

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Funktionelle Genomanalysen an humanen CD105-
positiven mesenchymalen Stamm- und
Progenitorzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Nicole Roes
2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Kronenwett

Korreferent: Prof. Dr. med. C. MacKenzie

„Das schönste, was wir erleben können,
ist das Geheimnisvolle.
Es ist das Grundgefühl, das an der Wiege von
wahrer Kunst und Wissenschaft steht.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1 Stammzellen	11
1.2 Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen	12
1.3 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen	15
1.4 Struktur und Funktion des Knochenmarkstromas	19
1.5 Die chronische myeloische Leukämie (CML) als Stammzellerkrankung	20
1.5.1 Epidemiologie und Klinik der CML	20
1.5.2 Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen der CML	21
1.5.3 Mechanismen der BCR-ABL-vermittelten Transformation	22
1.5.4 Stromaveränderungen bei malignen Neoplasien	24
2. Zielsetzung der Arbeit	26
3. Material und Methoden	27
3.1 Geräte	27
3.2 Materialien	28
3.3 Puffer, Medien und Zusätze	28
3.4 Chemikalien	29
3.5 Kit-Systeme	29
3.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie	30
3.7 Primer für die quantitative RT-PCR	31
3.8 Zellen	33
3.9 Methoden	33
3.9.1 Dichtegradientenzentrifugation	33

3.9.1.1 Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation	33
3.9.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von MNCs	34
3.9.2 Zellzahl-Bestimmung und Vitalitätstest	35
3.9.3 Immunmagnetische Zellisolation	36
3.9.3.1 Prinzip der Immunmagnetischen Zellisolation	36
3.9.3.2 „Magnetic Labeling“	37
3.9.3.3 Säulenchromatographie	37
3.9.4 Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung (FACS)	38
3.9.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	38
3.9.4.2 Ein-Farben-Fluoreszenz	40
3.9.4.3 Zwei-Farben-Immunfluoreszenz	42
3.9.5 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)	42
3.9.5.1 Prinzip der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung	42
3.9.5.2 FISH mittels BCR-ABL Zweifarben-Doppelfusion-Translokationssonde	43
3.9.6 CFU-Assay (Colony-forming-Unit-Assay) mit mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	46
3.9.6.1 Prinzip des CFU-Assays	46
3.9.6.2 CFU Assay mit mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	47
3.9.6.3 Auswertung der Colony forming assays	48
3.9.7 Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Arrays	48
3.9.7.1 Prinzip der cDNA-Arrays	48
3.9.7.2 RNA-Isolation	49
3.9.7.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
3.9.7.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	50
3.9.7.5 Säulenchromatographie	51
3.9.7.6 Hybridisierung	52
3.9.7.7 Quantifizierung, Normalisierung und statistische Analysen	54
3.9.8 Quantitative „Real-Time“-PCR	55
3.9.8.1 Prinzip der „Real-Time“ RT-PCR (Light Cycler System)	55
3.9.8.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) für „Real-Time“-PCR	57

3.9.8.2.1 Prinzip der cDNA-Synthese (reverse Transkription)	57
3.9.8.2.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) für „Real-Time“-PCR	57
3.9.8.3 Quantitative „Real-Time“-PCR	58
3.9.8.4 Auswertung und Schmelzkurvenanalyse	60
3.9.8.4.1 Relative Quantifizierung	60
3.9.8.4.2 Schmelzkurvenanalyse	62
3.9.8.5 Agarosegelelektrophorese	63
3.9.8.6 Sequenzierung	64
4. Ergebnisse	65
4.1 Immunphänotypische Charakterisierung CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse	65
4.2 Vergleich CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mit einer anderen Stammzellpopulation des Knochenmarks	68
4.2.1 Vergleichende Genexpressionsanalysen CD105-positiver Zellen mit CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark	68
4.2.1.1 Makroarray-basierter Vergleich von CD105-positiven und CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark	68
4.2.1.2 Hierarische Clusteranalysen der Makroarray-basierten Daten von CD105-positiven und CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen	73
4.2.1.3 Bestätigung der signifikant differentiell exprimierten Gene mittels quantitativer „Real-Time“-PCR	74
4.2.2 Funktioneller Vergleich CD105-positiver und CD34-positiver Stamm- und Progenitorzellen durch klonogenen Wachstumstest	78
4.3 Vergleich gesunder CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mit CD105-positiven Zellen einer Stammzellerkrankung des Knochenmark	79
4.3.1 Charakterisierung CD105-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit CML mittels FISH im Vergleich zu malignen CD34-positiven Zellen	79

4.3.2 Immunphänotypische Charakterisierung CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML mittels FACS und Vergleich mit CD105-positiven Zellen gesunder Spender	81
4.3.3 Makroarray-basierter Vergleich CD105-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit CML mit CD105-positiven Zellen gesunder Spender	82
5. Diskussion	86
5.1 Molekularer Phänotyp mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen	86
5.2 Veränderungen mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen im Rahmen der chronisch myeloischen Leukämie	91
5.3 Schlussfolgerung und Ausblick	98
6. Zusammenfassung	99
7. Anhang	101
7.1 Differentiell exprimierte Gene in CD34-positiven und CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender	101
7.2 Differentiell exprimierte Gene in CD105-positiven Zellen gesunder Spender und Patienten mit CML	104
8. Literaturverzeichnis	108
8. Curriculum vitae	128
9. Danksagung	131
10. Eidesstattliche Erklärung	132

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CML	Chronische myeloische Leukämie
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dNTP	Desoxribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acetat)
et al.	et alii
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
F _c R	Cristallizable Fragment-Rezeptor
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Maß für die Zellgröße bei FACS-Analysen (Forward Scatter)
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GlyA	Glycophorin A (Serin hydroxymethyltransferase)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HCl	Salzsäure
HLA-DR	Humanes Leukozyten-Antigen DR
IG	Immunglobuline

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
KM	Knochenmark
M	molar
MACS	Magnetic Associated Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MNCs	mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
MSF	Macrophage Stimulating Factor
µl	mikroliter
µM	mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerytherin
pH	Wasserstoffionenkonzentration
rh	recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SCF	Stem Cell Factor
sec.	Sekunden
SH	
SSC	Maß für Dichte und Granularität einer Zelle bei FACS-Analysen (Side Scatter)
sog.	sogenannt

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (self-renewal) und zur Differenzierung in gewebespezifische Zellen. Das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung wird durch die Umgebung, der sog. „Stammzellnische“, und dem genetischen Programm der Zelle reguliert (Zhang and Li 2008; Li and Xie 2005; Spradling et al. 2001). Abhängig von diesen Regulations- und Differenzierungsfaktoren findet eine symmetrische oder asymmetrische Teilung der Stammzellen statt. Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen zwei identische Tochterzellen, die die Plastizität der Stammzelle bewahren, oder sie führt zu zwei liniendeterminierten Zellen mit Verlust des Selbsterneuerungspotentials. Im Gegensatz dazu entstehen bei der asymmetrischen Teilung eine Tochterzelle mit Stammzellcharakter und eine liniendeterminierte Vorläuferzelle (Molofsky et al. 2004). Die Mechanismen, die zur symmetrischen oder asymmetrischen Zellteilung führen, sind sehr komplex und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Abhängig vom ontogenetischen Alter und ihrem Differenzierungspotential unterscheidet man embryonale von adulten Stammzellen. In der Embryonalentwicklung beginnt nach der Befruchtung der Eizellen und der Verschmelzung der elterlichen Vorkerne die Zellteilung. Bis zum 8-Zellstadium kann aus jeder dieser Zellen ein vollständiger Organismus hervorgehen. Deshalb bezeichnet man sie als totipotent (Tarnowski et al. 2006). Während der weiteren Entwicklung des Embryos, der sog. Präimplantationsphase, bildet sich kurz vor der Einnistung in die Gebärmutter die Blastozyste. Die Blastozyste besteht aus einer äußeren und inneren Zellmasse mit ca. 200 Zellen. Die Zellen der inneren Zellmasse werden als embryonale Stammzellen bezeichnet und gelten als pluripotent. Sie sind *in vivo* und *in vitro* in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) auszudifferenzieren (Thomson et al. 1998).

Bei adulten Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte Zellen mit allgemeiner Stammzelleigenschaft in differenziertem Gewebe. Sie haben ein geringeres

Selbsterneuerungsvermögen und ein eingeschränkteres Differenzierungspotential als embryonale Stammzellen (Lowry and Richter 2007). Durch Impulse des umgebenden Zellmilieus und Zellkontakten, der Extrazellulärmatrix, sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren entwickeln sich differenzierte, organspezifische Zellen. Dieser Prozess spielt eine entscheidende Rolle in der Zellhomöostase und Gewebeerneuerung. Somit findet man adulte Stammzellen vor allem in Geweben mit hoher Zellproliferation wie dem Plattenepithel der Haut (Blanpain et al. 2004), dem Dünndarm (Brittan et al. 2004; Marsham et al. 2002) und dem Knochenmark (Steidl et al. 2004; Nakauchi et al. 2004). Aber auch in zahlreichen anderen Geweben konnten adulte Stammzellen in unterschiedlicher Anzahl nachgewiesen werden: Leber (Nakauchi et al. 2004; Song et al. 2004), Lunge (Neuringer et al. 2004; Otto et al. 2002); Gehirn (Schanzer et al. 2004; Bazan et al. 2004; Ader et al. 2004; Winkler et al. 2003; Bjornson et al. 1999), Kornea und Retina (Boulton et al. 2004; Sun et al. 2004), Endothel (Hilbe et al. 2004, Asahara et al. 2004), Pankreas (Yao et al. 2004; Chaudhari et al. 2001), Skelettmuskulatur (Machida et al. 2004; Cao et al. 2004), Herzmuskulatur (Penn et al. 2004; Messina et al. 2004), Fettgewebe (Heldner et al. 2007; Fernyhough et al. 2008) und Schilddrüse (Thomas et al. 2006; Lan et al. 2007).

Neuere Studien geben Hinweise, dass adulte Stammzellen ein Keimblatt-überschreitendes Differenzierungspotential besitzen. Diese Potenz zur Ausreifung in verschiedene Zelltypen (des Mesoderms, des Endoderms und des Ektoderms) mit Verlust der gewebespezifischen Eigenschaft wird als Stammzellplastizität bezeichnet und kontrovers diskutiert (Körbling et al. 2003).

1.2 Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

Hämatopoetische Stammzellen haben die Fähigkeit, durch ein kontrolliertes Wechselspiel zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung für einen lebenslangen, bedarfsgerechten Nachschub der verschiedenen Zelltypen des Blutes zu sorgen. Ontogenetisch entstehen sie aus nicht-hämatopoetischen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs während der

1. Einleitung

Dottersackformation. Mindestens 10 enddifferenzierte Zelltypen können nach dem bisherigen Stand der Forschung aus den hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen: Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und dendritische Zellen.

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen sind charakterisiert durch Expression spezifischer Oberflächenantigene. Als Marker für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen hat sich das CD34-Antigen durchgesetzt (Civin et al. 1984). Das CD34-Antigen ist ein membranständiges Antigen, das auf der Oberfläche von frühen hämatopoetischen Stamm- und liniendeterminierten Vorläuferzellen, ferner auf Endothelzellen kleinerer Gefäße (Fina et al. 1990; Krause et al. 1996) und embryonalen Fibroblasten (Brown et al. 1991) exprimiert wird. Es handelt sich um ein hoch glykolisiertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 115 kDa, welches durch eine Vielzahl von Kinasen wie z.B. der Protein Kinase C oder der Tyrosinkinase phosphoryliert werden kann (Lanza et al. 2001). Die spezifische Funktion und die Liganden des CD34-Antigens konnten bis heute nicht bis ins Detail geklärt werden.

Die Population der hämatopoetischen CD34-Zellen ist sehr heterogen. Nur ein kleiner Anteil entspricht frühen hämatopoetische Stammzellen mit der Fähigkeit alle Formen reifer Blutzellen zu bilden. Den größten Teil stellen reifere, liniendeterminierte Vorläuferzellen dar, die in ihrer Entwicklung bereits auf eine bestimmte Zelllinie festgelegt sind. Durch Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Oberflächen-Antigene lassen sich Linienzugehörigkeit und Entwicklungsstadium dieser Zellen charakterisieren (Abb. 1.1). Frühe hämatopoetische Stammzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und hoher Differenzierungskapazität sind charakterisiert durch niedrige oder fehlende Koexpression von HLA-DR und CD38 sowie fehlen von linienspezifischen Marker (Petzer et al. 1996) und starker Expression von Thy-1 (CDw90) (Craig et al. 1993). Reifere liniendeterminierte CD34-Zellen sind charakterisiert durch die Expression von CD38 und linien-spezifischen Antigenen (Civin and Gore 1993; Huang and Terstappen 1994). Myelomonozytäre Differenzierung ist charakterisiert durch Koexpression von CD33 und CD45RA. Die erythroide Differenzierung durch Koexpression von CD71 und GlyA, während CD41 und CD61 Marker für die Megakaryozyten-assoziierte Differenzierung darstellen.

1. Einleitung

Koexpressionen von CD19 und CD7 sind spezifisch für lymphoide Vorläuferzellen. Ein ähnliches Expressionsmuster wie CD34-Zellen zeigt das CD133-Antigen (Kobari et al. 2001).

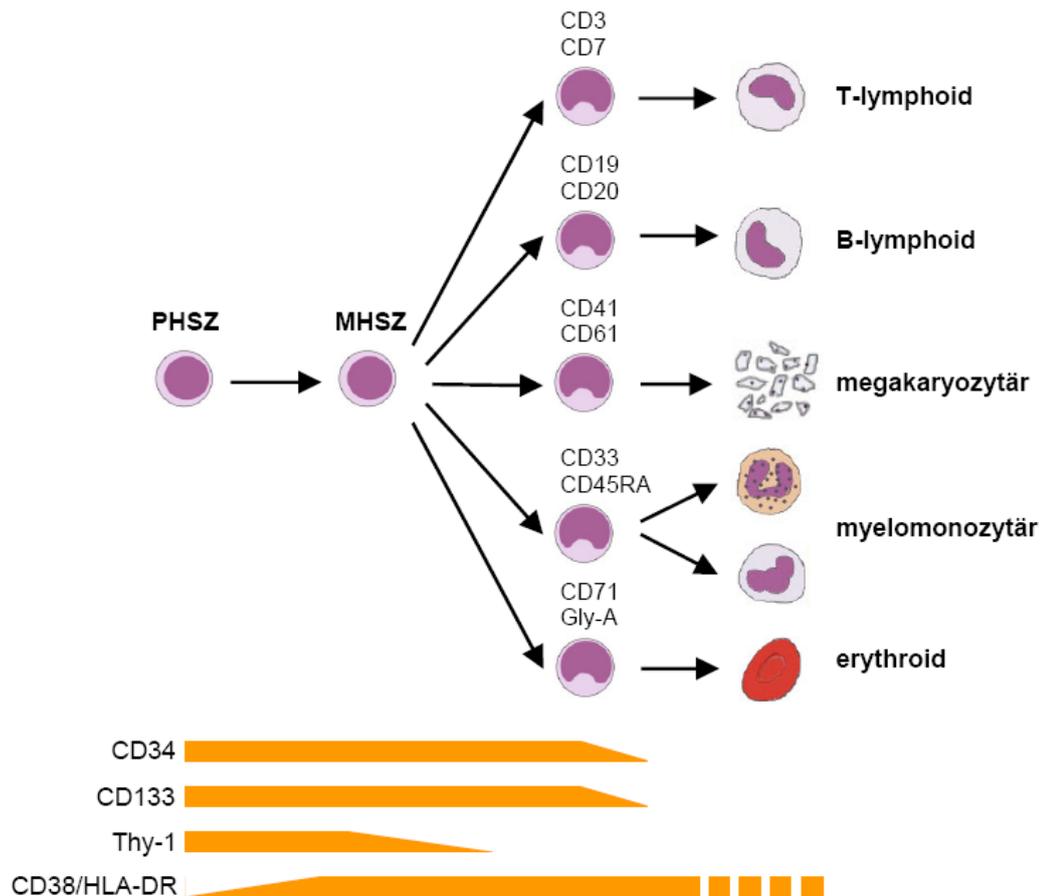


Abbildung 1.1: Eigenschaften und Differenzierungswege hämatopoetischer Stammzellen (modifiziert nach Steidl et al. 2003). Die differenzierungsabhängige Expression der Oberflächenproteine CD34, Thy-1, HLA-DR, CD38 und CD133 sind durch die Balken dargestellt. Die Dicke der jeweiligen Balken spiegelt die Expressionsstärke wider. **PHSZ:** pluripotente hämatopoetische Stammzelle; **MHSZ:** multipotente hämatopoetische Stammzelle

Für die Unterhaltung der normalen Hämatopoese als auch von malignen hämatopoetischen Neoplasien wird durch spezialisierte Knochenmarkstromazellen ein geeignetes Milieu zur Proliferation zur Verfügung gestellt (Glück et al. 1989; Mangabe et al. 1994).

Hämatopoetische Stammzellen sind von Stromazellen wie Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten, Adipozyten und Endothelzellen umgeben, die das für die Hämatopoese notwendige „*Microinvironment*“ bilden (Bianco et al. 2001). Eingebettet in die sog. „hämatopoetische Nische“ des Knochenmarks haben Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsmoleküle sowie Interaktionen der CD34-positiven Zellen mit zellulären Faktoren und Matrixkomponenten des Knochenmarksstroma einen entscheidenden Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der blutbildenden Zellen (Fuchs et al. 2004).

1.3 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen wurden erstmals 1966 von Friedenstein beschrieben (Friedenstein et al. 1966). Es handelt sich dabei um adhärente, morphologisch den Fibroblasten ähnliche Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert werden konnten und in Zellen des Stütz- und Bindegewebes differenzieren.

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen besitzen ein hohes Differenzierungspotential und können unter geeigneten Kulturbedingungen keimliniendeterminiert in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten, Knochenmarkstromazellen und Myozyten differenzieren (Brude et al. 1997; Majumdar et al. 2000; Pittenger et al. 1999; Prockot et al. 1997) (Abb. 1.2).

Die Differenzierbarkeit der mesenchymalen Stammzellen ist jedoch nicht nur auf Zelllinien des mesenchymalen Keimblattes beschränkt, sondern es konnte gezeigt werden, dass sie zu Nervenzellen (Benvenuti et al. 2006; Long et al. 2005; Barzelton et al. 2000), Hepatozyten (Talens-Visconti et al. 2006; Lee et al. 2004a), hämatopoetischen Zellen (Jiang et al. 2002a) und Myozyten (Kadivar et al. 2006; Zhang et al. 2006) differenzieren.

1. Einleitung

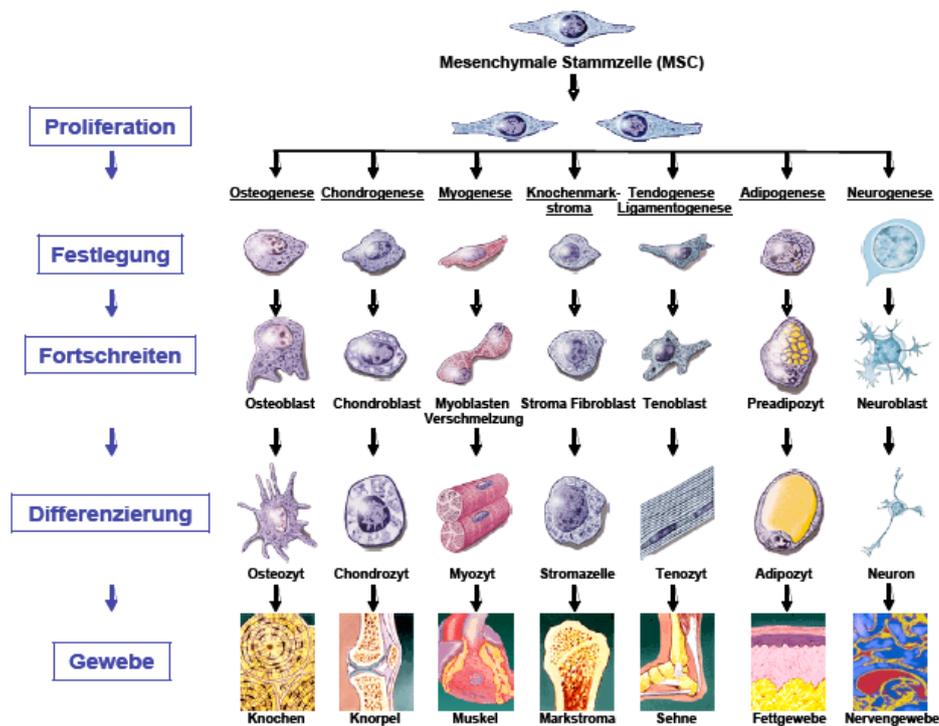


Abbildung 1.2: Model zum Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen (Caplan 1994; Osiris Therapeutics Inc.)

Die Isolation humaner mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen beruhte lange Zeit auf dem Selektionsfaktor der Plastikadhärenz unter charakteristischen Medienbedingungen (Caplan 1991). Die Isolierung und Expansion mesenchymaler Stammzellen aufgrund ihrer stabilen Adhäsion auf Plastik- oder Glasoberflächen konnte bislang erfolgreich aus Knochenmark, peripherem Blut, Nabelschnurblut und Fettgewebe etabliert und optimiert werden (Kassis et al. 2006; Wagner et al. 2005). Bislang ist für mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen kein spezifischer Phänotyp von Oberflächenantigenen bekannt. Die von ihnen exprimierten Oberflächenmoleküle findet man auch auf Oberflächen von endothelialen, mesenchymalen und epithelialen Zellen, sowie Muskelzellen. Ein gut reproduzierbares und praktikables Isolationsverfahren für stromale Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark mittels CD105-Antigen wurde 2000 durch Majumdar (Majumdar et al. 2000) beschrieben. Das Oberflächen-Antigen CD105 (Endoglin) ist ein homodimeres transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, bestehend aus Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten (Gougos and Letarte 1988). Es handelt sich um eine regulatorische Einheit des TGF- β (Transforming

1. Einleitung

growth factor β)-Rezeptorkomplex und moduliert die zelluläre Antwort auf TGF- β (Barbara et al. 1999). TGF- β , der Effektor des Endoglin, ist ein pleiotropes Zytokin, das zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Synthese extrazellulärer Matrix und Hämatopoese reguliert (Derynck and Feng 1997). Zusätzlich steuert es die Funktionen der Vaskulogenese und der Wundheilung. CD105 ist hauptsächlich auf vaskulären Endothelzellen und Synzythiotrophoblasten der Plazenta exprimiert (Gougs and Letarte 1988; Fonsatti et al. 2001), in geringerem Umfang auch auf hämatopoetischen Zellen (Lastres et al. 1992; Robledo et al. 1996), Stromazellen (Rokhlin et al. 1995), Fibroblasten (Gougos and Letarte 1988) und auf vaskulären glatten Muskelzellen (Adam et al. 1998).

Neben ihrem ausgeprägten Proliferations- und Differenzierungspotential sind humane mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen durch ihre spindelförmige fibroblastoide Zellmorphologie sowie durch die Präsenz spezifischer Oberflächenantigene, Adhäsionsmoleküle, extrazellulärer Matrixmoleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren charakterisiert (Tabelle 1.1) (Barry and Murphy 2004; Otto and Rao; Ringe et al. 2002a; Pittenger et al. 1999; Conget et al. 1999; Haynesworth et al. 1992; Galmiche et al. 1993; Gronthos et al. 1995; Haynesworth et al. 1996; Majumdar et al. 1998; Satomura et al. 1998; Bruder et al. 1998, Chichester et al. 1993).

Marker	Bezeichnung
Oberflächenantigene	CD13, CD29, CD49a, CD71, CD90, SH2 (CD105), CD114 (c-kit), SH3, SH4, STRO-1, MHC-1, α -smooth muscle actin, MAB1740
Zytokine und Wachstumsfaktoren	Interleukin: 1 α , 6,7,8,11,12,14,15 LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Zytokine und Wachstumsfaktoren Rezeptoren	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF β IR, TGF β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR
Adhäsionsmoleküle	Integrine: α V β 3, α V β 5, Integrin chains: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 4, ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1(CD106), ALCAM-1 (CD166), LFA-3, L-selectin, Endoglin, CD44

1. Einleitung

Bestandteile der Extrazellulärmatrix	Kollagen Typ I, III, IV, V, VI Fibronectin, Laminin, Hyalurone, Proteoglykane
--------------------------------------	--

Tabelle 1.1: Charakteristika mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen:

ALCAM: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule **bFGF:** basic Fibroblast Growth Factor, **EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor, **Flt3:** Fms-Like Tyrosin Kinase Ligand, **ICAM:** Intercellular Adhesion Molecule (CD54), **IFN- γ :** Interferon- γ , **LFA:** Lymphocyte Function-Associated Molecule, **LIF:** Leukemia Inhibitory Factor, **PDGFR:** Platelet-Derived Growth Factor Receptor, **SCFR:** Stem Cell Factor Receptor (CD117; c-kit), **TGF:** Transforming Growth Factor, **TNF:** Tumor Necrosis factor, **VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule

Die Population der mesenchymalen CD105-positiven Zellen ist insgesamt sehr heterogen. Phänotypisch können im Lichtmikroskop bis zu 3 Populationen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential und unterschiedlicher Proliferationsfähigkeit unterschieden werden. So zeigen sich in niedrigen Zellpassagen spindelförmige fibroblastenähnliche Zellen, große flache Zellen und kleine runde Zellen (Vogel et al. 2003).

Durchflusszytometrische Analysen typischer Oberflächenantigene zeigen, dass humane mesenchymale Stammzellen bezüglich einiger Marker phänotypisch homogen sind. Sie sind positiv für CD44, CD105, CD166, SH3 sowie SH4 und negativ für CD14, CD34 und das Leukozytenantigen CD45. Diese Oberflächenantigene werden bereits routinemäßig zur Kontrolle der Kulturhomogenität eingesetzt. Typische Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen fehlen auf den mesenchymalen Stammzellen. Klinisch bedeutsam ist die Ausprägung des immunologischen Phänotyps (CD40⁻, CD80⁻, CD86⁻, MHC-II⁻, MHC-I⁻, CD54⁻ [ICAM-1]) der auch nach der Differenzierung negativ bleibt. Eine *in vitro* Stimulation mit Interferon- γ induziert zwar eine erhöhte Expression von MHC-I und MHC-II sowie CD54, jedoch fehlen kostimulierende Moleküle der Immunabwehr (Tse et al. 2003). Dies ist für die klinische Anwendung von großer Bedeutung, da keine Abstoßungsreaktionen zu befürchten sind.

Zusammengefasst handelt es sich bei den isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen um eine sehr heterogene Population, die Unterschiede bezüglich ihrer Oberflächenepitope, der Zytokinsekretion und der Sekretion der Extrazellulärmatrix aufweist.

1.4 Struktur und Funktion des Knochenmarkstromas

Zur Unterhaltung der normalen Hämatopoese als auch bei malignen hämatopoetischen Neoplasien wird erst durch ein spezialisiertes Knochenmarksstroma ein geeignetes Milieu zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung zur Verfügung gestellt (Glück et al. 1989; Manabe et al. 1994).

Zu den Stromazellen des Knochenmarks zählen die Osteoblasten und –klasten, Fettzellen, Retikulumzellen, Endothelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten. Sie bilden zum einen durch ihre Oberflächenstrukturen und zum anderen durch die Produktion von Zytokinen das für die Hämatopoese geeignete Mikromilieu. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Knochenmarksstroma ist die extrazelluläre Matrix, die über die physikalisch stabilisierende Funktion hinaus an der Interaktion zwischen Stromazellen und hämatopoetischen Zellen beteiligt ist. Hauptbestandteile sind Glykoproteine (Kollagen I, III, IV, V, VI, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin und Hemonektin) und Proteoglykane (Hyaluronsäure, Chondroitin-, Dermatan- und Heparinsulfat) welche von verschiedenen Stromazellen wie Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet werden (Campbell et al. 1986; Owen et al. 1988; Lerat et al. 1993). Diese Matrixproteine können mehrere Bindungsregionen für verschiedene Adhäsionsmoleküle der Zellen der Hämatopoese besitzen. Die Mikrovaskulatur des Knochenmarks wird von Endothelzellen gebildet, die extraluminal von Retikulumzellen umgeben sind. Zwischen den Blutgefäßen des Knochenmarks und den Maschen des retikulären Bindegewebes besteht keine offene Verbindung, so dass die Endothelzellen eine wichtige Barrierefunktion einnehmen. Zur Transmigration in die Knochenmarksinsuloide bzw. ins periphere Blut spielen adhäsionsvermittelnde Wechselwirkungen der Stromazellen mit den Matrixkomponenten eine entscheidende Rolle. Die Mark-Blut-Schranke wird aber auch in der Gegenrichtung durchwandert. Dieser als „Homing“ bezeichnete Vorgang wird über membranständige Rezeptoren vermittelt (Tavassoli and Miguell 1991).

