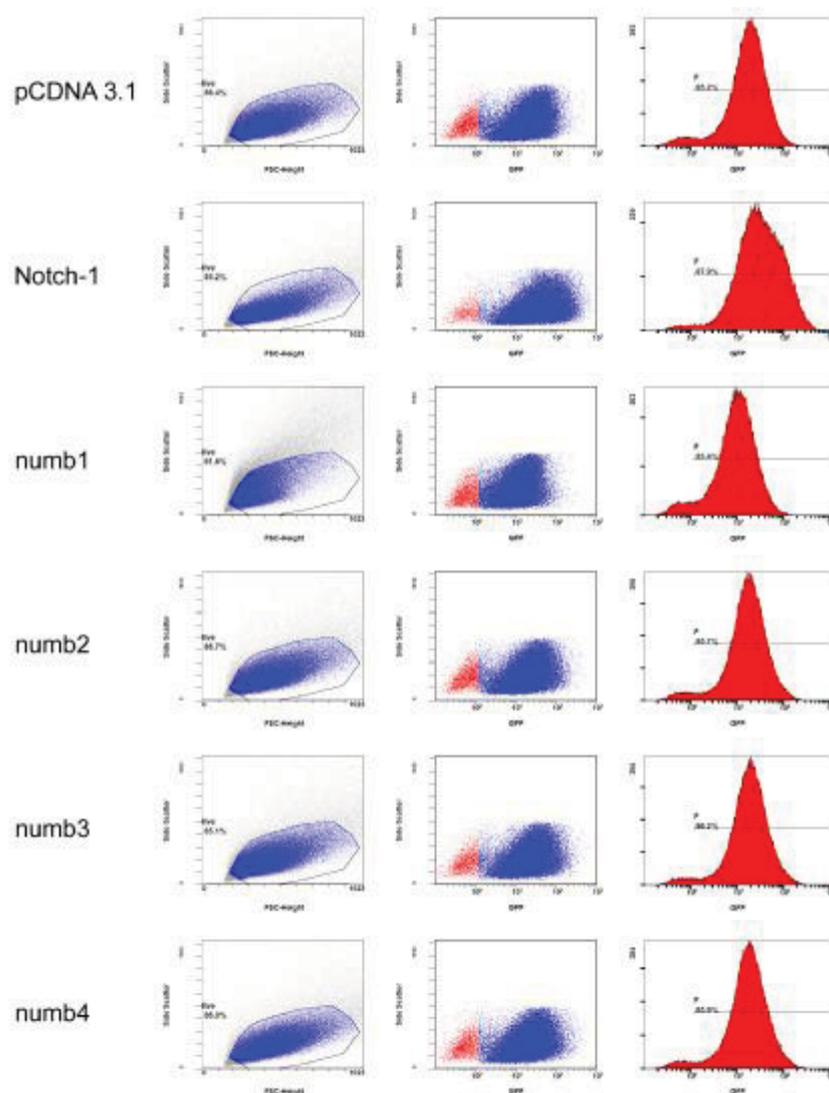


Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse der Notch-Aktivität in HEK293T. Für die Bestimmung der Notch-Aktivität wurden HEK293T-Zellen mit einem Reporterkonstrukt für Notch-Aktivität transduziert. Die gemessene GFP-Intensität wurde als Maß für die Aktivierung des Notch-Signalwegs benutzt. Hierbei zeigte es sich, dass die Transfektion von Notch-1<sup>intra</sup> tatsächlich die Expression von GFP in den Zellen erhöht. Die Transfektion von numb hingegen verringert die Anzahl bzw. die Intensität der GFP-exprimierenden Zellen hingegen nicht, oder nur marginal.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion verschiedener Faktoren auf das Zellschicksal humaner, hämatopoietischer Stammzellen zu untersuchen. Ein Projekt der Arbeit beschäftigte sich mit der Suche nach neuen Regulatoren, insbesondere Transkriptionsfaktoren, die die Selbsterneuerung und Differenzierung von humanen hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen beeinflussen.

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit untersuchte die Funktion der Zellschicksalsdeterminante *numb* in humanen hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen.

Die in der Arbeit verwendeten Methoden waren insgesamt technisch recht anspruchsvoll und teilweise äußerst störanfällig, weshalb zunächst die einzelnen angewandten Techniken diskutiert werden sollen.

### 4.1 Verwendete Techniken

Die meisten in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden an primären CD34<sup>+</sup>-Zellen unternommen. Ein Problem hierbei ist stets die Tatsache, dass die verwendeten Nabelschnurrestblute eine große Varianz bezüglich ihres Entwicklungspotentials bzw. des Gehaltes an CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigten. Außerdem ist zu beachten, dass die verwendeten Blute bezüglich ihres Alters, also der Zeit zwischen der Abnahme und der Aufreinigung, teils stark divergierten (von wenigen Stunden bis zu zwei Tagen), woraus Unterschiede im Entwicklungspotential der isolierten Zellen in den funktionellen Analysen resultieren könnten. Des Weiteren gab es starke Schwankungen bezüglich der Anzahl der aufgereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen, so konnte die Zellzahl zwischen  $5 \times 10^5$  und  $4 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>-Zellen pro Nabelschnurrestblut liegen – wodurch die Verwendung teils stark eingeschränkt wurde.

Besonders deutlich werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Bluten, wenn man sie auf ihr Koloniebildungspotential sowohl im CFU-GEMM als auch im LTC-IC Ansatz vergleicht. Im Mittel bildeten 30% der untransfizierten Zellen in CFU-GEMM Analysen zwar eine Kolonie, jedoch konnten einzelne Blute stark von diesem Wert abweichen. Auch in den durchgeführten LTC-IC Analysen konnten untransfizierte Zellen einzelner Blute bezüglich der Frequenz der gebildeten LTC-IC teils stark von einander unterscheiden im Mittel lagen sie jedoch bei 3%-5% (von Levetzow et al.

2006). In dieser Arbeit wurde für untransfizierte Zellen insgesamt eine Koloniefrequenz in CFU-GEMM Assays von 44,1% (n=32) ermittelt. Dieser Wert weicht zwar von den zuvor veröffentlichten Koloniefrequenzen ab, offenbart jedoch eine Schwäche des verwendeten Ausleseverfahrens, da die Beurteilung der Kolonienanzahl und auch deren Typisierung ein rein subjektives Verfahren ist und somit zwei Auswertungen ein und des selben Versuchs zu zwei unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Die in der Arbeit durchgeführten LTC-IC Analysen entsprechen im Gegensatz hierzu mit 4,01% (n=20) voll und ganz den erwarteten Ergebnissen für untransfizierte Zellen.

In Hinblick auf die in CFU-GEMM Versuchen gebildeten Kolonietypen ergaben sich zwischen den einzelnen Bluten teils auch recht große Unterschiede. Teilweise wurden in einzelnen Bluten bestimmte Kolonietypen überhaupt nicht oder nur in sehr geringer Frequenz ausgebildet. Diese Abweichungen können einerseits aus einer genetischen Varianz der verschiedenen Spender bzw. aus einer möglicherweise vorausgegangenen Medikation resultieren. Da sich solche Faktoren aus Datenschutzgründen im Vorfeld nicht erfassen lassen, können diese Abweichungen nicht verhindert werden. Im Mittel aller ausgewerteten Ansätze in denen auch Effektoren transfiziert wurden, betrug die Anzahl an roten Kolonien in den Kontrollen  $19,9\% \pm 3,3\%$ , die der weißen Kolonien  $65,4\% \pm 2,6\%$  und die der GEMM-Kolonien  $14,8\% \pm 4,5\%$  (n=32).

Eine der Hauptvoraussetzungen um die angestrebte Zielsetzung dieser Arbeit zu ermöglichen, war zunächst die Etablierung eines effektiven Gentransfers in frisch isolierte CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurrestblut. Dieser sollte weitestgehend schonend für die Zellen sein und gleichzeitig einen hocheffizienten Gentransfer geringer Zellzahlen erlauben, da die Anzahl der in Nabelschnurrestblut vorhandenen CD34<sup>+</sup>-Zellen äußerst begrenzt ist. Die Methode sollte *per se* nicht das Zellschicksal beeinflussen, da der Einfluss bestimmter Faktoren auf eben dieses in CD34<sup>+</sup>-Zellen eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielte.

Aus diesem Grund wurde im Zuge der Arbeit die Nucleofection für diese Bedürfnisse modifiziert und optimiert.

Die in von Levetzow et al. 2006 veröffentlichten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass sich mittels der Nucleofection geringe Zahlen von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit ausreichender Überlebensrate gut manipulieren lassen und die Methode *per se* keinen Einfluss auf das Zellschicksal von CD34<sup>+</sup>-Zellen hat. Zunächst wurden

deshalb die Auswirkungen der Nucleofektion auf das Zellwachstum untersucht. Hier zeigte es sich, dass nucleofizierte Zellen anfangs im Wachstum im Vergleich zu untransfizierten Zellen retardiert sind. Diese Wachstumsverzögerung ist jedoch schon am dritten Tag nach der Transfektion nicht mehr detektierbar und scheint sich somit nicht auf die weitere Entwicklung auszuwirken. Einen großen Einfluss auf das Überleben der Zellen scheint hingegen die Qualität wie auch die Menge der verwendeten DNA zu spielen, da die an Tag zwei gemessenen Überlebensrate in mit GFP-Plasmid transfizierten mit 50% fast 25% unter dem Wert der Mock-transfizierten Zellen lag. Die Transfektion von siRNAs scheint hingegen sehr viel schonender für die Zellen zu sein, da deren Transfektion die Anzahl lebendiger Zellen im Vergleich zu der untransfizierten Kontrolle kaum verändert wurde. Zwar reduzierte sich auch der Anteil der gebildeten Kolonien in CFU-GEMM Analysen von GFP-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen, jedoch unterscheiden sich die prozentualen Anteile der verschiedenen gebildeten Kolonietypen kaum, weshalb ein Einfluss der Überexpression von GFP auf das Zellschicksal ausgeschlossen wurde. Die LTC-IC Frequenz der mit GFP-transfizierten Zellen wurde im Vergleich zu den untransfizierten bzw. Mock-transfizierten Zellen jedoch reduziert. Die Reduktion der Koloniefrequenzen in CFU-GEMM wie LTC-IC Experimenten könnte einerseits durch Apoptose, bedingt durch die Aufnahme großer DNA-Mengen, oder aber auch durch mögliche toxische Effekte aufgrund der sehr starken GFP-Expression hervorgerufen werden. Derartige durch die Transfektion hervorgerufenen Effekte sind tatsächlich schon beobachtet worden (Stacey et al. 1993; Liu et al. 1999; Shimokawa et al. 2000). Im Bezug auf die durchgeführten Versuche konnte man jedoch annehmen, dass der induzierte Zelltod sich nicht auf eine bestimmte Zellpopulation innerhalb der CD34<sup>+</sup>-Zellen bezog und somit der Transfer der DNA nicht in das Entwicklungspotential der Zellen eingriff.

Als eine weitere Schwierigkeit bei der Versuchsdurchführung stellte sich die Verwendung von IRES-Plasmiden heraus. Diese erlauben zwar die Überexpression eines beliebigen Transgens sowie von GFP als separate Proteine, jedoch ist die IRES-abhängige Translation des zweiten Leserahmens in den meisten Fällen weitaus weniger effektiv als die des ersten (Davies und Kaufman 1992; Dirks et al. 1993). In dem für diese Arbeit verwendeten Vektor pIRES-EGFP (vgl. 3.1.2) befand sich die kodierende Region von EGFP hinter der IRES-Sequenz, vor die wiederum das entsprechende Gen kloniert werden konnte. Wie gut aus den Versuchen mit den

verschiedenen Transkriptionsfaktoren ersichtlich wird, variierte die Expression von GFP teilweise sehr stark. So zeigten z.B. nur  $15,9\% \pm 14,35\%$  der KLF10- bzw.  $17,1\% \pm 14,99\%$  der GAS41-transfizierten Zellen eine schwache GFP-Expression. Die Transfektion anderer Konstrukte wie z.B. ID1 führte mit  $76,8\% \pm 3,9\%$  hingegen zu einer wesentlich höheren detektierbaren GFP-Expression. Die Translation des Leserahmens hinter der IRES-Bindestelle wird also anscheinend wesentlich von der Sequenz des ersten Leserahmens beeinflusst. Dies ist jedoch auch unabhängig von dessen Größe, da auch Notch-1<sup>intra</sup> transfizierten Zellen, dessen Sequenz ca. 3kb groß ist, eine starke GFP-Translation aufweisen. Diese Eigenschaft bicistronischer Vektoren wurde auch schon von anderen Gruppen beschrieben (Zhou et al. 1998; Mizuguchi et al. 2000; Hennecke et al. 2001). Um dieses Problem zu vermeiden könnte man statt der benutzten IRES-Sequenz eine 2A-Sequenz aus Picornaviren, wie dem Maul-und-Klauenseuche-Virus benutzen. Die 2A-Sequenz ist eine sehr kurze Peptidsequenz, die in Wirtszellen proteolytisch geschnitten wird. Analog zu der Verwendung einer IRES-Sequenz würde man von einer mRNA zwei getrennte Proteine erhalten. Im Gegensatz zu der verwendeten IRES-Sequenz geschieht die Trennung der beiden Proteine jedoch posttranslational (Furler et al. 2001; Chinnasamy et al. 2006).

Die Versuche mit den Transkriptionsfaktoren schließlich ergaben, dass die Nucleofektion nicht geeignet ist für die Transfektion sehr geringer Zellzahlen. Da für diese Versuche die aufgereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen auf 13 verschiedene Ansätze verteilt werden mussten, reduzierte sich die Anzahl der Zellen pro Ansatz erheblich und lag im Mittel um  $1 \times 10^5$  Zellen. Bei derartig geringen Zellzahlen scheint die Nucleofektion jedoch einen wesentlich stärkeren Einfluss auf das Zellüberleben zu haben, da hier im Schnitt die Überlebensrate der transfizierten Zellen auf ca. 20% sank. Bei sehr geringen Transfektionseffizienzen wie KLF10, GAS41 oder MLLT3 wurde es somit unmöglich genug Zellen für beide funktionellen Analysen (CFU-GEMM und LTC-IC) zu sortieren. Des Weiteren wurde es durch die sehr geringen Zellzahlen, die nach den Transfektionen sortiert wurden, unmöglich, an den transfizierten Zellen PCR-Analysen durchzuführen, um die Auswirkungen der Überexpression z.B. von numb oder Notch in CD34<sup>+</sup>-Zellen zu untersuchen.

Aus diesem Grund wurde nach einer schonenderen Möglichkeit des Gentransfers in CD34<sup>+</sup>-Zellen gesucht. Daher haben wir mit Unterstützung von Prof. Helmut Hanenber das lentivirale System in unserer Arbeitsgruppe eingeführt. Der Vorteil

hierbei war zusätzlich, dass es sich hierbei um einen stabilen Gentransfer handelte, und somit auch die Folgen einer Überexpression über einen langen Zeitraum möglich wurden. Das verwendete foamyvirale Hüllprotein EM140 in Verbindung mit dem lentiviralen Plasmid pCL1 und dessen Derivaten ließ die Herstellung extrem hoher Virustiter zu, wodurch hervorragende Transduktionsergebnisse erzielt werden konnten. Die Transduktion schien sich zunächst auch wesentlich schonender auf das Überleben der Zellen auszuwirken. Später zeigte sich jedoch auch deutlich ein Nachteil des verwendeten foamyviralen Hüllproteins, da es einerseits eine sehr starke fusiogene Wirkung (Stanke et al. 2005) entwickelt, die zu Zellfusionen und letztendlich zum Absterben dieser führen kann. Dies gilt sowohl in *in vitro* wie auch für *in vivo* Experimente. So wachsen beispielsweise humane CD34<sup>+</sup>, die mit Foamyviren transduziert wurden, schlechter in NOD/SCID Mäusen an, als z.B. mit VSV-G typisierten Viren transduzierte CD34<sup>+</sup>-Zellen (Leurs et al. 2003). Besonders deutlich wurden schließlich die toxischen Eigenschaften des Hüllproteins in CFU-GEMM bzw. LTC-IC Ansätzen, in denen nach erfolgreicher Transduktion keinerlei Kolonien mehr gebildet wurden, da anscheinend die Infektion die Zellen derart schädigte, dass sie abstarben.

Insgesamt sind also beide benutzten Methoden für einen effektiven Gentransfer in CD34<sup>+</sup>-Zellen aus verschiedenen Gründen nicht vollends geeignet, wobei die virale Transduktion bei besserer Etablierung sicherlich aussagekräftigere Ergebnisse liefern würde, als die transiente Nucleofektion.

#### 4.2 Funktionelle Analyse stammzellspezifisch exprimierter Faktoren

Die Mechanismen, die die Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen regulieren sind bislang nur rudimentär verstanden. Mit dem Ziel neue, an der Regulation dieser Prozesse beteiligte Faktoren, insbesondere Transkriptionsfaktoren, zu identifizieren, wurden zunächst komplexe Genexpressionsprofile von lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>- und lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen miteinander verglichen. Die generierten Daten wurden nach Faktoren durchsucht, die in lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen stärker exprimiert waren als in lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen.

Die durchgeführten mit cDNAs von lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>- und lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen quantitativen PCR-Analysen ergaben, dass mehrere der in den komplexen

Genexpressionsanalysen identifizierten Gene tatsächlich in  $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ -Zellen stärker exprimiert wurden. Hierbei zeigte sich jedoch auch wiederum eine relativ große Varianz bezüglich der Expression der verschiedenen Faktoren in den verschiedenen analysierten Bluten. Diese Unterschiede in der Expression können einerseits wie bereits erwähnt durch eine gewisse genetische Varianz der verschiedenen Spender bzw. durch eine unbekannte Medikation im Vorfeld bedingt sein. Andererseits kann auch die durchflusszytometrische Sortierung der Zellen für die relative Varianz der verschiedenen Blute sorgen, da diese Methode hoch komplex ist und sich gerade bei aus Nabelschnurrestbluten isolierten  $\text{CD34}^+$  die zwei Zellpopulationen  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low-}}$  und  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^+$  nicht eindeutig bestimmen lassen. Dies kann zu einer geringfügig unterschiedlichen Positionierung der Sort-Gates bzw. der Zellen und innerhalb dieser zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Die Überexpression der verschiedene Kandidatengene zeigte zunächst eine wesentliche Schwachstelle der Nucleofektion. Da pro Nabelschnurrestblut bis zu 12 verschiedene Transfektionen durchgeführt wurden, verringerte sich die eingesetzte Zellzahl pro Transfektion erheblich. Dies hatte zur Folge, dass die Elektroporation sich deutlich schlechter auf das Zellüberleben auswirkte. Hierdurch wird eine Deutung der gewonnen Resultate im Bezug auf die Funktion der untersuchten Faktoren innerhalb der Hämatopoiese schwierig. So ist eine Diskussion der gesammelten Ergebnisse der Überexpression der Faktoren HHEX, GAS41, CBX5, KLF10 und DDIT3 nicht möglich, da die Stichprobenanzahl dafür nicht ausreichend ist.

Trotz dieser Tatsache konnten für einzelne der untersuchten Faktoren brauchbare Ergebnisse gesammelt werden, die eine Interpretation zulassen.

Die Überexpression der Gene ID1, ID1' sowie ID2, führt in CFU-GEMM Analysen zu einer verstärkten Bildung von gemischten Kolonien, die aus den primitivsten, also am wenigsten spezifizierten, späten Vorläuferzellen gebildet werden. Konsistent zu diesem Ergebnis führt die Überexpression dieser Faktoren auch in LTC-IC Analysen zu einer verstärkten LTC-IC Frequenz. Dies deutet insgesamt auf eine möglicherweise stammzellerhaltende Funktion der untersuchten ID-Gene in der humanen Hämatopoiese hin. Für die Helix-Loop-Helix Proteine ID1 und ID2 konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine wichtige Funktion in der Granulopoiese haben, wobei hier ID1 anscheinend in der frühen Granulopoiese aktiviert wird und ID2 in der terminalen. Wurde ID1 in  $\text{CD34}^+$ -Zellen überexprimiert und diese Zellen in

NOD/SCID-Mäuse transplantiert, so wurden vor allem neutrophile Zellen gebildet. Die Überexpression von ID2 führte hingegen zu einer verstärkten Bildung von eosinophilen wie neutrophilen Zellen (Buitenhuis et al. 2005). Konsistent dazu bilden Zellen in denen ID1 oder ID2 überexprimiert wurde mehr weiße Kolonien als GFP-transfizierte Zellen. In einer neueren Veröffentlichung konnte schließlich durch die Verwendung eine *knock in* Maus, in deren Zellen GFP unter Kontrolle des ID1 Promotors exprimiert wurde, gezeigt werden, dass ID1 wichtig für den Erhalt von hämatopoietischen Stammzellen in der Maus ist (Perry et al. 2007). Diese Veröffentlichung steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Überexpression von ID1 wie ID2 in CD34<sup>+</sup> zu einer erhöhten LTC-IC Frequenz führte. In diesem Zusammenhang, ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass ID1 in der als primitiver angesehenen Zellfraktion der lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup> fast 16-fach stärker exprimiert wurde als lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen, was auch auf eine stammzellerhaltende Funktion von ID1 in humanen hämatopoietischen Zellen hindeuten könnte. Aus diesem Grund sollte der lentivirale Gentransfer verbessert werden, so dass eine stabile Überexpression der Gene gewährleistet werden kann. Des Weiteren sollten Untersuchungen auf *in vivo*-Modelle wie z.B. der NOD/SCID-Maus ausgedehnt werden, da die verwendeten Zellkulturansätze sehr artifiziell sind, und nur Rückschlüsse auf Veränderungen in der Myelopoese zulassen. Außerdem sollten die transduzierten Zellen weiterhin auf Oberflächenmarker untersucht werden, um den Phänotyp der gebildeten Zellen genauer bestimmen zu können. In dieser Arbeit war dies leider nicht möglich, da nie genug Zellen für weitere Analysen sortiert werden konnten.

Die Überexpression von MLLT3 führte zu einer erhöhten Bildung von gemischten Kolonien, veränderte jedoch kaum die Frequenz der gebildeten LT-ICs. Bis vor kurzem war über die native Funktion von MLLT3 nichts bekannt. Der Hauptteil der Veröffentlichungen beschäftigte sich mit der Funktion des chimären Gens aus MLL und AF9, das durch eine Translokation entsteht, und schwere Leukämien hervorruft (Muller et al. 2004). In einer kürzlich erschienen Arbeit konnte schließlich gezeigt werden, dass MLLT3 eine wichtige Funktion bei der Regulation der Entwicklung von Erythrozyten und Megakaryozyten spielt (Pina et al. 2008). Die Autoren transduzierten hierfür CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen mit lentiviralen Plasmiden, die entweder zu einer Überexpression von MLLT3 oder zu einem *knock out* führten. Die Zellen wurden anschließend entweder *in vitro* oder *in vivo* analysiert. Ein *knock out* von

MLLT3 führte in CFU-GEMM Analysen zu einem kompletten Verlust von roten Kolonien wie auch gemischten Kolonien. Insofern scheinen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse im Einklang mit der Veröffentlichung von Pina et al. 2008 zu stehen, da hier die Überexpression von MLLT3 zu einer verstärkten Bildung von CFU-GEMM Kolonien führte, ohne die Bildung von roten Kolonien zu beeinflussen. Hierbei zu beachten ist, dass der CFU-GEMM Ansatz nicht immer eine eindeutige Wertung der Kolonien zulässt und es durchaus sein kann, dass auch rote Kolonien fälschlicherweise als gemischt klassifiziert wurden, da die Autoren eine verstärkte Bildung von roten Kolonien nach der Überexpression von MLLT3 beobachteten. Genau wie in vorliegender Arbeit beobachteten Pina et al. keinen Einfluss auf die Frequenz der gebildeten Kolonien in CFU-GEMM Analysen. Die Frage nach der Funktion von MLLT3 in der Hämatopoese scheint durch diese Veröffentlichung weitestgehend geklärt worden zu sein, weshalb weitere Versuche diesbezüglich nicht sinnvoll erscheinen.