1.5 Die chronische myeloische Leukämie (CML) als Stammzellerkrankung

1.5.1 Epidemiologie und Klinik der CML

Die CML ist eine maligne Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Fialkow et al. 1977), mit Beteiligung der Myelo-, Erythro- und Megakaryopoese sowie der B- und eines Teils der T-Lymphozyten und ist durch das BCR-ABL-Onkogen charakterisiert. Sie wird in die Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen eingeteilt (Vardiman et al. 2002). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Polycythaemia vera, die essentielle Thrombozythaemie, die Osteomyelofibrose sowie einige andere seltene Formen.

Die CML hat eine Inzidenz von etwa 1-2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr und ist somit die häufigste Erkrankung in der Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen (Faderl et al. 1999). Sie ist überwiegend eine Erkrankung des Erwachsenenalters mit einem Mittel von 53 Jahren, jedoch können zu einem niedrigen Prozentsatz auch Kinder und Jugendliche betroffen sein (Sawyers CL 1999; Schiffer CA 2007). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen.

Die CML verläuft klassischerweise in drei Krankheitsphasen: der chronischen Phase, der Akzelerationsphase und der Blastenkrise (Blastenschub). Der Krankheitsbeginn ist langsam und schleichend. Das Leitsymptom der chronischen Phase ist die Leukozytose und die Splenomegalie. Im Differentialblutbild finden sich neben reifen Granulozyten unreife Vorstufen der myeloischen Reihe bis hin zu den Myeloblasten (sog. Linksverschiebung). Der Anteil an unreifen Zellen sog. Blasten liegt unter 10%. In der Akzelerationsphase gewinnt die Erkrankung an Dynamik. Sie ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Leukozytose, Anämie, Thrombozytopenie und zunehmende Splenomegalie. Im Differentialblutbild zeigt sich eine zunehmende Zahl von Blasten (10-30%) und eine Basophilie (bis auf 20%) (Kantarjian et al. 1988). Die Blastenkrise tritt relativ plötzlich nach der Akzelerationsphase oder auch direkt aus der chronischen Phase heraus auf. Der Blastenanteil liegt zu diesem Zeitpunkt bei über 30% im peripheren Blut und im Knochenmark.

1.5.2 Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen der CML

Ursache der Erkrankung ist eine chromosomale Veränderung und anschließende Proliferation einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Charakteristisches zytogenetisches Merkmal der CML ist in nahezu 95% der Fälle das Vorhandensein eines Philadelphia-Chromosoms (Ph), welches als spezifische chromosomale Veränderung der leukämischen Zelle erstmals 1960 beschrieben wurde (Nowell and Hungerford 1960). Das Philadelphia-Chromosom ist ein verkürztes Chromosom 22, das durch reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 ($t(9;22)$) entstanden ist (Rowley 1973). Dadurch kommt es zur Fusion der beiden Gene BCR (breakpoint cluster region; Chromosom 22) und ABL (Ableson leukemia virus; Chromosom 9) und zur Bildung eines BCR-ABL Fusionsonkogens (Abb. 1.3). Je nach Bruchpunkt des BCR-Gens können unterschiedliche Spleißvarianten vorliegen, welche zu verschiedenen Fusionsproteinen mit einem Molekulargewicht von 185-230 kD führen.

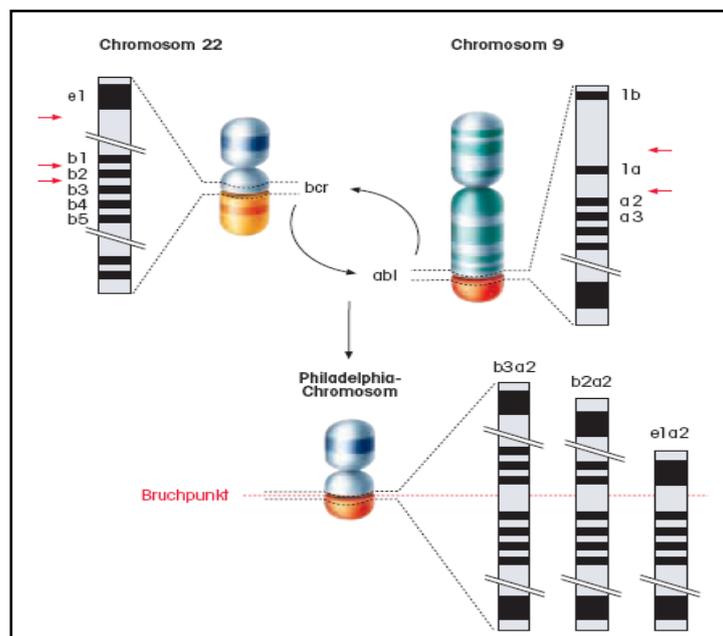


Abbildung 1.3: Translokation $t(9;22)$; Philadelphia-Chromosom (Kronenwett and Haas 2001)

Durch die unterschiedlichen Bruchstellen (Pfeile) entstehen die drei häufigsten BCR-ABL-Varianten b2a2, b3a2 und e1a2

Das zelluläre ABL-Gen (c-ABL) kodiert für ein 145 kD große, streng regulierte freie Tyrosinkinase mit vielfältigen und komplexen Funktionen (van Etten et al. 1999). Anhand der strukturellen Domänen lassen sich einige biologischen Funktionen ableiten. Von besonderer Bedeutung sind die SRC-Homologie-Domänen (SH1, SH2 und SH3). SH1 trägt die Tyrosinkinasefunktion, SH2 und SH3 verleihen dem Protein seine regulatorische Funktion und erlauben die Interaktion mit anderen Proteinen (Pawson and Gish 1992). C-terminal befinden sich die Domänen, die die Bindung an Aktin und DNA erlauben. Die c-ABL-Tyrosinkinaseaktivität wird unter physiologischen Bedingungen in engen Grenzen reguliert. An dieser Regulation sind trans- als auch cis-agierende Faktoren über die Interaktion der c-ABL SH3-Domäne beteiligt (Dai and Pendergast 1995; Mayer and Baltimore 1994). Das BCR-Gen kodiert für ein 160 kD Protein, das vor allem zytoplasmatisch lokalisiert ist. Es besitzt mehrere funktionelle Domänen u.a. eine Serin/Threonin-Kinase (Laurent et al. 2001). Die Funktion des BCR-Gen ist bis heute nur teilweise aufgeklärt.

1.5.3 Mechanismen der BCR-ABL-vermittelten Transformation

Das durch die t(9;22) entstehende BCR-ABL-Fusionsonkogen kodiert eine deregulierte Tyrosinkinase und besitzt im Vergleich zu c-ABL eine 100-fach erhöhte Enzymaktivität (Lugo et al. 1990). Das BCR-ABL Protein ist vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Die aktivierte Tyrosinkinase induziert zahlreiche zum Teil redundante Signal-Transduktionswege, u.a. den Ras- (Sawyers et al. 1995), den MAPK- (Cortez et al. 1997), den Jak-STAT- (Shuai et al. 1996) und den PI-3K/AKT-Signalweg (Varticovski et al. 1995). Die Folgen sind veränderte Adhäsionseigenschaften am Knochenmarksstroma, Aktivierung mitogener Signalwege und Apoptoseinhibition (Abb. 1.4).

1. Einleitung

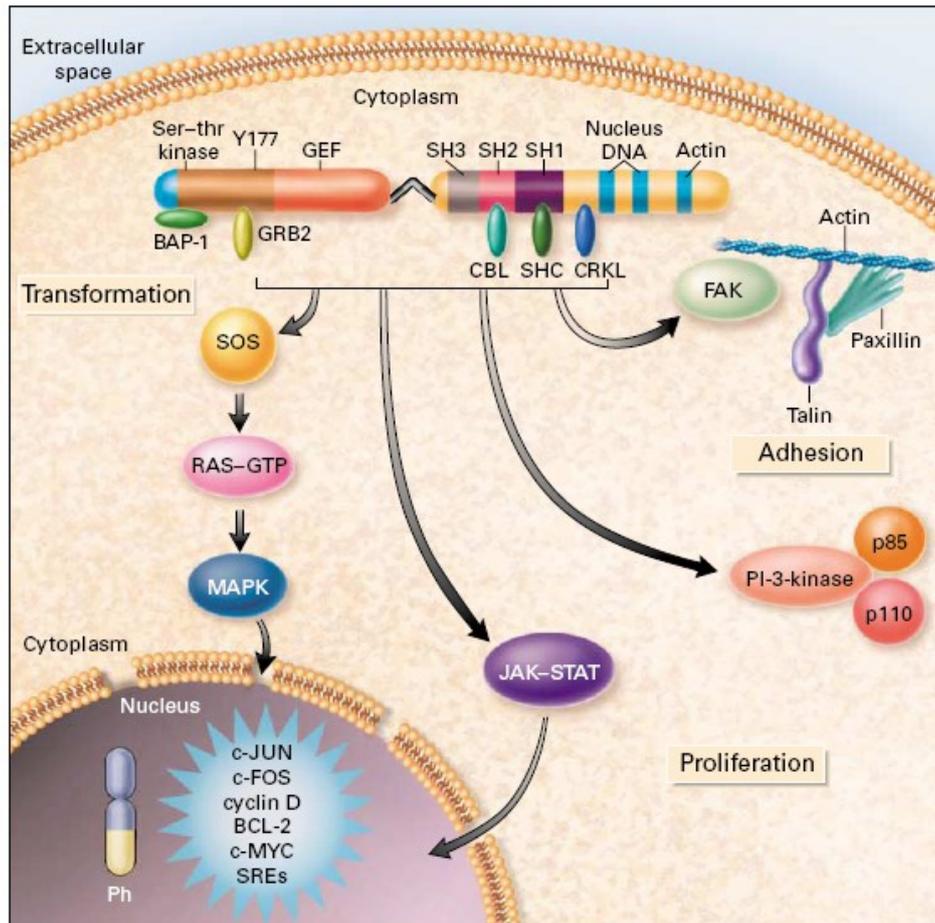


Abbildung 1.4: Signaltransduktionswege in BCR-ABL-positiven Zellen (Faderl et al. 1999)

Verschiedene strukturelle Domänen des chimären BCR-ABL-Proteins sind essentiell für die maligne Transformation. Sie binden Adaptermoleküle, die die Aktivierung mitogener Kaskaden und anti-apoptotischer Signale vermitteln. Darüber hinaus findet durch BCR-ABL die Tyrosinphosphorylierung zahlreicher Proteine statt, die für die Organisation der Zellmembran und des Zytoskelett bedeutsam sind.

Diese Signalkaskaden zeichnen sich durch teilweise überschneidende Interaktionen mit zahlreichen Substraten und assoziierten Molekülen, die nur schwer voneinander trennbar sind, so dass sie hier nur stark vereinfacht dargestellt werden können.

Die Aktivierung des mitogenen Ras (rat sarcoma viral oncogene homolog)-Signaltransduktionswegs durch BCR-ABL erfolgt über das Tyrosin an Position Y177 innerhalb des ersten BCR-Exons, das in der autophosphorylierten Form das Adaptermolekül GRB2 (growth-factor-receptor binding protein) binden kann und mit SOS (son of sevenless) Komplexe bildet. Der BCR-ABL-GRB2-Komplex aktiviert Ras, das infolgedessen die

MAP-Kinase (mitogene-activated protein kinase) phosphoryliert und aktiviert, worüber die Aktivierung mitogener Signale in BCR-ABL transformierten Zellen erfolgt. Ras kann jedoch auch über die Adaptermoleküle SHC (SRC homology domain-containing) und CRKL (v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like), beides Substrate von BCR-ABL, aktiviert werden. CRKL aktiviert sowohl Ras als auch den PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/AKT-Signaltransduktionsweg (Neshat et al. 2000). Die Signaltransduktion durch die PI3-Kinase führt zur Aktivierung einer Reihe von „downstream“ Effektormolekülen, worüber die Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie aufgehoben wird. Daraus resultiert eine verminderte Apoptose und eine Stimulation des Zellwachstums (Datta et al. 1997; del Peso et al. 1997). Des Weiteren kann BCR-ABL JAK-(Janus Kinase)- und STAT-(signal transducers and activators of transcription) Proteine aktivieren. Der JAK/STAT-Signalweg bildet die unmittelbare Verbindung zwischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Gentranskription. Neben STAT1 spielt insbesondere STAT5 eine entscheidende Rolle (Shuai et al. 1995; de Groot et al. 1999).

1.5.4 Stromaveränderungen bei malignen Neoplasien

Stromale Stamm- und Progenitorzellen stehen in enger räumlicher und funktioneller Wechselwirkung mit der normalen Hämatopoese und der Proliferation maligner Zellklone. Es gibt Hinweise, dass Stromaveränderungen bei verschiedenen Leukämietypen eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielen. Bei Patienten mit AML, CML sowie mit Multiplen Myelom konnten stromale Veränderungen bereits nachgewiesen werden (Duhrsen et al. 1996). So wurde im Knochenmark von Patienten mit AML eine Vermehrung der Fibroblasten und Endothelzellen beobachtet (Dilly et al. 1990). Neuere Studien konnten zeigen, dass maligne AML-Zell-Klone abhängig vom Stroma die Expression von Metalloproteinasen sowie deren Inhibitoren verändern (Marquez-Curtis et al. 2001; Dybkaer et al. 2001). Die Ursache und die sich daraus ableitenden Folgen für das Wachstum der malignen Zellen sind bislang noch unbekannt. Beim Multiplen Myelom zeigte sich, dass in malignen Plasmazellen Integrine und andere Adhäsionsmoleküle wie z.B. NCAM, LFA-1,

1. Einleitung

LFA-3, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6 verstärkt exprimiert werden (Harada et al. 1993; Huang et al. 1995). Gleichzeitig zeigen sich Veränderungen in den korrespondierenden stromalen Zellen. VCAM-1 und Fibronectin werden vermindert, der intrazelluläre Rezeptor für Hyaluron-vermittelte Motilität verstärkt exprimiert (Wallace et al. 2001).

Im Knochenmark von CML-Patienten konnte eine Vermehrung von Fibroblasten und Endothelzellen sowie eine Verminderung von Fettzellen gezeigt werden (Dilly et al. 1990; Kuto et al. 1984). Gleichzeitig besteht eine deutlich erhöhte Mikrogefäßdichte (Kvasnicka et al. 2004). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen, dass die Sinus-Endothelzellen eine Abnahme der Adventitiazellen und eine Zunahme der Anzahl und Größe der transzellulären Poren aufweisen, was die Migration maligner Zellen aus dem Knochenmark begünstigt.

Während des Progress der Erkrankung kommt es häufig zu einer Retikulin- bzw. Kollagenfaserfibrose. Die Vermehrung der Retikulinfasern ist assoziiert mit einer erhöhten Anzahl an Megakaryozyten, welche bestimmte Mediatoren wie „transforming growth factor- β “ (TGF- β) und „platelet-derived growth factor,“ (PDGF) sezernieren (Bousse-Krediles and le Martyre 1999). Beide Zytokine spielen auch eine maßgebliche Rolle im Rahmen des Pathomechanismus der Angiogenese, da sie innerhalb eines sehr vielschichtigen autokrinen und parakrinen funktionellen Netzwerks wirksam werden (Berse et al. 1999). Die Megakaryozyten sind typischerweise kleiner als normal und haben hypolobierte Kerne (Kuto et al. 1984). Des Weiteren zeigt sich eine Zunahme von BCR-ABL-positiven Makrophagen, welche im Rahmen der Zelldifferenzierung aus dem malignen Zellklon hervorgehen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen der Stromazusammensetzung das Wachstum der malignen CML-Zellen stimuliert, während die Proliferation der normalen Stamm- und Progenitorzellen unterdrückt wird (Bathia et al. 1995). Der genaue Wirkmechanismus des Zusammenspiels von Knochenmarkstroma und malignen CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen ist bislang nicht bekannt.

2. Zielsetzung der Arbeit

Sowohl für die normale Hämatopoese als auch für das Überleben und Proliferation maligner hämatopoetischer Zellen spielen Stromazellen im Knochenmark und deren Progenitoren durch Bereitstellungen eines geeigneten „*hämatopoetischen Microinvironment*“ eine entscheidende Rolle. Über die Stromalen Zellen des Knochenmarks und insbesondere über deren molekulare Eigenschaften und Veränderungen im Rahmen hämatologischer Neoplasien ist bislang nur wenig bekannt. Durch die Verfügbarkeit eines gut reproduzierbaren und praktikablen immunmagnetischen Isolationsverfahrens über das CD105-Antigen ist es möglich geworden aus dem Knochenmark eine klar definierte Zellpopulation zu isolieren, die eine große Zahl mesenchymaler Vorläufer enthält.

Ziel dieser Arbeit ist es, CD105-positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender auf molekularer und funktioneller Ebene mittels Immunfluoreszenz, genomweiten Genexpressionsanalysen durch cDNA-Arrays und klonogen Wachstumstests zu charakterisieren. Des Weiteren sollen die CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen mit einem weiteren Stamm- und Progenitorzelltyp des Knochenmarks, den CD34-positiven hämatologischen Stamm- und Progenitorzellen, verglichen werden. Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen stehen in enger räumlicher und funktioneller Wechselwirkung mit der normalen Hämatopoese. Über die molekularen Eigenschaften und Veränderungen im Rahmen hämatologischer Neoplasien ist bislang nur wenig bekannt. Um den Phänotyp von CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit einer malignen Stammzellerkrankung des Knochenmarks zu bestimmen, sollen in dieser Arbeit CD105-positive Zellen von Patienten mit CML mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, Immunfluoreszenz und Genexpressionsanalysen durch cDNA-Arrays analysiert werden.

Derartige molekulare Untersuchungen können einerseits neue Einblicke in die Biologie mesenchymaler Vorläuferzellen und deren Verwendung für die Gewebersatztherapie liefern. Des Weiteren führen sie zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Rolle von Stromazellen in der Genese von hämatologischen Neoplasien und eröffnen somit neue molekulare Ansatzpunkte für antineoplastische, Stroma-gerichtete Therapiestrategien.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Firma
Axioskop 2 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axioplan imaging 2 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biofuge fresco mit Heraeus Rotor #3325	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Durchflusszytometer FACSCalibur mit Software CellQuest	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
EasyCast™ Mini Gel Electrophoresis	Owl Separation Systems, Porthmouth, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Gel-Dokumentationssystem Gel Doc 200 mit Software QuantityOne	Bio-Rad Laboratories, München
HERAcell CO ₂ -Inkubator	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
HERAsafe HS 12 Sicherheitswerkbank	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Hybridisierungssofen ThermoHybaid	Thermo Hybaid GmbH, Heidelberg
HyBrite™	Vysis Inc., Downers Grove, USA
Lichtmikroskop, Diavert	Leica, Bensheim
Light Cycler	Roche applied science, Mannheim
LS 9000 Beckmann Coulter	Beckmann Fullerton, USA
Megafuge 1.0R mit Heraeus Rotor #2704	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
PCR Mastercycler gradient	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
Phosphorimager Fuji FLA-3000	FujiFilm, Düsseldorf
Power-Pac 300 (135 V, 400 mA)	Bio-Rad Laboratories, München
Speedvac Concentrator 5301	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
Spiegelreflexkamera F301	Nikon, Düsseldorf
Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
Zellcoulter MD II Series Analyzer	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

Tabelle 3.1: verwendete Geräte

3.2 Materialien

Material	Firma
5 ml FACS-Röhrchen	SARSTED AG, Nümbrecht
50 ml Falcon Tubes	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Atlas™ cDNA Expression Arrays	BD Biosciences Clontech, USA
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
LS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
0,2 ml PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Petrischale Ø 35mm	Corning Inc., Corning, USA
Petrischale Ø 96 mm	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Photometerküvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg
QIAShredder Säulen	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 3.2: Materialien

3.3 Puffer, Medien und Zusätze

Puffer, Medien, Zusatz	Firma
Dulbecco PBS	BIOCHROM AG, Berlin
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
FACSFlow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Methocult SF ^{BIT} H4439 (Methylcellulose)	CellSystems, St. Katharinen
RPMI 1640-Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
SDS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
SSC	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Tabelle 3.3: Puffer, Medien, Zusätze

3.4 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
CaliBRITE-Microbeads	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
DAPI II Counterstain	Abbott, Wiesbaden
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Eisessig	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethidumbromid (10mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
LymphoPrep™	Axis-Shield, Oslo Norway
Loading Dye (6x)	Promega GmbH, Mannheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NP-40	Abbott, Wiesbaden
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau 0,5%	BIOCHROM AG, Berlin

Tabelle 3.4: Chemikalien

3.5 Kit-Systeme

Kit-System	Firma
BD Atlas™ cDNA Expression Kit	BD Biosciences Clontech, USA
Human CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Light Cycler FastStart	Roche Diagnostic GmbH, Penzberg
DNA Master SYBER Green I	
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 3.5: Kit-Systeme

3.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper wurden mit einer Konzentration von $10 \mu\text{l}$ auf 1×10^5 Zellen in $50 \mu\text{l}$ PBS eingesetzt.

Primärantikörper	(Klon)	Isotyp	Firma
CD7 FITC	(4H9)	IgG2a	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD14 PE	(MφP9)	IgG2b	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD15 PE	(HI98)	IgG1	BD Pharmingen TM , Heidelberg
CD19 PE	(SJ25C1)	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD29 PE	(MAR4)	IgG1 _κ	BD Pharmingen TM , Heidelberg
CD31 FITC	(5.6E)	IgG1	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD34 FITC	(8G12)	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD38 PE	(HB7)	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD44 FITC	(IM7)	IgG2b	BD Pharmingen TM , Heidelberg
CD45 FITC	(2D1)	IgG1	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD54 FITC	(84H10)	IgG1	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD71 FITC	(L01.1)	IgG2a	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD105 FITC	(SN6)	IgG1	Serotec, Oxford, UK
CD105 PE	(SN6)	IgG1	Serotec, Oxford, UK
CD106 PE	(51-10C9)	IgG1	BD Pharmingen TM , Heidelberg
CD117 PE	(95C3)	IgG1	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD138 PE	(MI15)	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gly A PE	(11E4B-7-6)	IgG1 _κ	Immunotech, Marseille, Frankreich
HLA-DR PE	(L243)	IgG2a	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mouse IgG1 FITC	(W3/25)	IgG1	Serotec, Oxford, UK
Mouse IgG1 FITC	(X40)	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mouse IgG1 PE	(MOPC-21)	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mouse IgG2a FITC	(X39)	IgG2a	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Tabelle 3.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

3.7 Primer für die quantitative RT-PCR

Alle Primer für die quantitative RT-PCR wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) bezogen.

Die „Primer“-Sequenzen wurden mit Hilfe der „LightCycler Probe Design“-Software 1.0 (Roche Molecular Biochemicals) ausgewählt. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurden Exonübergreifende „Primer“ verwendet.

Genname	Abkürzung	Sequenz
Glycerinaldehyd-P-DH	GAPDH	5'-TCCATGACAACCTTGGTATCG-3'
	GAPDH	5'-CTAATTCTAGTGGGTCAAGATGATG-3'
		Amplikonlänge (bp): 380
		Annealing-Temp.: 61°C
Sequenz-specific transcription-activator	FLI-1	5'-AGGGAAAGTTCCTGC-3'
	FLI-1	5'-CCGTTGCTCTGTATTCTTA-3'
		Amplikonlänge (bp): 189
		Annealing-Temp.: 61°C
Human erythroblastosis Virus oncogene homolog 2	Ets-2	5'-CCACCAATGAGTTCAG-3'
	Ets-2	5'-GTGCCAAAACCTAATGT-3'
		Amplikonlänge (bp): 247
		Annealing-Temp.: 60°C
Human erg protein (ets-related gene)	ERG	5'-AACTAAAGCCGTCAGG-3'
	ERG	5'-CTCCATAGCGTAGGAT-3'
		Amplikonlänge (bp): 262
		Annealing-Temp.: 61°C

3. Material und Methoden

Genname	Abkürzung	Sequenz
Retinoblastoma-binding protein	RBP-7	5'-TAAACCAGACCCAAGTG-3'
	RBP-7	5'-CATCCTCTACAACAGC-3'
		Amplikonlänge (bp): 221
		Annealing-Temp.: 59°C
Nuclear transcription factor	NFX-1	5'-ACCAGGTATGCTATTG-3'
	NFX-1	5'-TTCCGACTACTACTTCC-3'
		Amplikonlänge (bp): 256
		Annealing-Temp.: 59°C
Immunglobulin mu binding: Protein 2	IGH2	5'-GCTGGTCACCTTTGAG-3'
	IGH2	5'-TCAGGGCTTTTTTCAGT-3'
		Amplikonlänge (bp): 269
		Annealing-Temp.: 61°C
Cell Division Control Protein 2 Homolog	CDC2	5'-ATGAGGTAGTAACACTCTG-3'
	CDC2	5'-GTAGCTAGGCTTCCTG-3'
		Amplikonlänge (bp): 268
		Annealing-Temp.: 60°C
Serin/Threonine-Protein: Kinase PLK1	pLK	5'-TCAATAAAGGCTTGGAGAAC-3'
	pLK	5'-GCCGTACTTGTCCGAA-3'
		Amplikonlänge (bp): 239
		Annealing-Temp.: 61°C
Cyclin B1	CyclinB	5'-ATTGTGTGCCCAAGAA-3'
	CyclinB	5'-CGACATCAACCTCTCC-3'
		Amplikonlänge (bp): 243
		Annealing-Temp.: 61°C

Tabelle 3.7: Primer für die quantitative RT-PCR

3.8 Zellen

Alle Patienten und alle gesunden Kontrollpersonen denen im Rahmen der experimentellen Arbeit Knochenmark entnommen wurde, wurden vor Entnahme vollständig über das Entnahmeverfahren und den wissenschaftlichen Zweck aufgeklärt und haben schriftlich ihr Einverständnis erklärt.

Verwendet wurden Knochenmarkaspirate von gesunden Spendern und von Patienten mit einer BCR-ABL-positiven CML. Die molekularbiologische Untersuchung der Patienten erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik mittels quantitativer „Real-Time“ RT-PCR (LightCycler-t(9;22)-Quantifikation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Es wurden hierbei Primer und Hybridisierungssonden verwendet, die die drei häufigsten Bruchpunktvarianten des BCR-ABL Fusionsgens enthielten. Die Verlässlichkeit dieser Methode wurde durch Studien in unsere Arbeitsgruppe bestätigt (Neumann et al. 2003).

3.9 Methoden

3.9.1 Dichtegradientenzentrifugation

Das bei einer Knochenmarkpunktion gewonnene Aspirat enthält neben spongösem Material ein heterogenes Gemisch zellulärer Bestandteile.

Um CD105-positive stromale Stamm- und Progenitorzellen bzw. CD34-positive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zu gewinnen, musste zunächst eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt werden.

3.9.1.1 Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation

Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation werden die verschiedenen zellulären Bestandteile des Knochenmarkaspirats (KM-Aspirat) anhand ihrer Schwebedichte aufgetrennt. Dazu

wird das zuvor mit PBS verdünnte KM-Aspirat auf ein Phasentrennmittel, z.B. Lymphoprep mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml überschichtet und anschließend zentrifugiert. Da Erythrozyten und polymorphkernige Zellen eine geringere Dichte als das Phasentrennmittel besitzen, durchwandern sie die Lymphoprep-Phase. An der Grenzschicht zum Lymphoprep bildet sich der sogenannte Interphase-Ring der von mononukleären Zellen gebildet wird (Abb. 3.1). In dieser Schicht befinden sich u.a. die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. Oberhalb des Interphase-Rings befindet sich eine thrombozytenreiche Plasma-Schicht.

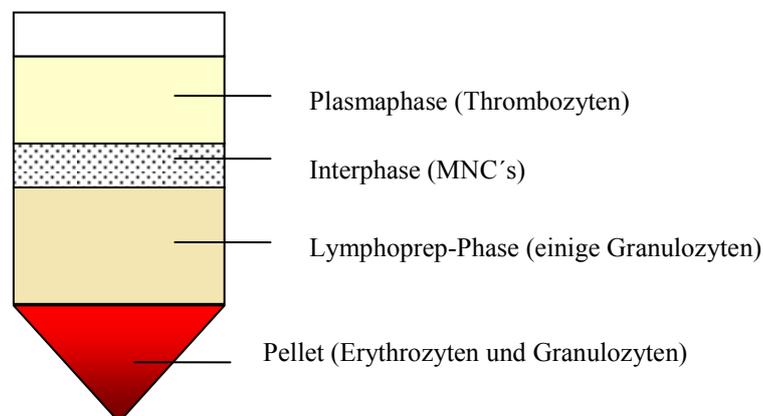


Abbildung 3.1: Phasen-Auftrennung von Knochenmarkaspiraten nach Dichtegradientenzentrifugation

3.9.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von MNCs

Nach Gewinnung des KM aus dem Beckenkamm der Patienten/Spender wurde dieses in ein Falcon-Tube überführt und 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Anschließend wurde das vorgelegte Lymphoprep-Medium vorsichtig um eine Durchmischung zu verhindern mit der KM-Zellsuspension überschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 20°C und 1500 U/min wurde der Interphase-Ring vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Falcon-Tube überführt. Die Zellsuspension wurde mit mindestens drei Volumenanteilen PBS aufgefüllt, durchmischt und für 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in PBS-Puffer aufgenommen, und zentrifugiert. Nach

3. Material und Methoden

diesem letzten Waschgang wurde das Zellpellet in einem definiertem Volumen PBS (500 μ l - 1 ml) resuspendiert und anschließend die Zellzahl durch einen Zählautomaten bestimmt.

3.9.2 Zellzahl-Bestimmung und Vitalitätstest

Die Anzahl der isolierten CD105- oder CD34-positiven Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Koenigshofen) ermittelt (Abb. 3.2). Hierfür wurden 10 μ l Zellsuspension mit 10 μ l 0,5%igem Trypanblau verdünnt und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau dringt durch eine veränderte Membrandurchlässigkeit in abgestorbene Zellen ein und färbt diese blau. Somit ist eine Unterscheidung zwischen abgestorbenen und vitalen Zellen möglich. Für die Zellzahlbestimmung wurden 4 Eckquadrate (Großquadrate) ausgezählt, die Ergebnisse gemittelt und entsprechend folgender Formel die Zellzahl bestimmt.

$$\text{Zellzahl pro ml Suspension} = \text{Mittelwert Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 (\text{Kammerfaktor})$$

Kammerfaktor 10^4 :
Fläche des Großquadrats: 1 mm^2
Höhe des Großquadrats: 0,1 mm
Volumen des Großquadrat: $0,1 \text{ mm}^3 \rightarrow 0,1 \mu\text{l} \rightarrow 10^{-4} \text{ ml}$

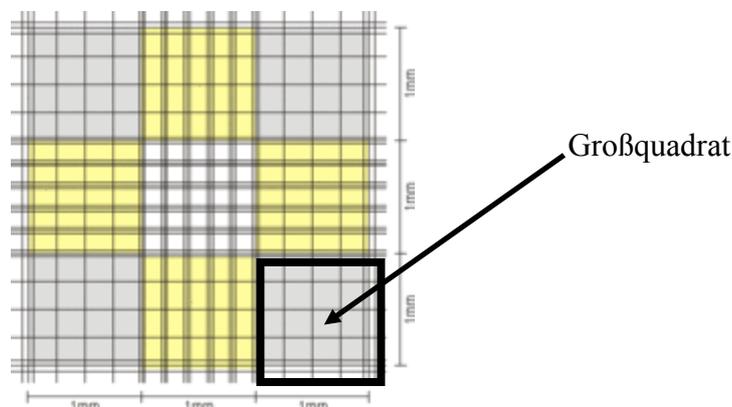


Abbildung 3.2: Zählkreuz der Neubauer-Zählkammer mit 4 Großquadraten (schwarze Markierung)

3.9.3 Immunmagnetische Zellisolation

Die Isolierung der CD105- und CD34-positiven Zellen aus der MNC-Fraktion erfolgte über eine immunmagnetische Separation. Der Anteil der CD105-positiven Zellen an den mononukleären Zellen des Knochenmarks entsprach ca. 0,01-0,001%, während der Anteil der CD34-positiven Zellen an den mononukleären Zellen des Knochenmarks 0,01% betrug.

3.9.3.1 Prinzip der Immunmagnetischen Zellisolation

Die immunmagnetische Zellisolation basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließender Säulenchromatographie. Der Antikörper der spezifisch gegen ein Epitop der Subpopulation gerichtet ist, ist an seinem Fc-Teil mit einem kolloidalen, magnetisierten „Microbead“ gekoppelt. Bei der anschließenden Säulenchromatographie durchlaufen die Zellen ein magnetisches Feld, das die Antikörper-markierten und somit magnetisierten Zellen in der Säule zurückhält. Die nicht-markierten Zellen durchlaufen die Säule. Nach Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können die AK-markierten Zellen eluiert werden (Abb. 3.3).

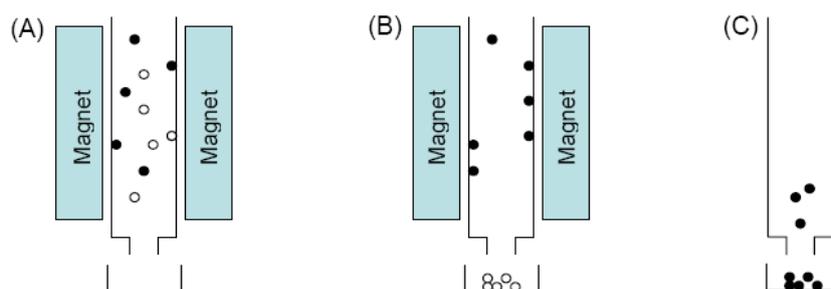


Abbildung 3.3: Schema der immunmagnetischen Isolierung. Bei der Säulenchromatographie durchläuft die Zellsuspension ein magnetisches Feld (A). Die Antikörper-markierten Zellen (schwarz) werden durch das magnetische Feld in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen (weiss) eluiert werden (B). Nach Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können die Antikörper-markierten Zellen mittels Stempel herausgedrückt werden (C)

3.9.3.2 „Magnetic Labeling“

Um die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen aus der mononukleären Zellsuspension zu selektionieren, wurden diese mit einem „Microbead“-gekoppelten Antikörper markiert, der spezifisch an das humane CD105-Epitop bindet. Für die magnetische Markierung wurden jeweils 10^7 MNCs in 80 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurden 20 μ l CD105 MicroBeads pro 10^7 MNCs hinzugefügt und der Ansatz bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Ansatz mit 10-20 Volumenanteilen MACS-Puffer aufgefüllt und 5 Minuten bei 20°C und 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann nach Verwerfen des Überstandes in 3-10 ml MACS-Puffer resuspendiert. Unmittelbar danach erfolgte die Säulenchromatographie.

Die Selektion der CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus der mononukleären Zellsuspension erfolgte mit dem Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit nach Angaben des Herstellers. Für die magnetische Markierung wurden jeweils 10^8 MNCs in 300 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurden 100 μ l FcR-Blocking-Reagent pro 10^8 MNCs und 100 μ l MACS CD34 MicroBeads (mouse IgG1, clon QBend/10) hinzugefügt und der Ansatz bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Das FcR-Blocking-Reagent vermindert nach Angaben des Herstellers die unspezifische Bindung des CD34-AK an den Fc-Teil.

MACS-Puffer:	450 ml PBS
	50 ml Humanalbumin 5%
	2 mM EDTA
	Lagerung bei 4°C

3.9.3.3 Säulenchromatographie

Einspannen der LS-Trennsäulen in den zugehörigen MACS-Magneten und Positionierung eines Falcon Tube unterhalb der Trennsäule. Vor Auftragen der vorbereiteten Zellsuspension wurden die Trennsäulen mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Nachdem die

Zellsuspension die Trennsäule durchlaufen hatte, erfolgte ein dreifacher Waschvorgang mit jeweils 3 ml MACS-Puffer, so dass die CD105-negativ Fraktion die Trennsäule durchlief während die CD105-positiv Fraktion in der Trennsäule angereichert wurde. Anschließend wurden die Trennsäulen aus dem Magneten entfernt und 5 ml MACS-Puffer auf die Säulen gegeben und die CD105-positiv Fraktion unter Druck eluiert (Abb. 3.3). Um die Spezifität dieses Anreicherungsverfahrens zu erhöhen, wurde die Säulenchromatographie mit einer neuen Trennsäule wiederholt. Anschließend wurde die Zellzahl durch einen Zählautomaten bzw. durch eine Vitalitätsfärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die isolierten CD105- und CD34-positiven Zellen wurden je nach weiterer Verwendung direkt eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Die Reinheitsbestimmung der immunmagnetisch angereicherten Zellen erfolgte mittels direkter Durchflusszytometrie [siehe 3.9.4.2].

3.9.4 Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung (FACS)

3.9.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften.

Bei der Durchflusszytometrie werden suspendierte Einzelzellen durch einen Laserstrahl geführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden können. Die suspendierten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom (Hüllstrom) nacheinander durch den Strahl eines Lasers geführt (Abb. 3.4). Durch die Querschnittsverringerng in der Meßküvette wird der laminare Proben- als auch der Hüllstrom beschleunigt und dadurch verjüngt (hydrodynamische Fokussierung). Der Abstand zwischen direkt aufeinanderfolgenden Zellen wird somit vergrößert, so dass die Zellen jeweils einzeln den Laserstrahl passieren. Am Messpunkt trifft ein monochromatischer Laserstrahl für den Bruchteil einer Sekunde auf die einzelnen Zellen.

3. Material und Methoden

Die erzeugten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden von einem optischen Detektionssystem erfasst und in elektrische Signale konvertiert. Streulicht, das in Richtung des einfallenden Laserstrahls fällt (engl. Forward scatter) korreliert mit der Zell- und Partikelgröße, während Streulicht das senkrecht zum einfallenden Laserstrahl fällt (engl. Side scatter), ein Maß für die Granularität darstellt. Das emittierte Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen und ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Das Fluorochrom absorbiert die Energie des Laserlichtes und gibt die absorbierte Energie durch Emission eines Photons mit größerer Wellenlänge (= geringere Energie) wieder frei. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird von entsprechenden Detektoren aufgefangen.

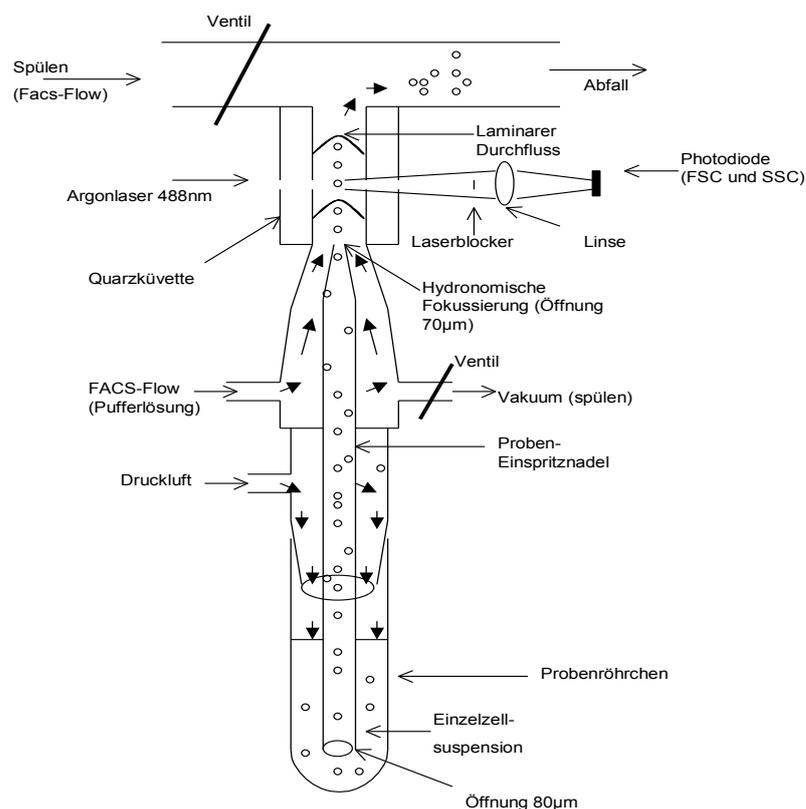


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Detektion in einem Durchflusszytometer (verändert nach Radbruch 2004)

Die durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit wurden mit einem FACSCalibur durchgeführt. In diesem Gerät trifft ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und

optional ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm auf die Zellen. Für die Fluoreszenzerfassung standen drei Kanäle FL1 ($\lambda_{FL1} = 530$ nm), FL2 ($\lambda_{FL2} = 585$ nm) und FL3 ($\lambda_{FL3} = 650$ nm) zur Verfügung. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software. Für jede Messung wurden 10.000 Zellen analysiert. Die Verarbeitung und Darstellung der ermittelten Daten erfolgte mit der WinMDI Software (Version 2.8).

3.9.4.2 Ein-Farben-Fluoreszenz

Zur Qualitätskontrolle der immunmagnetisch isolierten CD105- und CD34-positiven Zellen wurden von jeder Probe zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen entnommen und diese mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Verwendet wurde ein monoklonaler Anti-CD105-AK welcher an PE gekoppelt war und ein isotyp-identischer monoklonaler Anti-IgG1-FITC-AK als Kontroll-AK für die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. Desweiteren wurde ein monoklonaler Anti-CD34-AK welcher an FITC gekoppelt war und ein isotyp-identischer monoklonaler Anti-IgG1-FITC-AK als Kontroll-AK für die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen verwendet.

Für die Messung wurden die Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 2 Minuten bei 2400 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 μ l PBS-Puffer resuspendiert und je 50 μ l in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 μ l AK wurden die Zellen 20 min bei 4-8°C unter Lichtausschluß inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Proben mit je 1000 μ l PBS aufgefüllt und 5 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert und nach verwerfen des Überstandes in 500 μ l PBS resuspendiert. Die Reinheit der immunmagnetisch isolierten CD105-positiven Zellen betrug zwischen 91,5 und 98%, die der CD34-positiven Zellen zwischen 95 und 98% (Abb. 3.5).

3. Material und Methoden

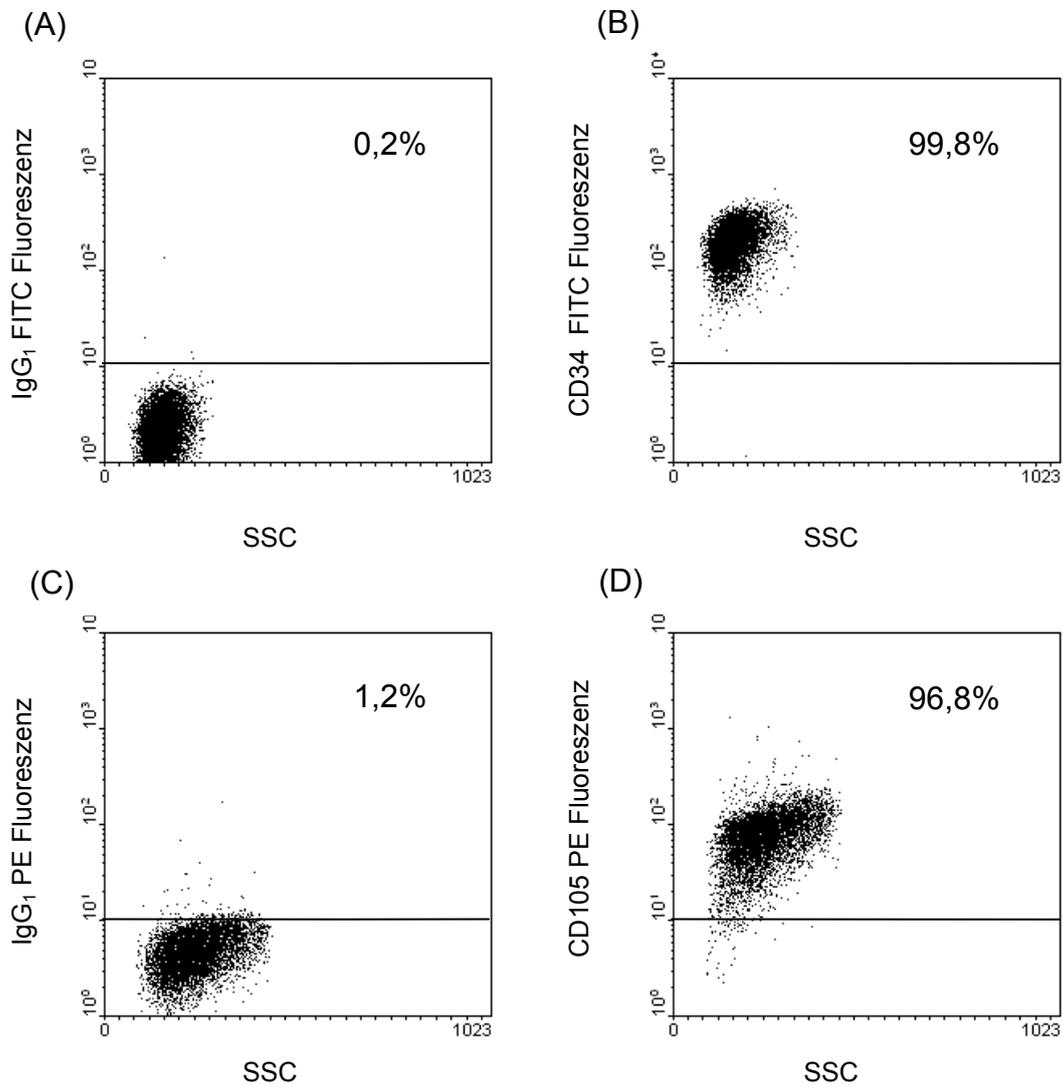


Abbildung 3.5: Reinheitsbestimmung von immunmagnetisch isolierten CD34- und CD105-positiven Zellen. Punktwolkendarstellung („Dot-Plot“ Darstellung) der FITC- und PE- Fluoreszenz mit der jeweiligen Isotypkontrolle (A,C) und dem CD34- bzw. CD105-Ansatz (B,D). Die Zellen unterhalb der Fluoreszenz-Intensitätsschwelle (waagrechte Linie) sind definiert als CD34- bzw. CD105-negativ. Die Reinheit der CD34- bzw. CD105-Zellen ergibt sich aus der Subtraktion der Werte aus der Isotypkontrolle (unspezifische Antikörperbindungen) von den CD34- bzw. CD105- Versuchsansätze. Die Reinheit der CD34-positiven Zellen in diesem Beispiel entspricht somit 99,6%, die der CD105-positiven Zellen 95,6%

3.9.4.3 Zwei-Farben-Immunfluoreszenz

Zur Analyse des Oberflächenprofils der mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen erfolgten Zweifarbenfluoreszenzanalysen von CD34- und CD105-positiven Zellen. Die Zweifarbenfluoreszenzanalysen erlaubten eine Vielzahl von Analysen bei sparsamem Einsatz des Probenmaterials. Eingesetzt wurden Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper gegen CD7, CD14, CD15, CD19, CD29, CD31, CD34, CD38, C44, CD45, CD64, CD71, CD105, CD106, CD117, CD138, GlyA und HLA-DR (Tab. 3.6) und die entsprechenden Isotyp-identischen monoklonalen Anti-IgG1/IgG2a/IgG2b als Kontroll-Antikörper. Für die Analyse wurden je 1×10^5 CD34- bzw. CD105-positive Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 2 Minuten bei 2400 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 50 µl PBS resuspendiert und mit je 10 µl der entsprechenden monoklonalen Antikörper für 20 Minuten bei 4-8°C unter Lichtausschluß inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Proben mit je 1000 µl PBS aufgefüllt und 5 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 500 µl PBS resuspendiert.

3.9.5 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

3.9.5.1 Prinzip der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung (ISH) wurde erstmals 1969 beschrieben (Gall and Pardue 1969). Die ISH machte es möglich, markierte DNA- oder RNA-Sequenzen als Sonden zu verwenden und ihr Vorkommen direkt im biologischen Präparat (in situ) wie z.B. in Metaphasenchromosomen oder Interphasezellen nachzuweisen. Das Prinzip der ISH beruht darauf, dass markierte einzelsträngige DNA- oder RNA-Fragmente (Sonden) an komplementäre Basensequenzen binden und stabile Doppelstränge entstehen. Bei der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgt die Markierung der Sonde entweder direkt mit einem Fluorochrom oder indirekt mit einem Hapten wie Biotin oder Digoxigenin, die nach der Hybridisierung mittels spezifischer an das Hapten bindendem Fluorochrom-

markiertem Streptavidin oder Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen werden (Gozzetti and Le Beau 2000). Damit sich die Sonde mit zellulärer DNA (Ziel-DNA) im Bereich komplementärer Basensequenzen zu einem Hybridmolekül zusammenlagern kann, müssen die Nukleinsäuren als Einzelstränge vorliegen, weshalb die doppelsträngigen DNA-Moleküle durch Erhitzen in Einzelstränge gespalten werden (Denaturierung). Anschließend erfolgt durch Absenken der Temperatur die Hybridisierungsreaktion. Nach der Hybridisierungsreaktion werden in einer Reihe von Waschschritten nicht-gebundene Sondenmoleküle entfernt. Die Fluoreszenzsignale können dann mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Der Anteil korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang zu Sonde und Ziel-DNA (Stringenz) wird durch verschiedene Versuchsbedingungen beeinflusst. Entscheidend sind die Temperatur bei Denaturierung und Hybridisierung sowie die Konzentrationen an Salzen und helixstabilisierenden Molekülen wie Formamid in den Hybridisierungs- und Waschlösungen (Leith and Jackson 1994).

3.9.5.2 FISH mittels BCR-ABL Zweifarben-Doppelfusion-Translokationssonde

Die in dieser Arbeit verwendete Vysis LSI BCR-ABL Zweifarben-Doppelfusions-Translokationssonde besteht aus einer Mischung aus BCR-Sonde (direkt markiert mit SpektrumGreen) und ABL-Sonde (direkt markiert mit SpektrumOrange). Die ABL-Sonde beginnt zentromerisch von den Argininsuccinat-Synthetase-Genen (ass) und erstreckt sich ungefähr 650 kb bis über das letzte ABL Exon in Richtung Telomer. Die BCR-Sonde überspannt einen genomischen Bereich von ungefähr 1,5 Mb. Sie beginnt innerhalb des variablen Segments der leichten Kette des Immunglobulin-Lokus (Lambda Typ), erstreckt sich auf Chromosom 22 über die BCR Region und endet an einem Punkt ungefähr 900 kb vom BCR-Gen entfernt in Richtung Telomer. Lediglich ein Bereich repetitiver Sequenzen von ca. 300 kb zwischen den Translokationspunkten ist nicht über die Sonde abgedeckt. Jedoch sind alle bisher beobachteten unterschiedlichen Bruchstellen erfasst. Während man in Ph-negativen Zellen zwei orangefarbene und zwei grüne Signale entsprechend der normalen Interphasenkernen von Chromosom 9 und 22 ohne Fusion nachweisen kann, finden sich in den Ph-positiven Zellen ein oranges, ein grünes, sowie zwei gelb

3. Material und Methoden

erscheinende Fusionssignale, die sich bei einer balancierten Translokation aus der Überlagerung der Farbstoffe an den Fusionsstellen ergeben.

Ausgangsmaterial für die FISH waren die zuvor mittels immunmagnetischer Zellisolation erhaltenen CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sowie die CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. Die hoch angereicherten Zellen wurden bei 2000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellt in 5 ml Ibrahim-Lösung durch vortexen resuspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2000 U/min für 4 Minuten. Das Zellpellet wurde in 5 ml frisch zubereitetem Carnoy's Fix durch vortexen resuspendiert und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um das Probenmaterial zu fixieren. Nach erneuter Zentrifugation und in Abhängigkeit der Trübung des Überstandes wurden die Proben erneut in Carnoy's Fix gewaschen. Das Probenmaterial wurde anschließend bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert

Ibrahim-Lösung: 1:19 (Eisessig : Aqua. dest.)

Carnoy's Fix: 1:3 (Eisessig : Methanol)

Zur Hybridisierung des Probenmaterial wurden 10 µl auf einen zuvor mittels Diamantschreiber markierten Objektträger aufgetropft. Zur Beurteilung der Zelldichte erfolgte die Kontrolle in einem Phasenkontrastmikroskop. Bei ausreichender Zelldichte wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) für je 1 Minute dehydriert und in 100%igem Ethanol bis zur Weiterbearbeitung gelagert. Für die anschließende Hybridisierung musste zunächst ein Sondengemisch nach Herstellerangaben aus Hybridisierungspuffer, DNA-Sonde und Aqua dest. hergestellt werden. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass die DNA-Sonden nur kurz dem Licht ausgesetzt waren.

3. Material und Methoden

LSI/WCP Hybridisierungspuffer	7µl
LSI DNA-Probe	1µl
H ₂ O	2µl
Gesamtvolumen	10µl

Tabelle 3.8: Reaktionsansatz DNA-Sonde

Um den restlichen Alkohol zu verdampfen wurden die Objektträger auf eine Heizplatte überführt. Für die Hybridisierung wurden 10 µl des vorbereiteten Sondengemischs auf die markierte Stelle des Objektträgers aufgetragen. Die Proben wurden dann luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum (Marabuwerke GmbH & Co KG, Tamm) abgedichtet, um die Proben vor Austrocknung zu schützen. Zur Hybridisierung wurden die Präparate in einen Hybridisierungsofen überführt. Im HYBrite-System erfolgte die Denaturierung von Ziel-DNA und DNA-Sonde simultan bei 75°C für 1 Minute. Anschließend erfolgte die Hybridisierung bei 37°C für 20 Stunden. Sowohl Denaturierung und Hybridisierung liefen als programmierter Arbeitsprozess automatisch ab.

Um überschüssiges und unspezifisch gebundenes Sondenmaterial zu entfernen und somit störende Eigenfluoreszenz zu vermeiden, wurden die Proben einem Waschvorgang unterzogen. Dazu wurden das Fixogum und das Deckglas vorsichtig entfernt und die Objektträger in eine Küvette mit zuvor auf 74°C erhitzter Waschlösung 1 überführt. Die Objektträger wurden 2 Minuten in Waschlösung 1 gewaschen und anschließend in eine Küvette mit Waschlösung 2 überführt. Nach 1 Minute bei Raumtemperatur wurden die Objektträger unter Lichtausschluß luftgetrocknet.

Waschlösung 1: 0,4 x SSC
0,3 % NP-40

Waschlösung 2: 2 x SSC
0,1 % NP-40

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden je 10 µl DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) in den Zielkreis pipettiert und erneut eine Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum abgedichtet.

Die Präparate konnten sofort fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet oder bei -20°C gelagert werden. Die Dokumentation der FISH Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD (charge coupled device) Kamera. Mit der Isis Software von Metasystems wurden repräsentative Bilder der jeweiligen Präparate aufgenommen und unter Verrechnung der einzelnen Farbsignale ausgewertet. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellkerne ausgezählt. Es wurden nur Zellkerne berücksichtigt bei denen der gesamte Kerne ohne Überlappungen mit anderen Zellkernen oder Artefkten sichtbar war. Für die Auswertung ist es entscheidend, dass jedes Labor seinen eigenen Cut-Off-Level für die verwendeten Sonden und für das verwendete Material erstellt, da die Rate falsch positiver oder falsch negativer Signale von der Sonde und auch vom Hersteller der Proben abhängig ist.

Dazu wurden jeweils 200 CD34-positive Zellen von gesunden Spendern ausgewertet und alle aberranten Signale notiert, die nicht sicher als Fusionssignal identifiziert werden konnten. Aus diesen Daten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der Untersuchung gebildet. Der Cut-Off-Level wurde dann aus der Summe des Mittelwertes und der dreifachen Standardabweichung gebildet. Der Cut-Off-Level lag bei 3%, d.h. die Anzahl der Kerne mit Fusionssignal musste über dem Cut-Off-Level (Grenzwert) für die Sondenkombination 1 rotes, 1 grünes, 2 zwei orangerote/grüne (gelbe) Fusionssignale liegen, damit die jeweilige Probe als BCR-ABL positiv bewertet wurden.

3.9.6 CFU-Assay (Colony-forming-Unit-Assay) mit mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

3.9.6.1 Prinzip des CFU-Assays

“Colony-forming assays” stellen eine etablierte Methode zur funktionellen Untersuchung determinierter Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungsgrade dar. Sie ermöglichen

eine Aussage über die Differenzierungskapazität von Vorläuferzellen durch Zellkultur in semisoliden Medien (z.B. Methylzellulose). Aufgrund der Zytokin- und Wachstumsfaktoren-Zusammensetzung lässt sich selektiv das Wachstum bestimmter Zellreihen stimulieren. So bilden hämatopoetische Vorläuferzellen mikroskopisch sichtbare Kolonien, die soweit ausreifen, dass ihre Zugehörigkeit zu erythroiden oder myeloiden Zellreihe bestimmt werden kann. Durch die Viskosität des Mediums wird eine Wanderung der Zellen verhindert, so dass die Tochterzellen Kolonien bilden, die sich mikroskopisch anhand von Form, Farbe und Morphologie typisieren lassen.