Die Überexpression von SOCS2 führte in CFU-GEMM Analysen zu einer verstärkten Bildung von gemischten (GEMM) Kolonien. Dies kann unter anderem darin begründet sein, dass die Zellen durch die Überexpression SOCS2 nicht mehr in der Lage sind, auf die im Medium enthaltenden Zytokine anzusprechen, und somit zunächst in der Differenzierung blockiert sind. Es ist bekannt, dass SOCS-Proteine negativ auf den JAK/STAT-Signalweg wirken, und so die Weiterleitung der durch die Zytokine ausgelösten Signale verhindern (Bayle et al. 2004). Da die Zellen nur transient SOCS2 überexprimieren, wird dieser Differenzierungsblock jedoch nach einigen Tagen in Kultur aufgehoben sein. Normalerweise wird die Expression der Gene der SOCS Familie über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert, d.h. die Expression von SOCS führt gleichzeitig wieder zu einer Reduktion seiner Transkription. Bei der gewählten Strategie unterbleibt jedoch diese Regulation, wodurch für die Zeit der Überexpression permanent ein hoher SOCS2-Spiegel in der Zelle vorhanden sein dürfte (Yasukawa et al. 2000).

Die Überexpression von SOCS2 führt auch zu einer höheren LTC-IC Frequenz im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch hier könnte die erhöhte Frequenz auf einen transienten Block der Differenzierung der Zellen zurückzuführen sein, wodurch sich die Zellen möglicherweise in der Langzeitkultur auch länger selbst erhalten, und somit die Frequenz der gebildeten LTC-IC erhöht ist. Es ist bekannt, dass auch in chronischen myeloiden Leukämien die Expression von SOCS2 erhöht ist, was eine

mögliche Funktion von SOCS2 bei der Differenzierung von hämatopoietischen Zellen bzw. einem möglichen Selbsterhalt von primitiven hämatopoietischen Zellen sehr wahrscheinlich macht (Schultheis et al. 2002). Weitere Untersuchungen von SOCS2 sollten besser an lentiviral transduzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen vorgenommen werden, da so möglicherweise ein noch stärkerer Effekt beobachtet werden könnte. Des Weiteren wäre es interessant, transduzierte Zellen weiter in Suspensionskultur zu kultivieren und diese dann durchflußzytometrisch zu analysieren. Wichtig wäre auch hier die Erweiterung der Analysen durch *in vivo* Versuche an NOD/SCID-Mäusen. Zusätzlich sollte die Funktion von SOCS2 durch RNAi ausgeschaltet werden, um dessen Rolle in der Hämatopoese weiter bestimmen zu können.

Die Überexpression von HOP (*homeodomain only protein*) führt signifikant zu einer verstärkten Bildung von weißen Kolonien in CFU-GEMM Analysen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Expression von HOP die Differenzierung zu roten Blutzellen hemmt. Bei HOP handelt es sich um ein Protein, das nur aus einer Homeodomäne besteht und das anscheinend keine Bereiche enthält, die mit der DNA interagieren. Man geht davon aus, dass HOP, ähnlich wie ID-Proteine, mit anderen Proteinen mit Homeodomäne dimerisieren und dadurch eine Interaktion dieser mit der DNA verhindern (Kook et al. 2006). Die Überexpression scheint in CFU-GEMM Analysen keinen Einfluss auf die Frequenz der gebildeten Kolonien zu haben. In LTC-IC Analysen wurde durch die Expression von HOP die Frequenz der gebildeten LTC-ICs im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, wobei hier jedoch zu beachten ist, dass hier lediglich in zwei Versuchen die ausreichende Anzahl positiv transfizierter Zellen isoliert werden konnte. Bisher wurde eine Funktion von HOP in der Entwicklung von Herz und Lunge beschrieben, wo es anscheinend als Tumorsuppressor wirkt (Chen et al. 2002; Chen et al. 2007). So wurde z.B. durch die Überexpression von HOP in der Lungenkrebszelllinie H2170 eine verringerte Teilungsfrequenz der Zellen beobachtet. Möglicherweise werden auch die CD34<sup>+</sup>-Zellen durch die Überexpression in ihrer Teilung gehindert, was schließlich zu einer höheren LTC-IC Rate führt, da sich die Zellen durch die transiente Überexpression erst später teilen bzw. sich differenzieren. Um dies genauer untersuchen zu können, sollten die Zellen stabil HOP überexprimieren. An diesen Zellen könnte man Untersuchungen zu den Zellteilungskinetiken z.B. durch die Verwendung des Farbstoffs PKH, machen, bzw. die transduzierten Zellen weiter mit Hilfe der Durchflußzytometrie klassifizieren sowie den CD34<sup>+</sup>-Gehalt über einen längeren

Zeitraum bestimmen. Leider lässt die geringe Stichprobenanzahl sowie die schlechte Überlebensrate der Zellen nach der Nucleofection keine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu.

### 4.3 Funktionelle Analyse der Zellschicksalsdeterminante numb

Ein weiterer Bestandteil der Arbeit war die funktionelle Analyse der Zellschicksalsdeterminante numb in primären CD34<sup>+</sup>-Zellen. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, fungiert numb als Antagonist zum Notch-Signalweg (Spana und Doe 1996). Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass der Notch-Signalweg eine wichtige Funktion innerhalb der Hämatopoese hat, und sowohl bei Zellschicksalsentscheidungen sowie mutmaßlich bei dem Erhalt von hämatopoietischen Stammzellen beteiligt ist (Milner et al. 1994; Washburn et al. 1997; Pui et al. 1999; Radtke et al. 1999; Ohishi et al. 2000; Varnum-Finney et al. 2000; Karanu et al. 2001; Stier et al. 2002; Karanu et al. 2003; Varnum-Finney et al. 2003; Maillard et al. 2005). Zunächst musste hierfür untersucht werden, ob humane CD34<sup>+</sup>-Zellen numb exprimieren. Hiefür wurden PCR-Analysen an frisch isolierten wie auch von kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt. Die Analysen ergaben, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten sowohl numb als auch numb-like exprimieren. Da für numb eine Interaktion mit Notch beschrieben wurde, wurde des Weiteren untersucht, ob CD34<sup>+</sup>-Zellen auch Komponenten des Notch-Signalwegs exprimierten. Die Analysen ergaben eindeutig, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen Notch-1 und Notch-2 exprimieren nicht, aber Notch-3 und Notch-4. Zusätzlich exprimierten sie die Notch-Liganden Delta-like 1, Delta-like 4 und DLK-1 eine Beobachtung, die sich mit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen deckt (Milner et al. 1994; Ohishi et al. 2000; Karanu et al. 2001). Da die Expression von Komponenten des Notch-Signalwegs nicht auch auf eine Aktivierung dieses in CD34<sup>+</sup>-Zellen schließen ließ, wurde die Expression von „klassischen“ Notch-Zielgenen auf PCR-Ebene untersucht. Hier ergaben die Analysen, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten sowohl HES1, HEY1 und HEY2 exprimieren. Dies deutet in der Gesamtheit darauf hin, dass in primitiven hämatopoietischen Zellen der Notch-Signalweg aktiviert ist. Auch in der Literatur finden sich Hinweise auf einen Einfluss der Hes-Gene auf die Entwicklung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen (Kawamata et al. 2002; Ishiko et al. 2005).

Weiterhin wurde mit Isoform-spezifischen Primern untersucht, welche numb-Isoformen in CD34<sup>+</sup>-Zellen aktiv sind bzw. ob unterschiedliche Isoformen in lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>- und lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen exprimiert werden. Die Untersuchungen an diesen Zellpopulationen zeigte, dass diese tatsächlich verschiedene numb-Isoformen exprimieren. Während lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen numb2 sowie möglicherweise numb3 exprimieren, sind in lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen die Isoformen eins, drei und vier aktiv. In der Literatur finden sich Hinweise, dass numb-Isoformen mit der kurzen Variante der PRR-Domäne (zwei und vier) in neuronalen Geweben eher zu einer Differenzierung der Zellen führen, während die Isoformen eins und drei vor allem in proliferierenden Geweben zu finden sind (Verdi et al. 1996; Verdi et al. 1999; Yoshida et al. 2003). Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen, die sehr viel stärker numb 2 als numb 3 exprimieren, kaum proliferieren, jedoch schon zu einer Differenzierung angeregt werden. Proliferationskinetiken von lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen zeigen, dass sich diese Zellen zunächst langsamer teilen als lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen. Im Gegensatz hierzu exprimieren lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen vor allem numb 1, was auf eine Proliferation dieser Zellen hindeuten könnte. Dies passt zu der Annahme, dass Progenitorzellen eine sehr hohe Proliferationskinetik aufweisen, während Stammzellen im Vergleich hierzu sich sehr viel seltener teilen (Sieff 1994; Arai et al. 2005; Suda et al. 2005; Suda et al. 2005).

Die Antikörperfärbungen an kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen ergaben, dass numb punktuell in den Zellen lokalisiert ist. Es scheint sich sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran zu befinden. Die Untersuchungen der Lokalisation der verschiedenen numb-Isoformen durch die Expression der GFP-Fusionsproteine in CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigte, dass numb1 und numb2 membranständig lokalisieren, während numb3 und numb4 eher im Zytoplasma vorliegen. Dies zeigt, dass anscheinend die Insertion in der PTB-Domäne wichtig für eine Verankerung des numb-Proteins in der Zellmembran ist. Diese Beobachtung deckt sich mit den von Dho et al. durchgeführten Versuchen mit isoformspezifischen Antikörpern (Dho et al. 1999). Die unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen numb-Isoformen könnte auf eine unterschiedliche biologische Funktion innerhalb der Zellen hindeuten. Bezogen auf die Antikörperfärbung an CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigt sich, dass diese wohl tatsächlich numb1, sowie schwach numb3 und numb4 exprimieren, da es sich ja hierbei um kultivierte Zellen handelte, die dadurch alle für CD38<sup>+</sup> positiv waren. Da jedoch für die

Färbungen kein Isoform-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, ist diese Aussage rein spekulativ auf den PCR Analysen begründet.

Die Überexpression aller vier numb-Isoformen führte in CFU-GEMM Analysen zu einer verstärkten Bildung von roten Kolonien, bei gleichzeitiger Reduktion der weißen Kolonien. Besonders stark war dieser Effekt nach der Überexpression der Isoformen zwei und drei zu beobachten. Die Überexpression von Notch-1 und Notch-2 hingegen resultierte in einer verstärkten Bildung von gemischten Kolonien und einer Reduktion der gebildeten roten Kolonien. Dieses Ergebnis lässt auf eine konservierte antagonistische Funktion von numb auf den Notch-Signalweg schließen. Leider konnten keine Ergebnisse über einen Einfluss der numb-Überexpression auf die Proliferation der Zellen gesammelt werden, da nach einer erfolgreichen Transfektion meist nur die für die funktionellen Analysen benötigten Zellmengen sortiert werden konnten. Hierbei wäre es sicherlich interessant gewesen, ob sich die in der Literatur für neurales Gewebe gefundenen Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Wirkung der einzelnen numb-Isoformen auch auf die Hämatopoiese übertragen lassen. Ein weiterer Hinweis auf eine antagonistische Funktion von numb gegenüber Notch ergibt sich aus den ermittelten Ergebnissen der numb-RNAi Versuche. Hier führte das Ausschalten der numb-Funktion in CFU-GEMM Analysen analog zu der Überexpression der beiden zytoplasmatischen Domänen von Notch zu einer erhöhten Anzahl gemischter Kolonien im Vergleich zu den Kontrollen bei einer gleichzeitigen Reduktion der gebildeten weißen Kolonien. Somit könnte eine der Funktionen von numb in der Myelopoiese die Determinierung eines erythroiden Zellschicksals durch eine mögliche Inhibition des Notch-Signals in den Zellen sein. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass durch die Aktivierung von Notch-1 die Bildung von Megakaryozyten initiiert und gleichzeitig eine erythroide Entwicklung unterdrückt wird (Kumano et al. 2001).

Unterstützt wird die These, dass numb antagonistisch zum Notch-Signalweg wirkt durch die Beobachtung, dass die Überexpression aller numb Isoformen in LTC-IC Versuchen die Frequenz der LTC-IC signifikant verringert, wohingegen die Überexpression der zytoplasmatischen Domänen von Notch-1 und Notch-2 im Vergleich zu GFP-Transfizierten Zellen diese erhöht. Diese Befunde decken sich mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die entweder den Notch-Signalweg durch die Zugabe löslicher Notch-Liganden stärker aktivierten, oder analog zu den hier durchgeführten Experimenten aktive Formen von Notch in CD34<sup>+</sup>-Zellen

überexprimierten, wodurch eine Stammzelleexpansion *in vivo* wie auch *in vitro* erreicht wurde (Varnum-Finney et al. 2000; Stier et al. 2002; Varnum-Finney et al. 2003). Interessanterweise wirkt sich die Überexpression von numb2 sowohl im CFU-GEMM als auch im LTC-IC am stärksten auf die Entwicklung der Zellen aus und scheint sie in eine Differenzierung zu drängen. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit den Beobachtungen anderer Gruppen, die besagen, dass numb 2 eher in sich differenzierenden Zellen aktiviert wird (Verdi et al. 1996; Verdi et al. 1999; Yoshida et al. 2003). Auch durch das Ausschalten der numb-Funktion mittels RNAi wurde die LTC-IC Frequenz im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Hierbei zeigte sich jedoch, dass das alleinige Ausschalten der numb-Funktion keinen Effekt auf die LTC-IC Frequenz hatte. Wurden hingegen siRNAs gegen numb und numb-like gleichzeitig transfiziert, erhöhte sich die LTC-IC Rate, was auf eine redundante Wirkung von numb-like hindeutet. Besonders drastisch wurde dieser Effekt, wenn CD34<sup>+</sup>-Zellen mit allen drei verwendeten siRNA transfiziert wurden. Insofern deuten alle Ergebnisse auf eine Funktion von numb innerhalb der humanen Hämatopoiese hin. So ist es durchaus möglich, dass numb auch hier bei binären Schicksalsentscheidungen eine Funktion ausübt, und durch das Vorhandensein von numb in einer Zelle diese in die rote Entwicklungslinie gedrängt wird.

Eine Interaktion von numb und Notch konnte in dieser Arbeit leider nicht gezeigt werden. Die mit einem Reporterplasmid durchgeführten Versuche, welches den Grad der Notch-Aktivität über die Expression von GFP widerspiegelt, zeigten keine Reduktion der GFP-Expression in numb-transfizierten Zellen, wohl aber eine Steigerung dieser nach der Transfektion mit konstitutiv aktiven Notch-1. Auch durchgeführte PCR-Analysen der Expression von klassischen Notch-Zielgenen an mit numb und Notch transfizierten HEK293T-Zellen (Daten nicht in der Arbeit) ließen nicht auf eine Inhibierung des Notch-Signals durch die Überexpression numb schließen. Hier schien eher die Überexpression der konstitutiv aktiven Variante von Notch-1 zu einer Reduktion der numb-Expression zu führen. Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits in Veröffentlichungen darauf verwiesen, dass nicht eindeutig geklärt ist, ob die Interaktion von numb und Notch in Säugern tatsächlich konserviert ist (Petersen et al. 2006).

Sollten numb und Notch-1 nicht direkt miteinander interagieren, so könnte die Erhöhte LTC-IC Frequenz in numb und numb-like RNAi Versuchen auch anders erklärt werden. Neue Veröffentlichungen deuten auf eine wichtige Interaktion von

numb mit dem Tumorsuppressor p53 hin. Durch die Interaktion von numb mit p53, wird dieses nicht ubiquitinyliert. In Folge dessen wird p53 nicht degradiert und bleibt somit in den Zellen länger stabil. Das Fehlen von numb in Brustkrebszellen führt hier zu geringeren Mengen von p53, so dass diese Zellen verstärkt proliferieren. Jedoch wurde auch hier eine erhöhte Aktivität des Notch-Signalwegs nachgewiesen (Colaluca et al. 2008), was wiederum auf eine Interaktion von numb und Notch hindeuten könnte. Jedoch ist es auch möglich, dass die verstärkte Notch-Expression zu einer Reprimierung von numb führt, da wie oben beschrieben die Überexpression der konstitutiven Form von Notch-1 in HEK293T zu einer verringerten numb-Expression führte.

Die Funktion von numb und Notch in der Hämatopoese wird allgemein recht kontrovers diskutiert, da es mittlerweile mehrere Veröffentlichungen (s.u.) gibt, die einen Einfluss von Notch auf den Erhalt hämatopoietischer Stammzellen bezweifeln. Sowohl das Ausschalten der RBPjk-Funktion im Knochenmark von Mäusen wie auch die Expression einer dominant negativen Variante des im Notch-Signalweg notwendigen Koaktivators Mastermind-like 1, die zu einer völligen Inhibition des Signalwegs führt, hat keinen Einfluss auf den Erhalt der adulten hämatopoietischen Stammzellen (Radtke et al. 1999; Han et al. 2002; Maillard et al. 2008). Die Arbeitsgruppe um Wilson (Wilson et al. 2007) konnte keinen Phänotyp in der Hämatopoese von Mäusen feststellen, in deren Knochenmark die numb-Funktion über Cre-Lox Rekombination ausgeschaltet worden war, wodurch die Autoren eine Funktion von numb in der murinen Hämatopoese ausschlossen. Jedoch zeigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass anscheinend minimale Mengen von numb-Protein für die Entwicklung eines normalen Phänotyps ausreichend sind (Petersen et al. 2006). Somit könnte es also sein, dass die Mäuse aus der Wilson-Studie zwar keine numb-Expression mehr zeigten, sich jedoch noch geringste Mengen des Proteins in den Zellen befand, wodurch der eigentliche Phänotyp kaschiert wurde. Dies würde auch erklären, warum in LTC-IC die Zellen nach der Aufnahme recht großer Mengen siRNA (-nämlich von allen drei siRNAs) den stärksten Phänotyp zeigten.

Um die Frage nach der Funktion von numb in der humanen Hämatopoese eindeutig zu klären, sollten CD34<sup>+</sup>-Zellen stabil mit den verschiedenen numb-Isoformen transduziert werden. Diese Zellen sollten dann einerseits wieder in *in vitro* Analysen untersucht werden, andererseits aber auch dringend *in vivo* z.B. in NOD/SCID

Mäusen untersucht werden, da so auf einfache Weise sowohl eine Funktion von numb in der Myelopoese und Lymphopoese untersucht werden kann. Des Weiteren sollten diese Zellen bezüglich der Expression verschiedener Notch-Zielgene untersucht werden, um eine mögliche Interaktion von numb und Notch zu verifizieren. Außerdem sollte eine lentiviral basierte Strategie zum Ausschalten der Genfunktion von numb und numb-like gewählt werden, um diese Zellen dann analog zu den Überexpressionen zu untersuchen.

Zudem wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit numb in CD34<sup>+</sup>-Zellen eine Funktion innerhalb der Endozytose bzw. dem Recyceln von Integrinen, wie es unlängst für u.a. HeLa-Zellen beschrieben wurde besitzt (Nishimura und Kaibuchi 2007). In diesem Kontext wäre es eine interessante Frage, ob CD34<sup>+</sup>-Zellen nach der Inaktivierung von numb noch in der Lage sind zu migrieren bzw. NOD/SCID-Mäuse zu repopulieren.

## 5 Zusammenfassung

Hämatopoietische Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, aber auch in der Lage sind Vorläuferzellen zu bilden, die sich zu hochspezialisierten Zelltypen des Blutes differenzieren können. Die Mechanismen, die diese Entscheidung, also Selbsterneuerung *versus* Differenzierung, steuern, sind bis heute nicht endgültig verstanden.

Ein Teil dieser Arbeit war es, neue Faktoren, die an diesen beiden Prozessen beteiligt sind, zu identifizieren. Hierfür wurden komplexe Genexpressionsprofile verschiedener Zellpopulationen primitiver hämatopoietischer Zellen durchgeführt. Interessante Kandidatengene wurden anschließend in Expressionsvektoren kloniert und transient in CD34<sup>+</sup>-Zellen zur Überexpression gebracht. Die manipulierten Zellen wurden durchflusszytometrisch sortiert und in verschiedenen Zellkultursystemen untersucht.

Hierbei fanden sich tatsächlich Faktoren, die anscheinend das Zellschicksal primitiver hämatopoietischer Zellen beeinflussen konnten. So wurde durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren ID1 und ID2 beispielsweise eine Expansion primitiver myeloischer Zellen herbeigeführt.

Des Weiteren wurde die Funktion der Zellschicksalsdeterminante numb in primitiven hämatopoietischen Zellen untersucht. Numb ist ein Protein, das antagonistisch auf den Notch-Signalweg wirkt. Für Notch wurde bereits in einer Vielzahl von Veröffentlichungen eine Funktion bei binären Entscheidungsprozessen in der Hämatopoese nachgewiesen. Es konnte durch RT-PCR Analysen gezeigt werden, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen tatsächlich numb exprimieren. Analysen an lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup>-Zellen zeigten, dass diese vor allem numb2 und schwach numb3 exprimieren, wohingegen in lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen eher numb1 exprimiert wird. Numb-Protein konnte erfolgreich in kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen durch immunohistochemische Färbungen nachgewiesen werden.

Die Überexpression von numb in frisch isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen führt in CFU-GEMM Analysen zu einer Verschiebung des Zellschicksals in Richtung der erythroiden Linie. Weiterhin wird durch die verstärkte numb-Expression der Anteil an primitiven Progenitorzellen reduziert. Umgekehrt führt das Ausschalten der numb-Funktion zu einer Expansion der primitiven Progenitorzellen sowie einer verstärkten Bildung gemischter Kolonien in CFU-GEMM Analysen.

## Abstract

Hematopoietic stem cells are defined as undifferentiated cells having the ability to self-renew, but also to give rise to progenitor cells that in turn can differentiate into all lineages of blood. However the mechanisms controlling the decision of self-renewal *versus* differentiation remain not fully understood.