3.9.6.2 CFU Assay mit mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

Um das Koloniebildungsverhalten von CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen wurden CFU Assays durchgeführt.

In Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Zellmengen wurden die Versuche mit 1×10^3 bis 2×10^4 Zellen pro Kulturschale durchgeführt. Pro Doppelansatz wurden 2,7 ml Methocult SF^{BIT} H 4436 in 5 ml Röhrchen vorgelegt. Das verwendete Methylzellulose-Medium enthielt folgende Zusätze: Bovin Serum Albumin, rekombinates humanes Insulin, humanes Transferrin (Eisen-gesättigt), 2-Mercaptoethanol, L-Glutamin, rh Stem cell factor, rh GM-CSF, rh IL-3, rh IL-6, rh G-CSF, rh Erythropoietin. Die zuvor immunmagnetisch isolierten CD105-positiven Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation bei 1600 U/min für 2 Minuten in RPMI 1640-Medium resuspendiert. Volumen und Zellen wurden so bemessen, dass nach Zugabe zum Methylzellulose-Medium ein Endvolumen von 3 ml entstand. Durch 1-minütiges „vortexen“ wurden die Zellen homogen im Medium verteilt. Je drei Petrischalen mit 35 mm Durchmesser wurden in eine Petrischale mit 96 mm Durchmesser platziert. Eine Petrischale wurde zur Schaffung eines feuchten Milieus mit 1 ml PBS-Puffer gefüllt, in die beiden verbleibenden Petrischalen wurde jeweils 1 ml des Methylzellulose-Zellgemischs pipettiert. Alle Ansätze wurden 14 Tage bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank inkubiert.

3.9.6.3 Auswertung der Colony forming assays

Die Auswertung der Colony-forming assays erfolgte nach einer 14-tägigen Inkubationszeit mit Hilfe eines Auflichtmikroskops bei 100-facher Vergrößerung.

Es wurden Burst-forming-Units-Erythrocytes (BFU-E) und Colony-forming-Units-Granulocyte/Monocyte (CFU-GM) unterschieden.

3.9.7 Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Arrays

3.9.7.1 Prinzip der cDNA-Arrays

Genexpressionsanalysen mit RT-PCR, RNase Protection Assays oder Northern Blots lassen nur die Untersuchung weniger Gene und Zielregionen zum gleichen Zeitpunkt zu. Die „cDNA-Array-Technik“ hingegen ermöglicht die simultane genomweite Expressionsanalyse einer Vielzahl von Genen auf mRNA Niveau.

Auf Atlas cDNA Arrays sind unterschiedliche cDNA Fragmente oder Oligonukleotide von 200 bis 2000 Basenpaarlänge auf Nylonmembranen, Plastikfilmen oder Glasplatten immobilisiert. In dieser Arbeit wurden cDNA-Assays auf Nylonmembranen verwendet, da diese eine hohe Qualität hinsichtlich des Expressionsprofils erzielen. Die verwendeten Arrays beinhalten 1176 genspezifische cDNA-Fragmente.

Für die cDNA-Arrays wird zuvor isolierte mRNA zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Als Substrat für die entstehende cDNA werden radioaktiv markierte Triphosphate verwendet, die in die wachsenden cDNA-Stränge eingebaut werden. Bei der anschließenden Hybridisierung binden die radioaktiv-markierten cDNA-Moleküle komplementär an die korrespondierenden Sequenzen auf dem Array. Somit entsteht aufgrund der emittierten Strahlung ein spezifisches Hybridisierungsmuster, welches mit Software-Programmen quantitativ ausgewertet werden kann.

Für die Genexpressionsanalysen wurde das BD AtlasTM cDNA Expression Array Kit verwendet. Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil des Kits. Die Genexpressionsanalysen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.9.7.2 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das „RNeasy Mini Kit“ verwendet. Alle nachfolgenden Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil des Kits. Die RNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion waren die zuvor mittels immunmagnetischer Zellisolation erhaltenen und lysierten CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. Das Verfahren beruht auf der selektiven Bindung aller RNA-Moleküle, die größer als 200 Nukleotiden sind, an einer Silica-Gel-Membran und der schrittweisen Reinigung der Gesamt-RNA von anderen intrazellulären Bestandteilen unter Verwendung einer Mikrozentrifuge.

Die bei -80°C gelagerten Lysate wurden auf Eis aufgetaut und in Volumina von max. 700 µl auf QIAshredder Säulen aufgetragen. Diese Säulen enthalten eine Biopolymermembran und dienen in Kombination mit einer zweiminütigen Zentrifugation bei maximaler Umdrehung der Homogenisierung der Lysate. Die Säulen wurden nach diesem Schritt verworfen und das in einem 2 ml Sammelgefäß enthaltene Eluat mit dem gleichen Volumen 70 %igen Ethanol vermischt. Danach wurde das Gemisch auf die RNeasy Elute Spin Säule mit einer Silicagel-Membran aufgetragen und bei 10.000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und für einen ersten Waschschriff wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Membran aufgetragen, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation bei 10.000 U/min für 15 Sekunden. Das entstehende Eluat wurde erneut verworfen. Die Säule wurde nun in ein neues Sammelgefäß überführt und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 13.000 U/min für 2 Minuten. Anschließend wurden die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 U/min eluiert. Nachfolgend wurden RNA-Gehalt und -Reinheit des Eluats photometrisch bestimmt.

3.9.7.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Menge an einzelsträngiger RNA zu bestimmen, wurde die Extinktion der Proben in einem Multiwell-Photometer (Eppendorf GmbH, Seelze) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen.

Über die optische Dichte der Proben bei 260 nm kann die Konzentration der einzelsträngigen RNA bestimmt werden. Eine OD von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm steht für die Reinheit der Nukleinsäure und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die entsprechenden Messungen wurde 1 µl der RNA in 49 µl H₂O aufgenommen. Die Proben wurden gegen den Leerwert (50 µl H₂O) gemessen.

3.9.7.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Für die Konvertierung der mRNA zu cDNA wurde ein Gen-spezifisches Primergemisch (CDS-Primer-Mix BD Bioscience Clontech, Heidelberg) verwendet, welches nur Primer der „gespotteten“ cDNA der Arrays enthielt. Dies erhöht durch Reduktion der Komplexität des resultierenden cDNA-Pools die Sensitivität und ermöglicht es kleinste RNA-Mengen einzusetzen. Als Substrat für die entstehende cDNA wurde α -³²P-Desoxyadenosintriphosphat (dATP) verwendet.

Für die cDNA-Synthese wurden 2-5 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 1-2 µl benötigt. Wurde diese Konzentration nicht erreicht, wurde die entsprechende RNA-Menge in einer Speedvac unter Vakuum eingetrocknet und in 1-2 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

Für die Synthese der cDNA wurde zunächst ein Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur vorbereitet:

3. Material und Methoden

Reaktionsgemisch (ohne Enzym)	pro Reaktion
5 x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl[pH8,3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	2 µl
10 x dNTP Mix (5 mM dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
[α - ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)	3,5 µl
DTT (100 mM)	0,5 µL
Gesamtvolumen	7 µl

Tabelle 3.9: Reaktionsgemisch cDNA-Synthese

Die entsprechend vorbereiteten RNA Proben wurde mit 1,5 µl CDS Primermix in einem 0,5 ml PCR-tube vermischt, abzentrifugiert und in einem vorgeheizten PCR Thermal Cycler für 4,5 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl MMLV- Transcriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) pro Reaktion zum Reaktionsgemisch. Nach einer 3-minütige Inkubation bei 50°C wurden 8 µl des entsprechenden Reaktionsgemisches dem Ansatz zugegeben, die Proben vorsichtig durchmischt und erneut für 25 Minuten bei 50°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 10 x Termination Mix (0.1 M EDTA [pH 8,0], 1 mg/ml Glykogen) pro Reaktion beendet. Um ungebundenes α -³²P-Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und unspezifischen cDNA-Fragmenten (<100 bp) zu entfernen wurde eine Säulenchromatographie angeschlossen.

3.9.7.5 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung der radioaktiv markierten cDNA erfolgte im nächsten Schritt die Säulenchromatographie. Dazu wurden die cDNA-Proben mit 190 µl NT2-Puffer vermischt und anschließend auf NucleoSpin Extraktionssäulen aufgetragen, die zuvor in 2 ml Sammelgefäße eingesetzt worden waren. Anschließend wurden die Proben 1 Minute bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die NucleoSpin Extraktionssäulen wurden anschließend auf

neue 2 ml Sammelgefäße transferiert und nach Auftragen von 400 µl NT3-Puffer auf die Extraktionssäule erneut 1 Minute bei 14.000 U/min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Zur Elution der gereinigten cDNA erfolgte das Auftragen von 100 µl NE-Puffer auf die NucleoSpin Extraktionssäulen, nachdem diese zuvor in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 U/min für 1 Minute. Um die Effizienz der radioaktiven Markierung zu überprüfen, wurde die Radioaktivität in einem β -Counter über eine Szintillationsmessung bestimmt. Die Radioaktivität der Proben sollte bei $>5 \times 10^6$ cpm liegen.

3.9.7.6 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wird die radioaktiv markierte cDNA nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die entsprechende cDNA auf Nylonmembranen gebunden. Um unspezifische DNA-Bindungen auf den Nylon Arrays zu reduzieren, wurden diese zunächst prähybridisiert. Pro Nylonmembran wurde 5 ml ExpressHyb Hybridisierungslösung auf 68°C erwärmt und mit 0,5 mg Heringssperma-DNA (Gibco BRL, Eggenstein) vermischt, die zuvor bei 95-100°C denaturiert wurde. Bis zum Gebrauch der Prähybridisierungslösung wurde diese bei 68°C inkubiert. Für die Hybridisierung wurden die Hybridisierungsflaschen mit deionisiertem Wasser gefüllt und die Nylonmembranen eingebracht, so dass sie an der Glaswand anlagen und die cDNA Spots zum Flaschenlumen ausgerichtet waren. Nach Entfernung des Wassers wurde die vorbereitete Prähybridisierungs-Lösung in die Hybridisierungsflaschen überführt und die Nylonmembranen 30 Minuten bei 68°C in einem Hybridisierungsofen bei kontinuierlicher Rotation (6 U/min) inkubiert.

Währenddessen wurden die gereinigten cDNA Proben für die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wurden die gereinigten markierten cDNA Proben mit 1 M NaOH und 10 mM EDTA bei 68°C für 20 Minuten denaturiert.

3. Material und Methoden

Markierte Probe	~100 μ l
10 x Denaturierungspuffer (1 M NaOH, 10 mM EDTA)	~11 μ l
Gesamtvolumen	~111 μ l

Tabelle 3.10: Reaktionsgemisch Denaturierung cDNA

Nach der Denaturierung erfolgte eine Neutralisation mit 1 M NaH_2PO_4 . Die hinzugefügte C_{0t} -1 DNA (Qiagen, Hilden) dient der Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungen und der Absättigung repetitiver Sequenzen. Der Ansatz wurde anschließend 10 Minuten bei 68°C inkubiert.

C_{0t} -1 DNA	5 μ l
2 x Neutralisierungspuffer (1 M NaH_2PO_4 , pH 7,0)	~115 μ l
Gesamtvolumen	~230 μ l

Tabelle 3.11: Reaktionsgemisch Neutralisation denaturierte cDNA

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben in die Hybridisierungsflaschen überführt und 20 Stunden bei 68°C unter kontinuierlicher Rotation (6 U/min) hybridisiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde das Hybridisierungsgemisch entfernt und die Nylonmembranen einem hochstringenten Waschvorgang unterzogen. Dazu wurden die Nylonmembranen drei Mal für 30 Minuten bei 68°C mit Waschlösung 1 und ein Mal für 30 Minuten bei 68°C mit Waschlösung 2 gewaschen.

Waschlösung 1: 2 x SSC
1 % SDS (Natriumdodecylphosphat)

Waschlösung 2: 0,1 x SSC
0,5 % SDS

Anschließend wurden die Nylonmembranen in 2 x SSC überführt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gewaschenen Nylonmembranen wurden in Plastikfolien eingeschweißt und für 24-96 Stunden auf einen PhosphorImager Screen aufgelegt und in Expositionskassetten überführt. Die Expositionskassetten wurden in einer Schutzbox gelagert, um die natürliche Hintergrundstrahlung zu minimieren. Die Inkubationszeit war abhängig von der jeweiligen Ausgangsradioaktivität.

3.9.7.7 Quantifizierung, Normalisierung und statistische Analysen

Die Intensität der Expressionssignale wurde durch einen PhosphorImager mit Hilfe der BAS-Reader 3.01 Software (Raytest, Straubenhard Deutschland) gescannt.

Die Bildanalyse und die Berechnung der Signalintensität und der Hintergrundwerte der Arrays erfolgte mittels AIDA Image Analyser Software 2.09 (Raytest, Straubenhard, Deutschland). Nach Subtraktion der Hintergrundstrahlung wurde die mediane Intensität der 20% stärksten exprimierten Gene berechnet. Die Rohdaten wurden dann mittels dieser medianen Intensität normalisiert und die Expressionsrate als Verhältnis der Punktintensität zu medianer Intensität ausgedrückt.

Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ein Signifikanzniveau von 99% ($p < 0,01$) wurde als signifikant differentielle Genexpression angesehen. Zur hierarchischen Clusteranalyse wurde die „hcclust“-Funktion der Statistik-Software „R“ verwendet. Diese ist Teil des Bioconductor Projekts (<http://www.bioconductor.org>) und basiert auf einem „average linkage clustering“-Algorithmus.

3.9.8 Quantitative “Real-Time”-PCR

3.9.8.1 Prinzip der “Real-Time” RT-PCR (Light Cycler System)

Die quantitative “Real-Time”-PCR erlaubt einen exakten quantitativen und qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren bei geringem Zeitaufwand.

Dazu werden zwei Konzepte vereint, zum einen die Verkürzung des Amplifikationszyklus und zum anderen die kontinuierliche Messung des PCR-Produktes. Die Verkürzung des Amplifikationszyklus wird erreicht durch kleine Probenvolumina, durch die spezielle Kinetik und durch die spezifischen Reaktionsbedingungen. Die Teilreaktionen der Amplifikation (Annealing, Denaturation und Elongation) laufen nicht nur in Phasen mit konstanter Temperatur ab, sondern erfolgen zu jedem Zeitpunkt im Zyklus, also auch in den Phasen des Temperaturanstiegs bzw. –abfalls. Dabei ist die Geschwindigkeit abhängig von der jeweiligen Temperatur. Es finden also mehrere Reaktionen gleichzeitig statt. Des Weiteren findet die PCR-Reaktion in Glaskapillaren statt, welche durch Luft abgekühlt bzw. erhitzt werden. Die geringe Wärmekapazität von Luft und das optimale Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Glaskapillaren ermöglicht eine schnelle Änderung der Cycle-Temperatur. Zusammen mit der Verkürzung der einzelnen Amplifikationsphasen lässt sich somit die Dauer der gesamten PCR um ein Vielfaches verringern.

Die kontinuierliche Messung des PCR-Produktes erfolgt durch Detektion eines Fluoreszenzsignals, z.B. SYBR Green I, welches während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsprodukts ansteigt. Die verwendeten klaren Borsilikat-Glaskapillaren fungieren dabei als Reaktionsgefäß und als Küvette für die Fluoreszenzmessung. SYBR Green I kann nur nach Bindung an doppelsträngiger DNA (dsDNA) detektiert werden. Es interkaliert dabei unspezifisch in den kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA. Während der Denaturierungs- und Annealingphase liegt kaum doppelsträngige DNA vor, und es wird nur eine schwache Fluoreszenz gemessen. Am Ende der Elongationsphase liegt die meiste DNA in Doppelsträngen vor und die maximale Menge SYBR Green I ist gebunden. Dies entspricht dem maximalen Fluoreszenzsignal. Durch Messung der Fluoreszenz am Ende der Elongationsphase ist die steigende Menge des PCR-Produktes von Zyklus zu Zyklus detektierbar. Der LightCycler stellt die gemessene

3. Material und Methoden

Fluoreszenz kontinuierlich am Monitor graphisch dar. Die Kurve zeigt einen typischen 3-phasigen Aufbau. In der ersten Phase ist das Hintergrundsignal des Systems größer als das Signal des eingesetzten Fluorochroms. Mit Zunahme des PCR-Produktes steigt die Kurve exponentiell bis es zum Stillstand der Reaktion kommt. Das Eintreten der Reaktion in die Plateauphase ist abhängig von der Verfügbarkeit der dNTP's, Primer, der initialen Templatekonzentration und der Produktkonzentration.

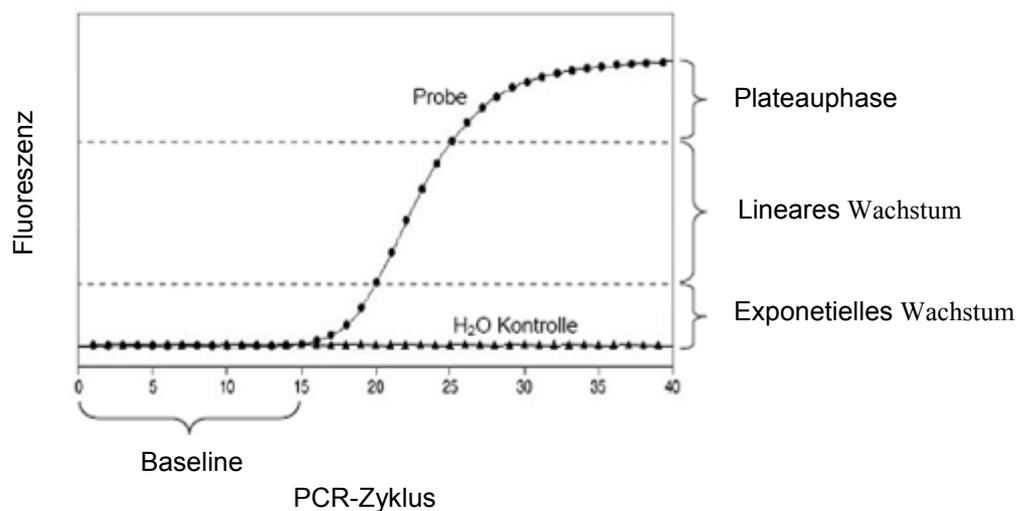


Abbildung 3.6: Phaseneinteilung der detektierten Fluoreszenz bei der „Real-Time“-PCR mit SYBR Green I

Ein Monitoring der Fluoreszenz in jedem Zyklus kann zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA benutzt werden (Wittwer et al. 1997). Höhere Ausgangsmengen verschieben die Kurve nach links. Dieser in Zykluszahlen fraktionierte Shift ist proportional zum Zweierlogarithmus der initialen Templatekonzentration. Standardkurven, interne und externe Standards ermöglichen eine relative Quantifizierung des PCR-Template. Eine Spezifizierung des entstandenen PCR-Produktes erfolgt durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR.

3.9.8.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) für „Real-Time“-PCR

3.9.8.2.1 Prinzip der cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Ribonukleinsäuren können nicht als Template für eine PCR eingesetzt werden, so dass diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden müssen (Kawasaki et al. 1989). Dies erfolgt mittels reverser Transkriptasen (RT), die aus Retroviren isoliert werden können. Es gibt verschiedene reverse Transkriptasen unterschiedlicher Herkunft und verschiedener enzymatischer Aktivität. Diese Enzyme sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen und können RNA- als auch DNA-Sequenzen als Matrix verwenden. Im ersten Schritt heften sich die Polymerasen an den RNA-Einzelstrang und ein komplementärer DNA-Strang wird gebildet. Im zweiten Schritt wird über die Exoribonukleaseaktivität der reversen Transkriptase der Hybridstrang aus RNA-DNA hydrolisiert. Anschließend wird ein kompletter DNA-Doppelstrang synthetisiert. Zum Umschreiben der RNA in DNA benötigt die reverse Transkriptase einen Primer in Form eines kurzen Oligonukleotids. Diese Primer können eine spezifische oder auch eine zufällige Sequenz (Random-Primer) haben und sind meist 6-20 Nukleotide lang.

3.9.8.2.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) für „Real-Time“-PCR

Die cDNA-Synthese in dieser Arbeit erfolgte durch eine Moloney Murine Leukemia Virus reverse Transcriptase (MMLV-RT, 200 U/μl, Invitrogen, Darmstadt), welche u.a. die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aufweist. Als Primer wurde ein zufällig synthetisiertes Hexamer verwendet. Die eingesetzte RNA wurde zuvor wie unter 3.9.7.2 beschrieben mittels RNeasy Mini Kit isoliert. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis.

Für die Synthese der cDNA wurde zunächst ein Reaktionsgemisch vorbereitet:

3. Material und Methoden

	pro Reaktionen
5 x M-MLV Puffer	10,5 µl
4 x dNTPs 25 mM	2,1 µl
N6 (Randomprimer) 5 mg/ml	1,1 µl
DTT 0,1 mM	0,53 µl
Rnase freies Wasser	10,3 µl
Gesamtvolumen	24,53 µl

Tabelle 3.12: Reaktionsgemisch cDNA-Synthese

Von dem Reaktionsgemisch wurden lediglich 19 µl weiter verwendet. Die Angaben beziehen sich auf eine Einzelprobe und wurden entsprechend der verwendeten Probenanzahl angepasst.

Anschließend wurden die RNA-Proben (19 µl) in 0,5 ml Eppendorf PCR-Gefäße überführt und bei 65°C 10 Minuten inkubiert um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Nach der Inkubation wurden die Proben 7 Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 21 µl des Reaktionsgemisches dem zuvor 1,3 µl MMLV-Transcriptase und 0,6 µl RNasin (Invitrogen, Darmstadt 40 U/µl) zugesetzt wurden. Beim RNasin handelt es sich um einen RNase-Inhibitor der den Abbau der RNA während der Reaktion minimiert. Die reverse Transkription erfolgte über 60 Minuten bei 37°C (PCR-Mastercycler gradient, Eppendorf GmbH, Wesseling) Anschließend wurden die MMLV Reverse-Transcriptase für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert und die Proben auf 4°C abgekühlt. Die cDNA-Proben wurden anschließend bei 4°C über Nacht oder bei -20°C gelagert.

3.9.8.3 Quantitative „Real-Time“-PCR

Für die quantitative „real-Time“-PCR wurde das Fast Start DNA Master SYBRGreen 1 Kit verwendet. Alle nachfolgenden Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil des Kits. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die eingesetzte RNA wurde zuvor wie unter 3.9.7.2 beschrieben mittels RNeasy Mini Kit

3. Material und Methoden

isoliert. Alle Primer wurden mit Hilfe der LightCycler Probe Design-Software, Version 1.0 (Roche Applied Science, Mannheim) ausgewählt und wurden von der Firma TIBMolBiol bezogen (siehe Tab.:3.8). Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurde Exon-übergreifende Primer ausgewählt. Als externe Kontrolle und Referenz für die relative Quantifizierung wurde das „House-Keeping-Gen“ GAPDH (3-Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) eingesetzt. Alle Arbeiten erfolgten wenn nicht gesondert erwähnt auf Eis unter Lichtausschluß.

Für die quantitative „Real-Time“-PCR wurde zunächst ein Reaktionsgemisch vorbereitet

	1 Reaktion
H ₂ O, steril PCR grade	11,6 µl
MgCl ₂ (4 mM)	2,4 µl
Forward Primer 10 µM	1 µl
Reverse Primer 10 µM	1 µl
SYBRGreen I	2 µl
Gesamtvolumen	18 µl

Tabelle 3.13: Reaktionsgemisch „Real-Time“-PCR

Jeweils 18 µl des Reaktionsgemisches wurden in speziell für den Light Cycler konzipierten Glaskapillaren vorgelegt, welche sich in speziell vorgekühlten Metalladaptoren (LightCycler Sample Adapter) befanden. Anschließend wurden 2 µl der 1:5 verdünnten cDNA Proben bzw. 2 µl H₂O (Negativkontrolle) in die Kapillaren pipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die Glaskapillaren wurden mit entsprechenden Deckeln verschlossen und 10 Sekunden bei 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler Probenkarussell überführt und die PCR gestartet. Die PCR unterteilte sich in eine Präinkubationsphase in der die Taq-Polymerase aktiviert wurden, einer 45 Zyklus langen Amplifikationsphase mit Denaturierungs-, Annealing- und Elongationphase, sowie einer abschließenden Schmelzkurvenanalyse. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben auf 40°C abgekühlt.

3. Material und Methoden

Zur System-unabhängigen Kontrolle der Amplifikation wurden die LightCycler-Amplifikationsprodukte in einer Gelelektrophorese dargestellt. Dazu wurde das Amplifikationsprodukt durch Zentrifugation der Glaskapillaren in Eppendorf Reaktionsgefäße transferiert.

Reaktionsschritt	Temperatur	Reaktionsdauer	Temperaturänderung
1. Initiale Denaturierung:	95°C	480 sec	20°C/sec
2. Amplifikation 45 Zyklen:			
a. Denaturierung	95°C	15 sec	20°C/sec
b. Annealing	59-62°C*	5 sec	20°C/sec
c. Elongation	72°C	20 sec	20°C/sec
3. Schmelzkurve:			
	95°C	0	20°C/sec
	65°C	15 sec	20°C/sec
	97°C	0	0,1°C/sec
4. Abkühlung:	40°C	30 sec	20°C/sec

Tabelle 3.14: Temperaturzyklen der quantitativen „real Time“ PCR

(* Primer-spezifische Bedingungen)

3.9.8.4 Auswertung und Schmelzkurvenanalyse

3.9.8.4.1 Relative Quantifizierung

Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit der LightCycler-Software Version 3.5 (Roche Applied Science, Mannheim).

Als Quantifizierungsstrategie wurde eine normalisierte relative Quantifizierung gewählt (Pfaffl et al. 2001), wobei die mRNA Expressionsdaten eines Zielgenes mit denen eines Referenzgenes („House-Keeping“-Gen) verglichen wurden. Dabei wurden nicht die absoluten mRNA- bzw. cDNA-Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des Zielgens wurde auf ein zweites ubiquitäres und homogen exprimiertes Gen bezogen. In

3. Material und Methoden

dieser Arbeit wurde das „House-Keeping“-Gen GAPDH (3-Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) als interner Standard und Referenz verwendet.

Als Maß für die Quantifizierung wurde der „crossing point“ herangezogen. Der „crossing point“ (CP) stellt den Schnittpunkt der PCR-Amplifikationskurve mit der Hintergrundkurve dar und definiert die Zykluszahl, bei der die Amplifizierung in die exponentielle Phase eintritt. Er entspricht dem Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve und somit dem Wendepunkt der ersten Ableitung. Für die Berechnung wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP-Wert des Referenzgenes vom CP-Wert des Zielgens subtrahiert.

$$\Delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$$

Nach dieser Normierung wurde vom ΔCP Wert der CD34-positiven Zellen der ΔCP Wert der CD105-positiven Zellen subtrahiert.

$$\Delta \Delta CP = \Delta CP \text{ CD34} - \Delta CP \text{ CD105}$$

Dies ergab den relativen Expressionsunterschied, normalisiert zum Referenzgen. Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus, was einer optimalen „real time“ PCR Effizienz entspricht. Die wahre „real time“ PCR Effizienz bewegt sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7-1,9 und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf. Geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen führen somit zu enormen Expressionsunterschieden. Ausgehend davon wurde das effizient-korrigierte Quantifizierungsmodell entwickelt (Pfaffl et al. 2001).

$$\text{Verhältnis} = \frac{(E_{\text{Testgen}})^{\Delta CP \text{ Testgen} (CD34-CD105)}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP \text{ Referenzgen} (CD34-CD105)}}$$

E = Effizienz

CP = „crossing point“

Testgen = auf seine Expression zu untersuchendes Gen

Referenzgen = Stabiles, konstitutiv exprimierte Gen

Für die PCR-Effizienz wurde nach Anleitung (LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim) der Wert 1,85 eingesetzt.

3.9.8.4.2 Schmelzkurvenanalyse

Die Spezifizierung des entstandenen PCR-Produktes erfolgte durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet unspezifisch an dsDNA (doppelsträngige DNA). Somit kommt es auch durch die Bildung von Primer-Dimeren und unspezifischen Nebenprodukten zu einem Fluoreszenzanstieg der primär nicht vom spezifischen PCR-Produkt zu unterscheiden ist. Eine Differenzierung zwischen dem spezifischem PCR-Produkt und den Primer-Dimeren oder unspezifischen Nebenprodukten wird erst durch die sich an die Elongationsphase der PCR anschließende Schmelzkurvenanalyse möglich. Bei dieser werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich langsam aufgeheizt bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m), die sowohl von der Länge des PCR-Produktes als auch vom GC-Gehalt abhängig ist. Kleinere Fragmente, wie z.B. Primer-Dimere weisen somit einen niedrigeren Schmelzpunkt als die PCR-Produkte auf. Stellt man die negative Ableitung der Fluoreszenz über die Temperatur ($-d(F)/dT$) graphisch dar, entsteht dabei ein Peak entsprechend der Länge und des GC-Gehalts des PCR-Produktes (Ririe et al. 1997).