One part of this thesis was the identification of new factors which play a role in these processes. Therefore, complex gene expression profiles of different hematopoietic cell populations from diverse sources were analyzed. Genes of interest were then cloned into expression vectors and transiently overexpressed in CD34<sup>+</sup> cells. Successfully manipulated cells were sorted by flow cytometry and examined in different cell culture assays. Using this approach, it was possible to identify factors, namely ID1 and ID2, whose overexpression seem to influence the cell fate of primitive hematopoietic cells, leading to an expansion of primitive myeloid cells.

As a second part, the function of the cell fate determinant numb in primitive hematopoietic cells was investigated. Numb is thought to antagonize Notch function. It has been shown in multiple publications that Notch functions in defining binary cell fate decisions in hematopoietic cells. In RT-PCR experiments we could show that indeed primitive hematopoietic cells, namely CD34<sup>+</sup> cells, express numb RT-PCR analysis using isoform- specific primers revealed that lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low/-</sup> cells express mainly numb2 and weakly numb3 whereas lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> cells express numb1.

CFU-GEMM analysis showed that the overexpression of numb in CD34<sup>+</sup> cells leads to a shift of the cell fate to the erythroid lineage. Additionally, after overexpression of numb, the amount of primitive progenitors is reduced in LTC-IC analysis. On the other hand, the RNAi mediated knock down of numb resulted in an increased formation of mixed colonies in CFU-GEMM analysis, thus leading to an expansion of primitive progenitors. Taken together the results indicate that numb plays a role during myelopoiesis. Numb seems to specify progenitors to the erythroid lineage while preventing differentiation into other myeloid cell types.

## 6 Literatur

- Abramovich, C. und R. K. Humphries (2005). "Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells." Curr Opin Hematol **12**(3): 210-6.
- Abramovich, C., N. Pineault, H. Ohta und R. K. Humphries (2005). "Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion." Ann N Y Acad Sci **1044**: 109-16.
- Al-Hajj, M. (2007). "Cancer stem cells and oncology therapeutics." Curr Opin Oncol **19**(1): 61-4.
- Amit, M., M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor und J. A. Thomson (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.
- Andrews, R. G., J. W. Singer und I. D. Bernstein (1986). "Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors." Blood **67**(3): 842-5.
- Anversa, P. (2005). "Aging and longevity: the IGF-1 enigma." Circ Res **97**(5): 411-4.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh und T. Suda (2004). "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." Cell **118**(2): 149-61.
- Arai, F., A. Hirao und T. Suda (2005). "Regulation of hematopoietic stem cells by the niche." Trends Cardiovasc Med **15**(2): 75-9.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand und R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-6.
- Bani-Yaghoub, M., C. J. Kubu, R. Cowling, J. Rochira, G. N. Nikopoulos, S. Bellum und J. M. Verdi (2007). "A switch in numb isoforms is a critical step in cortical development." Dev Dyn **236**(3): 696-705.
- Bayle, J., S. Letard, R. Frank, P. Dubreuil und P. De Sepulveda (2004). "Suppressor of cytokine signaling 6 associates with KIT and regulates KIT receptor signaling." J Biol Chem **279**(13): 12249-59.
- Beachy, P. A., S. S. Karhadkar und D. M. Berman (2004). "Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis." Nature **432**(7015): 324-31.
- Becker, A. J., C. E. Mc und J. E. Till (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." Nature **197**: 452-4.
- Bellaiche, Y., M. Gho, J. A. Kaltschmidt, A. H. Brand und F. Schweisguth (2001). "Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division." Nat Cell Biol **3**(1): 50-7.
- Bellantuono, I. (2004). "Haemopoietic stem cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 607-20.
- Berdnik, D., T. Torok, M. Gonzalez-Gaitan und J. A. Knoblich (2002). "The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila." Dev Cell **3**(2): 221-31.
- Betschinger, J. und J. A. Knoblich (2004). "Dare to be different: asymmetric cell division in Drosophila, C. elegans and vertebrates." Curr Biol **14**(16): R674-85.

- Bhatia, M., D. Bonnet, U. Kapp, J. C. Wang, B. Murdoch und J. E. Dick (1997). "Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture." J Exp Med **186**(4): 619-24.
- Bhatia, M., J. C. Wang, U. Kapp, D. Bonnet und J. E. Dick (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5320-5.
- Bracker, T. U., B. Giebel, J. Spanholtz, U. R. Sorg, L. Klein-Hitpass, T. Moritz und J. Thomale (2006). "Stringent regulation of DNA repair during human hematopoietic differentiation: a gene expression and functional analysis." Stem Cells **24**(3): 722-30.
- Brummendorf, T. H., W. Dragowska, J. Zijlmans, G. Thornbury und P. M. Lansdorp (1998). "Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells." J Exp Med **188**(6): 1117-24.
- Buitenhuis, M., H. W. van Deutekom, L. P. Verhagen, A. Castor, S. E. Jacobsen, J. W. Lammers, L. Koenderman und P. J. Coffey (2005). "Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix-loop-helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2." Blood **105**(11): 4272-81.
- Calvi, L. M. (2006). "Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche." Ann N Y Acad Sci **1068**: 477-88.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg und D. T. Scadden (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-6.
- Cayouette, M., A. V. Whitmore, G. Jeffery und M. Raff (2001). "Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium." J Neurosci **21**(15): 5643-51.
- Chen, F., H. Kook, R. Milewski, A. D. Gitler, M. M. Lu, J. Li, R. Nazarian, R. Schnepf, K. Jen, C. Biben, G. Runke, J. P. Mackay, J. Novotny, R. J. Schwartz, R. P. Harvey, M. C. Mullins und J. A. Epstein (2002). "Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development." Cell **110**(6): 713-23.
- Chen, Y., M. Pacyna-Gengelbach, N. Deutschmann, S. Niesporek und I. Petersen (2007). "Homeobox gene HOP has a potential tumor suppressive activity in human lung cancer." Int J Cancer **121**(5): 1021-7.
- Chinnasamy, D., M. D. Milsom, J. Shaffer, J. Neuenfeldt, A. F. Shaaban, G. P. Margison, L. J. Fairbairn und N. Chinnasamy (2006). "Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI." Viro J **3**: 14.
- Civin, C. I., L. C. Strauss, C. Brovall, M. J. Fackler, J. F. Schwartz und J. H. Shaper (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol **133**(1): 157-65.
- Civin, C. I., T. Trischmann, N. S. Kadan, J. Davis, S. Noga, K. Cohen, B. Duffy, I. Groenewegen, J. Wiley, P. Law, A. Hardwick, F. Oldham und A. Gee (1996). "Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis." J Clin Oncol **14**(8): 2224-33.
- Colaluca, I. N., D. Tosoni, P. Nuciforo, F. Senic-Matuglia, V. Galimberti, G. Viale, S. Pece und P. P. Di Fiore (2008). "NUMB controls p53 tumour suppressor activity." Nature **451**(7174): 76-80.
- Conneally, E., J. Cashman, A. Petzer und C. Eaves (1997). "Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9836-41.

- Davies, M. V. und R. J. Kaufman (1992). "The sequence context of the initiation codon in the encephalomyocarditis virus leader modulates efficiency of internal translation initiation." J Virol **66**(4): 1924-32.
- Deschamps, J., E. van den Akker, S. Forlani, W. De Graaff, T. Oosterveen, B. Roelen und J. Roelfsema (1999). "Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse." Int J Dev Biol **43**(7): 635-50.
- Deschamps, J. und J. van Nes (2005). "Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse." Development **132**(13): 2931-42.
- Dho, S. E., M. B. French, S. A. Woods und C. J. McGlade (1999). "Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain." J Biol Chem **274**(46): 33097-104.
- Dick, J. E., M. Bhatia, O. Gan, U. Kapp und J. C. Wang (1997). "Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice." Stem Cells **15 Suppl 1**: 199-203; discussion 204-7.
- Dirks, W., M. Wirth und H. Hauser (1993). "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells." Gene **128**(2): 247-9.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller und M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-87.
- Duhrsen, U., J. L. Villeval, J. Boyd, G. Kannourakis, G. Morstyn und D. Metcalf (1988). "Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients." Blood **72**(6): 2074-81.
- Durand, C. und E. Dzierzak (2005). "Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells." Haematologica **90**(1): 100-8.
- Dzierzak, E. (2005). "The emergence of definitive hematopoietic stem cells in the mammal." Curr Opin Hematol **12**(3): 197-202.
- Erlach, H. A. (1989). "Polymerase chain reaction." J Clin Immunol **9**(6): 437-47.
- Evans, M. J. und M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Ferrell, C. M., S. T. Dorsam, H. Ohta, R. K. Humphries, M. K. Derynck, C. Haqq, C. Largman und H. J. Lawrence (2005). "Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells." Stem Cells **23**(5): 644-55.
- Frise, E., J. A. Knoblich, S. Younger-Shepherd, L. Y. Jan und Y. N. Jan (1996). "The Drosophila Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11925-32.
- Furler, S., J. C. Paterna, M. Weibel und H. Bueler (2001). "Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons." Gene Ther **8**(11): 864-73.
- Gallacher, L., B. Murdoch, D. M. Wu, F. N. Karanu, M. Keeney und M. Bhatia (2000). "Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7." Blood **95**(9): 2813-20.
- Giebel, B., D. Corbeil, J. Beckmann, J. Hohn, D. Freund, K. Giesen, J. Fischer, G. Kogler und P. Wernet (2004). "Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **104**(8): 2332-8.

- Giebel, B., T. Zhang, J. Beckmann, J. Spanholtz, P. Wernet, A. D. Ho und M. Punzel (2006). "Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division." Blood **107**(5): 2146-52.
- Gottgens, B., A. Nastos, S. Kinston, S. Piltz, E. C. Delabesse, M. Stanley, M. J. Sanchez, A. Ciau-Uitz, R. Patient und A. R. Green (2002). "Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors." Embo J **21**(12): 3039-50.
- Guo, M., L. Y. Jan und Y. N. Jan (1996). "Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch." Neuron **17**(1): 27-41.
- Han, H., K. Tanigaki, N. Yamamoto, K. Kuroda, M. Yoshimoto, T. Nakahata, K. Ikuta und T. Honjo (2002). "Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision." Int Immunol **14**(6): 637-45.
- Hartenstein, V. und J. W. Posakony (1989). "Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*." Development **107**(2): 389-405.
- Hayashi, K., N. Abe, T. Watanabe, M. Obinata, M. Ito, T. Sato, S. Habu und M. Satake (2001). "Overexpression of AML1 transcription factor drives thymocytes into the CD8 single-positive lineage." J Immunol **167**(9): 4957-65.
- Hayashi, K., W. Natsume, T. Watanabe, N. Abe, N. Iwai, H. Okada, Y. Ito, M. Asano, Y. Iwakura, S. Habu, Y. Takahama und M. Satake (2000). "Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single-positive T cells." J Immunol **165**(12): 6816-24.
- Hennecke, M., M. Kwissa, K. Metzger, A. Oumard, A. Kroger, R. Schirmbeck, J. Reimann und H. Hauser (2001). "Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs." Nucleic Acids Res **29**(16): 3327-34.
- Hoegg, S. und A. Meyer (2005). "Hox clusters as models for vertebrate genome evolution." Trends Genet **21**(8): 421-4.
- Hofmeister, C. C., J. Zhang, K. L. Knight, P. Le und P. J. Stiff (2007). "Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche." Bone Marrow Transplant **39**(1): 11-23.
- Huang, E. J., H. Li, A. A. Tang, A. K. Wiggins, R. L. Neve, W. Zhong, L. Y. Jan und Y. N. Jan (2005). "Targeted deletion of numb and numbl like in sensory neurons reveals their essential functions in axon arborization." Genes Dev **19**(1): 138-51.
- Huang, S., P. Law, K. Francis, B. O. Palsson und A. D. Ho (1999). "Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules." Blood **94**(8): 2595-604.
- Iscove, N. N. und K. Nawa (1997). "Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion." Curr Biol **7**(10): 805-8.
- Ishiko, E., I. Matsumura, S. Ezoe, K. Gale, J. Ishiko, Y. Satoh, H. Tanaka, H. Shibayama, M. Mizuki, T. Era, T. Enver und Y. Kanakura (2005). "Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1." J Biol Chem **280**(6): 4929-39.
- Jacobson, L. O. (1951). "Further studies on factor influencing recovery from radiation injury." Proc Inst Med Chic **18**(13): 300-1.
- Jolkowska, J. und M. Witt (2000). "The EVI-1 gene--its role in pathogenesis of human leukemias." Leuk Res **24**(7): 553-8.

- Kamel-Reid, S. und J. E. Dick (1988). "Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells." Science **242**(4886): 1706-9.
- Kamminga, L. M. und G. de Haan (2006). "Cellular memory and hematopoietic stem cell aging." Stem Cells **24**(5): 1143-9.
- Karanu, F. N., B. Murdoch, T. Miyabayashi, M. Ohno, M. Koremoto, L. Gallacher, D. Wu, A. Itoh, S. Sakano und M. Bhatia (2001). "Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells." Blood **97**(7): 1960-7.
- Karanu, F. N., L. Yuefei, L. Gallacher, S. Sakano und M. Bhatia (2003). "Differential response of primitive human CD34- and CD34+ hematopoietic cells to the Notch ligand Jagged-1." Leukemia **17**(7): 1366-74.
- Katz, F. E., R. Tindle, D. R. Sutherland und M. F. Greaves (1985). "Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells." Leuk Res **9**(2): 191-8.
- Kawamata, S., C. Du, K. Li und C. Lavau (2002). "Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations." Oncogene **21**(24): 3855-63.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst und S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-21.
- Kmita, M. und D. Duboule (2003). "Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering." Science **301**(5631): 331-3.
- Kondo, M., A. J. Wagers, M. G. Manz, S. S. Prohaska, D. C. Scherer, G. F. Beilhack, J. A. Shizuru und I. L. Weissman (2003). "Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application." Annu Rev Immunol **21**: 759-806.
- Kook, H., W. W. Yung, R. J. Simpson, H. J. Kee, S. Shin, J. A. Lowry, F. E. Loughlin, Z. Yin, J. A. Epstein und J. P. Mackay (2006). "Analysis of the structure and function of the transcriptional coregulator HOP." Biochemistry **45**(35): 10584-90.
- Korbling, M. und P. Anderlini (2001). "Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?" Blood **98**(10): 2900-8.
- Krause, D. S., M. J. Fackler, C. I. Civin und W. S. May (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." Blood **87**(1): 1-13.
- Kreider, B. L., S. H. Orkin und J. N. Ihle (1993). "Loss of erythropoietin responsiveness in erythroid progenitors due to expression of the Evi-1 myeloid-transforming gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6454-8.
- Kumano, K., S. Chiba, K. Shimizu, T. Yamagata, N. Hosoya, T. Saito, T. Takahashi, Y. Hamada und H. Hirai (2001). "Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression." Blood **98**(12): 3283-9.
- Kurosawa, H. (2007). "Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells." J Biosci Bioeng **103**(5): 389-98.
- Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." Development **131**(5): 965-73.
- Lapidot, T., F. Pflumio, M. Doedens, B. Murdoch, D. E. Williams und J. E. Dick (1992). "Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice." Science **255**(5048): 1137-41.

- Larochelle, A., J. Vormoor, H. Hanenberg, J. C. Wang, M. Bhatia, T. Lapidot, T. Moritz, B. Murdoch, X. L. Xiao, I. Kato, D. A. Williams und J. E. Dick (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy." Nat Med **2**(12): 1329-37.
- Leary, A. G., L. C. Strauss, C. I. Civin und M. Ogawa (1985). "Disparate differentiation in hemopoietic colonies derived from human paired progenitors." Blood **66**(2): 327-32.
- Lecuyer, E. und T. Hoang (2004). "SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia." Exp Hematol **32**(1): 11-24.
- Leurs, C., M. Jansen, K. E. Pollok, M. Heinkelein, M. Schmidt, M. Wissler, D. Lindemann, C. Von Kalle, A. Rethwilm, D. A. Williams und H. Hanenberg (2003). "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells." Hum Gene Ther **14**(6): 509-19.
- Lewis, I. D. und C. M. Verfaillie (2000). "Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood." Exp Hematol **28**(9): 1087-95.
- Lewis, J. (1998). "Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates." Semin Cell Dev Biol **9**(6): 583-9.
- Lin, H. (2002). "The stem-cell niche theory: lessons from flies." Nat Rev Genet **3**(12): 931-40.
- Liu, H. S., M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen und N. J. Ke (1999). "Is green fluorescent protein toxic to the living cells?" Biochem Biophys Res Commun **260**(3): 712-7.
- Lopingco, M. C. und A. S. Perkins (1996). "Molecular analysis of Evi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia." Curr Top Microbiol Immunol **211**: 211-22.
- Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid und E. Shelton (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections." J Natl Cancer Inst **12**(1): 197-201.
- Maillard, I., T. Fang und W. S. Pear (2005). "Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway." Annu Rev Immunol **23**: 945-74.
- Maillard, I., U. Koch, A. Dumortier, O. Shestova, L. Xu, H. Sai, S. E. Pross, J. C. Aster, A. Bhandoola, F. Radtke und W. S. Pear (2008). "Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **2**(4): 356-66.
- Majeti, R., C. Y. Park und I. L. Weissman (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." Cell Stem Cell **1**: 635-645.
- Martinez Arias, A., V. Zecchini und K. Brennan (2002). "CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development?" Curr Opin Genet Dev **12**(5): 524-33.
- Mayani, H., W. Dragowska und P. M. Lansdorp (1993). "Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines." J Cell Physiol **157**(3): 579-86.
- McGill, M. A. und C. J. McGlade (2003). "Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain." J Biol Chem **278**(25): 23196-203.
- McGinnis, W. und R. Krumlauf (1992). "Homeobox genes and axial patterning." Cell **68**(2): 283-302.
- McNiece, I. K., A. B. Kriegler und P. J. Quesenberry (1989). "Studies on the myeloid synergistic factor from 5637: comparison with interleukin-1 alpha." Blood **73**(4): 919-23.

- Medvinsky, A. und E. Dzierzak (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." Cell **86**(6): 897-906.
- Medvinsky, A. L., N. L. Samoylina, A. M. Muller und E. A. Dzierzak (1993). "An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse." Nature **364**(6432): 64-7.
- Mikkola, H. K., C. Gekas, S. H. Orkin und F. Dieterlen-Lievre (2005). "Placenta as a site for hematopoietic stem cell development." Exp Hematol **33**(9): 1048-54.
- Miller, J. S., K. A. Alley und P. McGlave (1994). "Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor." Blood **83**(9): 2594-601.
- Miller, J. S., C. Verfaillie und P. McGlave (1992). "The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture." Blood **80**(9): 2182-7.
- Milner, L. A., R. Kopan, D. I. Martin und I. D. Bernstein (1994). "A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors." Blood **83**(8): 2057-62.
- Miyoshi, H., K. Shimizu, T. Kozu, N. Maseki, Y. Kaneko und M. Ohki (1991). "t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10431-4.
- Mizuguchi, H., Z. Xu, A. Ishii-Watabe, E. Uchida und T. Hayakawa (2000). "IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector." Mol Ther **1**(4): 376-82.
- Moloney, D. J., V. M. Panin, S. H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K. D. Irvine, R. S. Haltiwanger und T. F. Vogt (2000). "Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch." Nature **406**(6794): 369-75.
- Moore, K. A., H. Ema und I. R. Lemischka (1997). "In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells." Blood **89**(12): 4337-47.
- Moore, M. A. und D. Metcalf (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.
- Morishita, K., E. Parganas, T. Matsugi und J. N. Ihle (1992). "Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32Dc13 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor." Mol Cell Biol **12**(1): 183-9.
- Morrison, S. J. und I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." Immunity **1**(8): 661-73.
- Mucenski, M. L., B. A. Taylor, J. N. Ihle, J. W. Hartley, H. C. Morse, 3rd, N. A. Jenkins und N. G. Copeland (1988). "Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors." Mol Cell Biol **8**(1): 301-8.
- Muller, C. I., M. Trepel, R. Kunzmann, A. Lais, R. Engelhardt und M. Lubbert (2004). "Hematologic and molecular spontaneous remission following sepsis in acute monoblastic leukemia with translocation (9;11): a case report and review of the literature." Eur J Haematol **73**(1): 62-6.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Nervi, B., D. C. Link und J. F. DiPersio (2006). "Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization." J Cell Biochem **99**(3): 690-705.

- Nie, J., S. S. Li und C. J. McGlade (2004). "A novel PTB-PDZ domain interaction mediates isoform-specific ubiquitylation of mammalian Numb." J Biol Chem **279**(20): 20807-15.
- Nishimura, T. und K. Kaibuchi (2007). "Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3." Dev Cell **13**(1): 15-28.
- Ohishi, K., B. Varnum-Finney, D. Flowers, C. Anasetti, D. Myerson und I. D. Bernstein (2000). "Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1." Blood **95**(9): 2847-54.
- Ohki, M. (1993). "Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid leukaemia." Semin Cancer Biol **4**(6): 369-75.
- Ohlstein, B., T. Kai, E. Decotto und A. Spradling (2004). "The stem cell niche: theme and variations." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 693-9.
- Okuda, T., J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld und J. R. Downing (1996). "AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis." Cell **84**(2): 321-30.
- Ono, R., T. Nosaka und Y. Hayashi (2005). "Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis." Int J Hematol **81**(4): 288-93.
- Perry, S. S., Y. Zhao, L. Nie, S. W. Cochrane, Z. Huang und X. H. Sun (2007). "Id1, but not Id3, directs long-term repopulating hematopoietic stem-cell maintenance." Blood **110**(7): 2351-60.
- Petersen, P. H., H. Tang, K. Zou und W. Zhong (2006). "The enigma of the numb-Notch relationship during mammalian embryogenesis." Dev Neurosci **28**(1-2): 156-68.
- Pina, C., G. May, S. Soneji, D. Hong und T. Enver (2008). "MLLT3 regulates early human erythroid and megakaryocytic cell fate." Cell Stem Cell **2**(3): 264-73.
- Portin, P. (2002). "General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *Drosophila melanogaster*: a review." Hereditas **136**(2): 89-96.
- Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, T. Kadesch, R. R. Hardy, J. C. Aster und W. S. Pear (1999). "Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination." Immunity **11**(3): 299-308.
- Punzel, M., K. A. Moore, I. R. Lemischka und C. M. Verfaillie (1999). "The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells." Leukemia **13**(1): 92-7.
- Punzel, M., S. D. Wissink, J. S. Miller, K. A. Moore, I. R. Lemischka und C. M. Verfaillie (1999). "The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro." Blood **93**(11): 3750-6.
- Punzel, M., T. Zhang, D. Liu, V. Eckstein und A. D. Ho (2002). "Functional analysis of initial cell divisions defines the subsequent fate of individual human CD34(+)CD38(-) cells." Exp Hematol **30**(5): 464-72.
- Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald und M. Aguet (1999). "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." Immunity **10**(5): 547-58.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke und I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.
- Rhyu, M. S., L. Y. Jan und Y. N. Jan (1994). "Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells." Cell **76**(3): 477-91.