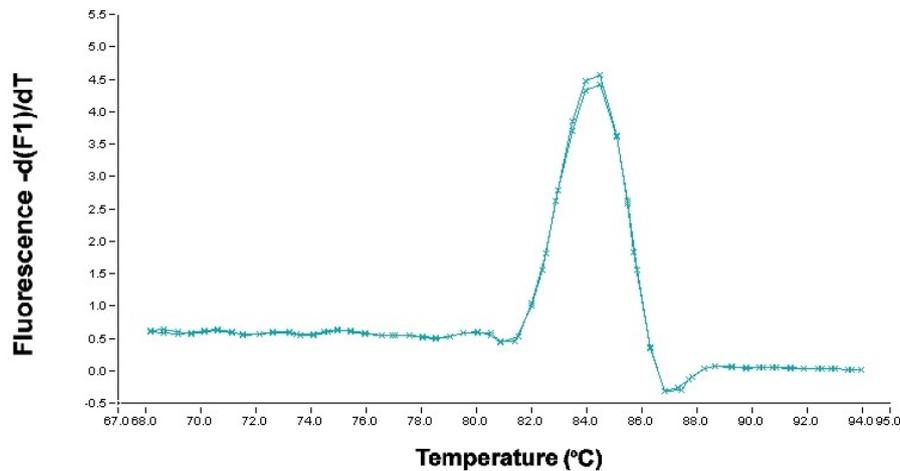


Abbildung 3.7: Graphische Darstellung der negativen Ableitung der Fluoreszenz über die Temperatur ($-d(F)/dT$). Das Maximum der 1. Negativen Ableitung entspricht der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Produktes

3.9.8.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Identifizierung von DNA-Fragmenten. Durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der zwischen die Basen der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente mittels langwelligem UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise kann weniger als 1 μg DNA detektiert werden. Die Migration der DNA während der Elektrophorese ist abhängig von verschiedenen Parametern wie Konformation und molekulare Größe der DNA, Agarose-Konzentration, Laufpuffer und angelegter Spannung.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist bei linearen Molekülen umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Im Vergleich zum mitlaufenden Marker, bestehend aus Fragmenten bekannter Größe, kann man Rückschlüsse auf die Größe der DNA-Fragmente in der Probe ziehen.

Für diese Arbeit wurden 1,25%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde dazu in einer entsprechenden Menge TBE-Puffer gegeben und durch Erhitzen in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben und das Gel in eine vorbereitete Gelform gegossen. Die zuvor mit

3. Material und Methoden

einem speziellem DNA-Proben-Puffer (Blue/Orange Loading Dye 6x, Promega Madison, WI, USA) versetzten Proben wurden nach Aushärten des Geles aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 120 Volt über 1 Stunde aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator) fotografiert und mit der dazugehörigen Software bearbeitet. Anhand des aufgetragenen Standards (Smart Ladder SF, Eurogentec) konnte die Größe der PCR-Fragmente ermittelt werden.

Ethidiumbromid-Lösung: 1 µg/ml Ethidiumbromid in dH₂O

5 x Tris-Borat-Puffer (TBE): 445 mM Tris-HCl
445 mM Borat
10 mM EDTA, pH 8,0

100bp Größenstandard 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

3.9.8.6 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die DNA-Proben wurden dazu mit den entsprechenden Primern vermischt und in einem Endvolumen von 7 µl in 200 µl PCR-Tubes versandt.

Für die Sequenzierungen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

PCR-Produkt pro bp	0,2 ng
Primer	20 pmol
H ₂ O	ad. 7 µl

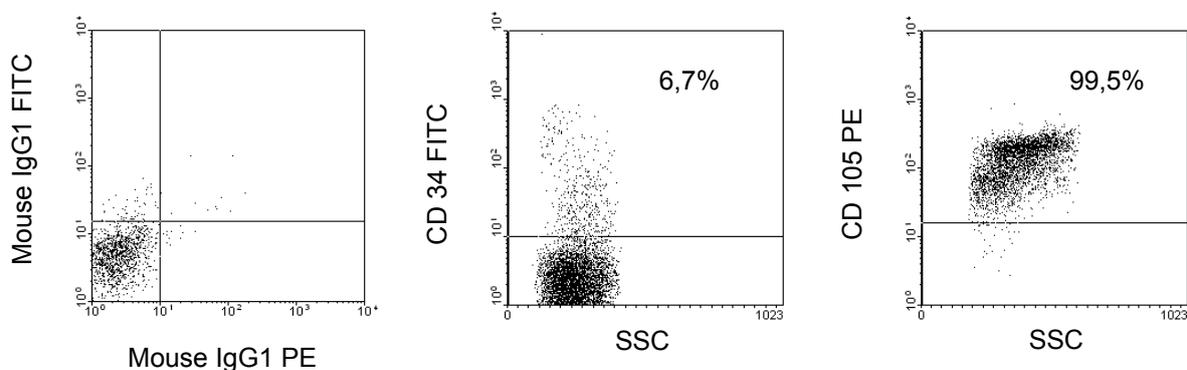
Tabelle 3.15: Sequenzierungsansatz

4. Ergebnisse

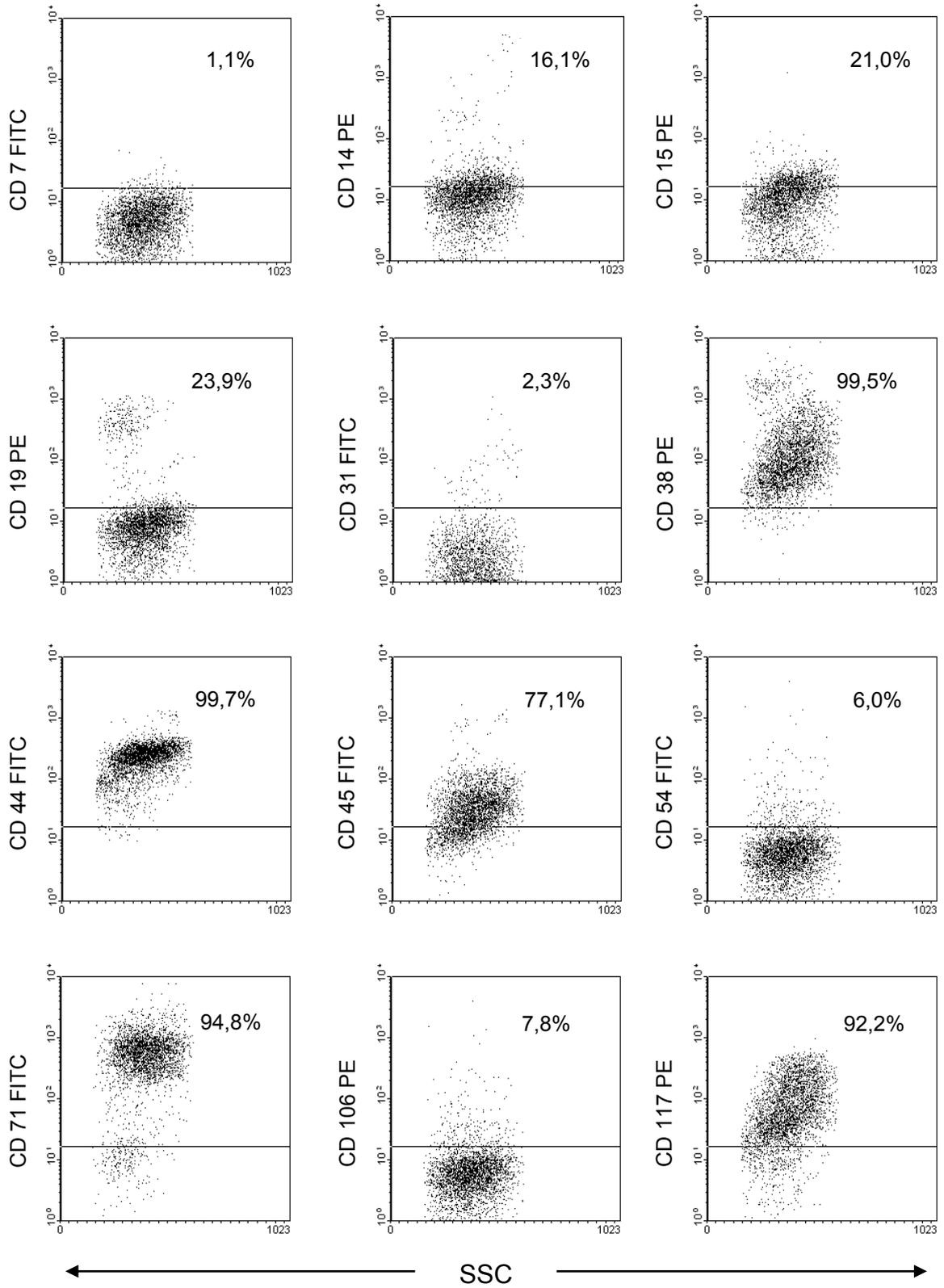
4.1 Immunphänotypische Charakterisierung CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen werden seit ca. 30 Jahren durch ihre selektive Anheftung an Plastikoberflächen von Zellkulturgefäßen gewonnen und sind in vielfältigen Studien untersucht worden. Insgesamt handelt es sich um sehr heterogene Populationen mit Unterschieden bezüglich ihrer Oberflächenepitope, der Zytokinsekretion und der Sekretion der Extrazellulärmatrix.

Um die in dieser Arbeit mittels CD105-Antigen isolierten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen phänotypisch zu charakterisieren, wurde zunächst eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Dazu wurden immunmagnetisch isolierte CD105-positive Zellen aus dem Knochenmark von drei freiwilligen Spendern mittels direkter Zweifarben-Immunfluoreszenz analysiert. Insgesamt wurden 15 Oberflächenantigene analysiert. Da bislang noch kein einzelner Oberflächenmarker identifiziert worden ist, der mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen eindeutig charakterisiert, wurde eine Kombination von hämatopoetischen Markern, Epithelzellmarkern und Stammzellmarkern eingesetzt, um ein spezifisches Oberflächenprofil zu erhalten, welches mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von anderen Zellen des KM abgrenzt.



4. Ergebnisse



4. Ergebnisse

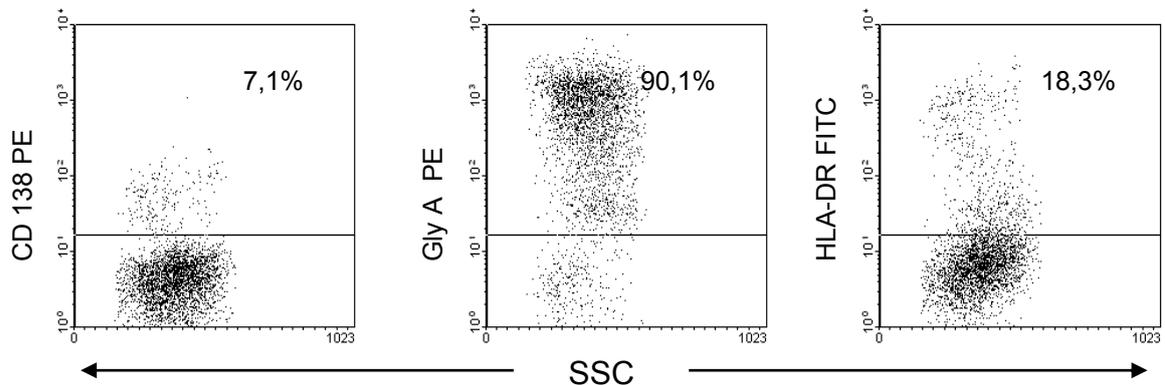


Abbildung 4.1: Oberflächenmarker mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse. Punktwolkendarstellung („Dot-Plot“-Darstellung) der FITC- und PE-Fluoreszenzen verschiedener Oberflächenmarker. Die Zellen unterhalb der Fluoreszenz-Intensitätsschwelle (waagrechte Linie) sind als negativ definiert. Verwendet wurden immunmagnetisch isolierte CD105-positive Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark freiwilliger Spender. Anhand der Streulichtsignale (FSC/SSC) konnte die diskriminierende Grenze zwischen den in die Auswertung eingehenden Zellen so gesetzt werden, dass mit Sicherheit alle CD105-positiven Zellen in die Messung eingeschlossen wurden, ohne dabei zu viel Verunreinigungsergebnisse aufzunehmen. Bei der Analyse der Ergebnisse wurden nur solche Ergebnisse berücksichtigt, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches lagen. Die statistischen Angaben der % positiven Zellen bezog sich auf die eingegrenzten („gegateten“) Zielzellen. Ein repräsentatives von 3 durchgeführten Experimenten ist dargestellt

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass die untersuchte Population mit 91,5 - 98% CD105-positiven Zellen eine hohe Reinheit besaßen. Diese CD105-positiven Zellen sind homogen positiv für CD71 und GlyA typische Marker erythroider Progenitoren, jedoch negativ bzw. schwach positiv für lymphoide Marker wie CD7, CD14, CD15 und CD19. Der Panleukozytenmarker CD45, Hauptbestandteil der Lymphozytenmembran ist nur schwach auf CD105-positiven Zellen exprimiert. Das Oberflächenantigen CD34, welches hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen kennzeichnet, ist auf frisch isolierten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen zum Teil nachweisbar mit einer großen Bandbreite von 0 - 34%. Adhäsionsmoleküle wie CD138 (Syndecan-1) und insbesondere der Endothelzellmarker VCAM-1 (CD106) waren auf den CD105-positiven Zellen nicht nachweisbar, was zeigt, dass es sich bei der isolierten Zellpopulation nicht um Endothelzellen handelt. Ebenso fehlten entscheidende Oberflächenmarker für die

Ausprägung eines immunologischen Phänotyps wie CD54 (ICAM-1) und HLA-DR (MHC-II). Für den Stammzellmarker CD114 (c-kit) waren die isolierten CD105-positiven Zellen homogen positiv, ebenso für den bereits etablierten Stammzellmarker CD44, ein Hyaluronsäurerezeptor der mit verschiedenen hochproliferativen biologischen Systemen assoziiert ist wie z.B. der Immunantwort durch das zelluläre Immunsystem.

Bei den isolierten CD105-positiven Zellen handelt es sich um eine eigenständige Population, welche hinsichtlich der Expression stammzellrelevanter Marker positiv war, während sie für eine Reihe hämatopoetischer Marker wie CD7, CD14, CD15, CD19 und CD45 negativ bzw. schwach positiv waren.

4.2 Vergleich CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mit einer anderen Stammzellpopulation des Knochenmarks

4.2.1 Vergleichende Genexpressionsanalysen CD105-positiver Zellen mit CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark

4.2.1.1 Makroarray-basierter Vergleich von CD105-positiven und CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark

Um humane mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen auch auf molekularer Ebene zu charakterisieren, führten wir mittels cDNA-Array Technologie eine Expressionsanalyse auf mRNA-Niveau durch. Hierdurch war es uns möglich, ein genomweites Genexpressionsprofil zu erstellen und dieses mit einer anderen Stammzellpopulation im Knochenmark zu vergleichen, nämlich der CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle.

Eingesetzt wurden hochangereicherte CD34-positive und CD105-positive Zellen aus dem Knochenmark 5 freiwilliger Spender (Abb. 3.5), welche interindividuell verglichen wurden.

4. Ergebnisse

Mit den verwendeten cDNA-Makroarrays war es möglich, 1185 ausgewählte Gene auf ihre Expressionsstärke hin zu untersuchen (Abb. 4.2).

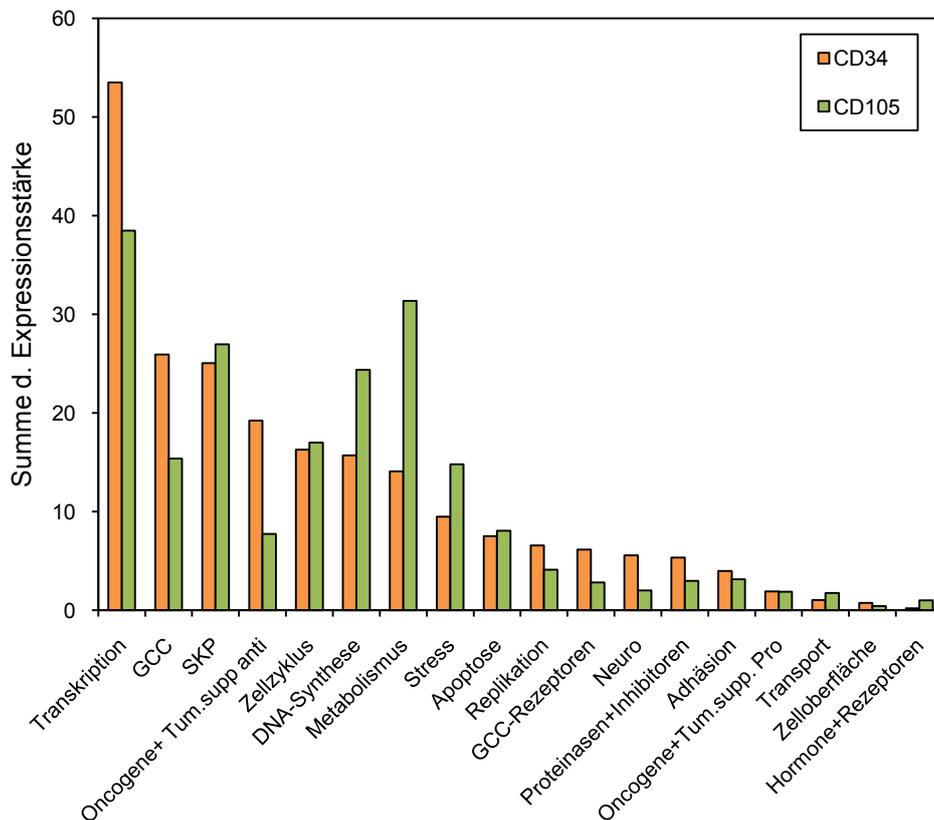


Abbildung 4.2: Darstellung der Gesamtexpressionsstärke verschiedener funktioneller Gengruppen in CD34-positiven und CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen. Verwendet wurden hochangereicherte CD34- und CD105-positive Stamm- und Progenitorzellen. In die Analyse wurden jeweils 5 Proben von CD34-positiven und CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen einbezogen. Die Balken zeigen die Gesamtexpressionsstärke aller Gene einer funktionellen Gruppe mit einer relativen Mindestexpressionsstärke von 0,1. **GCC:** growth factors, receptors **SKP:** proteinases, inhibitors

Insgesamt waren 115 Gene signifikant differentiell exprimiert (Anhang; Abb. 7.1). Nach Einteilung in funktionelle Gruppen zeigte sich, dass in Summe die Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine, deren Rezeptoren sowie Onkogene und Tumorsuppressorgene in CD34-positiven Zellen stärker exprimiert waren als in CD105-positiven Zellen. In CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen zeigten sich hingegen Gene der DNA-Synthese, Gene in Bezug auf Stressabwehr sowie Gene im

4. Ergebnisse

Zusammenhang mit dem intrazellulären Stoffwechsels stärker expremiert. Keine Unterschiede zeigten sich bei Genen welche verantwortlich sind für Zellzyklusregulation, Apoptose, Signaltransduktion oder Adhäsion.

In der Detailanalyse der Gene die eine Bedeutung in der DNA-Synthese haben, zeigte sich, dass lediglich 3 Gene (multL homolog 1, ERCC, Translin) 1,7- bis 4,4-fach höher in CD34-positiven Zellen expremiert waren, während 20 Gene der Regulation der DNA-Synthese (MCM2, MCM3, MCM4, MCM6, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, TOP1, TOP2a, Polymerase α , Polymerase δ 1, Polymerase ϵ , Polymerase ϵ 2, Ligase III, Ubiquitin-conjugating enzym, RAD23 homolog B, Ku antigen, Replication protein 3) 2- bis 7-fach höher in stromalen Vorläuferzellen expremiert waren (Abb. 4.3A).

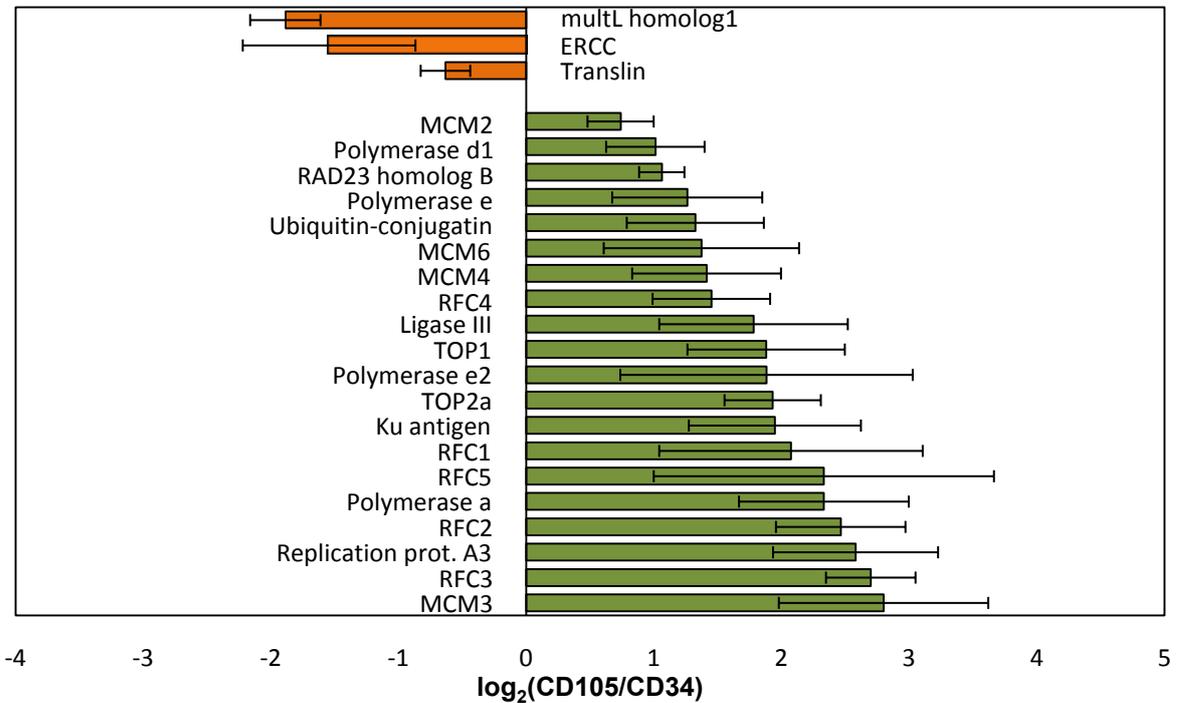
Bei den Genen der Zellzyklusregulation zeigten sich insgesamt 19 Gene signifikant differentiell expremiert. Davon waren 10 Zellzyklus-regulierende Gene (cyclin dependent kinase inhibitor 1C [p57], cyclin dependent kinase inhibitor 2A [p16], cyclin dependent kinase inhibitor 2A [p19], cyclin d2, CDK5, CDK6, myeloid cell nuclear differentiation antigen, fms-related tyrosin kinase 3, special AT-rich sequence binding protein 1, nucleolar protein 1) in CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen 2-13fach höher expremiert, während in CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen weitere 9 Zellzyklus-regulierende Gene (cyclin A2, cyclin B1, CDC2, CDC20, CDC25A, CDC28, polo-like kinase, FUSE binding protein, transcription factor Dp1) 2,3- bis 5,8-fach höher expremiert waren (Abb. 4.3B).

In der funktionellen Gruppe der Transkriptionsfaktoren waren insgesamt 22 Gene signifikant differentiell expremiert. Davon waren 14 Gene (FLI-1, Ets-2, GATA-binding protein 2, ERG, transcription factor AP-4, immediate early protein, early growth response, ELH-3, transcription factor CP-2, transcription activator SNF2A, guanine nucleotide binding protein, ZFP 161, ZFP 91, INI1) in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen 2 bis 32-fach höher expremiert, während 8 Gene (ZFP 148, immunglobulin mu binding protein 2, nuclear transcription factor NFX-1, purine-rich element binding protein, RBP-7, p65, STAT-1, STAT-2) durch 2 bis 6,4-fach höher in stromale Stamm- und Progenitorzellen expremiert waren (Abb. 4.3C). Im Bezug auf Stressabwehr waren insgesamt 4 Gene (cytosolic superoxid dismutase 1, Glutaredoxin [GPX], heat shock protein 70 kDa protein 8,

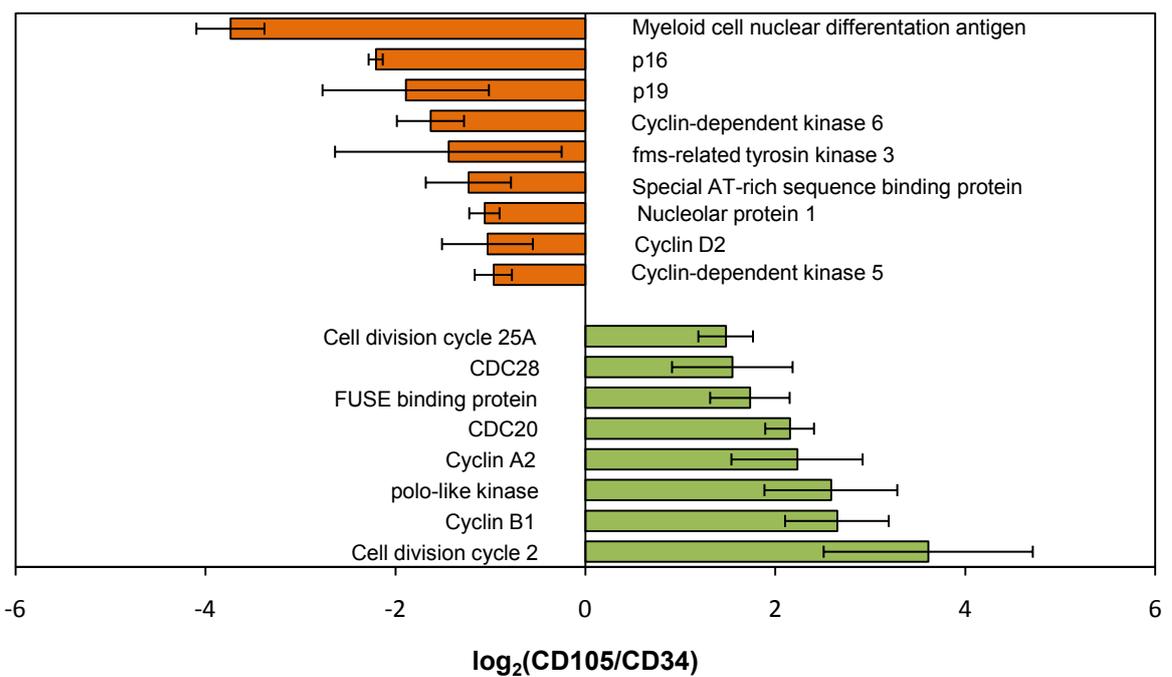
4. Ergebnisse

Glutathione peroxidase2) 5 bis 12-fach höher in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert.