- Robb, L., N. J. Elwood, A. G. Elefanty, F. Kontgen, R. Li, L. D. Barnett und C. G. Begley (1996). "The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse." Embo J **15**(16): 4123-9.
- Robb, L., I. Lyons, R. Li, L. Hartley, F. Kontgen, R. P. Harvey, D. Metcalf und C. G. Begley (1995). "Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7075-9.
- Roegiers, F. und Y. N. Jan (2004). "Asymmetric cell division." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 195-205.
- Saha, V., B. D. Young und P. S. Freemont (1998). "Translocations, fusion genes, and acute leukemia." J Cell Biochem Suppl **30-31**: 264-76.
- Salcini, A. E., S. Confalonieri, M. Doria, E. Santolini, E. Tassi, O. Minenkova, G. Cesareni, P. G. Pelicci und P. P. Di Fiore (1997). "Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module." Genes Dev **11**(17): 2239-49.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santolini, E., C. Puri, A. E. Salcini, M. C. Gagliani, P. G. Pelicci, C. Tacchetti und P. P. Di Fiore (2000). "Numb is an endocytic protein." J Cell Biol **151**(6): 1345-52.
- Sauvageau, G., U. Thorsteinsdottir, C. J. Eaves, H. J. Lawrence, C. Largman, P. M. Lansdorp und R. K. Humphries (1995). "Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo." Genes Dev **9**(14): 1753-65.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.
- Schultheis, B., M. Carapeti-Marootian, A. Hochhaus, A. Weissner, J. M. Goldman und J. V. Melo (2002). "Overexpression of SOCS-2 in advanced stages of chronic myeloid leukemia: possible inadequacy of a negative feedback mechanism." Blood **99**(5): 1766-75.
- Shen, Q. und S. Temple (2002). "Creating asymmetric cell divisions by skewing endocytosis." Sci STKE **2002**(162): PE52.
- Shen, Q., W. Zhong, Y. N. Jan und S. Temple (2002). "Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts." Development **129**(20): 4843-53.
- Shih, C. C., M. C. Hu, J. Hu, J. Medeiros und S. J. Forman (1999). "Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells." Blood **94**(5): 1623-36.
- Shimokawa, T., K. Okumura und C. Ra (2000). "DNA induces apoptosis in electroporated human promonocytic cell line U937." Biochem Biophys Res Commun **270**(1): 94-9.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer und S. H. Orkin (1995). "Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL." Nature **373**(6513): 432-4.
- Shmelkov, S. V., R. St Clair, D. Lyden und S. Rafii (2005). "AC133/CD133/Prominin-1." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 715-9.
- Sieff, C. A. (1994). "Hematopoietic cell proliferation and differentiation." Curr Opin Hematol **1**(4): 310-20.
- Siminovitch, L., E. A. McCulloch und J. E. Till (1963). "The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies." J Cell Physiol **62**: 327-36.

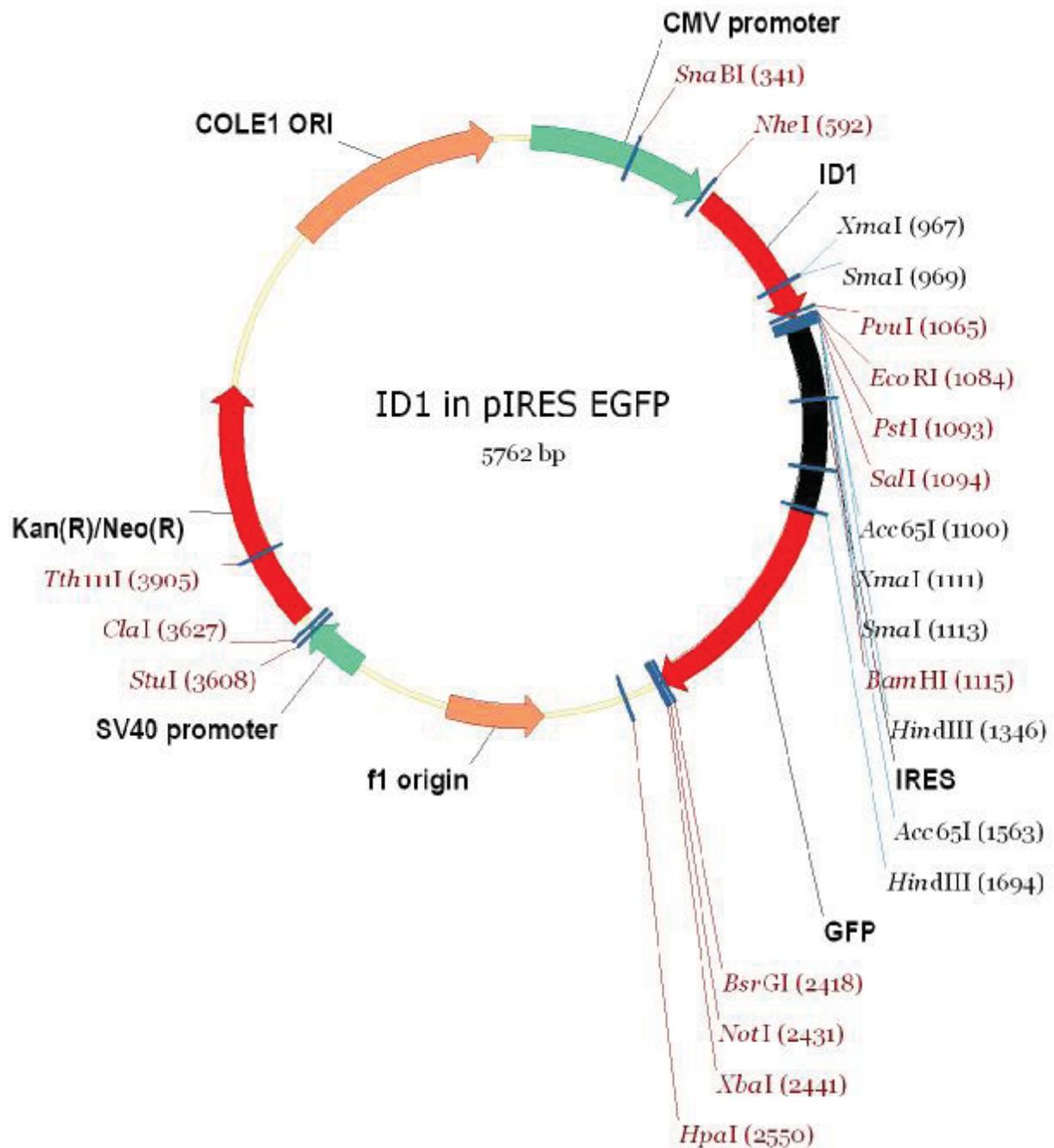
- Smith, C. A., S. E. Dho, J. Donaldson, U. Tepass und C. J. McGlade (2004). "The cell fate determinant numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling." Mol Biol Cell **15**(8): 3698-708.
- Spana, E. P. und C. Q. Doe (1996). "Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates." Neuron **17**(1): 21-6.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld und I. L. Weissman (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.
- Spangrude, G. J. und R. Scollay (1990). "A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells." Exp Hematol **18**(8): 920-6.
- Spradling, A., D. Drummond-Barbosa und T. Kai (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.
- Stacey, K. J., I. L. Ross und D. A. Hume (1993). "Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages." Immunol Cell Biol **71** ( Pt 2): 75-85.
- Stanke, N., A. Stange, D. Luftenegger, H. Zentgraf und D. Lindemann (2005). "Ubiquitination of the prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide regulates subviral particle release." J Virol **79**(24): 15074-83.
- Stier, S., T. Cheng, D. Dombkowski, N. Carlesso und D. T. Scadden (2002). "Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome." Blood **99**(7): 2369-78.
- Suda, J., T. Suda und M. Ogawa (1984). "Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors." Blood **64**(2): 393-9.
- Suda, T., F. Arai und A. Hirao (2005). "Hematopoietic stem cells and their niche." Trends Immunol **26**(8): 426-33.
- Suda, T., F. Arai und S. Shimmura (2005). "Regulation of stem cells in the niche." Cornea **24**(8 Suppl): S12-S17.
- Suda, T., J. Suda und M. Ogawa (1984). "Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(8): 2520-4.
- Sutherland, H. J., P. M. Lansdorp, D. H. Henkelman, A. C. Eaves und C. J. Eaves (1990). "Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3584-8.
- Tang, H., S. B. Rompani, J. B. Atkins, Y. Zhou, T. Osterwalder und W. Zhong (2005). "Numb proteins specify asymmetric cell fates via an endocytosis- and proteasome-independent pathway." Mol Cell Biol **25**(8): 2899-909.
- Taupin, P. und F. H. Gage (2002). "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals." J Neurosci Res **69**(6): 745-9.
- Terstappen, L. W., S. Huang, M. Safford, P. M. Lansdorp und M. R. Loken (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-27.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall und J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Thorsteinsdottir, U., G. Sauvageau und R. K. Humphries (1999). "Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size." Blood **94**(8): 2605-12.

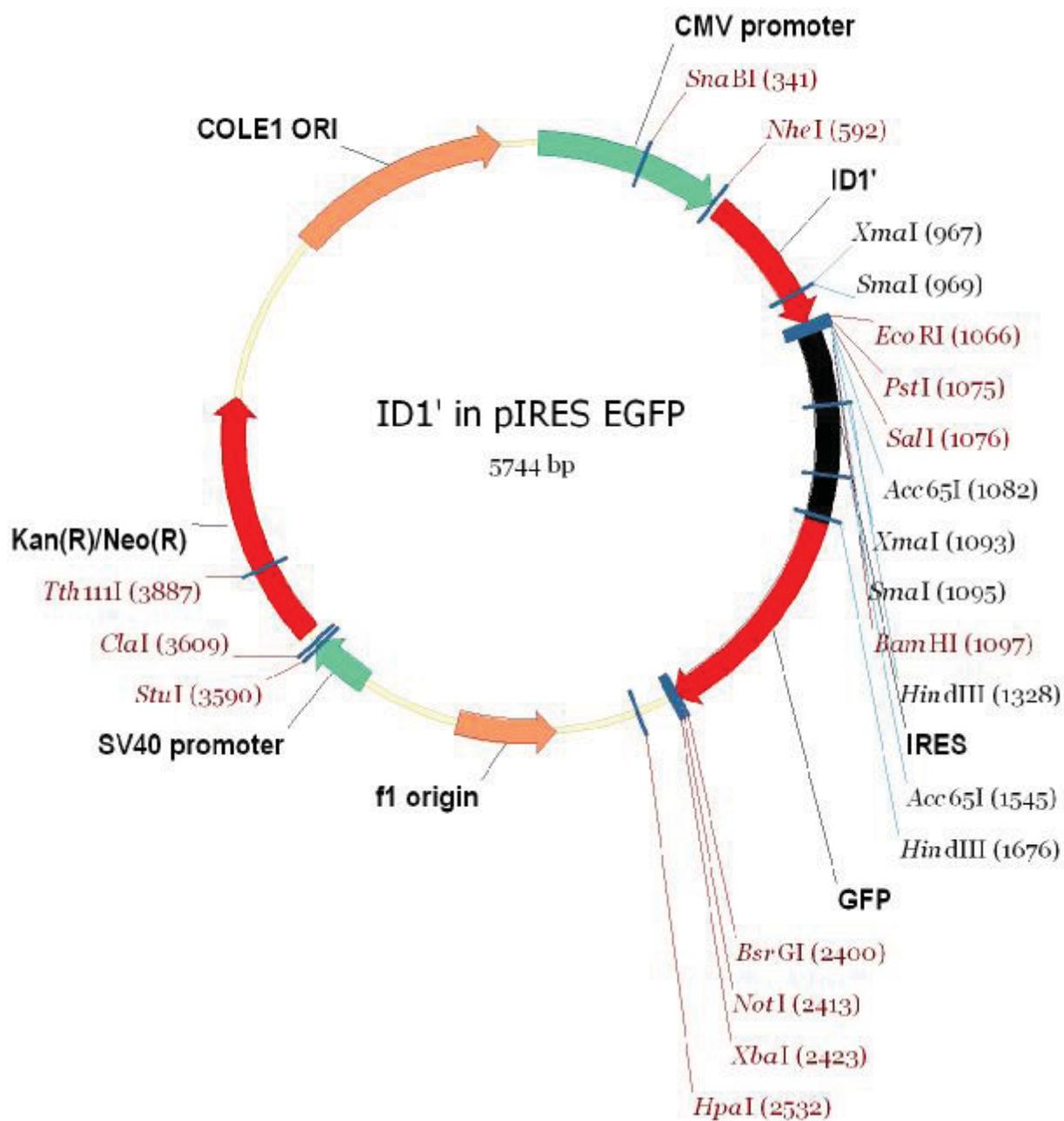
- Till, J. E. und C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-22.
- Toriya, M., A. Tokunaga, K. Sawamoto, K. Nakao und H. Okano (2006). "Distinct functions of human numb isoforms revealed by misexpression in the neural stem cell lineage in the Drosophila larval brain." Dev Neurosci **28**(1-2): 142-55.
- Tsai, F. Y., G. Keller, F. C. Kuo, M. Weiss, J. Chen, M. Rosenblatt, F. W. Alt und S. H. Orkin (1994). "An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2." Nature **371**(6494): 221-6.
- Uemura, T., S. Shepherd, L. Ackerman, L. Y. Jan und Y. N. Jan (1989). "numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos." Cell **58**(2): 349-60.
- Vaccari, T. und D. Bilder (2005). "The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking." Dev Cell **9**(5): 687-98.
- Varnum-Finney, B., C. Brashem-Stein und I. D. Bernstein (2003). "Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability." Blood **101**(5): 1784-9.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, C. Brashem-Stein, C. Nourigat, D. Flowers, S. Bakkour, W. S. Pear und I. D. Bernstein (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-81.
- Verdi, J. M., A. Bashirullah, D. E. Goldhawk, C. J. Kubu, M. Jamali, S. O. Meakin und H. D. Lipshitz (1999). "Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10472-6.
- Verdi, J. M., R. Schmandt, A. Bashirullah, S. Jacob, R. Salvino, C. G. Craig, A. E. Program, H. D. Lipshitz und C. J. McGlade (1996). "Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate." Curr Biol **6**(9): 1134-45.
- von Levetzow, G., J. Spanholtz, J. Beckmann, J. Fischer, G. Kogler, P. Wernet, M. Punzel und B. Giebel (2006). "Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells." Stem Cells Dev **15**(2): 278-85.
- Wagers, A. J. und I. M. Conboy (2005). "Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis." Cell **122**(5): 659-67.
- Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Marin-Padilla, A. H. Sharpe und N. A. Speck (1996). "Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3444-9.
- Washburn, T., E. Schweighoffer, T. Gridley, D. Chang, B. J. Fowlkes, D. Cado und E. Robey (1997). "Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision." Cell **88**(6): 833-43.
- Weissman, I. L. (2000). "Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities." Science **287**(5457): 1442-6.
- Wieser, R., A. Volz, U. Vinatzer, K. Gardiner, U. Jager, M. Mitterbauer, A. Ziegler und C. Fonatsch (2000). "Transcription factor GATA-2 gene is located near 3q21 breakpoints in myeloid leukemia." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 239-45.
- Wilson, A., D. L. Ardiet, C. Saner, N. Vilain, F. Beermann, M. Aguet, H. R. Macdonald und O. Zilian (2007). "Normal hemopoiesis and lymphopoiesis in the combined absence of numb and numblake." J Immunol **178**(11): 6746-51.

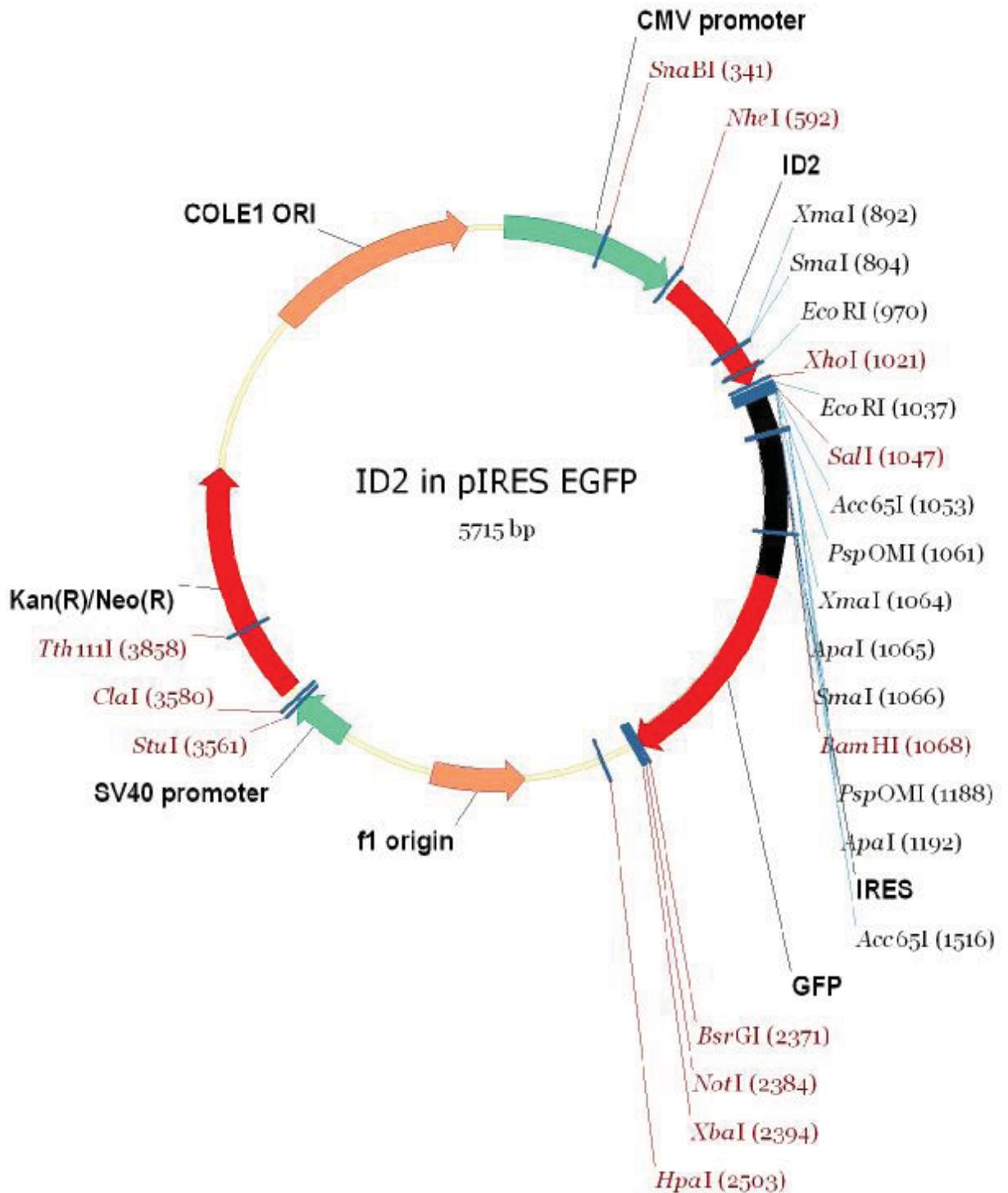
- Wodarz, A. und W. B. Huttner (2003). "Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates." Mech Dev **120**(11): 1297-309.
- Wolpert, L. (1994). "Positional information and pattern formation in development." Dev Genet **15**(6): 485-90.
- Yamagata, T., K. Maki und K. Mitani (2005). "Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis." Int J Hematol **82**(1): 1-8.
- Yasukawa, H., A. Sasaki und A. Yoshimura (2000). "Negative regulation of cytokine signaling pathways." Annu Rev Immunol **18**: 143-64.
- Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney und D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-12.
- Yoshida, T., A. Tokunaga, K. Nakao und H. Okano (2003). "Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas." Differentiation **71**(8): 486-95.
- Zanjani, E. D., M. G. Pallavicini, J. L. Ascensao, A. W. Flake, R. G. Langlois, M. Reitsma, F. R. MacKintosh, D. Stutes, M. R. Harrison und M. Tavassoli (1992). "Engraftment and long-term expression of human fetal hemopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero." J Clin Invest **89**(4): 1178-88.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina und L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-41.
- Zhong, W., J. N. Feder, M. M. Jiang, L. Y. Jan und Y. N. Jan (1996). "Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis." Neuron **17**(1): 43-53.
- Zhong, W., M. M. Jiang, M. D. Schonemann, J. J. Meneses, R. A. Pedersen, L. Y. Jan und Y. N. Jan (2000). "Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6844-9.
- Zhou, Y., J. Aran, M. M. Gottesman und I. Pastan (1998). "Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector." Hum Gene Ther **9**(3): 287-93.
- Zhu, J., D. M. Giannola, Y. Zhang, A. J. Rivera und S. G. Emerson (2003). "NF-Y cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4." Blood **102**(7): 2420-7.
- Zilian, O., C. Saner, L. Hagedorn, H. Y. Lee, E. Sauberli, U. Suter, L. Sommer und M. Aguet (2001). "Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates." Curr Biol **11**(7): 494-501.