(A)



(B)



4. Ergebnisse

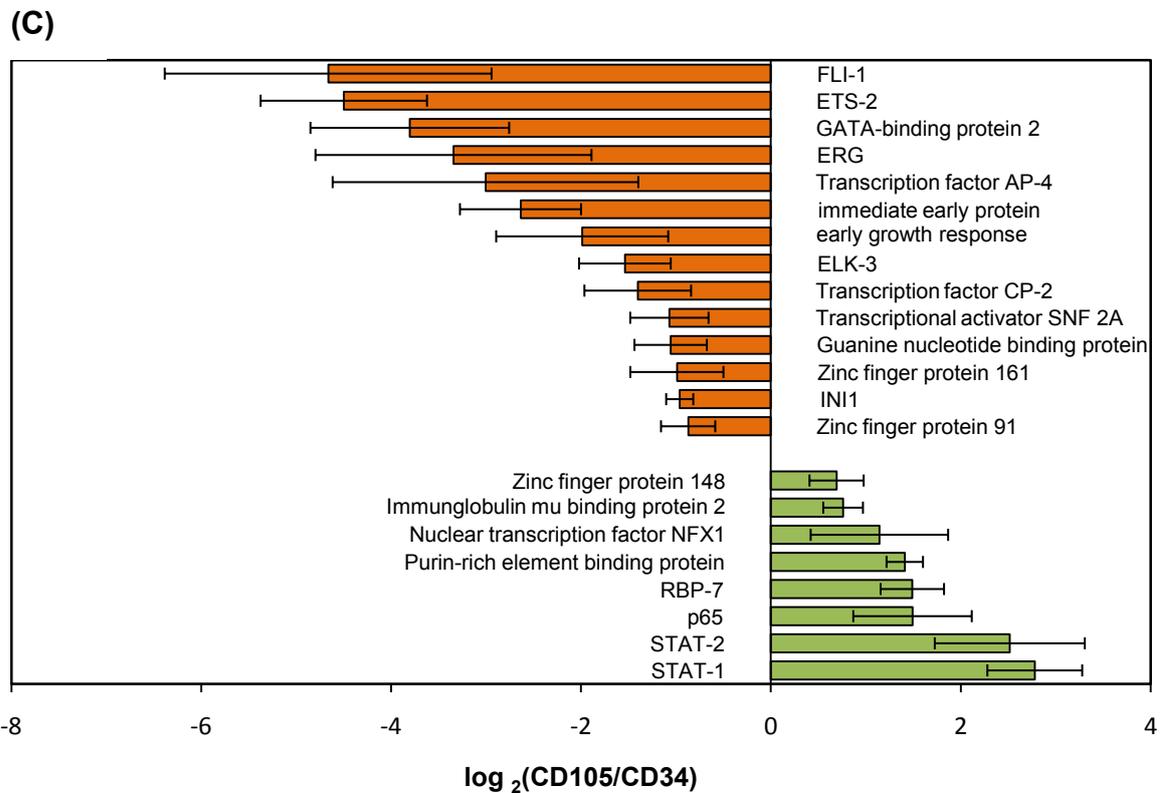


Abbildung 4.3: Signifikant differentiell exprimierte Gene der DNA-Synthese, der Zellzyklusregulation und der Transkriptionsfaktoren in CD34-positiven Zellen und CD105-positiven Zellen. Verwendet wurden hoch angereicherte CD34- und CD105-positive Zellen. Die Reinheit lag für die CD34-positiven Zellen zwischen 96 und 99%, die für die CD105-positiven Zellen zwischen 92 und 98%. Für die reverse Transkription der Gesamt-RNA wurde ein Array-spezifischer CDS-Primermix verwendet, um die Komplexität des resultierenden cDNA-Pools herabzusetzen und auf diese Weise die Sensitivität zu erhöhen. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Expressionsverhältnisse. Abbildung (A) zeigt signifikant differentiell exprimierte Gene der DNA-Synthese (MCM: „minichromosome maintance“-Gene; RFC: reduced folat carrier; TOP: Topoisomerase). Abbildung (B) zeigt signifikant differentiell exprimierte Gene der Zellzyklusregulation (CDC: cell division cycle). Abbildung (C) zeigt signifikant differentiell exprimierte Gene der Transkription (ERG: early growth response protein; FLI: friend leukemia virus integration; STAT: signal transducer and activator of transcription).

Die grünen Balken zeigen die im Vergleich höher exprimierten Gene in CD105-positiven Zellen, die orangen Balken zeigen die im Vergleich höher exprimierten Gene in CD34-positiven Zellen.

4.2.1.2 Hierarische Clusteranalysen der Makroarray-basierten Daten von CD105-positiven und CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen

Zur weitergehenden Analyse der Daten führten wir eine unüberwachte hierarchische Clusteranalyse mit einem „average-linkage“-Algorithmus durch.

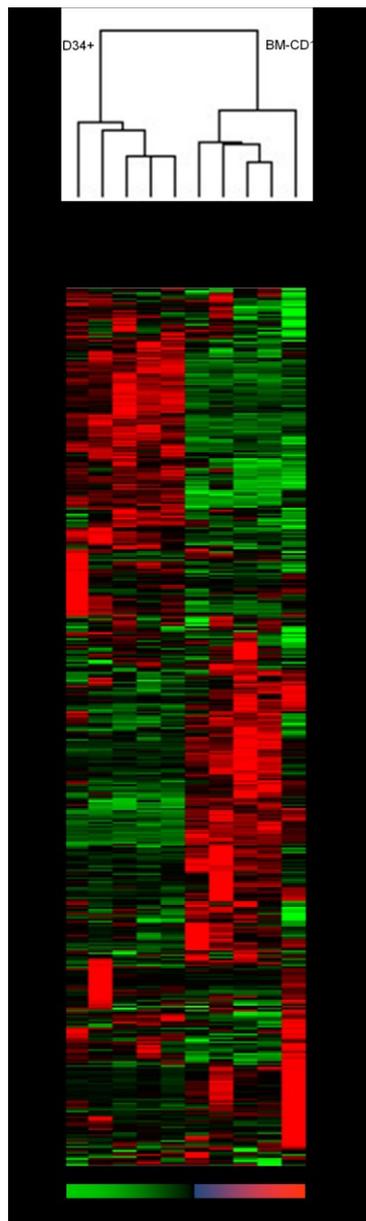


Abbildung 4.4: Unterschiede der molekularen Phänotypen von CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen in einer hierarchische Clusteranalyse. Verglichen werden CD34-positive Zellen und CD105-positive Zellen

4. Ergebnisse

aus dem Knochenmark gesunder Spender auf der Basis der 440 stärksten exprimierten Genen. Jede Spalte des Diagramms repräsentiert eine Probe, jede Zeile repräsentiert ein Gen. Die Länge der Äste des Clusterbaums zeigt den Verwandtschaftsgrad von zwei Proben an. Die Expressionsstärke der einzelnen Gene im Vergleich zur medianen Expressionsstärke aller Gene ist farbkodiert. Rote Felder zeigen ein hohes Expressionsniveau zum Gesamtmedian, grüne ein niedriges Expressionsniveau. Anhand dieser Darstellung kann der Grad der Ähnlichkeit der einzelnen Proben gezeigt werden

In die Clusteranalyse wurden die 440 am stärksten exprimierten Gene einbezogen. Hierdurch war es möglich das Ausmaß der Heterogenität der Proben abzuschätzen. Des Weiteren war es möglich, charakteristische Expressionsmuster von CD105-positiven Zellen im Vergleich zu CD34-positiven Zellen darzustellen. In die Analyse wurden jeweils 5 Proben von CD34-positiven und CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen einbezogen. Die Isolation erfolgte für beide Zellpopulationen aus dem Knochenmark gesunder Spender.

Aus dem Dendogramm lässt sich ersehen, dass in beiden Zellpopulationen homogene charakteristische Genexpressionsmuster vorliegen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass sich die CD105-positiven Zellen bezüglich ihres Genexpressionsprofil deutlich vom Genexpressionsprofil der CD34-positiven Zellen unterscheiden.

4.2.1.3 Bestätigung der signifikant differentiell exprimierten Gene mittels quantitativer „Real-Time“-PCR

Zur Bestätigung der Daten aus den cDNA-Array-Experimenten wurde die mRNA-Expression ausgewählter Gene in CD34- und CD105-positiven Zellen durch quantitative „real-time“ RT-PCR bestimmt.

Untersucht wurde die revers transkribierte mRNA von hochangereicherten CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von 3 Patienten und hochangereicherte CD105-positiv mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von 3 Patienten. Die Reinheit der immunmagnetisch isolierten CD105-positiven Zellen lag zwischen 91,5 und 98%, die der CD34-positiven Zellen zwischen 95 und 98% (Abb. 3.5).

4. Ergebnisse

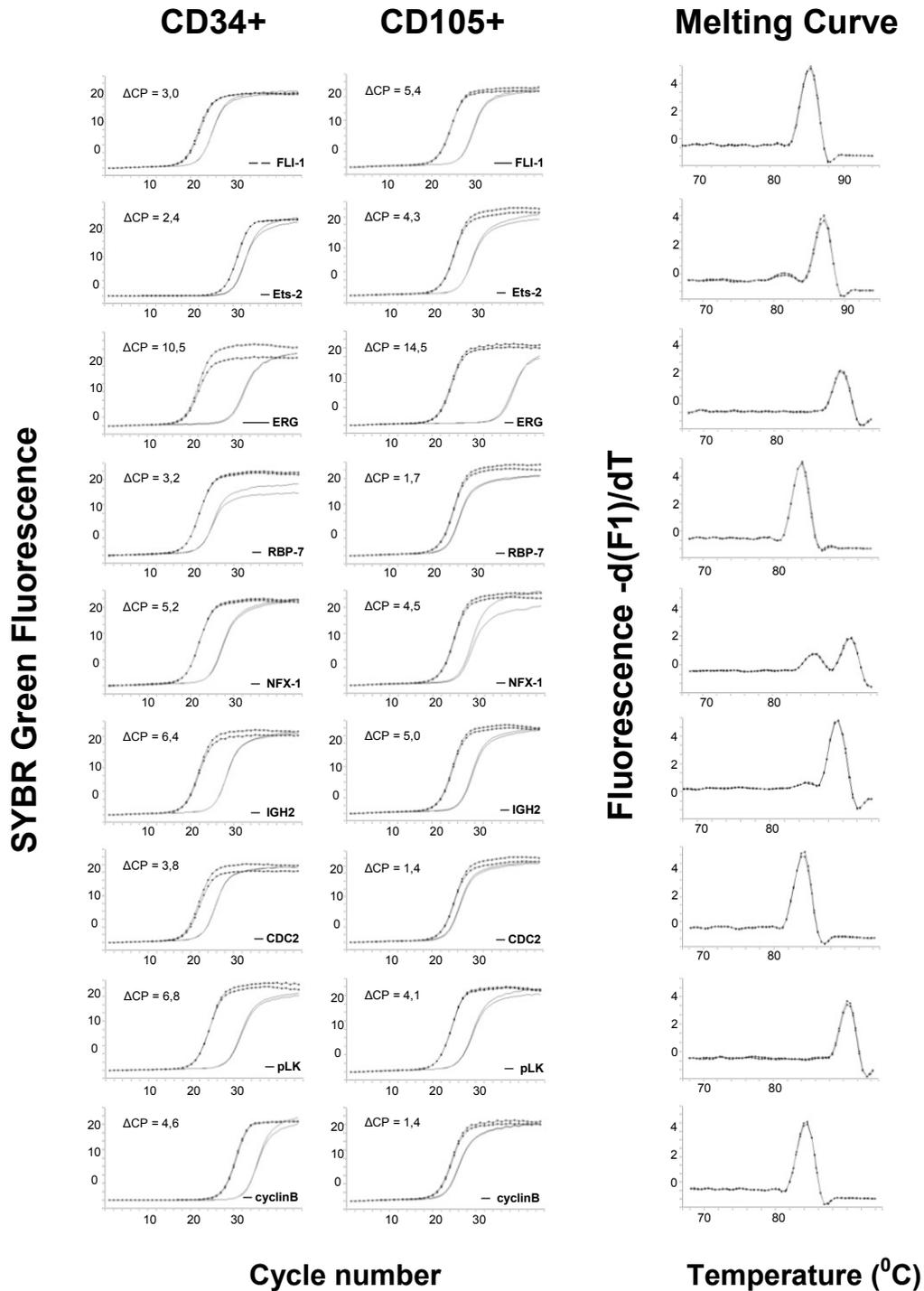


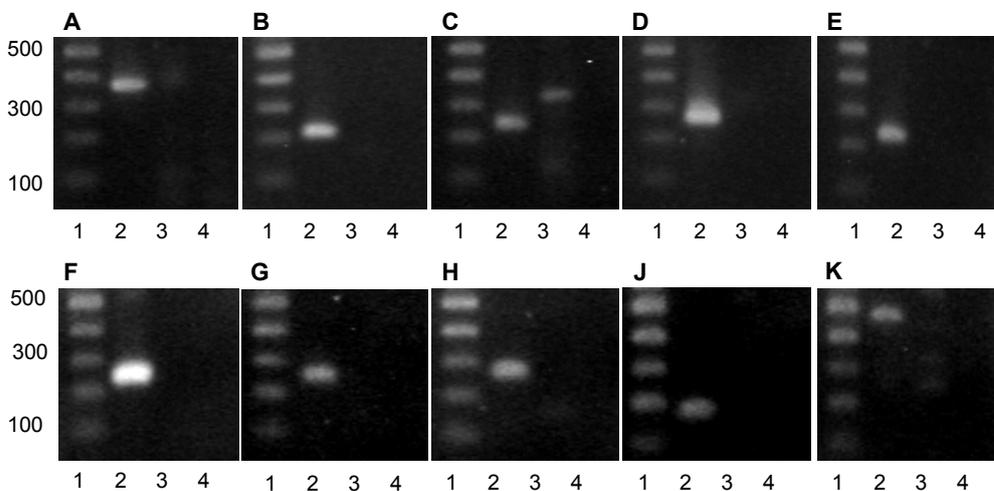
Abbildung 4.5: Quantitative „real-time“-RT-PCR mittels LightCycler-Technologie zur Bestätigung der cDNA-Array-Experimente. Eingesetzt wurden jeweils 3 Proben von CD34- bzw. CD105-positiven Zellen gesunder Probanden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Probe. Als externe Kontrolle und Referenz für die relative Quantifizierung wurde das Referenz-Gen GAPDH (3-Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) eingesetzt dargestellt als Punktlinie. Als Maß für die Quantifizierung wurde der „crossing

4. Ergebnisse

point“ herangezogen. Zur Normalisierung der Werte wurde der CP-Wert des Referenzgenes vom CP-Wert des Zielgens subtrahiert (Δ CP).

Ausgewählt wurden 9 signifikant differentiell exprimierte Gene aus der funktionellen Gruppe der Zellzyklusregulation und der Transkriptionsfaktoren. Als externe Kontrolle und Referenz für die relative Quantifizierung wurde das Referenz-Gen GAPDH (3-Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) eingesetzt (Abb. 4.5).

Schmelzkurvenanalysen und Agarosegelelektrophorese zeigten, dass bei der RT-PCR jeweils ein einziges PCR-Produkt entstanden ist, welches der zu erwarteten Länge entsprach (Abb. 4.5 und Abb. 4.6). Zur weiteren Spezifizierung der Ergebnisse erfolgte die Sequenzierung des entstandenen PCR-Produkts durch die Firma SEQLABSequence Laboratories, Göttingen. Alle PCR-Produkte entsprachen der Gensequenz der ausgewählten Gene.



1 = 10 μ l 100bp DNA-Leiter

2 = Probe (PCR-Produkt) 3 = RNA-Kontrolle 4 = Wasser-Kontrolle

Abbildung 4.6: Elektrophoretische Auftrennung der „Real-Time“-RT-PCR-Produkte in einem 1 %igem Agarosegel. Jeweils 10 μ l des PCR-Produktes wurde für 1 Stunde bei 120 V aufgetrennt und das Gel anschließend auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Jeweils 1 repräsentatives Ergebnis ist dargestellt.

4. Ergebnisse

(A = GAPDH; B = RBP-7; C = cyclin B; D = IGH2; E = pLK; F = Ets2; G = NFX-1; H = CDC2; J = FLI-1; K = Erg)

Um die Genexpressionsdaten der cDNA-Arrays mit den Ergebnissen der quantitativen „Real-Time“-RT-PCR zu vergleichen stellten wir die Ergebnisse direkt einander gegenüber (Abb. 4.7).

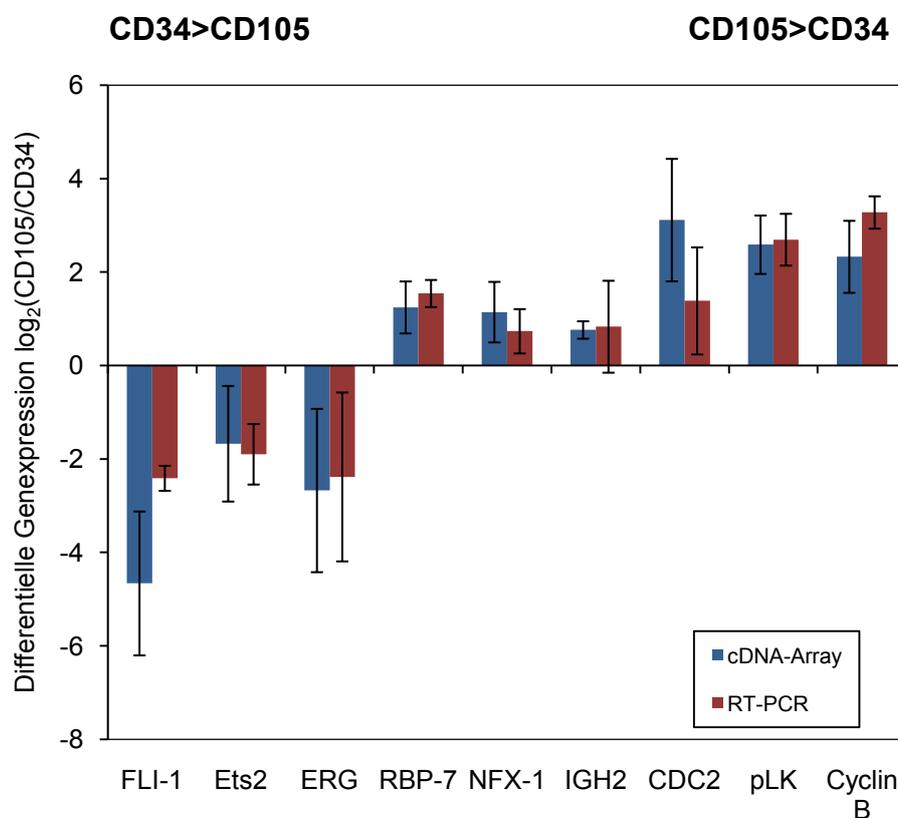


Abbildung 4.7: Vergleich der Daten von quantitativer „real-time“ RT-PCR und cDNA-Array-Analysen. Verglichen wurde die Expression von 9 Genen in CD34-positiven und CD105-positiven Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender. Die Daten beruhen auf einem relativen Expressionsunterschied normalisiert zum Referenzgen. Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Expressionsverhältnisse von jeweils drei Proben

Anhand dieser Darstellung zeigt sich deutlich, dass die mit den cDNA-Arrays ermittelten Genexpressionsdaten bei allen untersuchten Genen durch die quantitative „Real-Time“-RT-PCR bestätigt werden konnten.

4.2.2 Funktioneller Vergleich CD105-positiver und CD34-positiver Stamm- und Progenitorzellen durch klonogenen Wachstumstest

Die Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in alle blutbildende Zellen wird durch eine Reihen von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsmolekülen sowie durch die Interaktion mit zellulären Faktoren und Matrixkomponenten bestimmt und lässt sich mittels klonogenem Wachstumstest teilweise *in vitro* simulieren. In der Immunphäotypisierung zeigte sich, dass einige Marker der erythropoetischen und myeloiden Differenzierung, wie z.B. CD71, GlyA, CD7 und CD19 in CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen exprimiert waren.

Um zu untersuchen, ob CD105-positive Zellen in Zellen der Hämatopoese differenzieren können, setzten wir die Zellen in einen klonogenen hämatopoetischen Wachstumstest ein. Dazu wurden hochangereicherte immunmagnetisch isolierte CD105-positive Zellen und CD34-positive Zellen in semisolidem Methylzellulosemedium mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren inkubiert. Nach 2 Wochen konnte der Anteil der ausdifferenzierten BFU-E-Kolonien (erythroid) und der CFU-GM-Kolonien (myelo-monozytär) aus CD105-positiven Zellen ausgezählt und prozentual in Relation zur hämatopoetischen Kontrolle (CD34-positiv) dargestellt werden.

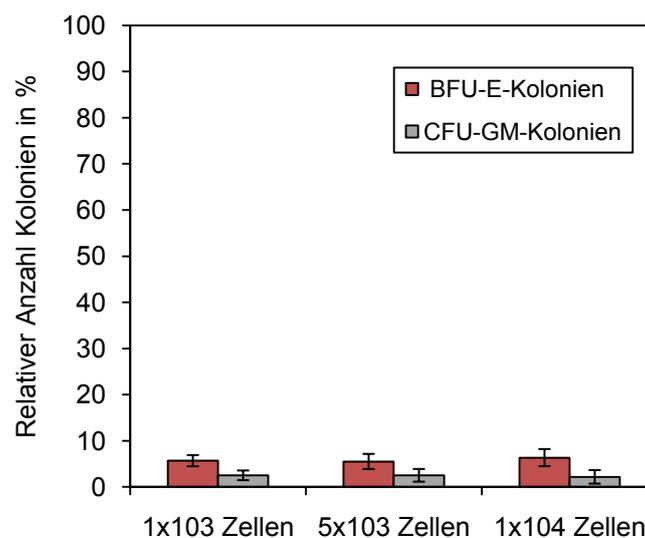


Abbildung 4.8: Klonogenes Wachstum von humanen CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen im Vergleich zu CD34-positiven Zellen. CD105-positive Zellen wurden in semisolidem Methylzellulosemedium

4. Ergebnisse

in den Konzentrationen 1×10^3 ; 5×10^3 ; 1×10^4 Zellen inkubiert. Nach 2 Wochen wurde die Anzahl der BFU-E-Kolonien (Rot) und CFU-GM-Kolonien (Grau) ausgezählt und in Relation zur Kontrolle (CD34-positive Zellen) dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung von 3 durchgeführten Experimenten im Doppelansatz sind angegeben

Mittels klonogenem Wachstumsvergleich konnte gezeigt werden, dass CD105-positive Stamm- und Progenitorzellen konzentrationsunabhängig unter den gegebenen hämatopoetischen Bedingungen kein signifikantes klonogenes Wachstum in eine hämatopoetische Differenzierung zeigten. Des Weiteren waren die wenigen ausgebildeten Kolonien im Vergleich zu den CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen in Größe und Granularität deutlich herabgesetzt. Die BFU-E-Kolonien und die CFU-GM-Kolonien kamen im Mittel 90% kleiner zur Darstellung.

4.3 Vergleich gesunder CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen mit CD105-positiven Zellen einer Stammzellerkrankung des Knochenmark

4.3.1 Charakterisierung CD105-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit CML mittels FISH im Vergleich zu malignen CD34-positiven Zellen

Bei der CML handelt es sich um eine Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, deren Ursache eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 ist. Es kommt somit zu dem typischen BCR-ABL-Rearrangement. Da bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt ist, an welchem Punkt der Stammzellentwicklung die Translokation stattfindet, stellte sich die Frage, ob das für die Philadelphia Chromosom positive CML typische BCR-ABL-Rearrangement auch bei mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen nachweisbar ist. Um dies zu überprüfen, führten wir eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durch. Ausgangsmaterial für die FISH waren zuvor mittels immunmagnetischer Zellisolation erhaltene hochangereicherte CD34-positive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (n=3) und hochangereicherte CD105-

4. Ergebnisse

positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von CML-Patienten in chronischer Phase (n=3). Für die FISH wurde eine BCR-ABL Zweifarben Doppelfusions Translokationssonde verwendet.

In Abbildung 4.7 sind repräsentative Fluoreszenzsignale der verschiedenen Zelltypen dargestellt.

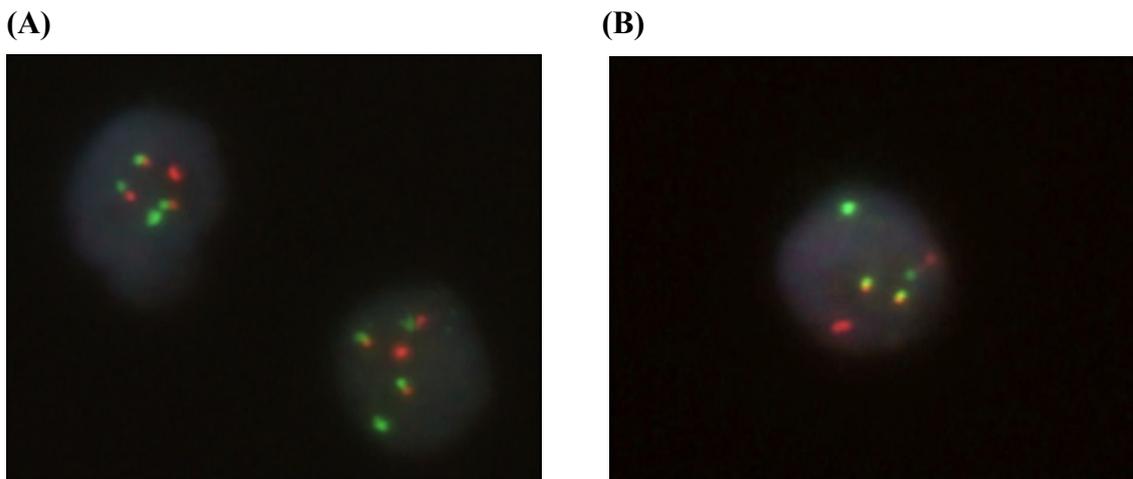


Abbildung 4.9: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen und CD34-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark von CML-Patienten. Verwendet wurden hochangereicherte CD34-positive hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sowie hochangereicherte CD105-positive Stamm- und Progenitorzellen von CML-Patienten. (A) CD34-positive Zellen von CML-Patienten (B) CD105-positive Zellen von CML-Patienten

Insgesamt war in 85% der CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML das BCR-ABL-Genrearrangement nachweisbar. In CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML waren im Durchschnitt 70% der Gesamtpopulation BCR-ABL positiv. Damit läßt sich das BRC-ABL-Fusionsgen in den isolierten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen im Vergleich zu malignen CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen überrepräsentativ nachweisen. Die als Kontrolle eingesetzten CD34-positiven Zellen gesunder Spender waren durchgehend negativ für das BCR-ABL-positives Genrearrangement.

4.3.2 Immunphänotypische Charakterisierung CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML mittels FACS und Vergleich mit CD105-positiven Zellen gesunder Spender

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen stehen in enger räumlicher und funktioneller Wechselwirkung mit der normalen Hämatopoese und der Proliferation maligner Zellklone. Über die molekularen Eigenschaften und Veränderungen im Rahmen hämatologischer Neoplasien ist bislang nur wenig bekannt. Um den Phänotyp von CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit einer malignen Knochenmarkerkrankung zu bestimmen, führten wir zunächst eine durchflusszytometrische Untersuchung durch.

Verwendet wurden immunmagnetisch hochangereicherte CD105-positive Zellen aus dem Knochenmark von 3 Patienten mit CML in chronischer Phase. Zum Vergleich dienten Daten, die an Zellen des gleichen Typs von 3 gesunden Spendern erhoben worden waren.

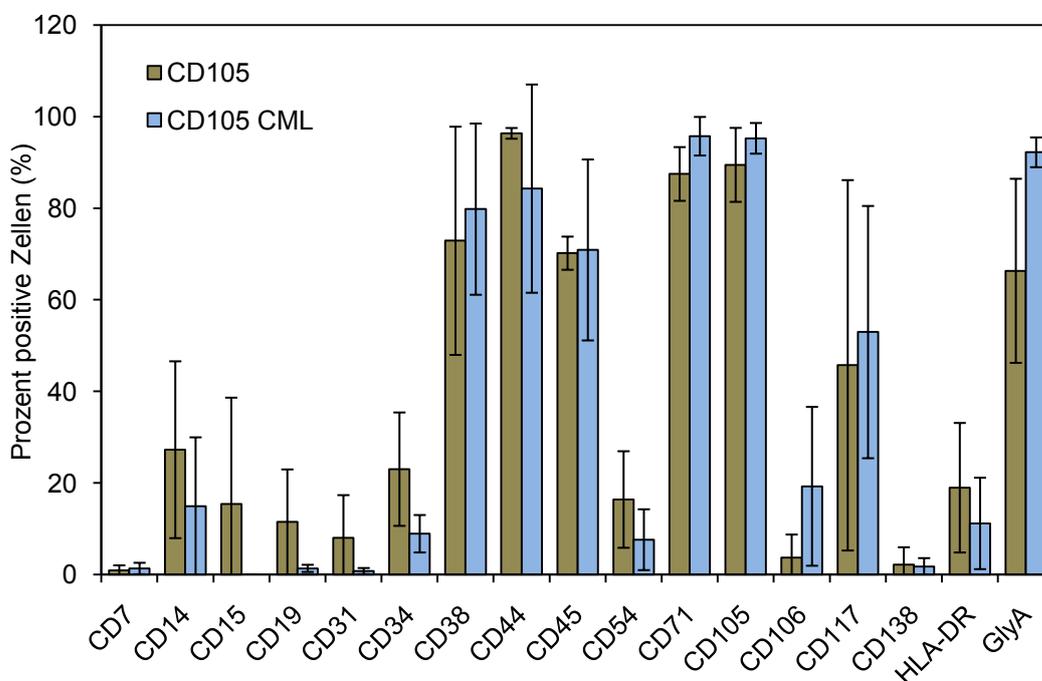


Abbildung 4.10: Oberflächenmarker CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML mittels FACS-Analyse im Vergleich zu CD105-positiven Zellen gesunder Spender. Mittelwert und Standardabweichung von 3 durchgeführten Experimenten sind angegeben

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass die untersuchten CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML für die Marker CD38, CD44 und CD71 wie die Vergleichsproben von gesunden Spendern homogen positiv waren. Geringe Unterschiede zeigten sich bei den typischen Oberflächenmarkern hämatopoetischer Zellen wie CD7, CD14, CD15, CD19 und CD31 die im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender geringer auf der Zelloberfläche exprimiert waren. Ebenfalls fehlten CD54 (ICAM-1) und HLA-DR (MHC-II) als typische immunologische Oberflächenmarker. Die Expressionsunterschiede zwischen gesund und krank lagen jedoch innerhalb der Standardabweichungen, so dass sich im Rahmen der malignen Transformation keine signifikante Veränderung der untersuchten Oberflächengene ergeben.