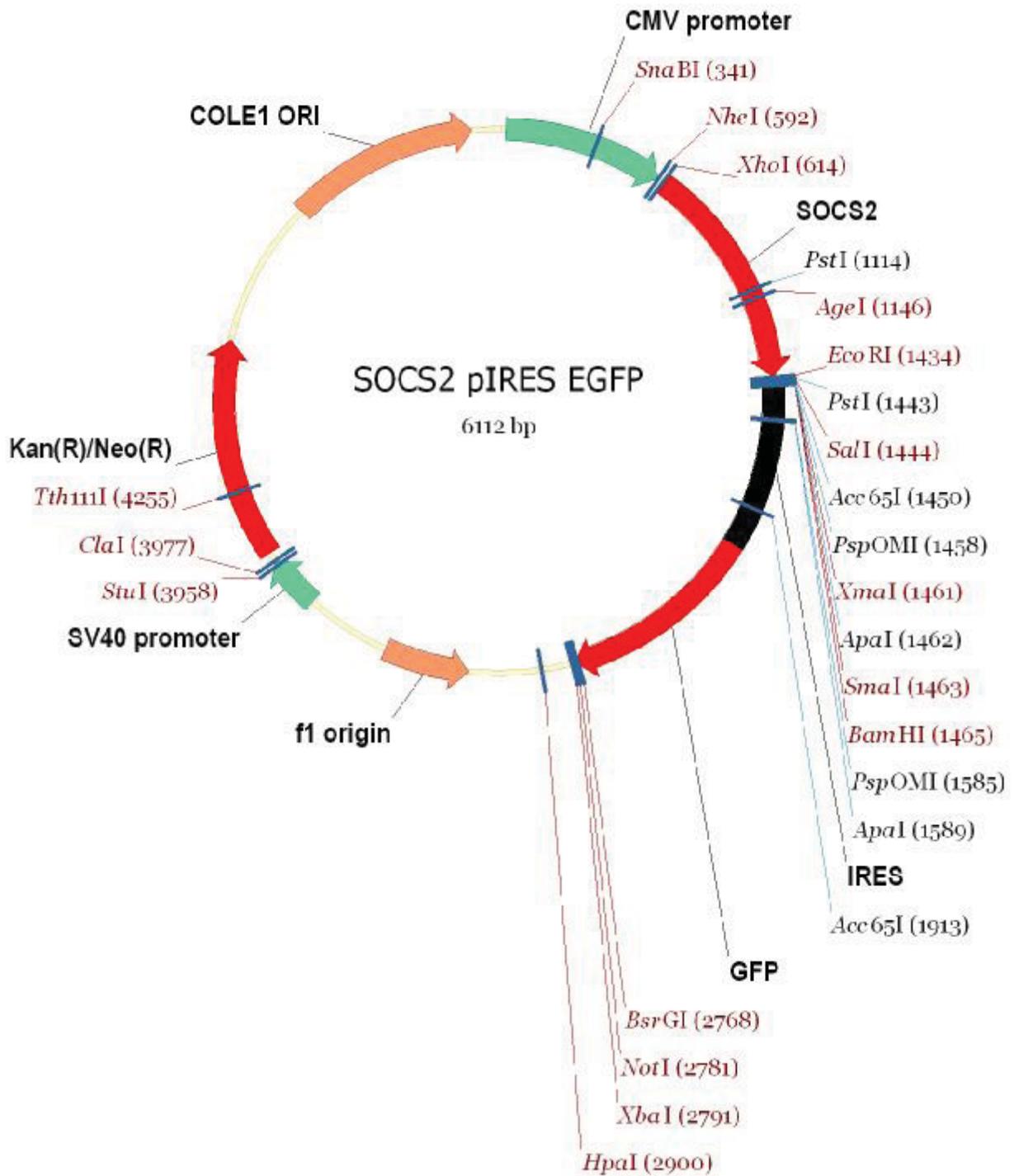


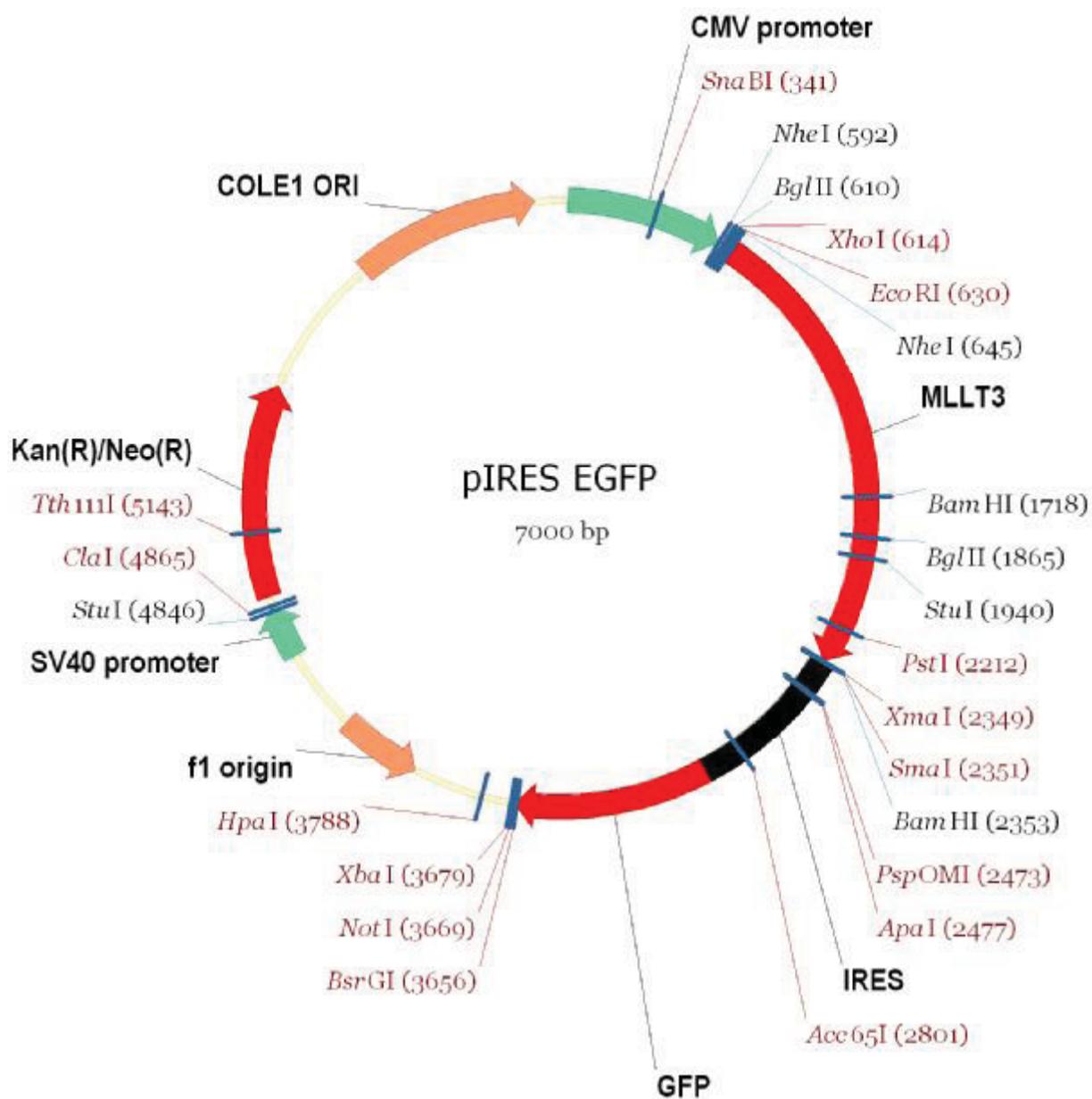
## 7.2 Plasmidkarten

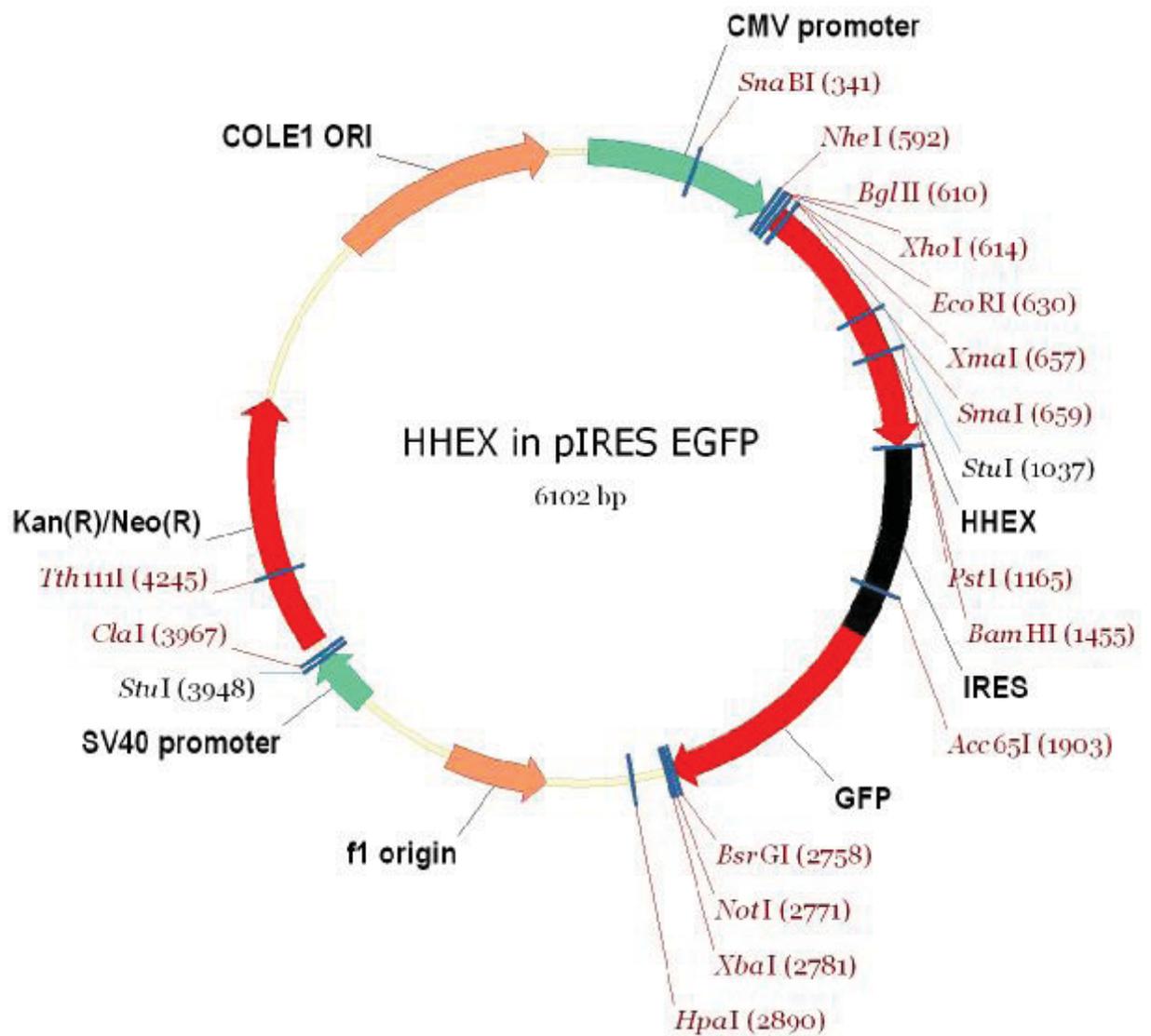


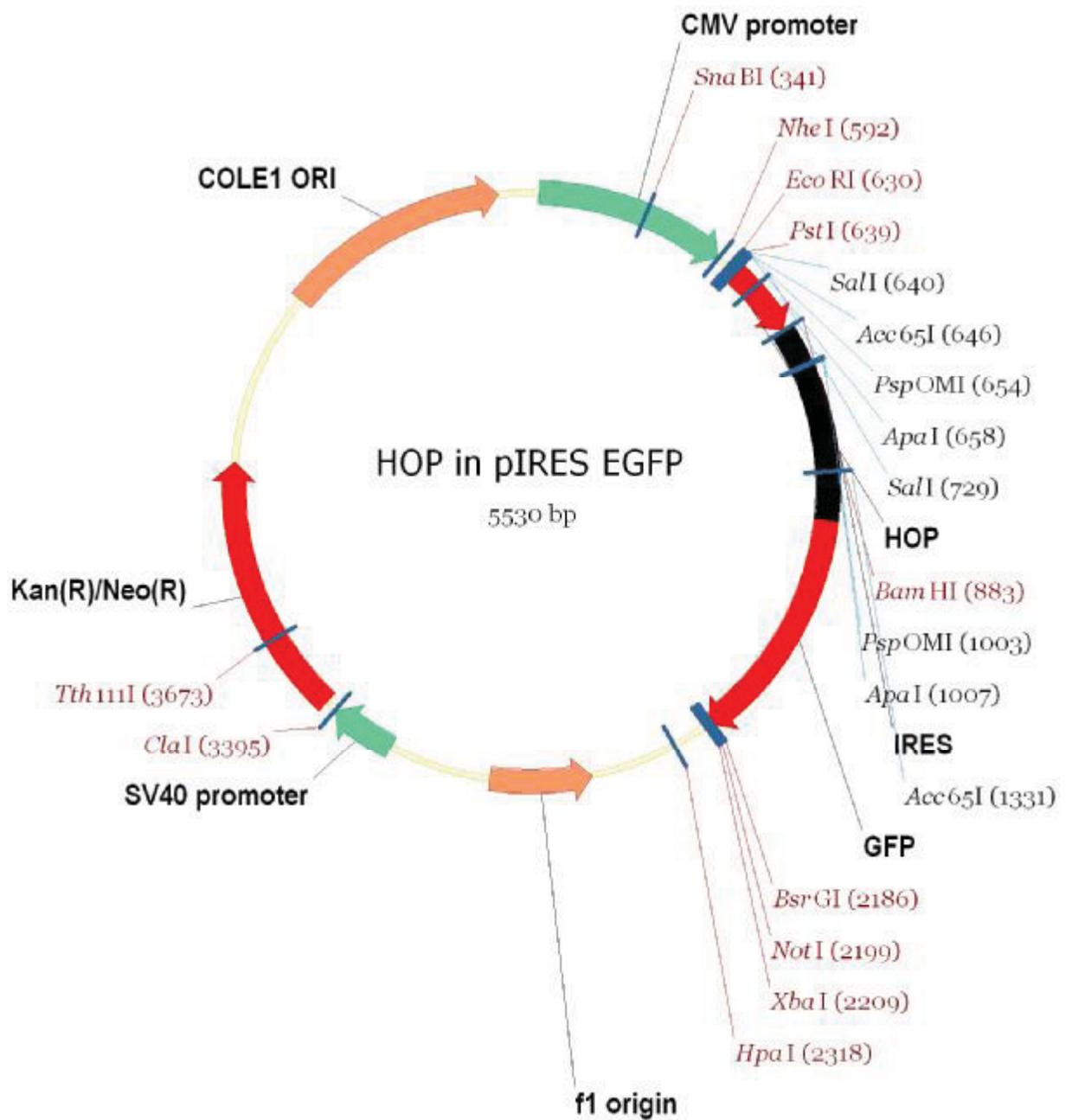


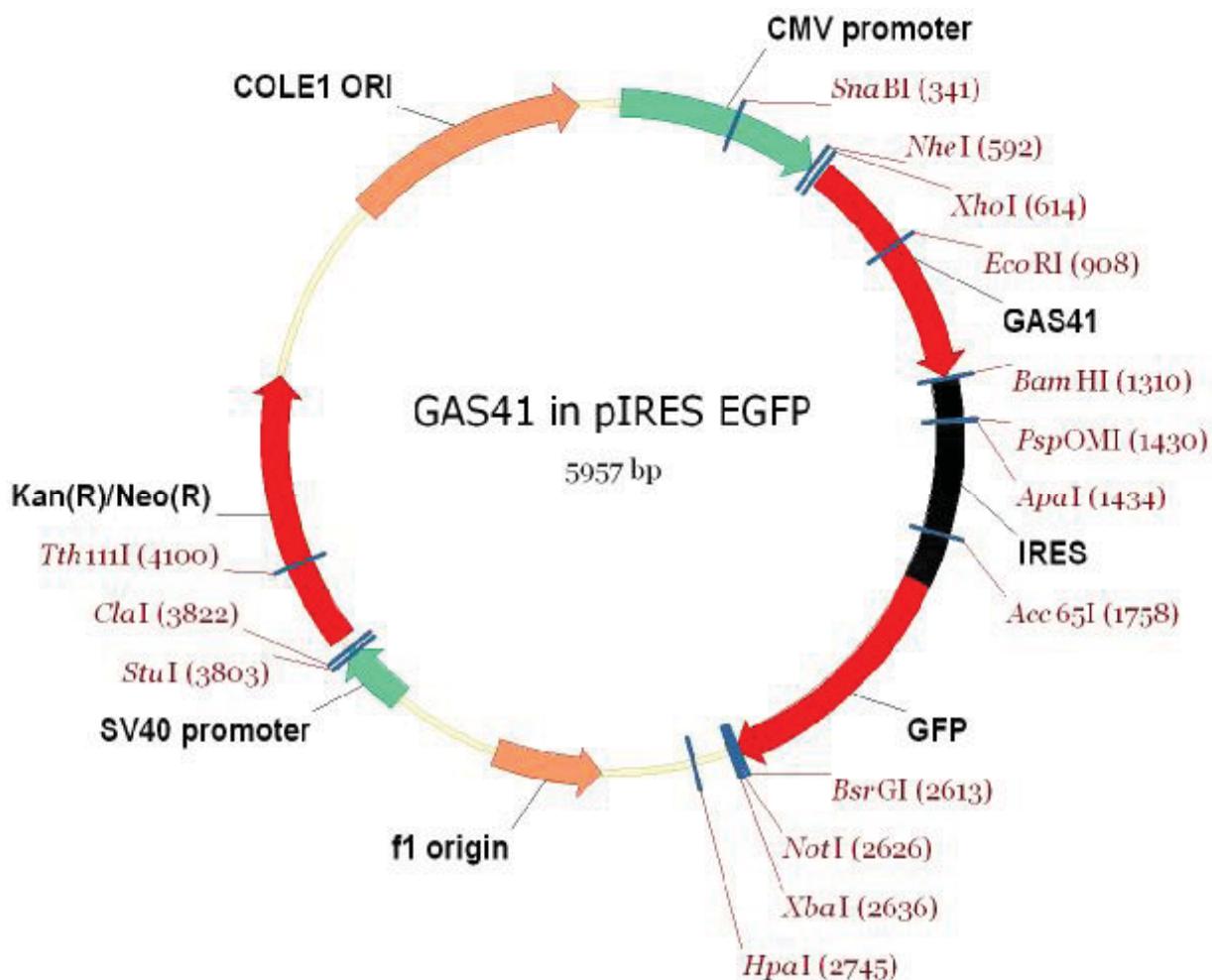


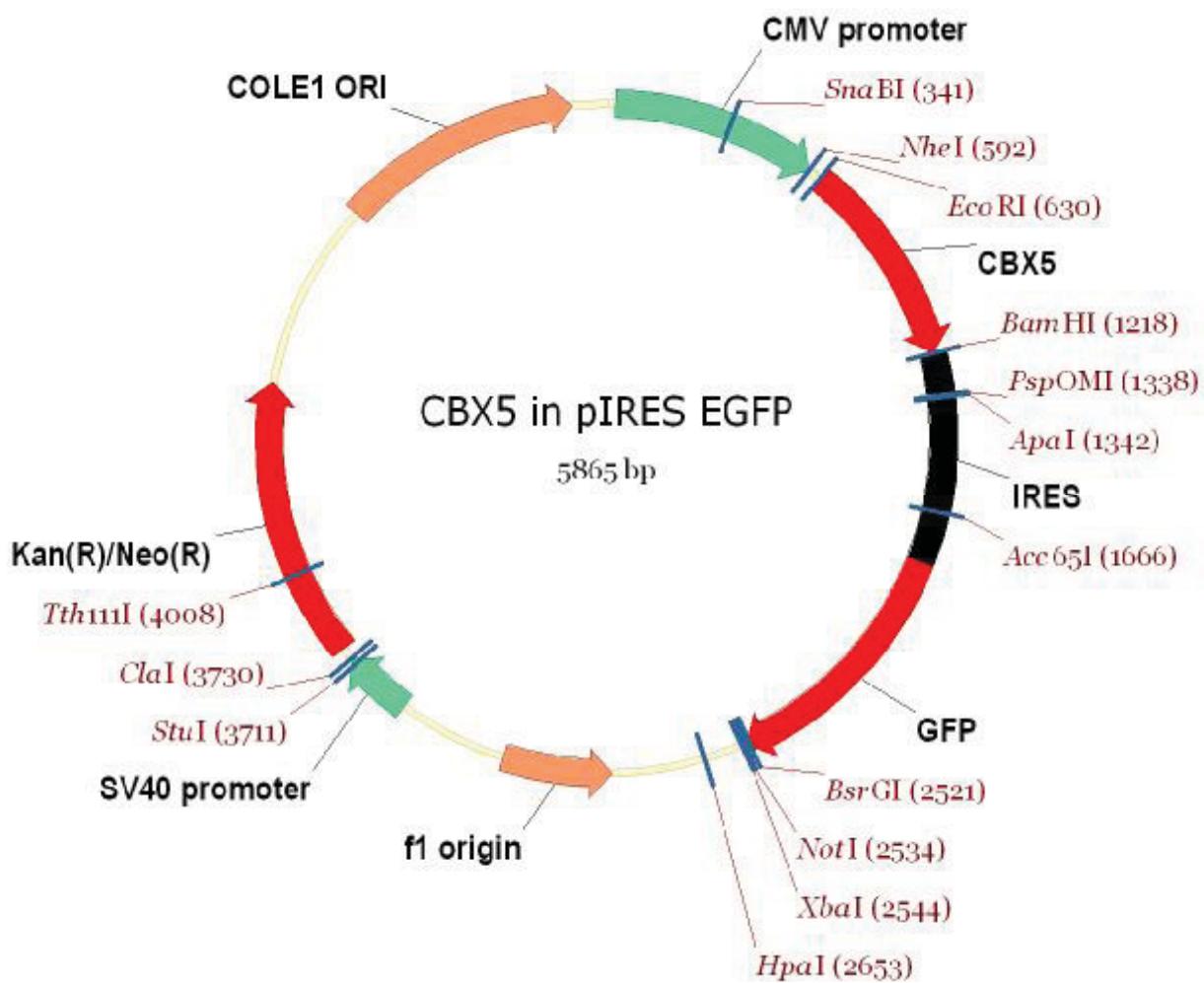


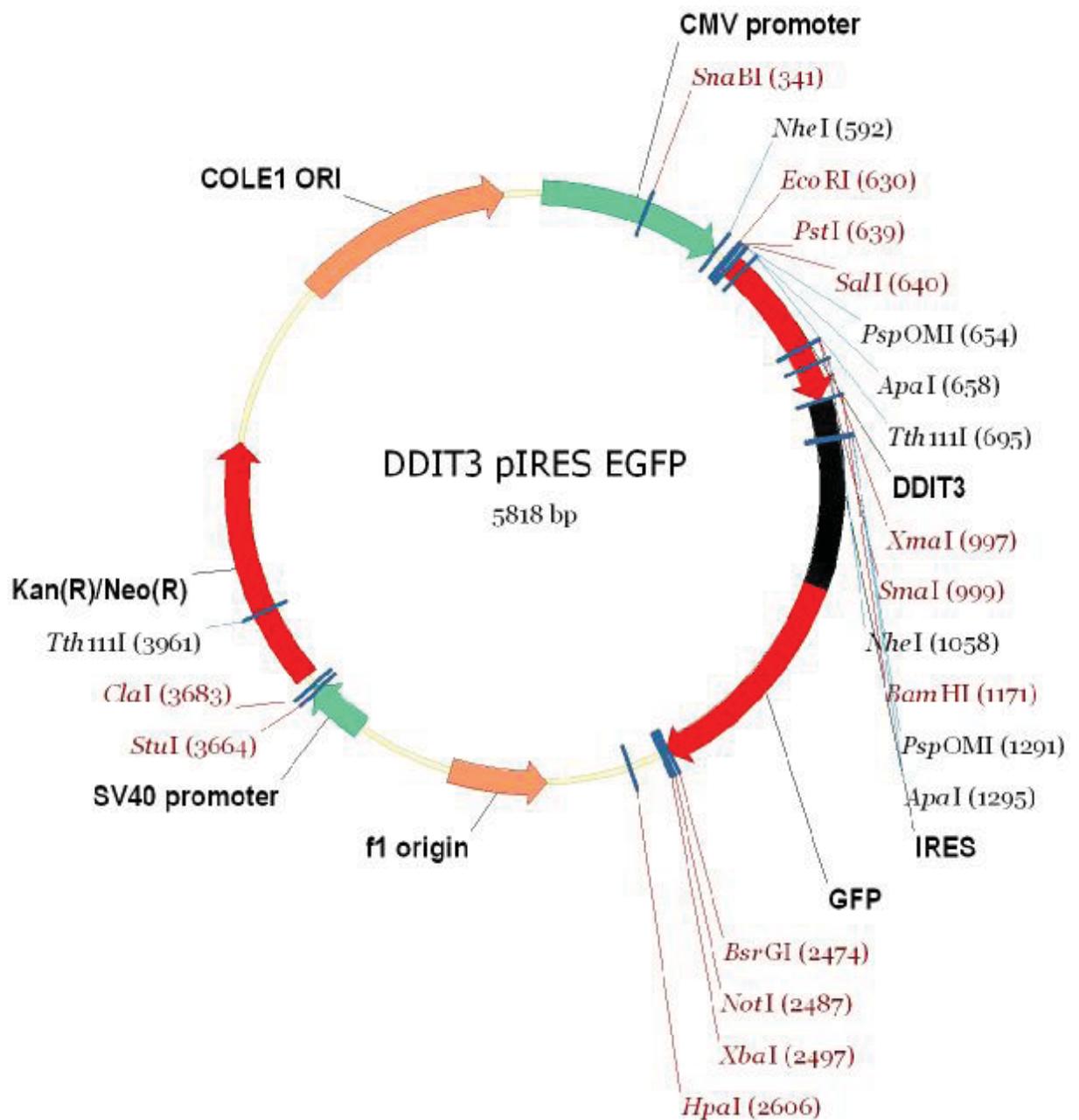


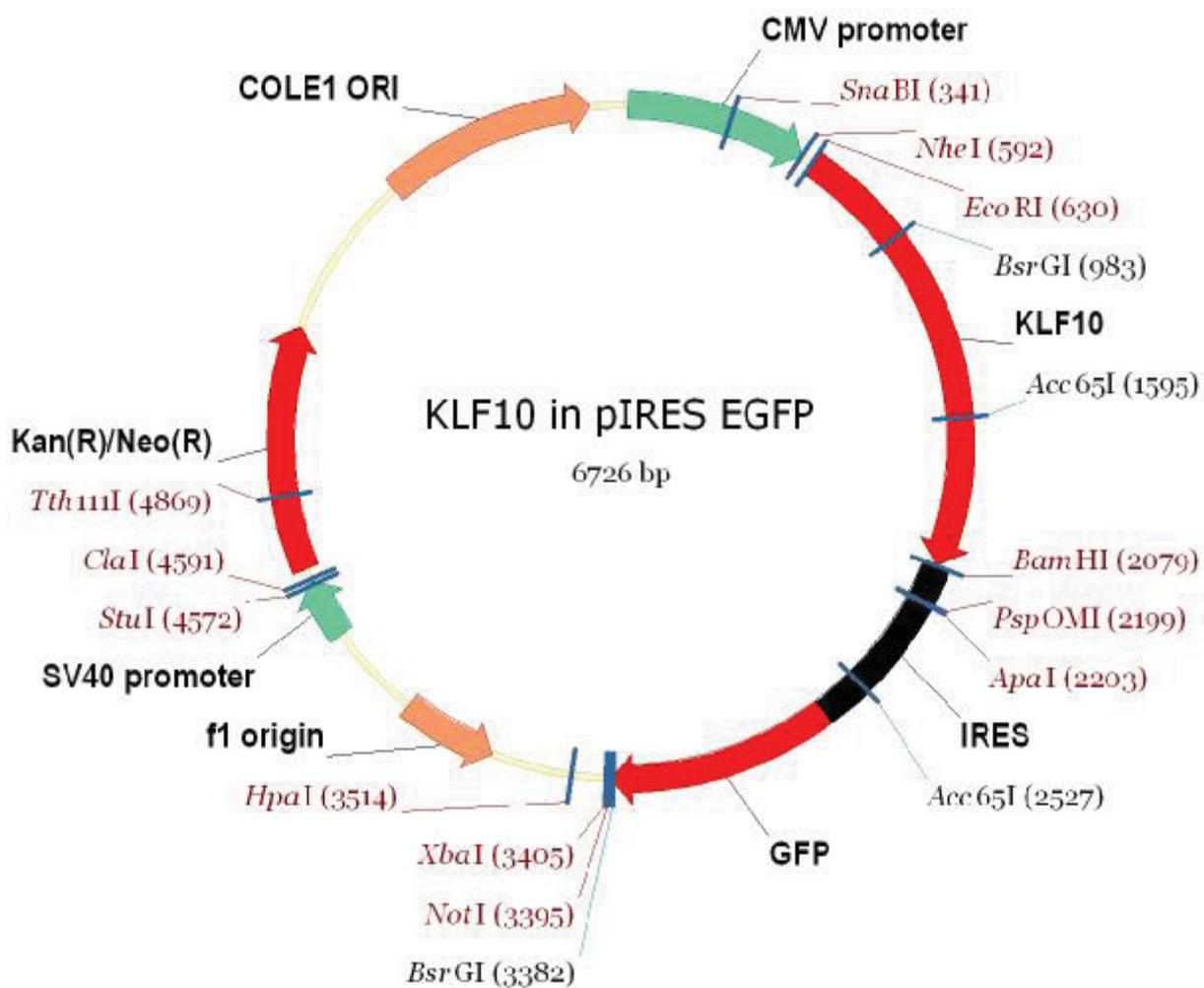


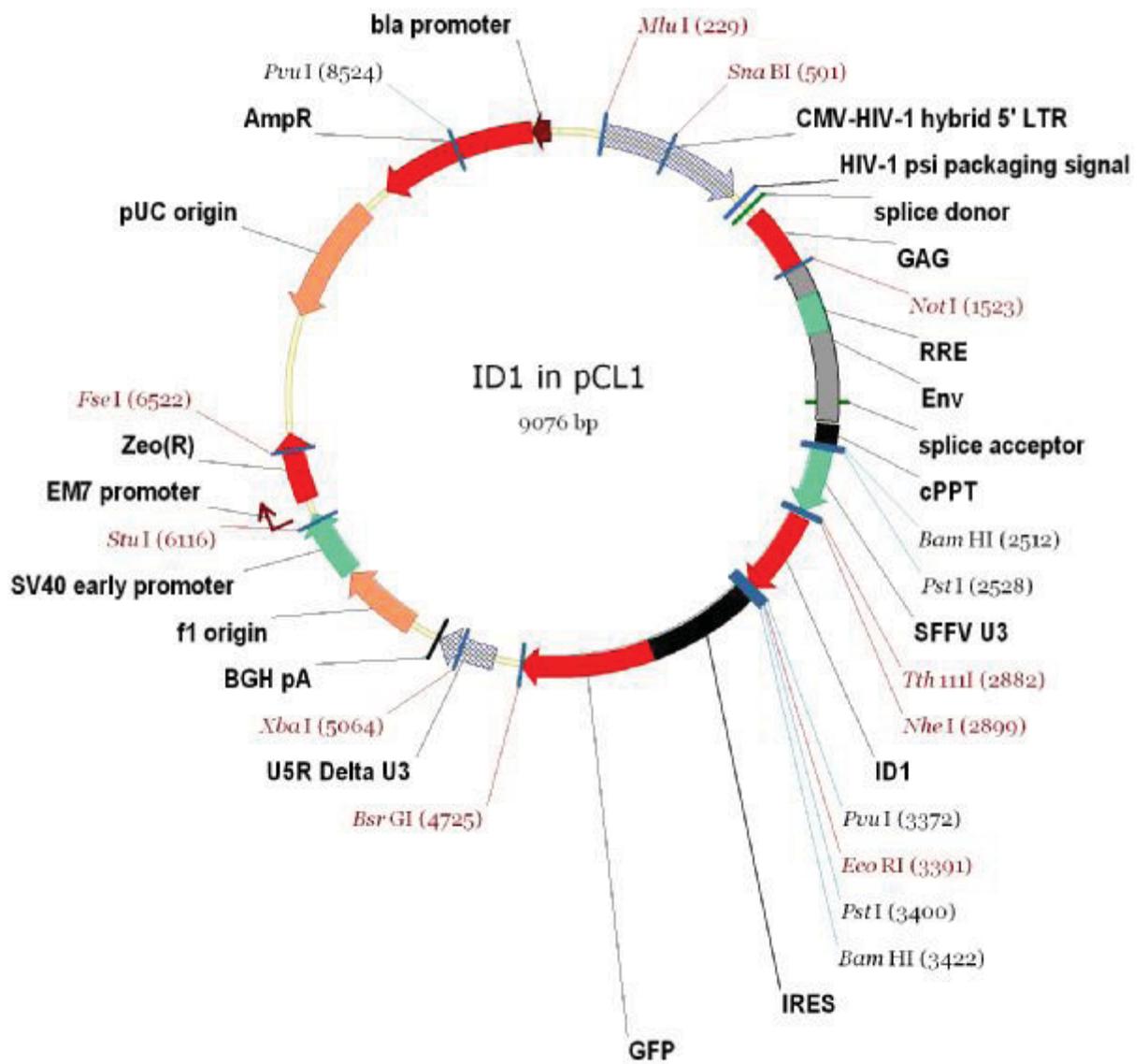


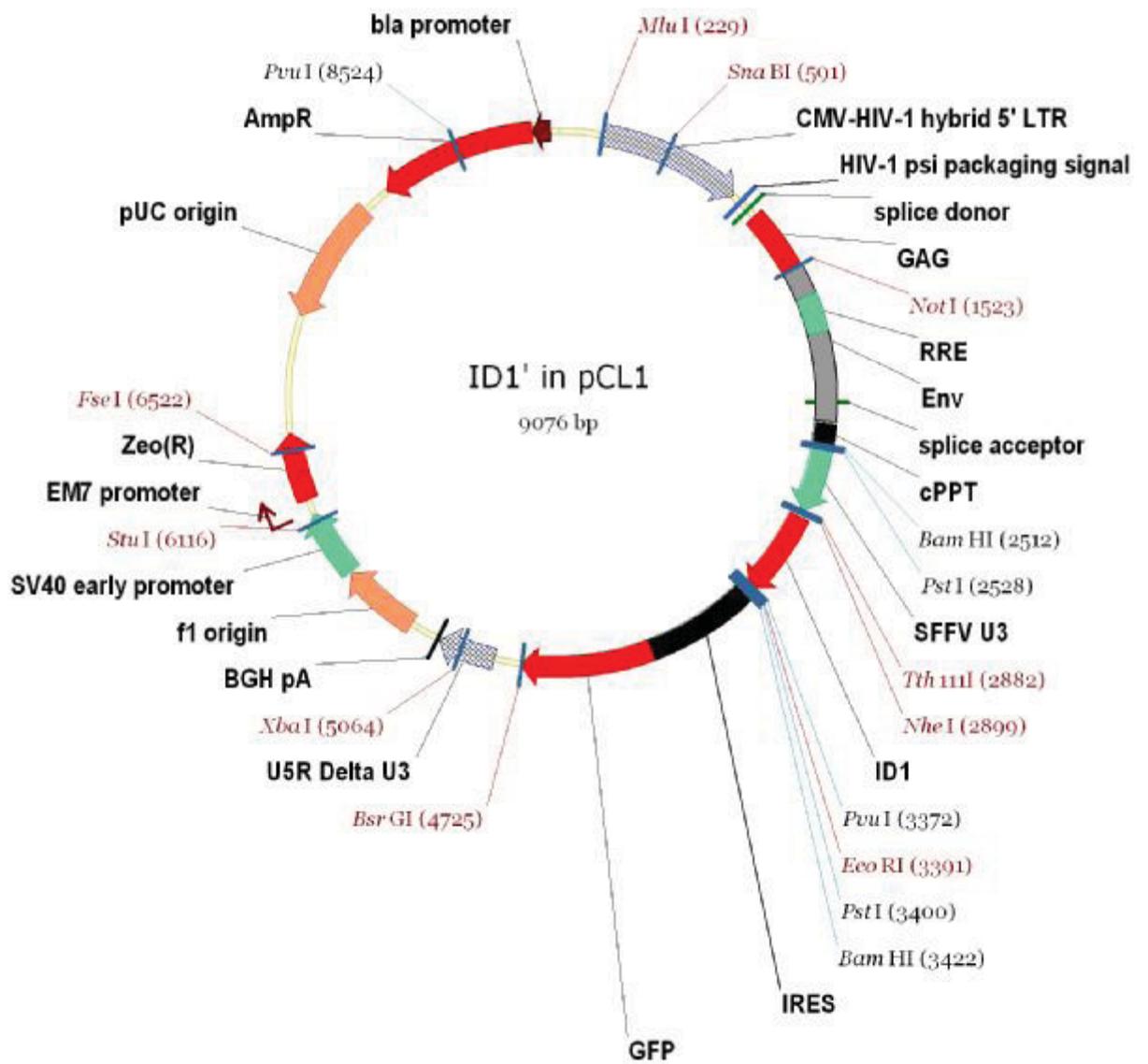


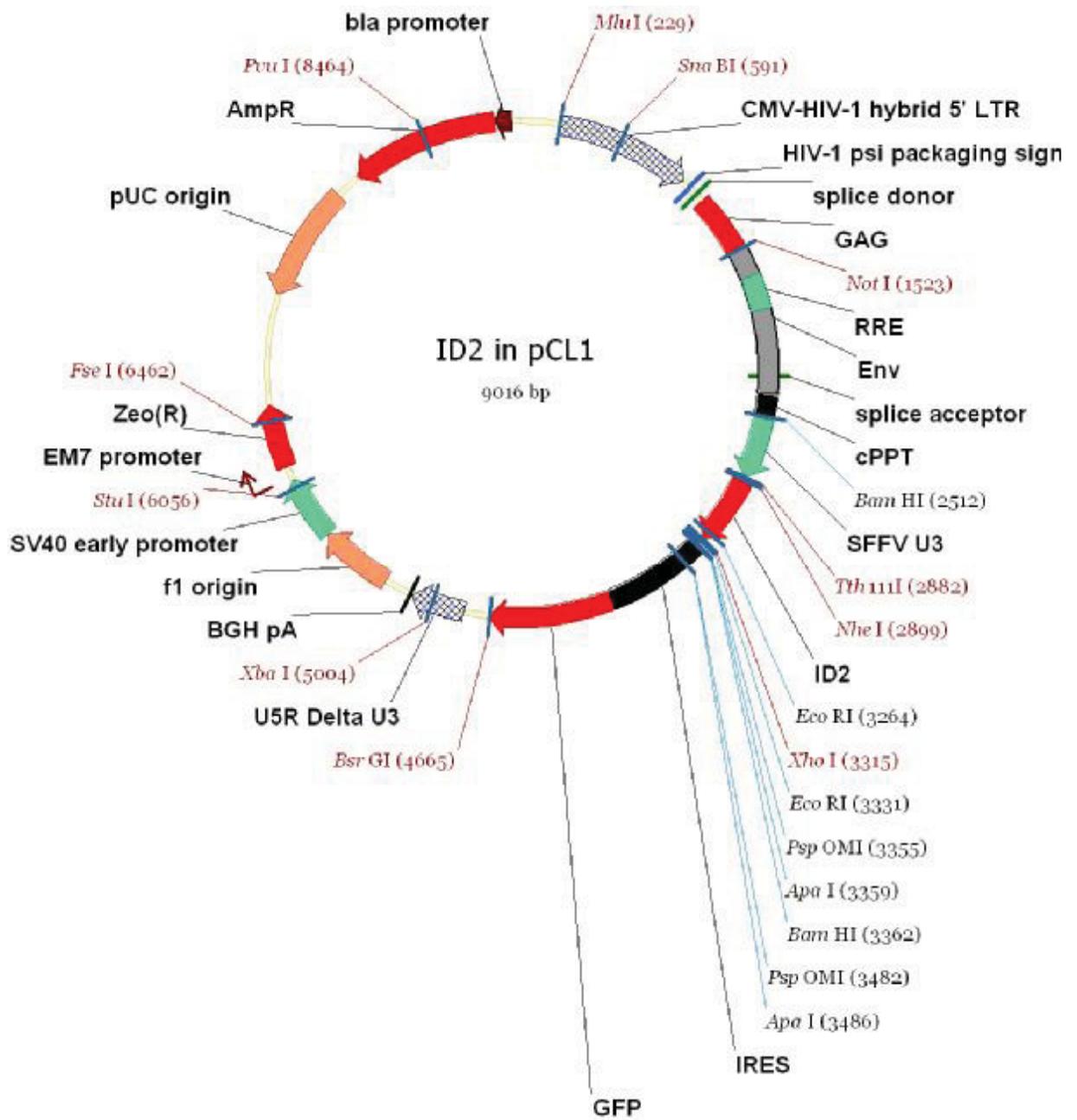


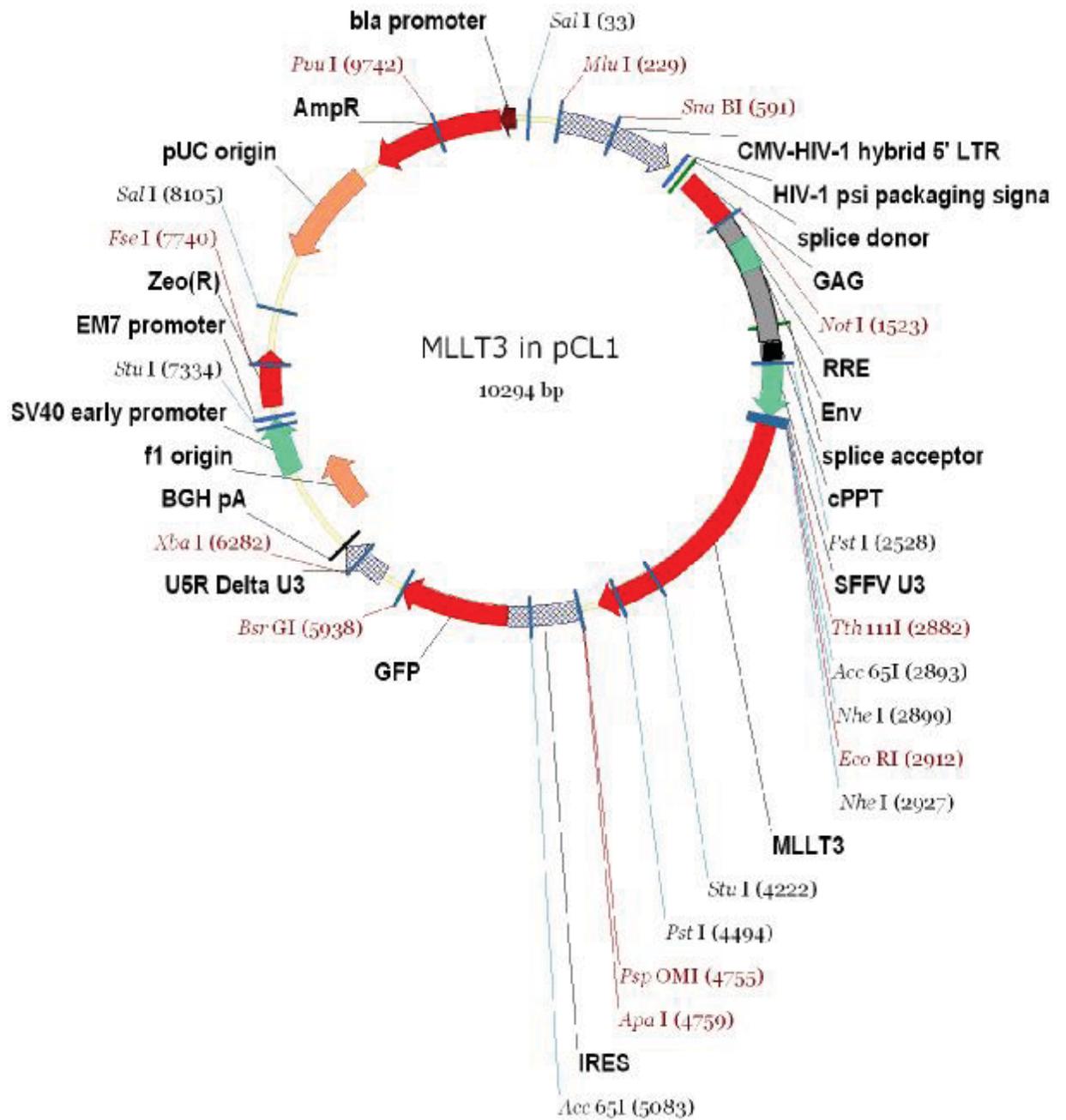


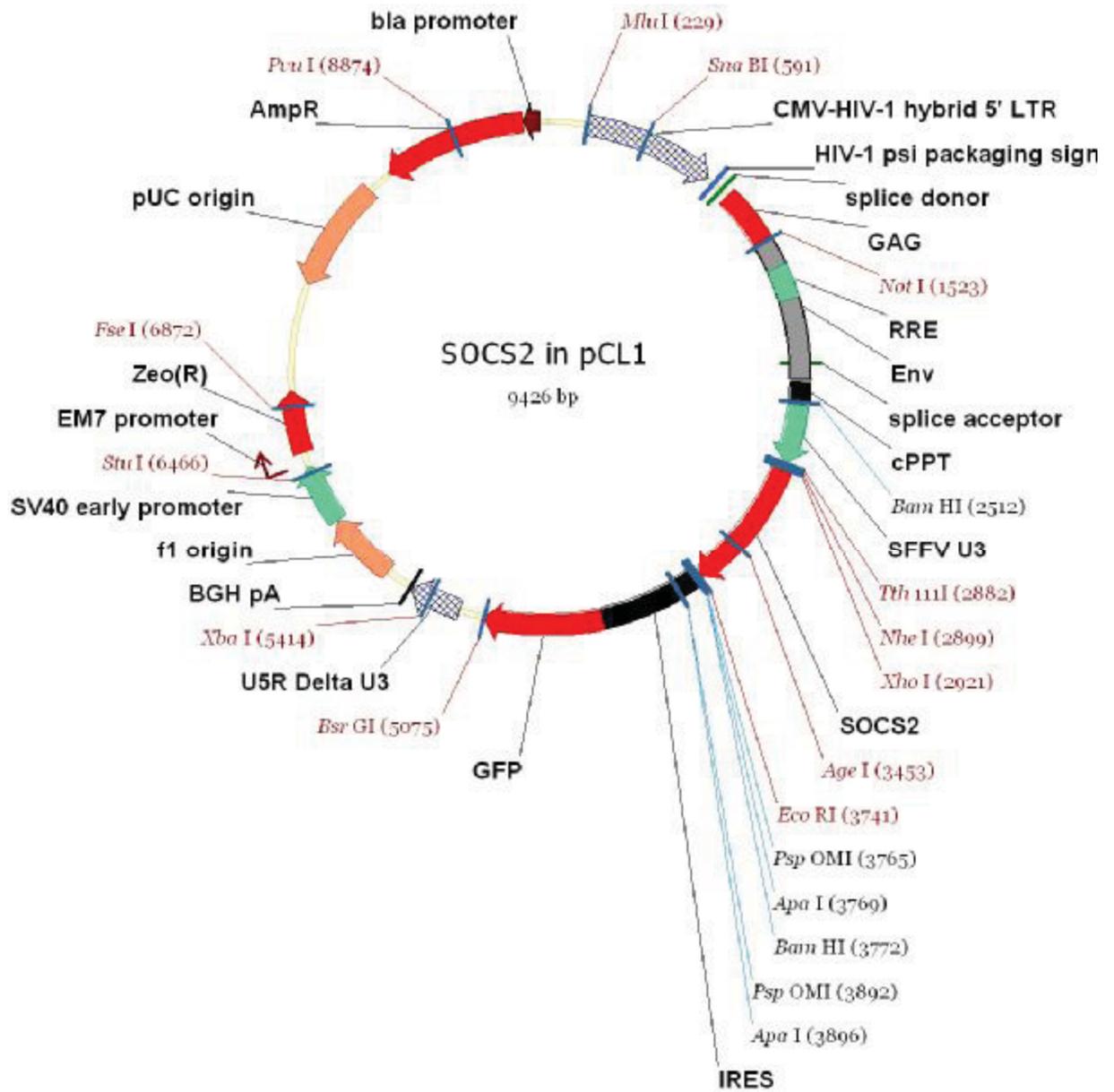


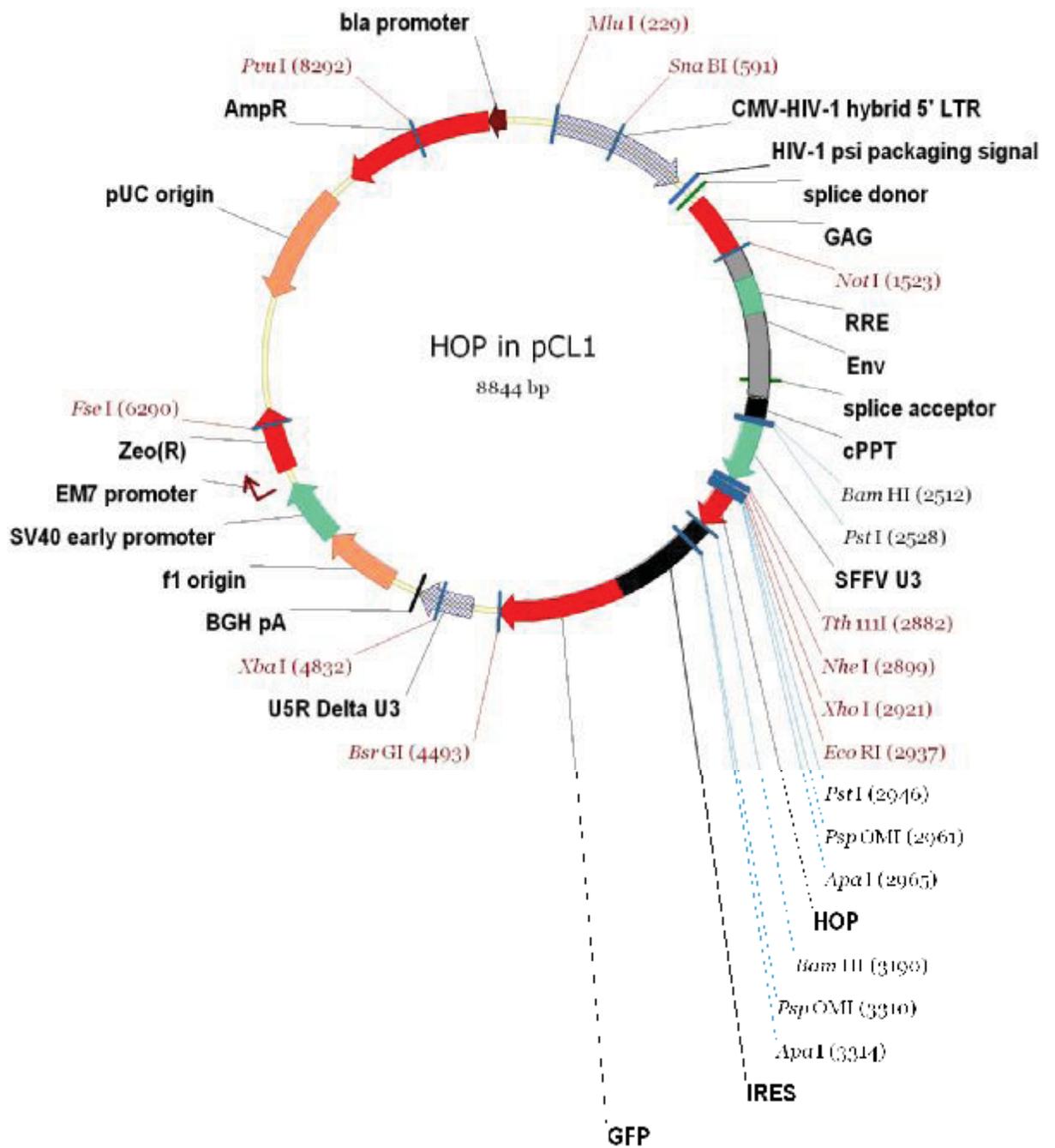


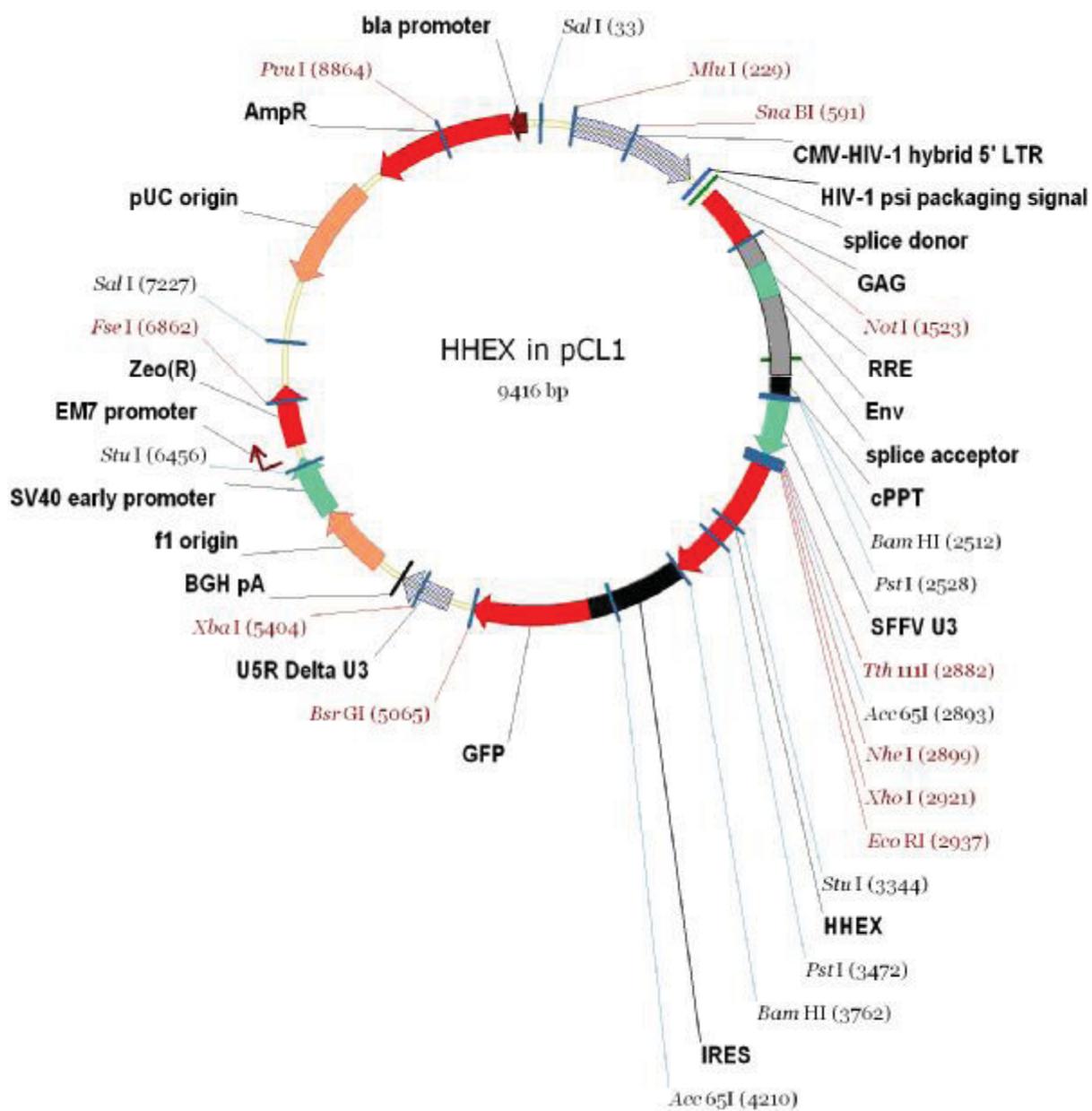


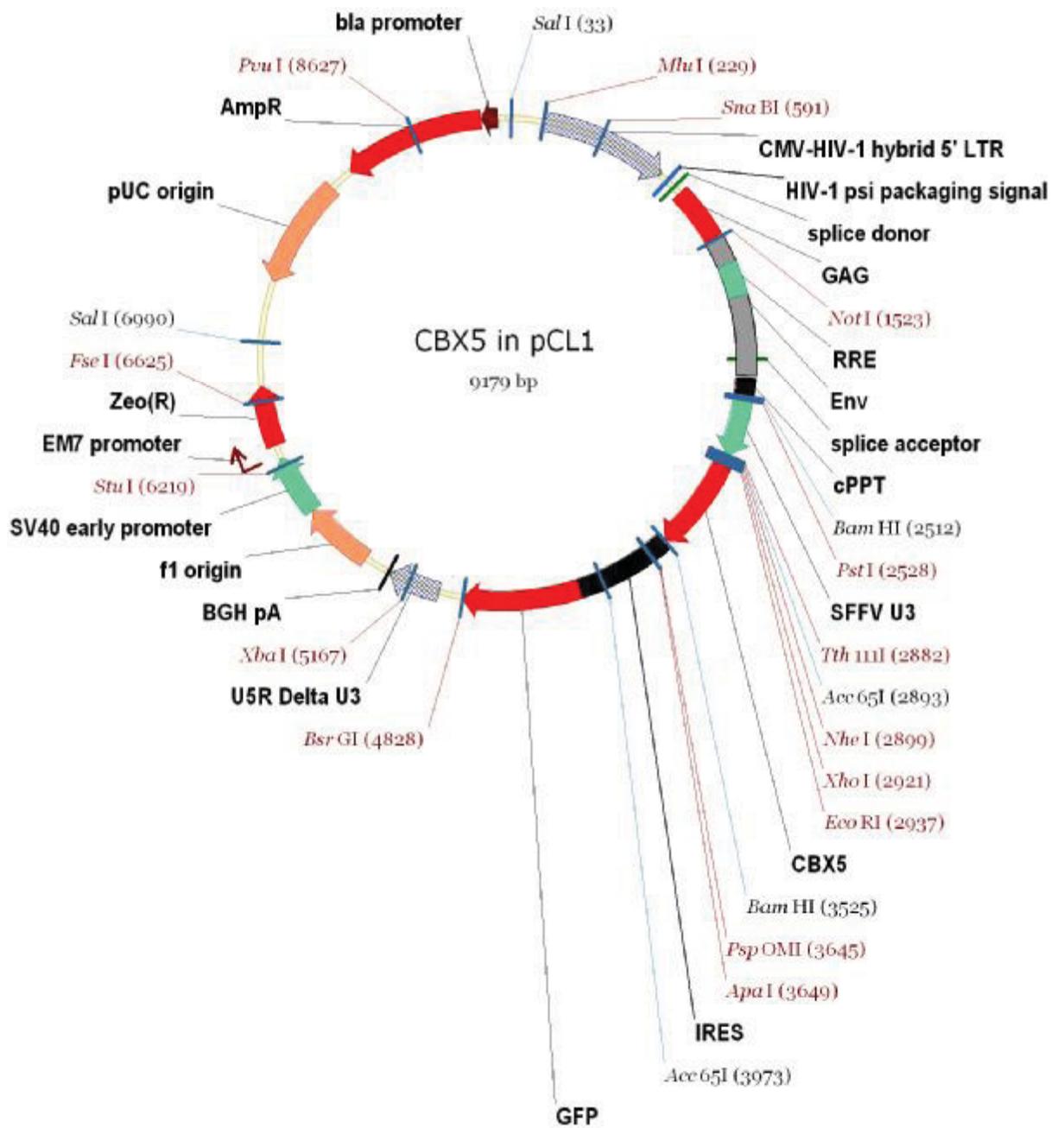


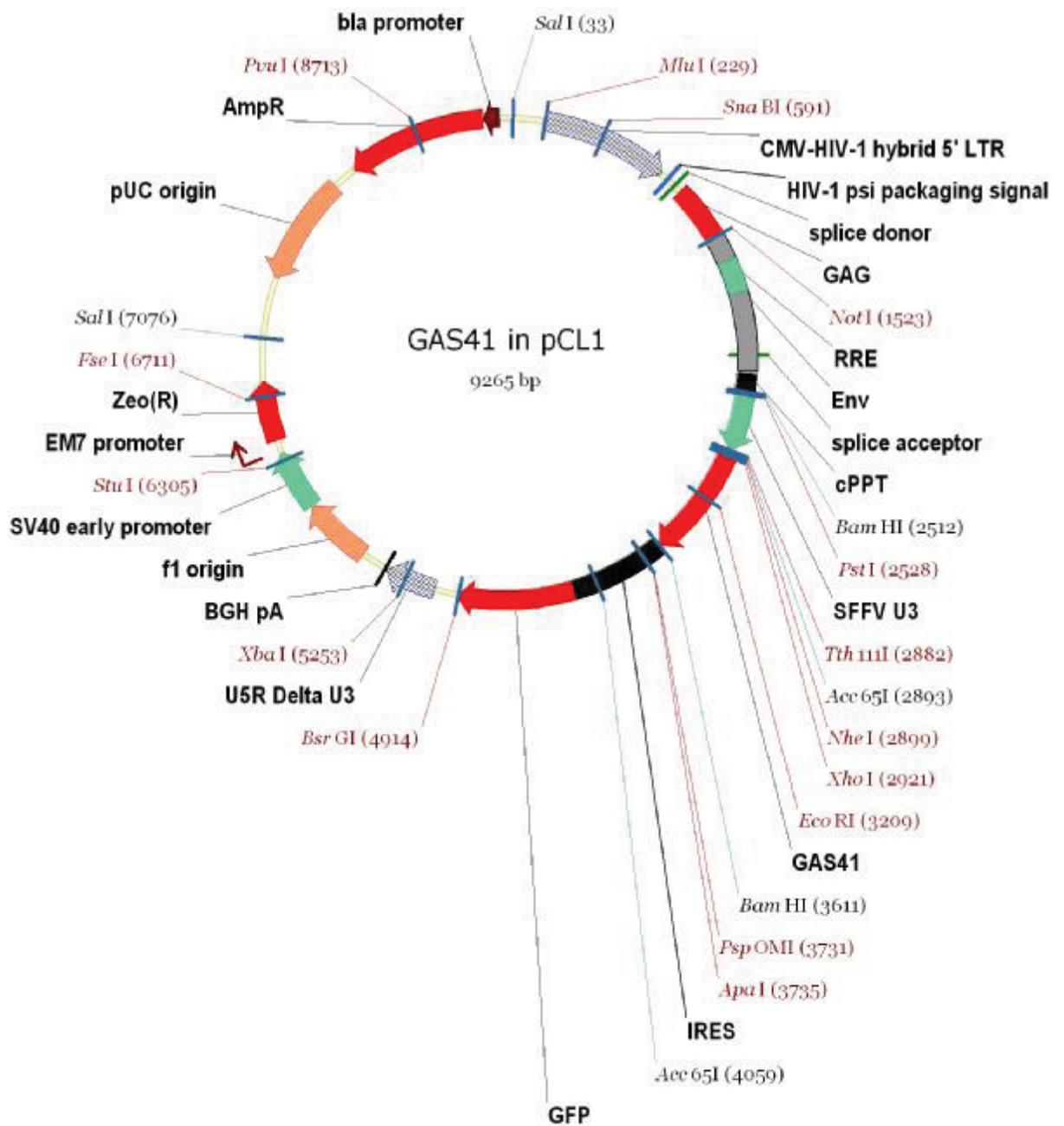


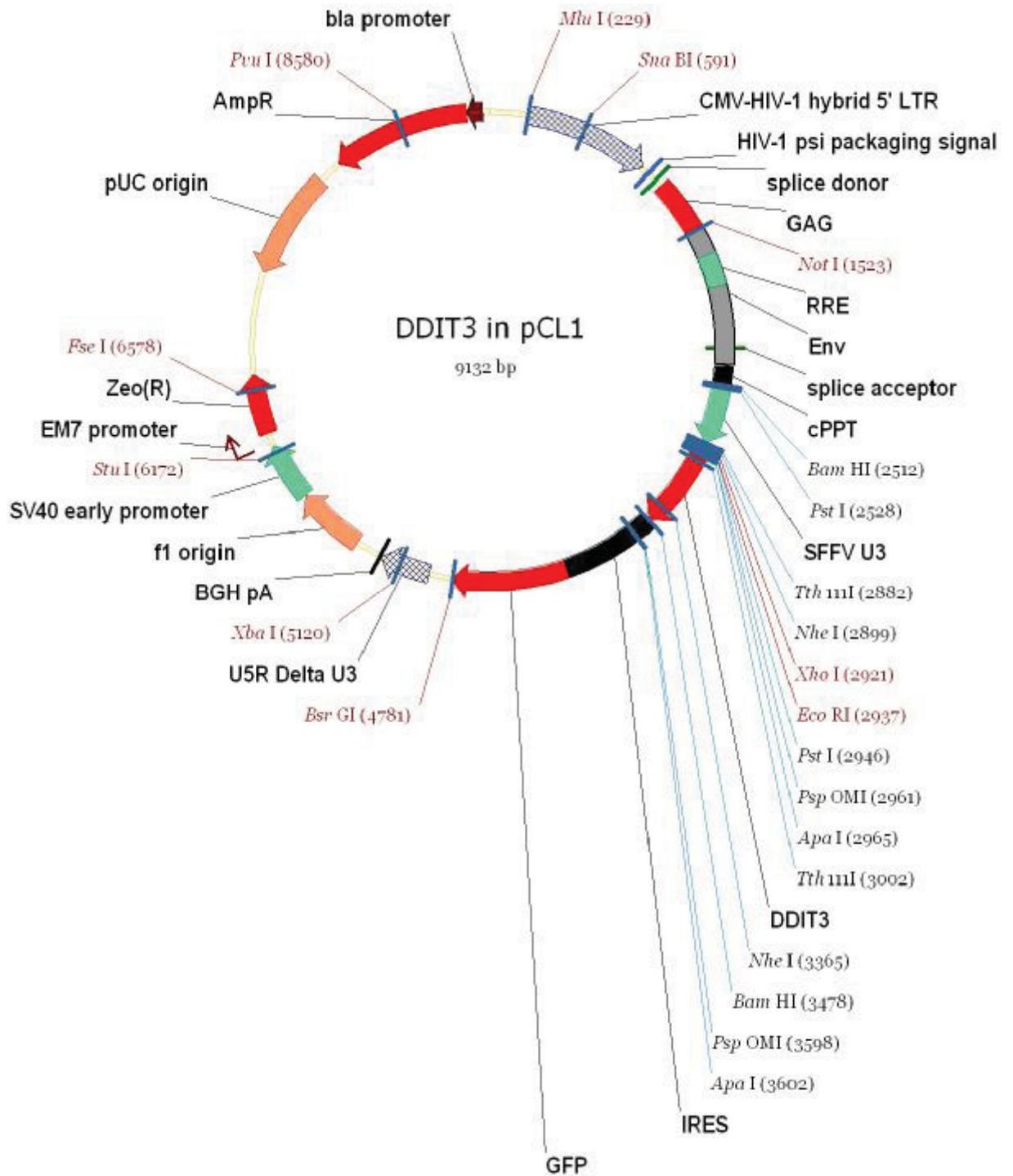


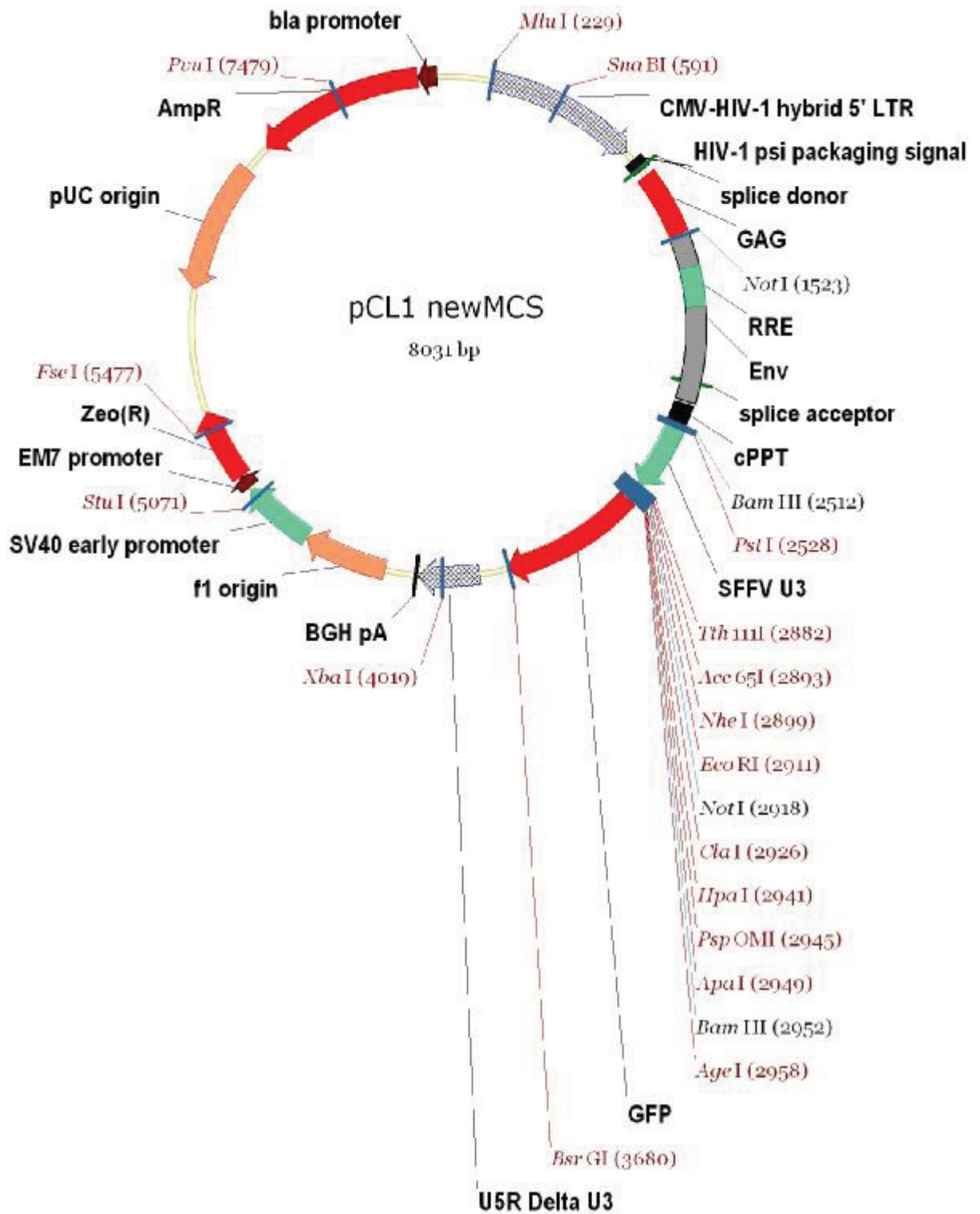


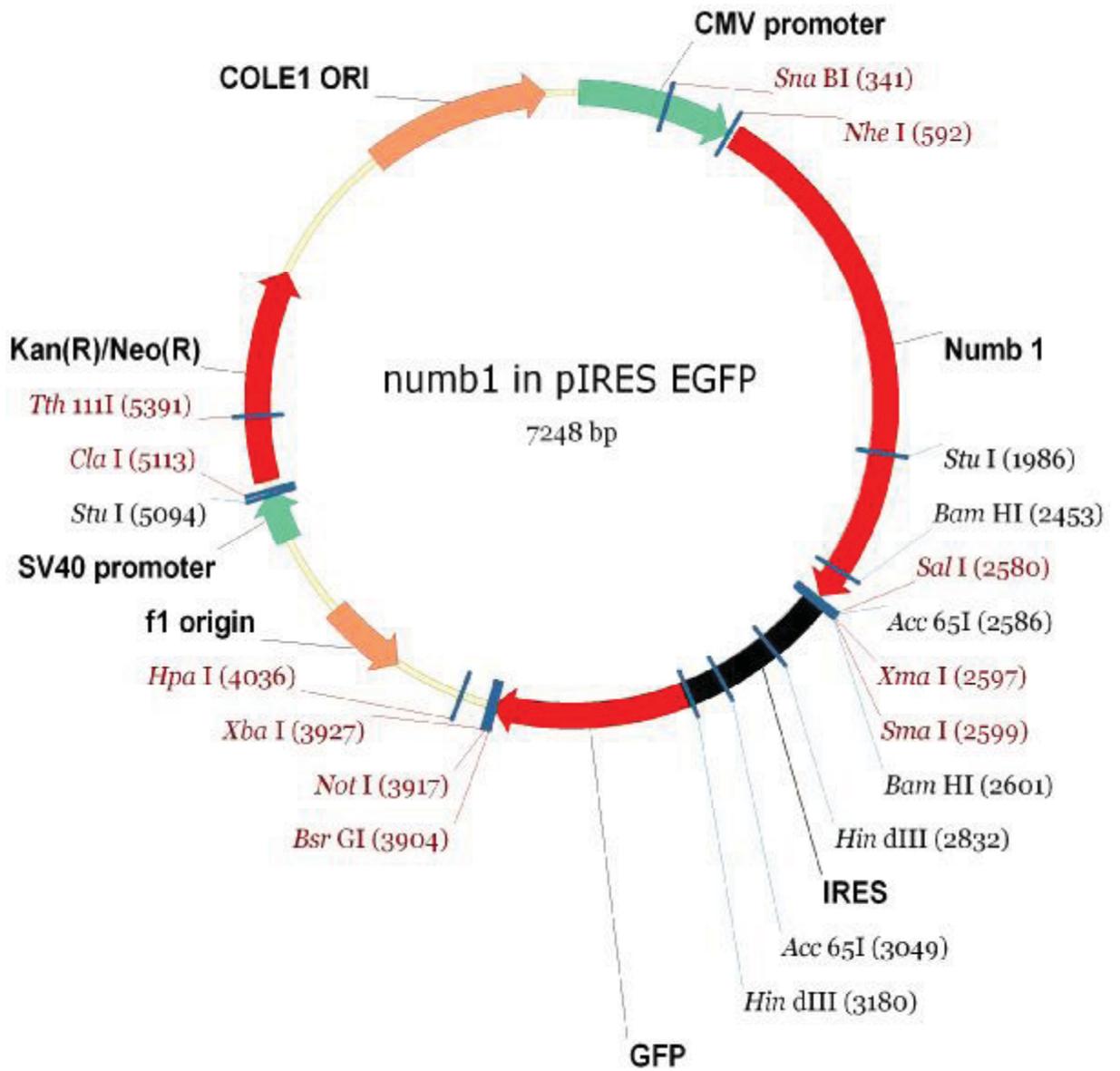


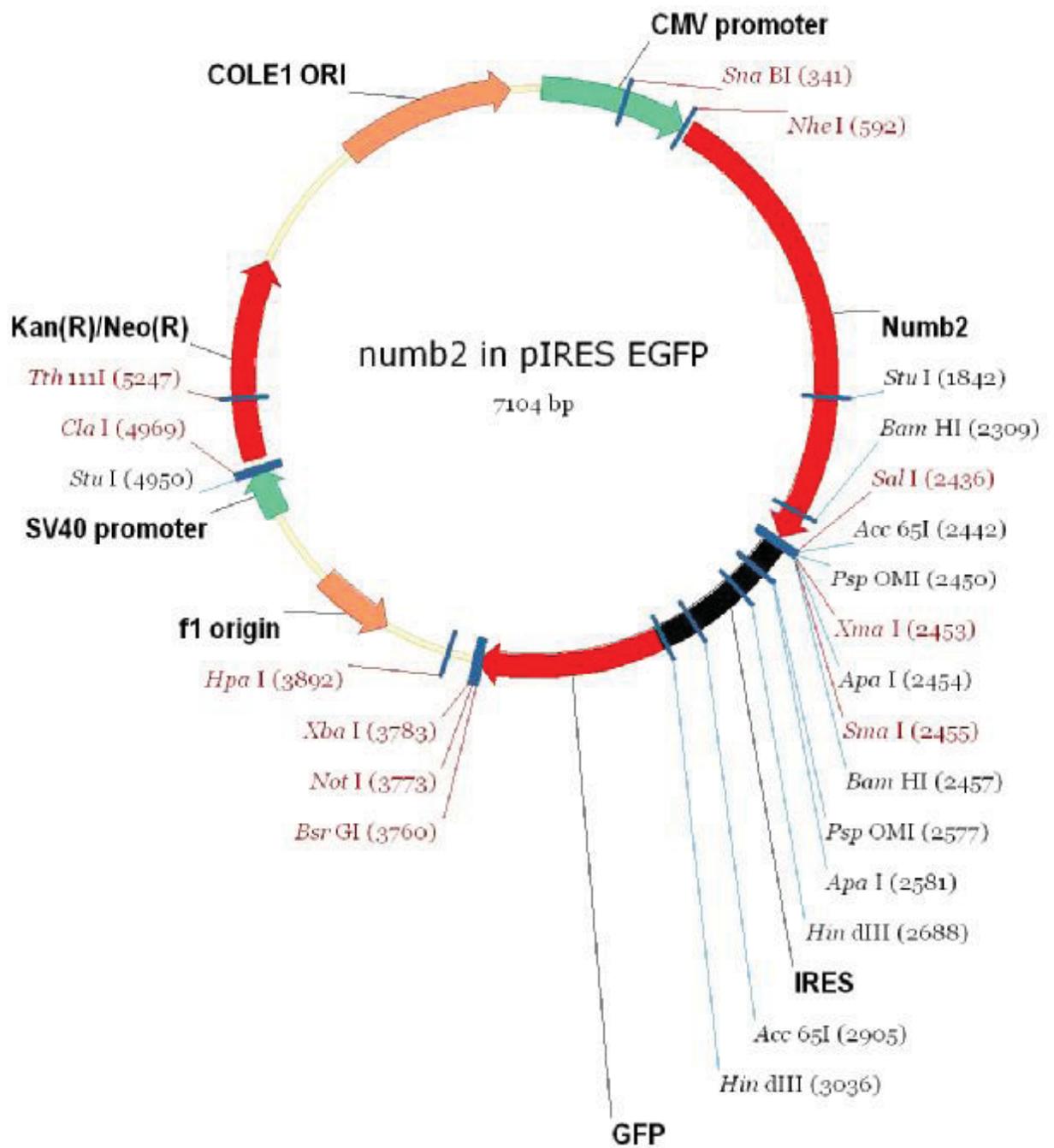


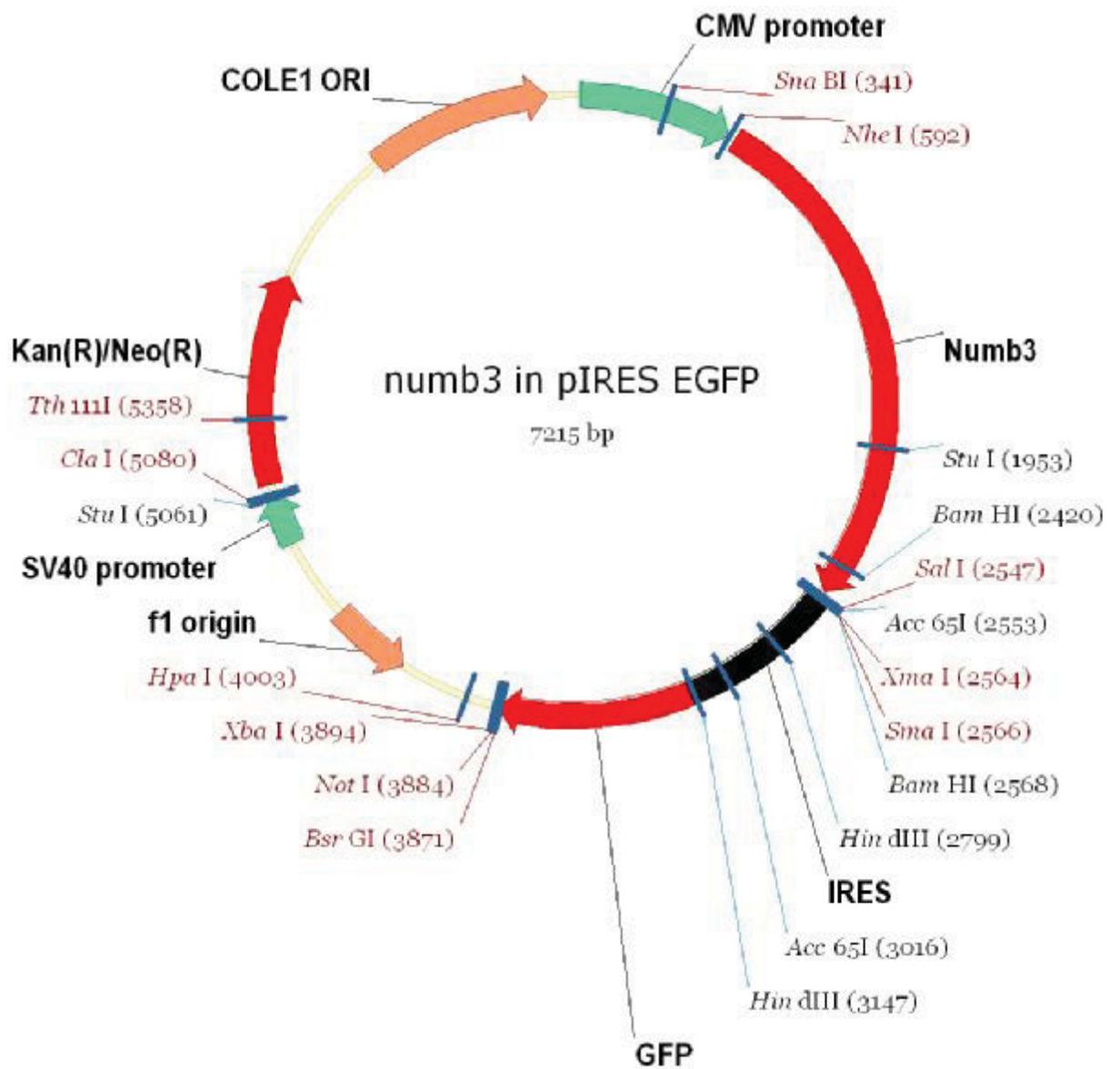


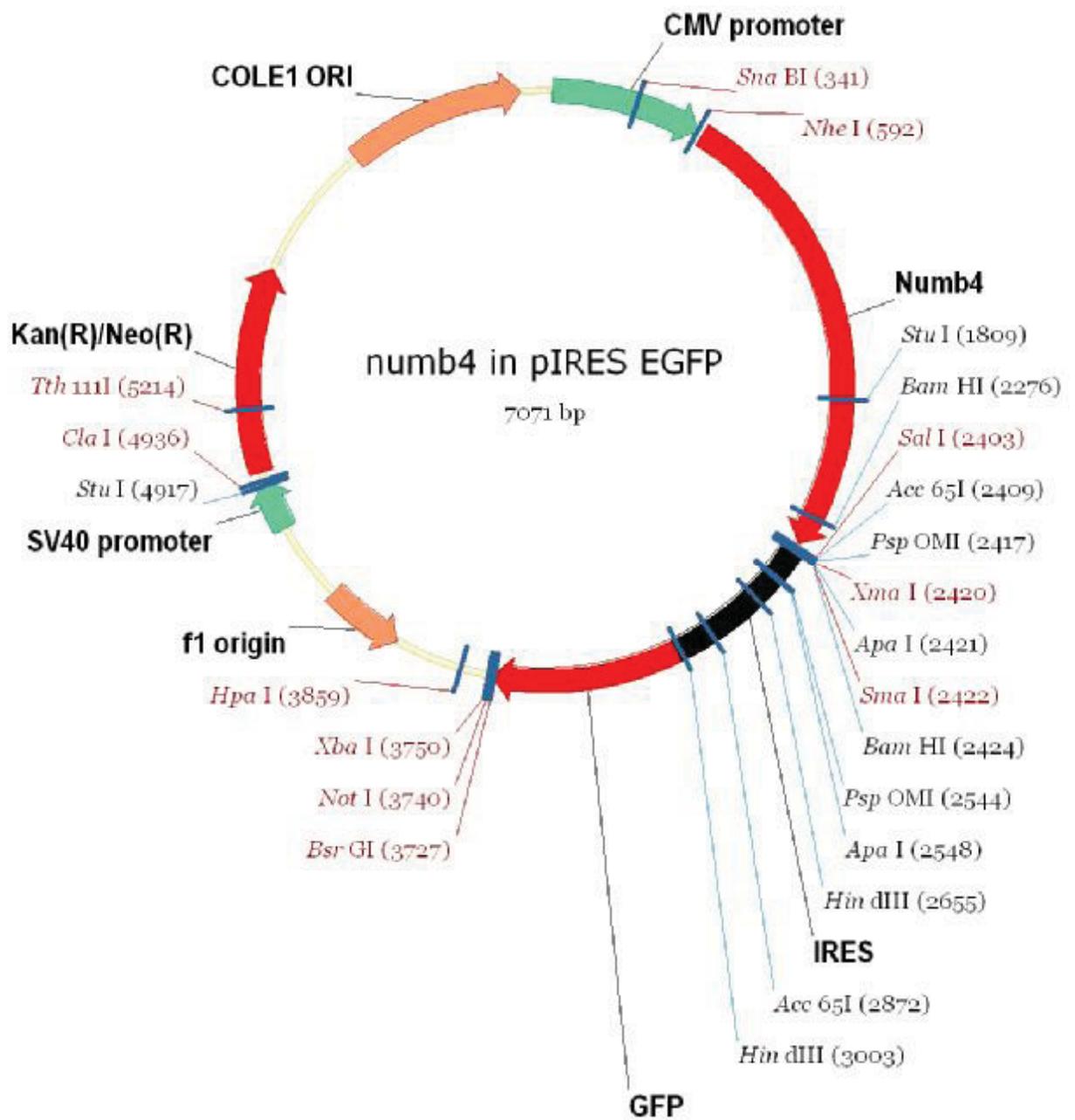












### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>AGM</b>	Aorta, Gonaden, Mesonephron
<b>BFU-E</b>	Burst-Forming-Unit-Erythroid
<b>bp</b>	Basenpaar(e)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CB</b>	Cord Blood
<b>CD</b>	Cluster-of-Differentiation
<b>cDNA</b>	copy DNA
<b>CFU</b>	Colony-Forming-Unit
<b>CFU-E</b>	Colony-Forming-Unit-Erythroid
<b>CFU-GEMM</b>	Colony-Forming-Unit-Granulocyte,-Erythroid,-Macrophage,- Megakaryocyte
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>DMEM</b>	Dulbeco´s-Modified-Eagle´s-Medium
<b>DNA</b>	Desoxy-ribonuclein-acid
<b>dNTP</b>	Desoxy-Nucleotid-Tri-Phosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated-Cell-Scan
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluoreszeinisothiozyanat
<b>Fit-3L</b>	Fms-like tyrosine-kinase-3-Ligand
<b>FSC</b>	Forward-Scatter
<b>GAPDH</b>	Glycerin-aldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
<b>EGFP</b>	enhanced green fluorescent protein
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HS</b>	Horse-Serum
<b>HSZ</b>	Hämatopoietische Stammzelle(n)
<b>HPZ</b>	Hämatopoietische Progenitorzelle(n)
<b>I20</b>	IMDM + 20% FCS
<b>IMDM</b>	Iscoves-Modified-Dulbecco´s-Medium
<b>IRES</b>	Internal-Ribosomal-Entry-Site
<b>l</b>	Liter
<b>LDA</b>	Limiting-Dilution-Assay
<b>LTC-IC</b>	Long-Term-Culture-Initiating-Cell
<b>MACS</b>	Magnetic-Activated-Cell-Sorting
<b>MNZ</b>	Mononukleäre Zellen
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NK-IC</b>	Natural-Killercells-Initiating-Cell
<b>NOD/SCID</b>	Non-obese-Diabetic/Severe-Combined-Immunodeficiency
<b>PBS</b>	Phosphat-Buffer-Solution
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PEI</b>	Polyethylenimin

---

<b>Pen/Strep</b>	Penicillin und Streptomycin
<b>RNA</b>	Ribo-nuclein-acid
<b>RT-</b>	Reverse-Transkription
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real-Time PCR
<b>SCF</b>	Stem-Cell-Factor
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SOP</b>	Sensory-Organ-Precursor
<b>SRC</b>	SCID-Repopulating-Cell
<b>SSC</b>	Side-Scatter
<b>TPO</b>	Thrombopoetin
<b>U/ml</b>	Units pro Milliliter
<b>UV</b>	Ultraviolett

## 8. Lebenslauf

### Lebenslauf

Gregor von Levetzow	Staatsangehörigkeit: deutsch Familienstand: verheiratet, ein Kind
16.07.1978	Geboren in Köln, Nordrhein-Westphalen Eltern: Michael von Levetzow und Evelyn von Levetzow, geb. Kompisch
1984-1988	Besuch der kat. Grundschule Everhardstrasse in Köln- Ehrenfeld
1988-1997	Besuch der Königin-Luise-Schule in Köln
Ab Oktober 1997	Studium der Biologie an der Albertus-Magnus Universität in Köln
September 2000	Vordiplom
Mai-August 2001	Dreimonatiges Praktikum im Centre for Cellular and Molecular Biology der Deakin University Melbourne, Australien bei Herrn Prof. Dr. Peter Beech
November 2002	Abschluss der mündlichen Diplomprüfungen Prüfungsfächer: Genetik, Entwicklungsbiologie, Biochemie
Januar-November 2003	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz am Institut für Genetik der Universität zu Köln Titel: Untersuchung von Segmentierungsgenen in der Spinne <i>Cupiennius salei</i>