4.3.3 Makroarray-basierter Vergleich CD105-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit CML mit CD105-positiven Zellen gesunder Spender

Um genomweiten transkriptionellen Veränderungen in mesenchymalen Vorläuferzellen im Rahmen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zu untersuchen, führten wir mittels cDNA-Array Technologie eine Expressionsanalyse auf mRNA-Niveau durch. Eingesetzt wurden hochangereicherte CD105-positive Zellen von gesunden freiwilligen Spendern (n=5) und CD105-positiven Zellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase (n=6).

Mit den verwendeten cDNA-Makroarrays war es möglich, 1185 ausgewählte Gene auf ihre Expressionsstärke hin zu untersuchen (Abb. 4.11).

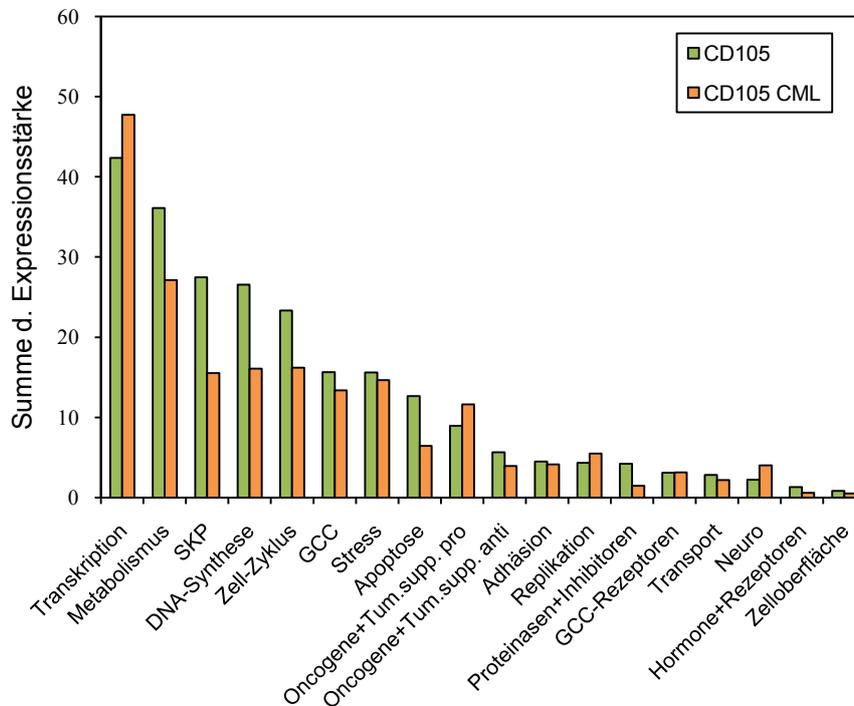


Abbildung 4.11: Darstellung der Gesamtexpressionsstärke der funktionellen Gengruppen in CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender und CD105-positiven Zellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase. Verwendet wurden hochangereicherte CD105-positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen. In die Analyse wurden jeweils 5 Proben von gesunden Spendern und 6 Proben von Patienten mit CML in chronischer Phase einbezogen. Die Balken zeigen die Gesamtexpressionsstärke aller Gene einer funktionellen Gruppe mit einer relativen Mindestexpressionsstärke von 0,1. **GCC:** growth factors, receptors **SKP:** proteinases, inhibitors

Insgesamt waren 152 Gene signifikant differentiell exprimiert. Davon waren in CD105-positiven Zellen von Patienten mit CML 24 Gene hoch- und 128 Gene herunter reguliert (Anhang Tab. 7.1).

Nach Einteilung in funktionelle Gruppen zeigte sich, dass Gene der Zellzyklusregulation, der DNA-Synthese, der Transkription, der Apoptosesteuerung und der Stressabwehr in CD105-positiven Zellen von CML-Patienten im Vergleich zu CD105-positiven Zellen gesunder Spender eine niedrigere Expressionsstärke aufwiesen. Des Weiteren war die Signalwahrnehmung über Oberflächenmoleküle und Signalauslösung über

4. Ergebnisse

Wachstumsfaktoren und Interleukine in CD105-positiven Zellen im Knochenmark von CML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern verändert.

In der Detailanalyse der Gene, die eine Bedeutung in der DNA-Synthese haben, zeigte sich, dass 20 Gene (darunter verschiedene replication factor C-Untereinheiten, helicase II (KU70), helicase II (KU80), Ligase 1, MCM3, MCM5, TOP1, DNA polymerase gamma, activator 1 replication factor C, RAD23 homolog B) 1,9 bis 5,2-fach höher in CD105-positiven Zellen gesunder Spender exprimiert waren, während in CD105-positiven Zellen von Patienten mit CML im Vergleich keine Gene überexprimiert waren.

In der funktionellen Gruppe der Transkriptionsfaktoren waren insgesamt 17 Gene signifikant differentiell exprimiert. Davon waren 14 Gene (STAT1, STAT2, STAT6, BRCA, retinoblastom binding protein 2, ZFM1, DNA-binding protein SMBP-2, NFX1, paired box protein 5, retinoblastoma-binding protein p46, E2F transcription factor 3, DNA binding protein HIP116, basic transcription factor 2 p44, PCAF-association factor 65 alpha, mitochondrial transcription factor 1, transcription intermediary factor 1) 1,7 bis 4,8-fach niedriger exprimiert, während 3 Gene (ZNF 161, TAT-binding protein 1, ISGF3) 1,7 bis 1,9-fach höher in CD105-positiven Zellen von Patienten mit CML exprimiert waren.

In der Zellzyklusregulation zeigten sich insgesamt 14 Gene signifikant differentiell exprimiert. Davon waren 14 Gene 1,5 bis 3,0-fach höher in CD105-positiven Zellen gesunder Spender exprimiert. Darunter PLK1, Fuse binding protein, CDC2, CDC25A, CDC25B, CDC2 related kinase, CDC like kinase 2, CDK9, MAP kinase 1, E2F dimerization partner 1, cyclin G-associat kinase, R kappa B DNA binding protein.

In der Gruppe der Oberflächenmoleküle sind 3 Gene signifikant differentiell exprimiert. In der Gruppe der Adhäsionsmoleküle fand sich in CD105-positiven Zellen von Patienten mit CML eine 7,1-fach höhere Expression von cadherin 5, während die $\alpha 7$ Integrinuntereinheit 2,2-fach niedriger exprimiert war. Der tyrosine kinase EphA1 receptor hingegen war 12,9-fach höher in CD105-positiven Zellen gesunder Spender exprimiert. Außerdem zeigte sich, verglichen mit gesunden CD105-positiven Zellen, ein unterschiedliches Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Davon waren 4 Genen (calgranulin A, calgranulin B, Interleukin 12 beta subunit, IL2 receptor alpha) 1,7- bis 2,9-fach höher in CD105-Zellen von Patienten mit CML exprimiert und 10 Genen 1,5 bis 8,9-fach niedriger exprimiert, unter anderem Interleukin 10, Interleukin 1 beta, Interleukin 13 und neuromedin B. Signifikante

4. Ergebnisse

Unterschiede in der Genexpression zeigten sich in Bezug auf Stressabwehr und intrazellulären Stoffwechsels, welche in CD105-positiven Zellen gesunder Spender höher exprimiert waren. Es zeigte sich eine 1,9 bis 6,8-fach niedrigere Expressionsstärke von Genen, die zur Detoxifikation von Fremdstoffen und DNA-Reparatur benötigt werden, wie die Glutathion-S-Transferase 1, die Glutathion-reductase und zytosolischer Superoxid-dismutase 1.

Verschiedene Gene, die BCR-ABL in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen nachgeschaltet sind, wie JAK2, K-RAS, RAS-related protein RAB5A, RAS-related protein RAB2, RAS-related protein RAB6A und N-RAS sind in CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML nicht überexprimiert.

5. Diskussion

5.1 Molekularer Phänotyp mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen werden seit ca. 30 Jahren durch ihre selektive Anheftung an Plastikoberflächen von Zellkulturgefäßen gewonnen und sind in vielfältigen Studien untersucht worden. Da ein spezifischer Marker mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen, analog zu dem Oberflächenmarker CD34 für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle bislang noch nicht beschrieben werden konnte, ist eine eindeutige Charakterisierung mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen derzeit nicht möglich. Aufgrund dieser Problematik wurde zur Charakterisierung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) sog. Dominici-Kriterien festgelegt. Hierzu gehören die Adhärenz an Plastik, die Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD11b⁻, CD14⁻ CD19⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD79 alpha⁻ und HLA-DR⁻) und das multipotente Differenzierungspotential *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten (Dominici et al. 2006). Allerdings handelt es sich bei den aus dem Knochenmark isolierten Zellen nicht um eine homogene Zellpopulation, sondern vielmehr um ein heterogenes Zellgemisch, mit verschiedenen Subpopulationen, welche morphologisch als auch immunzytochemisch unterschieden werden können. Die gewonnenen Zellen können in ihrer Genexpression, Differenzierungskapazität und ihrem Wachstumspotential stark variieren.

In dieser Arbeit wurden mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen mittels C105-Antigen aus dem Knochenmark isoliert. Zur Charakterisierung der CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen wurde zunächst die Immunfluoreszenz gewählt, die eine Untersuchung auf Einzelzellniveau erlaubt. Es konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen aus dem Knochenmark ein spezifisches Oberflächenantigenexpressionsmuster aufweisen. Typische Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen wie CD7, CD14, CD15, CD19, CD31 und CD45 fehlen oder sind nur schwach auf der Oberfläche exprimiert. Interessanterweise sind die isolierten CD105-positiven Zellen des Knochenmarks homogen positiv für CD71 und GlyA, klassische Marker für erythroide Progenitoren. Dass es sich bei den verwendeten

Zellen nicht um erythropoetische Vorläuferzellen handelte, konnte durch das fehlende Wachstum der CD105-positiven Zellen im klonogenen Wachstumstest mit Erythropoetin-haltigem Medium gezeigt werden. Auch eine Verunreinigung durch myelomonozytäre Progenitoren konnten wir unter Hämatopoese spezifischen Wachstumsbedingungen nicht nachweisen.

Der klassische Endothelzellmarker CD106 ist in unseren Analysen auf den isolierten Zellen homogen negativ, was zeigt das es sich bei den isolierten Zellen nicht um Endothelzellen handelt. CD106, auch als vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) bezeichnet, ist ein Transmembranprotein mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen, das überwiegend Ca^{2+} -unabhängige Adhäsion vermittelt. Neben der starken Membranbetonung lässt sich CD106 auch granulozytär verteilt über das gesamte Plasma nachweisen. Seine Expression wird durch inflammatorische Mediatoren wie z.B. IL-1 β , IL-4, TNF α und IFN γ induziert. Es interagiert mit den Integrinen $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, Very Late Antigen-4) und $\alpha 4\beta 7$ und unterstützt den Austritt der Leukozyten aus den Blutgefäßen. Neben aktivierten Endothzellen, ist es auf Knochenmarksstromazellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Fibrblasten nachweisbar (Wu 2007). Interessanterweise wird CD106 als Marker für mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen abhängig von Zellpassage, Differenzierungsgrad und Untersuchungsmethode in der Literatur kontrovers diskutiert. Hier scheint die Spendervariabilität eine große Rolle zu spielen (Romanov et al. 2006). Insgesamt schwanken die in der Literatur beschriebenen Expressionsstärken in FACS-Analysen u.a. abhängig vom Spenderalter von 5-70% (Mareshi et al. 2006). Allerdings ist für die häufig beschriebene Immunfluoreszenz zu berücksichtigen, dass sich bei einer intra- und extrazellulären Verteilung eines Proteins unterschiedliche Ergebnisse für lysierte und nicht lysierte Zellen ergeben. In der Literatur hat CD106 jedoch einen festen Stellenwert in der Charakterisierung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (Izadpanah et al. 2006; Mareshi et al. 2006; Romanov et al. 2005).

Das Oberflächenantigen CD34, welches hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen kennzeichnet, ist in unseren Analysen auf frisch isolierten mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen variabel nachweisbar. Dies deckt sich mit weiteren Studien, allerdings geht diese initiale Antigenoberflächenexpression im Laufe einer Kultivierung verloren (Waller et

al. 1995). Das ursprüngliche Vorhandensein zeigt, dass es möglicherweise einen gemeinsamen Vorläufer für beide Populationen gibt.

Um CD105-positive Stamm- und Progenitorzellen auf molekularer Ebene zu charakterisieren wurden in dieser Arbeit hochangereicherte CD105-positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen durch simultane genomweite Expressionsanalysen auf mRNA-Niveau analysiert und mit einer anderen Stammzellpopulation des Knochenmarks, den CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, verglichen. Diese auf Macroarrays beruhende Methode wurde 2001 bei Stammzellen des Knochenmarks erstmalig angewendet (Steidl et al. 2001). In unseren Untersuchungen zeigten sich wesentliche Unterschiede, welche die unterschiedlichen zellbiologischen und funktionellen Eigenschaften von mesenchymalen und hämatopoetischen Zellen widerspiegeln.

In dieser Arbeit gelang es 115 signifikant differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Im Detail zeigten sich in den Expressionsanalysen, 23 Gene der DNA-Synthese differentiell exprimiert. Davon waren 20 Gene, welche unter anderem für die S-Phase des Zellzyklus notwendig sind, in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen höher exprimiert. Darunter minichromosom maintenance proteins (MCM) als entscheidender Teil der DNA-Replikation (Chong et al. 1996), welche nur in proliferierenden Zellen exprimiert werden. Die minichromosom maintenance proteins sind Komponenten des prä-replikativen Komplexes, welcher an der Initialisierung der Replikation beteiligt ist. Spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der DNA-Transkription, der DNA-Reparatur und der Chromatin-Regulation (Forsburg 2004). Der hochexprimierte Replikationsfaktor C (RFC) ist ein heteropentamerer Proteinkomplex, der in eukaryotischen Zelle eine wichtige Rolle in der DNA-Replikation und DNA-Reparatur spielt (Mossi and Hübscher 1997). Die Untereinheiten besitzen eine Molekularmasse von 140, 40, 38, 37 und 36 kDa.

Ebenfalls erhöht exprimiert sind die eigentlichen Replikationsenzyme die DNA-Polymerasen, als auch die Topoisomerasen. In der Gruppe der Zellzyklus-regulierenden Gene zeigten sich insgesamt 19 Gene differentiell exprimiert. Davon 9 Gene in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. Darunter cyclin A2 welches zum einen eine Akzeleration des Übertritts von der G1- in die S-Phase bewirkt und zum anderen durch seine Partner CDC2 und CDK2 den Übergang von der G2- in die M-Phase kontrolliert. Wie das cyclin A2 kontrolliert cyclin B1 mit seinem Partner CDC2 den Übergang von der G2- in

die M-Phase (Li et al. 1997, Kushner et al. 1999). Die Serin-threonin Kinase PLK spielt eine entscheidende Rolle in der späten G2 Phase und dem Durchlaufen der M-Phase des Zellzykluses (Takaki et al. 2008). CDC25A ist notwendig für die G1-S-Überleitung durch Aktivierung von cyclin E und CDK2 (Fernandez-Vidal et al. 2008). Es zeigt sich, dass in jeder Phase des Zellzyklus Gene überexprimiert zur Darstellung kommen. Im Vergleich dazu sind in CD34-positiven hämatologischen Stamm- und Progenitorzellen 3 Zellzyklus-Inhibitoren (CDK inhibitors 1C, 2A und 2D) höher exprimiert, darunter auch der Zellzyklusinhibitor p57. Somit weist das Genexpressionsmuster CD105-positiver Zellen auf eine größere Proliferationsaktivität im Vergleich zu CD34-positiver Zellen hin.

In der funktionellen Gruppe der Transkriptionsfaktoren waren insgesamt 22 Gene signifikant differentiell exprimiert. Hier zeigte sich ein deutliches Muster von Transkriptionsfaktoren, welches möglicherweise ausschlaggebend für mesenchymale oder hämatopoetische Zelldifferenzierung ist. In den mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen waren 8 Gene überexprimiert. Darunter STAT1 und STAT2. STAT-(signal and transducer and activator of transcription) Proteine sind zytoplasmatische Proteine die mit membranständigen Rezeptoren interagieren und externe Signale an den Zellkern weiterleiten können (Levy and Darnell 2002). Durch ihre Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Signalübertragung durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormonen sind sie an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Apoptose, der angeborenen und adaptiven Immunität und der Angiogenese (Horvath 2000; Bromberg 2001). Die direkte Signalweiterleitung, ohne Beteiligung weitere Botenstoffe, ermöglicht eine Genaktivierung innerhalb weniger Minuten und gewährleistet eine hohe Signalerhaltung und Spezifität. Die Familie der STAT-Proteine besteht aus sieben Mitgliedern: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. STAT2 ist, neben STAT1 an der durch Interferon-induzierten immunregulatorischen Prozessen beteiligt (Park et al. 2000). Neben der Stimulations-induzierten Tyrosinphosphorylierung Genexpression ist auch eine konstitutive Genexpression durch STAT1 möglich. Diese führt zur Apoptoseinduktion. Ebenfalls erhöht exprimiert ist das immunglobulin mu binding protein 2 (IGHMBP2). Das Genprodukt von IGHMBP2 besteht aus 993 Aminosäuren und enthält 3 verschiedene funktionelle Domänen: eine Helikase-Domäne, eine R3H-Domäne und ein Zinkfinger-Motiv. Das Protein steht im

Zusammenhang mit DNA-Replikation, prä-mRNA Splicing und Transkription. Die genaue zelluläre Funktion ist noch unbekannt (Guenther et al. 2009). Das in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen überexprimierte retinoblastoma-bindig Protein (RBP7) spielt eine Schlüsselposition im Aufbau und der Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur (Murzina et al. 2008).

In den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen waren insgesamt 14 Gene höher exprimiert. Darunter einige Mitglieder der Ets-Transkriptionsfaktoren, wie FLI-1, ERG und Ets2. Es handelt sich hier um wichtige Effektoren des Ras-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges im Zellkern.

Im Bezug auf Stressabwehr waren insgesamt 4 Gene (cytosolic superoxid dismutase 1 [SOD1], Glutaredoxin [GPX], heat shock protein 70 kDa protein 8, Glutathione peroxidase 2) höher in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert. Der Einfluss von oxidativen Stress auf den Organismus ist durch zahlreiche Studien belegt und wird als Ursache für Alterungsprozesse und zahlreiche Krankheiten angesehen. Eine große Rolle spielt hier die Anhäufung sog. reaktiver Sauerstoffspezies. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen in kleinen Mengen in allen Zellen bei einer Vielzahl von Vorgängen wie z.B. der Signaltransduktion, der Aufrechterhaltung des Immunsystems und der Apoptose. Durch erhöhte Produktion kommt es zur Beeinflussung einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen. So können reaktive Sauerstoffspezies direkte Veränderungen an den Basenpaaren bewirken oder die Konformation der DNA verändern und damit zur Entstehung von Mutationen beitragen (Ma 2010). Es treten aber auch verstärkt Modifikationen von Proteinen und Kohlenhydraten, Lipid-Peroxidationen oder Membranschäden auf. Zur Beseitigung der reaktiven Sauerstoffprodukte stehen dem Körper eine Vielzahl von Mechanismen zur Verfügung. Neben dem Glutathion-System existieren spezifische antioxidative Enzyme, darunter Katalasen, Peroxidasen und die Superoxid-Dismutase. Die erhöhte Expression dieser Gene in CD105-positiven Zellen spricht für eine höhere Stressresistenz und genetische Stabilität der mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass CD105-positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen eine deutlich erhöhte Proliferationsaktivität aufweisen und insgesamt eine grössere genetische Stabilität durch eine stärkere Stressabwehr aufzeigen. Deutlich wird auch dass die beiden Stammzellpopulationen ein spezifisches Muster an Transkriptionsfaktoren

besitzen, welches entscheidend für hämatopoetische oder mesenchymale Differenzierung ist.

Die hierarchische Clusteranalysen zeigt das hämatologische Stamm- und Progenitorzellen und mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen mathematisch anhand ihrer Genexpressionsprofile voneinander unterschieden werden können. Dies unterstützt den Stellenwert der gemessenen transkriptionellen Veränderungen. Die Ähnlichkeit der Proben untereinander innerhalb der einzelnen Gruppen zeigt, dass die Unterschiede der Genexpressionsmuster interindividuell nur sehr klein sind. Dies ist unter anderem durch die Verwendung von Gen-spezifischen Primergemischen für die reverse Transkription, welche nur Primer der „gespotteten“ cDNA der Arrays enthielt erreicht worden. Somit erhöht sich durch Reduktion der Komplexität des resultierenden cDNA-Pools die Sensitivität und ermöglicht es kleinste RNA-Mengen einzusetzen. Somit konnten Poolbildungen und Amplifikationen von cDNA vermieden werden. Zur Validierung unserer Ergebnisse erfolgte Bestätigungsexperimente durch quantitative real-time RT-PCR. Alle untersuchten Gene konnten durch die zweite unabhängige Methode bestätigt werden, was die Zuverlässigkeit der verwendeten Makroarrays unterstützt.

5.2 Veränderungen mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen im Rahmen der chronisch myeloischen Leukämie

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen stehen in enger räumlicher und funktioneller Wechselwirkung mit der normalen Hämatopoese und der Proliferation maligner Zellklone. Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis der ätiopathogenetischen Beteiligung von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen bei hämatologischen Neoplasien zu vertiefen und entitätsspezifische transkriptionelle Veränderungen zu identifizieren.

Die chronische myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Fialkow et al. 1977). Charakteristisches zytogenetisches Merkmal der CML ist in nahezu 95% der Fälle das Vorhandensein eines Philadelphia-Chromosoms. Dieses abnormale Chromosom ist das Resultat einer reziproken Translokation

der Chromosomen 9 und 22. Dadurch kommt es zur Fusion der beiden Gene BCR (breakpoint cluster region; Chromosom 22) und ABL (Ablesion leukemia virus; Chromosom 9) und zur Bildung eines BCR-ABL-Fusionsonkogens. Nach heutigem Verständnis ist dieses Gen bzw. sein Genprodukt die BCR-ABL-Tyrosinkinase, monokausal für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich. Die konstitutive Tyrosinkinaseaktivität des BCR-ABL Proteins mit vorwiegend zytoplasmatischer Lokalisation ermöglicht es dem Fusionsprotein, mit einer Vielzahl verschiedener Proteine und intrazellulärer Signalkaskaden zu interagieren und deren Aktivität zu beeinflussen (Sawyers et al. 1995; Shuai et al. 1996; Varticovski et al. 1995). Die Folge sind veränderte Eigenschaften der zellulären Adhäsion im Knochenmark und peripheren Blut, erhöhte Resistenz der Leukämiezellen gegenüber apoptotische Stimuli und einer von externen Wachstumsfaktoren unabhängige zelluläre Proliferation (Warmuth et al. 1999; Deininger et al. 2000).

Verschiedene Studien vermuten den Ursprung der reziproken Translokation in einer übergeordneten Vorstufe der hämatologische Stamm- und Progenitorzelle (Gunsilius et al. 2000; Fang et al. 2005). Fang isolierte Progenitorzellen aus Knochenmark von Patienten mit CML welche Flk1-positiv und CD31- sowie CD34-negative waren und kultivierte diese auf Einzelzellniveau und zeigte, dass diese Population Ursprung sowohl hämatopoetischer als auch endothelialer Zellen ist, welche beide die BCR-ABL-Translokation tragen. Diese Studien waren Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zum Einfluss von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen auf die maligne Transformation. So wurde bei Patienten mit CML in weiteren Studien gezeigt, dass die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen frei von Leukämie-typischen Veränderungen sind, insbesondere der BCR-ABL-Translokation (Carrara et al. 2007; Wöhrer et al. 2007). Im komplexen funktionellen Zusammenspiel zwischen Knochenmarkstroma und Hämatopoese spielen neben mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen auch Makrophagen eine entscheidende Rolle, da sie in die neoplastische Proliferation mit einbezogen sind (Golde et al. 1977; Thiele et al. 1998). Makrophagen gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor, umgeben die perisinusoidalen Endothelzellen und bilden zusammen mit den stromalen Zellen das „microinvironment“ für die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. Diese „zentralen“ Makrophagen sind in der Lage hämatopoetische Wachstumsfaktoren freizusetzen und stehen außerdem über interzelluläre Verbindungen mit hämatopoetischen

Vorläuferzellen in Verbindung. Da sie aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen, sind sie positiv für das BCR-ABL-Fusionsonkogens und vermutlich mitverantwortlich für die selektive Proliferation der malignen Zellklone (Bhatia et al. 1995). Der gelegentliche PCR-Nachweis BCR-ABL-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark von Patienten mit CML ist vermutlich auf eine Kontamination der Proben mit malignen Makrophagen zurückzuführen. Die in dieser Arbeit untersuchten hochangereicherten CD105-positiven Zellen waren zu 85% positiv für die BCR-ABL-Translokation, was darauf hinweist, dass mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen bei der CML Teil des malignen Klons sind. Somit stehen unsere Daten zunächst im Widerspruch zu den oben genannten Studien. Da jedoch CD34-positive und CD105-positive Stamm- und Progenitorzellen womöglich aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle hervorgehen, die CML eine Stammzellerkrankung ist und man bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau weiß, an welchem Punkt der Stammzellentwicklung die Translokation stattfindet, ist es nicht auszuschließen, dass das chromosomale Rearrangement bereits in einer sehr frühen Stammzelle stattfindet und die CD105-positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen dadurch ebenfalls das BCR-ABL-Translokationsgen tragen.

Um den immunologischen und molekularen Phänotyp der CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit einer malignen Knochenmarkerkrankung, wie der CML zu bestimmen, führten wir durchflusszytometrische Untersuchungen und genomweite Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Array durch. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass das Oberflächenantigenmuster im Rahmen der malignen Transformation unverändert bleibt. Diese deckt sich mit Ergebnissen aus weiteren Studien (Zao et al. 2006; Carrara et al. 2007).

Um Veränderungen auf molekularer Ebene abzuklären, haben wir erstmals ein Genexpressionsprofil CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML erstellt. Für CD34-positive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen wurden Veränderung auf molekularer Ebene auf Genexpressionebene bereits gezeigt (Kronenwett et al. 2005).