Seit Januar 2004	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Markus Müschen am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Los Angeles, den  
13.05.2008

Gregor von Levetzow

## Teilpublikationen:

**von Levetzow G**, Spanholtz J, Beckmann J, Fischer J, Kögler G, Wernet P, Punzel M, Giebel B.: Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells.

Stem Cells Dev. 2006 Apr;15(2):278-85.

Feldhahn N, Henke N, Melchior K, Duy C, Soh BN, Klein F, **von Levetzow G**, Giebel B, Li A, Hofmann WK, Jumaa H, Müschen M.: Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells.

J Exp Med. 2007 May 14;204(5):1157-66. Epub 2007 May 7.

## 9 Danksagung

Ich habe irgendetwas mal gehört, dass Danksagungen gerne zu Beginn der Korrektur einer Arbeit gelesen werden, was es für mich nicht einfacher macht jede Person, die mir bei der Erstellung der Arbeit eine Hilfe war, gebührend zu würdigen.

Zunächst bedanke ich mich bei Dr. Johannes Fischer dafür, dass er es mir ermöglicht hat meine Arbeit am ITZ anzufertigen. Besonders danke ich ihm für seine Hilfsbereitschaft in verschiedensten Situationen.

Bei Prof. Dr. Markus Müschen bedanke ich mich für die Begutachtung der Arbeit sowie für die Zeit diese zu verfassen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Prof. *h.c.* Dr. Frank Wunderlich für seine Bereitschaft, das Koreferat dieser Arbeit zu übernehmen, bedanken.

Dr. Bernd Giebel danke ich für die spannende Fragestellung sowie seine Betreuung der Arbeit. Seine unermüdliche (und manchmal gefürchtete) Diskussionsbereitschaft half, Ergebnisse nicht vorschnell zu interpretieren sondern diese kritisch zu hinterfragen, und so neue Lösungsansätze zu finden, und es mir somit ermöglichte den in der Wissenschaft essentiellen kritischen Blick auf die Daten zu entwickeln.

Bei PD. Dr. Michael Punzel bedanke ich mich für das Erlernen der funktionellen Analysen sowie die netten Gespräche, die wir von Zeit zu Zeit führten.

Bei Prof. Dr. Gesine Kögler bedanke ich mich für die Bereitstellung der Nabelschnurrestblute.

Bei Prof. Dr. Helmut Hanenberg bedanke ich mich für das Erlernen des viralen Gentransfers, sowie die verschiedenen Plasmide die er mir bereitwillig zur Verfügung stellte.

Aus der Arbeitsgruppe möchte ich besonders Julia Beckmann hervorheben, die trotz ihrer vielen Arbeit auch immer noch Zeit für morgendliche Gespräche hatte, und die mir auch in vielen anderen Dingen eine Hilfe war. Bei Liska Horsch möchte ich mich für die netten Plaudereien über Katzen, Fische und Wohnungssuche bedanken. Andre Görgens danke ich für seine humorvolle, optimistische Art sowie für die mp3. Ausserdem möchte ich mich bei Jan Spanholtz bedanken, der viele Dinge mit auf den Weg gebracht hat und ein ausgesprochen angenehmer Zeitgenosse ist, mit dem ich auch nach Münster noch das Hotelzimmer teilen würde. Ronnie Cadeddu und Sebastian Scheitza möchte ich auch für lustige Zeiten in der Zellkultur danken.

Zusätzlich möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Uhrberg, hier besonders bei Julia Christ, die immer sehr hilfsbereit war bedanken. Für aufmunternde Worte bezüglich der Dissertation möchte ich mich bei Sabine Krause bedanken.

Außerdem möchte ich meiner Mutter danken, die es mir ermöglichte Biologie zu studieren und mich auch nach dem Studium weiter unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Cornelia, die immer für mich da war und trotz ihrer eigenen Doktorarbeit sowie unserem Kind es schaffte, mir den Rücken frei zu halten und mich mental wieder aufzubauen. Die trotz mancher schwieriger Zeit immer zu mir gehalten hat und mich in vielen Dingen unterstützt hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Sohn Max bedanken, einfach nur weil Du da bist und dadurch Sonnenschein in mein Leben bringst.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Los Angeles, den 13.05.2008

(Gregor von Levetzow)