Insgesamt konnten wir 152 differentiell exprimierte Gene im Vergleich zu CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender nachweisen. Nach Einteilung in funktionelle Gruppen zeigte sich, dass Gene der Zellzyklusregulation, der

DNA-Synthese, der Apoptosesteuerung und der Stressabwehr in CD105-positiven Zellen von CML-Patienten eine niedrigere Expressionsstärke aufwiesen. Somit weist das Genexpressionsmuster von CD105-positiven Zellen bei der CML im Vergleich zu ihrem Gegenstück beim Gesunden auf eine geringere Proliferation und eine geringere Stressresistenz hin. Des Weiteren zeigte sich, dass die Signalwahrnehmung über Oberflächenmoleküle sowie die konstitutive Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in CD105-positiven Zellen im Knochenmark von CML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern verändert war. Zytokine können das biologische Verhalten der Zellen beeinflussen, indem sie die Zellproliferation stimulieren, Apoptose unterdrücken, die Immunantwort modulieren und schließlich die Tumervaskularisierung stimulieren (Kebelman-Betzing et al. 2001). Sie sind somit Schlüsselenzyme im Prozess der malignen Transformation (Wu et al. 2005). So konnte bereits gezeigt werden, dass es in der Blastenkrise der CML zu einer abnormalen Expression von IL1beta, IL6, GM-CSF und LIF (leukemia inhibitory factor) durch Stromazellen und somit einer parakrinen Stimulation der malignen Zellpopulation (Ferrajoli et al. 1996) kommt. Unsere Daten zeigen eine verminderte Expression von IL10, IL13, IL1b und insulin-like growth factor binding Protein und eine erhöhte Expression von IL12 beta subunit sowie Calgranulin A und B (S100A8 und S100A9) in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie. Calgranulin, auch als S100 kalzium-bindendes Protein beschrieben, gehört zur Familie der kalzium-bindenden EF-Hand Proteine und wird gewebs- und zellspezifisch lediglich in Vertebraten exprimiert (Schafer and Heizmann 1996). Bislang umfasst die Familie der S100 Proteine 21 Mitglieder, es handelt sich dabei um kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-12 kDa mit überwiegend saurer Aminosäurezusammensetzung. Die Namensgebung erfolgt aufgrund ihrer Löslichkeit in 100%iger Ammoniumsulfatlösung. Sie sind in die Regulation vieler unterschiedlicher Prozesse einbezogen, wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellmotilität, Zellzyklusregulation, Transkription, Inflammation und Überleben (Donato 2001; Heizmann et al. 2002; Donato 2003; Salama et al. 2008). Mit Ausnahme der S100-Proteine S100B, CALB (Calbinin 3) und S100P sind alle bisher identifizierten Mitglieder auf einem engen Gen-Cluster auf Chromosom 1q21 lokalisiert, welches bekannt ist für seine chromosomalen Anomalien und Rearrangements in malignen Neoplasien (Heinzmann et al. 2002; Emberley

et al. 2004; Carlsson et al. 2005, Luthra et al. 2007; Liu et al. 2008). Eine ganze Reihe von S100 Proteinen sind in malignen Zellen differentiell exprimiert und sind assoziiert mit Tumorentwicklung, Tumorentstehung und Metastasierung (Salama et al. 2008). Eine erhöhte Expression von S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B) konnte bereits beim Adenokarzinom des Pankreas (Shen et al. 2004), Blasenkarzinomen (Yao et al. 2007) und Mammakarzinomen (Cross et al. 2005) nachgewiesen werden. Man erkannte außerdem, dass ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke der S100 Proteine und dem Ausmaß des invasiven Verhaltens der malignen Zellen besteht. Die Bestimmung von S100A8 und S100A9 im Serum wurde bereits als neue, exaktere Screening Methode im Vergleich zur PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomvorsorge diskutiert (Hermani et al. 2005). Für die chronische myeloische Leukämie konnte eine Überexpression von S100A8 und S100A9 in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen erstmals in unserer Untersuchungen gezeigt werden. Obwohl die Funktion der S100 Proteine in malignen Zellen bislang noch unbekannt sind, kann das spezifische Expressionsmuster dieser Proteine ein wertvolles neues prognostisches Instrument darstellen.

Des Weiteren zeigte sich in den Genexpressionsdaten eine Überexpression von kleinen G-Proteinen. Kleine G-Proteine sind monomere GTPasen, die im Zellzyklus an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt sind. Anhand der unterschiedlichen Funktionen in der Zelle wird die Subfamilie der kleinen G-Proteine, die über 100 Mitglieder enthält, in 5 Subfamilien eingeteilt (Takai et al. 2001): die Ras-, Rho-, Sar1/Arf- sowie die Ran-Familie. Ras-ähnliche Proteine beeinflussen die Genexpression und sind an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Eine konstitutive Aktivierung der Ras-Proteine führt häufig zur Tumorentstehung bei. Die Proteine der Sar1/Arf-Familie und der Ran-Familie übernehmen die Regulation des Vesikeltransportes, sowie die Regulation des Transportes zwischen Zytoplasma und Zellkern (Stein et al. 2003). Im Rahmen der Mitose übernehmen sie die Funktion der Organisation der Mikrotubuli (Carazo-Salas et al. 2001). Die Rho-Proteine sind hauptsächlich an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Ridly et al. 1992). Das Aktin-Zytoskelett ist maßgeblich an der Stabilität der Zell-Zell-Interaktion als auch der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt. Die Stabilität der Verbindungen kann entscheidend für die Interaktionen der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und dem Stroma sein. Bezüglich der Adhäsion der malignen Stamm- und Progenitorzellen an die

Extrazellulärmatrix sind Stimulation als auch Inhibition der Proliferation beschrieben. Zum einen konnte gezeigt werden, dass maligne hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine verminderte Adhäsion an das Stroma und Fibronectin zeigen, während sie eine gesteigerte Adhäsion an Laminin und Kollagen Typ IV aufweisen (Verfaillie et al. 1992). Die gestörte Adhäsion führt schließlich zur gesteigerten Proliferation der malignen Zellklone. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass BCR-ABL die Adhäsion hämatopoetischen Zellen an Fibronectin verstärkt und diese Art der Adhäsion die Proliferation fördert (Kramer et al. 1999). Entscheidend dabei ist die Fähigkeit der malignen Zellen, sich auch bei Verlust der Stromabindung weiter zu vermehren (Krämer et al. 2001; Bazzoni et al. 1996). Außerdem können Mitglieder der Rho-Familie Einfluss auf die Genexpression nehmen (Hill et al. 1995) und Aufgaben im zellulären Vesikeltransport übernehmen (Lamaze et al. 1996). In den Genexpressionsdaten zeigte sich eine erhöhte Expression von RhoA. Vermutlich führt die gesteigerte Adhäsion zu einem Proliferationsimpuls.

Betrachtet man Gene der Zellzyklusregulation, der DNA-Synthese und der Transkription, so zeigt sich in unseren Genexpressionsanalysen von malignen CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen eine profunde Veränderungen im Genexpressionsprofil. In der Gruppe der Zellzyklus-regulierenden Gene zeigten sich insgesamt 13 Gene differentiell exprimiert. Davon waren 12 Gene in stromalen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender erhöht exprimiert. Es zeigt sich, dass in jeder Phase des Zellzyklus Gene überexprimiert zur Darstellung kommen. In der funktionellen Gruppe der DNA-Synthese zeigten sich 14 Gene differentiell exprimiert. Davon waren alle Gene in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender erhöht exprimiert. Zusammenfassend zeigt sich beeindruckend die erniedrigte Proliferationsaktivität in CD105-positiven Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen verminderter Proliferationsaktivität der stromalen Stamm- und Progenitorzellen und dem Auftreten einer progredienten retikulären und kollagenen Fibrose im Krankheitsverlauf der chronisch myeloischen Leukämie. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bereits in 28% der Fälle eine schwere Fibrose vor (Thiele et al. 2000). Mehrere Untersuchungen haben zeigen können, dass die Myelofibrose ein wesentlicher prognostischer Marker für das Überleben darstellt (Lazarrino et al. 1986; Thiele et al. 1998). Wenn die chronische myeloische Leukämie in eine aggressive oder

blastische Phase übergeht, kommt es häufig zur Progredienz. Die Ursachen für die Fibrose sind derzeit noch nicht genau verstanden. Wiederholt sind in diesem Zusammenhang signifikante Korrelationen zwischen der Anzahl der Megakaryozyten einschließlich ihrer Vorläuferzellen mit der Faserdichte beschrieben worden (Thiele et al. 2000). Experimentelle Studien zeigen außerdem eine Beteiligung der Monozyten/Makrophagen, die wie die Megakaryozyten PDGF und TGF- β produzieren (Rameshwar et al. 1996).

Daneben zeigten sich bei Apoptose-assoziierten Gene Veränderungen im Genexpressionsprofil. Einerseits waren pro-apoptotische Gene wie caspase 2, GADD45, GADD153 und BAX herunter reguliert, andererseits aber auch die anti-apoptotischen Gene BAG1, BCL-xl, IAP3, AKT1 und Insulin-like growth factor 1 receptor. Da es sich sowohl um pro- als auch um anti-apoptotische wirksame Genprodukte handelt, kann letztlich der funktionelle Aspekt aus den in diese Arbeit gewonnen Daten nicht abgeschätzt werden, Zudem darf die Apoptose nicht als isolierter pathophysiologischer Mechanismus gesehen werden.

Die Genexpressionsdaten spiegeln im Gegensatz zu CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen nicht die pathogenetischen Säulen der CML wider. So lassen sich in den gewonnen Daten keine Hinweise auf eine erhöhte mitogene Aktivität durch Hochregulation von Zellzyklusgenen und auf eine reduzierte Apoptoseaktivität finden. Beides entscheidende Mechanismen der CML. Auch Gene die BCR-ABL nachgeschaltet sind wie die Janus kinase 2 und Gene der ras-Familie, sind in CD105-positiven mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen nicht signifikant in ihrer Expression verändert, im Gegensatz zu CD34-positiven Zellen der CML, bei denen eine Veränderung der transkriptionellen Aktivität nachgeschalteter Gene gezeigt wurde (Kronenwett et al. 2005; Diaz Blanco et al. 2007). In Zusammenschau mit den Ergebnissen der FISH spricht dies für das stumme Vorhandensein der BCR-ABL-Translokation.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann man sagen, dass Genexpressionsanalysen ein probates Mittel darstellen, um neue prognostische Marker und neue therapeutische Zielgene zu identifizieren. Obwohl die BCR-ABL-Translokation als Ursache der chronischen myeloischen Leukämie bekannt ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen nur unvollständig erforscht. Die Schwierigkeit der Fassbarkeit der CML-Zellbiologie liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Unterschiede zur normalen Hämatopoese oft nur gering erscheinen. Unsere Daten erweitern das molekulare Verständnis der Pathogenese der CML, insbesondere der Bedeutung der mesenchymalen Vorläuferzellen.

Im Rahmen der Gewebeersatztherapie durch Stammzelle stellt sich immer wieder die Frage, inwieweit mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen zur Behandlung verschiedener Erkrankungen genutzt werden können. Undifferenzierte mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit, die Hämatopoese zu unterstützen und das Milieu zu regulieren (Haynesworth et al. 1996; Deans et al. 2000). Ihnen wird außerdem eine Immunmodulation und –Suppression zugeschrieben (Le Blanc et al. 2006). Der Mechanismus dieser immunologischen Einflüsse ist bislang nur zum Teil verstanden, spielt aber für die klinische Anwendung eine große Rolle. Im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation stellt die Gabe von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen durch Unterdrückung der Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Graft Versus Host Disease) einen neuen vielversprechenden Therapieansatz dar, wobei derzeit unklar ist, welche Auswirkungen dies auf die jeweilige Grunderkrankung hat (Herrero et al. 2010).

Das große Differenzierungsvermögen der mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen und die Unterdrückung der Immunabwehr stellt eine entscheidende wirtschaftliche und medizinische Bedeutung für die allogenen Anwendung der Zellen im Rahmen des Tissue Engineering dar.

6. Zusammenfassung

Für die normale Hämatopoese spielen Stromazellen und deren Progenitorzellen durch Bereitstellung eines geeigneten „*hämatopoetischen Microenvironment*“ eine entscheidende Rolle. Dennoch ist über mesenchymale Progenitorzellen des Knochenmarks und deren Veränderungen im Rahmen hämatologischer Neoplasien bisher nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, CD105-positive mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender auf molekularer und funktioneller Ebene zu charakterisieren und diese mit einem weiteren Stamm- und Progenitorzelltyp des Knochenmarks, den CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen, zu vergleichen. Des Weiteren sollten die genomweiten transkriptionellen Veränderungen in mesenchymalen Vorläuferzellen im Rahmen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) mit Hilfe von cDNA-Makroarrays untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde in Immunfluoreszenzanalysen gezeigt, dass CD105-positive Zellen des Knochenmarks ein spezifisches Oberflächenexpressionsmuster besitzen, welches sich durch klassische Marker erythropoetischer Progenitorzellen wie CD71, dem Fehlen typischer hämatopoetischer Oberflächenmarker, dem Fehlen des Endothelzellmarkers VCAM-1 und dem Fehlen immunologischer Marker wie HLA-DR auszeichnet. Trotz Nachweisbarkeit typischer Erythropoesemarker konnte mittels klonogenem Wachstumstest ausgeschlossen werden, dass es sich bei den isolierten CD105-positiven Zellen um erythropoetische Progenitorzellen handelt. In den vergleichenden genomweiten Genexpressionsanalysen von CD105-positiven und CD34-positiven Zellen mittels cDNA-Makroarrays spiegelten sich auf molekularer Ebene unterschiedliche zellbiologische und funktionelle Eigenschaften wider. Der molekulare Phänotyp CD105-positiver mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen weist auf eine erhöhte Proliferationsaktivität und eine aktivere Stressabwehr hin. Beide Vorläuferzellpopulationen exprimierten ein spezifisches Muster an Transkriptionsfaktoren, welches entscheidend für eine hämatopoetische und mesenchymale Differenzierung ist. Keine transkriptionelle Unterschiede zeigten sich für Apoptose-, Signaltransduktion- und Adhäsion-assoziierte Gene.

Beim Vergleich CD105-positiver Zellen gesunder Spender mit denjenigen von Patienten mit CML zeigten sich immunphänotypisch keine Unterschiede im Muster der Oberflächenantigene. Im Gegensatz dazu konnten erstmals durch vergleichende genomweite Genexpressionsanalysen von CD105-positiven Zellen gesunder Spender und von Patienten mit CML 152 signifikant differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Der molekulare Phänotyp von CD105-positiven Zellen von Patienten mit CML weist auf eine geringere Proliferationsaktivität und eine geringere genetische Stabilität durch eine verminderte Expression von Genen der Stressabwehr hin. Erstmals konnte für die CML eine Überexpression von S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B) in mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen gezeigt werden. Beides Gene, die mit Tumorentwicklung, Invasion und Metastasierung assoziiert sind. Eine Veränderung von BCR-ABL-nachgeschalteten Genen, wie sie in CD34-positiven Zellen bei der CML nachgewiesen wurden, zeigte sich nicht, obwohl die in dieser Arbeit isolierten CD105-positiven Zellen in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung das BCR-ABL-Translokationsgen trugen. Unsere Befunde sprechen daher einerseits für eine stumme BCR-ABL-Translokation in mesenchymalen Vorläuferzellen und zum anderen dafür, dass das chromosomale Rearrangement bereits in einer frühen Stammzelle stattfindet.

Diese Arbeit liefert erstmals eine genomweite Transkriptionsanalyse von CD105-positiven Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender und Patienten mit CML. Die Ergebnisse ermöglichen neue Einblicke in die Biologie mesenchymaler Vorläuferzellen und führen zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Rolle von Stromazellen in der Genese von hämatologischen Neoplasien.

7. Anhang

7.1 Differentiell exprimierte Gene in CD34-positiven und CD105-positiven Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender

Genbank	Gene name	Med.	CD34					Ratio	CD105					Med.
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
adhesion														
L12002	integrin, alpha 4 (antigen CD49D)	0,317						0,52						0,608
M59040	CD44 antigen (Indian blood group)	0,161						3,29						0,049
apoptosis														
X76104	death-associated protein kinase 1	0,300						1,90						0,158
U32944	dynein, cytoplasmic, light polypeptide	0,344						0,54						0,634
U28014	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	0,635						5,21						0,122
cell cycle														
X51688	cyclin A2	0,089						0,23						0,384
M25753	cyclin B1	0,152						0,17						0,884
X05360	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0,054						0,14						0,386
U01038	polo (Drosophila)-like kinase	0,079						0,17						0,483
D13639	cyclin D2	0,296						3,05						0,097
M14505	cyclin-dependent kinase 4	0,225						0,78						0,290
L27211	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16, inhibits CDK4)	0,135						6,75						0,020
X66365	cyclin-dependent kinase 6	1,606						3,17						0,507
U40343	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	0,290						4,14						0,070
X66364	cyclin-dependent kinase 5	0,168						1,98						0,085
X55504	nucleolar protein 1 (120kD)	0,181						2,45						0,074
M81750	myeloid cell nuclear differentiation antigen	0,564						11,06						0,051
U05340	CDC20 (cell division cycle 20, S. cerevisiae, homolog)	0,179						0,22						0,804
X54942	CDC28 protein kinase 2	0,244						0,44						0,560
M81933	cell division cycle 25A	0,104						0,50						0,209
L23959	transcription factor Dp-1	0,490						0,31						1,598
M97287	special AT-rich sequence binding protein 1	0,247						2,04						0,121
U05040	far upstream element (FUSE) binding protein 1	0,044						0,34						0,130
cell surface														
M34480	integrin, alpha 2b (antigen CD41B)	0,473						3,56						0,133
AF060231	poliovirus receptor-related 1 (nectin)	0,155						0,37						0,416
DNA-synthesis														
D21063	MCM2 DNA replication licensing factor	0,568						0,47						1,198
M13194	excision repair cross-complementing rodent repair deficie	0,747						2,03						0,368
X74794	minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 4	0,413						0,40						1,025
M80397	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125i	0,266						0,50						0,537
J03250	topoisomerase (DNA) I	0,071						0,36						0,198
D84557	minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe	0,130						0,42						0,310
J04088	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)	0,282						0,26						1,089
U07418	mutL (E. coli) homolog 1 (colon cancer, nonpolyposis type	3,798						4,43						0,858
L07493	replication protein A3 (14kD)	0,065						0,16						0,407
D21090	RAD23 (S. cerevisiae) homolog B	0,278						0,47						0,594
L14922	replication factor C (activator 1) 1 (145kD)	0,045						0,20						0,224

7. Anhang

Genbank	Gene name	Med.	Ratio										Med.	
			CD34					CD105						
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
DNA-synthesis														
M87338	replication factor C (activator 1) 2 (40kD)	0,089											0,18	0,488
M32865	thyroid autoantigen 70kD (Ku antigen)	0,183											0,39	0,473
AF025840	polymerase (DNA directed), epsilon 2	0,022											0,17	0,132
L09561	polymerase (DNA directed), epsilon	0,063											0,40	0,159
L07540	replication factor C (activator 1) 5 (36.5kD)	0,025											0,15	0,172
D38073	minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 3	0,052											0,15	0,359
L07541	replication factor C (activator 1) 3 (38kD)	0,066											0,16	0,424
X84740	ligase III, DNA, ATP-dependent	0,079											0,31	0,259
X06745	polymerase (DNA directed), alpha	0,094											0,20	0,480
M87339	replication factor C (activator 1) 4 (37kD)	0,336											0,37	0,911
M74524	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	0,256											0,44	0,576
X78627	translin	0,628											1,71	0,368
growth factor														
M32977	vascular endothelial growth factor	0,098											0,24	0,413
M57627	interleukin 10	0,453											0,15	3,052
D16431	hepatoma-derived growth factor (HDGF)	0,318											0,24	1,339
K03515	glucose phosphate isomerase	1,027											4,12	0,249
K02770	interleukin 1, beta	0,473											0,46	1,034
M92381	thymosin, beta 10	4,799											2,13	2,257
X04602	interleukin 6 (interferon, beta 2)	0,510											0,27	0,146
M17733	thymosin, beta 4	11,916											6,93	1,719
growth factor-receptors														
M59818	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	1,114											6,26	0,178
X01057	interleukin 2 receptor, alpha	3,625											3,04	1,191
U03187	interleukin 12 receptor, beta 1	0,109											8,39	0,013
M75914	interleukin 5 receptor, alpha	0,051											0,43	0,118
M60459	erythropoietin receptor	0,025											0,18	0,141
D11086	interleukin 2 receptor, gamma	0,503											3,93	0,128
metabolism														
M65212	catechol-O-methyltransferase	0,943											4,72	0,200
M14200	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator)	1,498											10,12	0,148
D00726	ferrochelataze (protoporphyrin)	0,100											0,07	1,440
X15480	glutathione S-transferase pi	5,254											4,67	1,126
X53463	glutathione peroxidase-related protein 2 (GPRP)	0,094											0,08	1,128
L19185	peroxiredoxin 2	1,028											0,05	20,580
M13267	cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)	0,404											0,20	2,008
X76648	glutaredoxin (thioltransferase)	0,168											0,27	0,634
neuro														
X53655	neurotrophin 3	4,678											2,85	1,641
oncogenes, tumor suppressors														
M80359	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	0,154											0,36	0,434
K00650	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0,293											3,53	0,083
U11732	ets variant gene 6 (TEL oncogene)	0,470											6,44	0,073
M15024	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog	0,423											3,13	0,135
V00568	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	9,531											6,25	1,525
proteinases and inhibitors														
Y00264	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II)	0,624											5,24	0,119
D00761	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	0,166											0,48	0,348
M93056	serpin proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member	1,044											6,57	0,159
replication														
M23619	high-mobility group protein AT-hook 1 (HMGA1)	5,457											1,64	3,338

7. Anhang

Genbank	Gene name	Med.	CD34					Ratio	CD105					Med.
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
SKP														
M16038	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homo	0,211						23,44						0,009
U78576	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	0,187						6,23						0,030
X01060	transferrin receptor (p90, CD71)	0,187						0,08						2,381
L36719	mitogen-activated protein kinase kinase 3	0,129						0,15						0,866
D10924	chemokine (C-X-C motif), receptor 4 (fusin)	0,781						6,05						0,129
L29511	growth factor receptor-bound protein 2	1,084						2,39						0,453
X69550	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	1,902						2,54						0,750
S76965	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	0,043						0,11						0,402
L20422	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase	0,107						0,19						0,571
stress														
Y00371	heat shock 70kD protein 8	0,193						0,12						1,660
M34664	heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)	0,202						0,29						0,705
M25627	glutathione S-transferase A2	0,142						0,28						0,507
transcription														
L19067	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog	0,105						0,38						0,278
M97935	STAT1	0,061						0,17						0,366
M97934	STAT2	0,032						0,14						0,226
L04282	zinc finger protein 148 (pHZ-52)	0,333						0,68						0,492
X15949	interferon regulatory factor 2	0,236						0,64						0,367
M21535	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related	0,256						8,53						0,030
U15306	nuclear transcription factor, X-box binding 1	0,103						0,43						0,238
M68891	GATA-binding protein 2	1,101						13,76						0,080
Z36715	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	0,643						5,23						0,123
U35143	retinoblastoma-binding protein 7	0,101						0,38						0,264
L14754	immunoglobulin mu binding protein 2	0,058						0,60						0,097
M96577	E2F transcription factor 1	0,117						0,59						0,198
U04847	actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, mem	1,043						1,93						0,540
S73885	transcription factor AP-4 (activating enhancer-binding prot	0,120						4,80						0,025
D26155	actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, mem	0,352						1,97						0,179
J04102	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	0,141						35,25						0,004
D28118	zinc finger protein 161	0,747						1,88						0,398
M93255	Friend leukemia virus integration 1	1,311						16,39						0,080
L11672	zinc finger protein 91	0,327						1,82						0,180
M14631	guanine nucleotide binding protein (G protein)	7,776						2,14						3,635
M62829	early growth response 1	0,747						3,06						0,244
M62831	immediate early protein	0,827						3,66						0,226
U03494	transcription factor CP2	0,423						2,36						0,179

<0,08
0,08-1
0,3-1
1,0-3
3,0-9
>10

Abbildung 7.1: Darstellung differenziell exprimierte Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen. Analysiert wurden 5 Proben von gesunden Spendern. Die relative Expressionsstärke ist farbkodiert dargestellt. Angegeben sind die Mediane der Proben, sowie deren Verhältnis (CD34/CD105) zueinander. Die Bezeichnung der Gene erfolgt nach der HUGO-Nomenklatur. **SKP:** proteinases, inhibitors

7.2 Differentiell exprimierte Gene in CD105-positiven Zellen gesunder Spender und Patienten mit CML

GenBank	Gene name	Med.	Ratio		Med.										
			CD105-HD					CD105-CML							
			1	2		3	4	5	1	2	3	4	5	6	
adhesion															
X74295	integrin alpha 7B (IGA7B)	0,160													
X79981	cadherin 5 (CDH5)	0,057													
apoptosis															
X04434	insulin-like growth factor I receptor (IGF1R)	0,335													
U25994	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	0,272													
U13021	caspase 2 (CASP2)	0,543													
L41690	tumor necrosis factor receptor 1-associated death	0,355													
M60974	growth arrest & DNA damage-inducible protein	0,260													
U04806	FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3 ligand;	0,149													
L34583	protein-tyrosine phosphatase 1E	0,099													
S83171	BCL2-binding athanogene 1 (BAG1)	0,408													
M63167	akt1 proto-oncogene	0,546													
M93426	protein-tyrosine phosphatase zeta (R-PTP-zeta)	0,120													
S40706	growth arrest & DNA damage-inducible protein 153	0,332													
U29680	BCL2-related protein A1 (BCL2A1)	0,140													
U45880	inhibitor of apoptosis protein 3 (API3; IAP3)	0,187													
U84388	RIP-associated protein with death domain (RAIDD)	0,097													
L22474	BAX	0,150													
cell cycle															
U01038	polo-like kinase (PLK)	0,557													
AF046079	BUBR1 protein kinase	0,307													
M80629	CDC2-related protein kinase CHED	0,186													
U05040	FUSE binding protein	0,208													
X05360	cell division control protein 2 homolog (CDC2)	0,444													
U08191	R kappa B DNA-binding protein	0,232													
D88435	cyclin G-associated kinase (GAK)	0,224													
M81934	cell division cycle 25 homolog B (CDC25B)	0,392													
AF051782	diaphanous 1 (HDIA1)	0,155													
L23959	E2F dimerization partner 1	1,647													
M81933	cell division cycle 25 homolog A (CDC25A)	0,286													
U28838	transcription factor TFIIIB 90-kDa subunit (TFIIIB90)	0,107													
L29220	CDC-like kinase 3 (CLK3)	0,115													
L25676	cell division protein kinase 9 (CDK9)	0,193													
X66365	cell division protein kinase 6 (CDK6)	0,574													
DNA-Synthesis															
D38073	MCM3 DNA replication licensing factor	0,426													
L07541	replication factor C 38-kDa subunit (RFC38)	0,492													
AF025840	DNA polymerase II subunit B	0,213													
M32865	Ku 70-kDa subunit (KU70)	0,545													
X59764	DNA-lyase; AP endonuclease 1 (APE1)	0,297													
U33841	ataxia telangiectasia mutated protein (ATM)	0,255													
AF082556	TRF1- polymerase (TANKYRase; TNKS)	0,126													
D21090	UV excision repair protein RAD23 homolog B	0,664													
X52221	xeroderma pigmentosum group D complementing	0,259													
M30938	Ku (p70/p80) subunit	0,203													
L20046	xeroderma pigmentosum group G complementing	0,381													

7. Anhang

GenBank	Gene name	Med.	CD105-HD					Ratio	CD105-CML						Med.
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	6	
oncogenes, tumor suppressors															
L25050	ras homolog gene family member A (RHOA; ARHA)	1,896						0,63							3,011
X75042	c-rel proto-oncogene protein	0,166						0,62							0,267
V00568	myc proto-oncogene	1,594						0,33							5,809
proteinases and inhibitors															
D00761	proteasome beta 1 subunit (PSMB1)	0,428						2,05							0,231
K01500	alpha-1-antichymotrypsin (ACT)	0,163						2,01							0,081
D00759	proteasome alpha 1 subunit (PSMA1)	0,208						1,56							0,133
D00760	proteasome subunit alpha type 2 (PSMA2)	0,540						1,56							0,347
D88378	proteasome inhibitor subunit 1 (PSMF1)	0,461						1,51							0,306
SKP															
M18391	ephrin type A receptor 1 (EPHA1)	1,441						6,94							0,208
L08807	protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2	0,626						3,82							0,164
M23410	14-3-3n protein eta	0,624						3,75							0,166
M29870	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)	0,284						3,06							0,093
L13738	tyrosine-protein kinase ack	0,300						2,91							0,103
M23410	junction plakoglobin (JUP)	0,324						2,65							0,122
M31724	protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)	0,244						2,41							0,101
X59932	c-src kinase (CSK)	0,169						2,39							0,071
M63960	serine/threonine protein phosphatase alpha 1 (PPP1CA)	1,197						2,39							0,501
S87759	protein phosphatase 2C alpha isoform (PP2C-alpha)	0,542						2,36							0,230
AF036905	linker for activation of T-cells (LAT)	0,388						2,00							0,194
U61166	SH3p17 protein	0,190						1,92							0,099
L24959	calcium/calmodulin-dependent protein kinase subunit	0,148						1,85							0,080
M33336	cAMP-dependent protein kinase I alpha subunit	0,290						1,78							0,163
U14417	ras-related GTPase (RALGEF)	0,249						1,78							0,140
L14778	serine/threonine protein phosphatase 3 (PPP3CA)	0,474						1,65							0,287
U17032	GAP-associated protein	0,150						1,58							0,095
X75621	tuberin(TSC2)	0,290						0,68							0,423
X66363	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)	0,117						0,54							0,217
M65066	cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory	0,335						0,51							0,662
L07597	ribosomal protein S6 kinase II alpha 1 (S6KII-alpha 1)	0,564						0,49							1,143
L111285	MAP kinase kinase 2	0,115						0,17							0,676
stress															
Y00371	heat shock 70-kDa protein 8 HSP73	1,724						8,30							0,208
X14672	polymorphic arylamine N-acetyltransferase (PNAT)	0,166						2,59							0,064
L13278	quinone oxidoreductase	0,120						2,46							0,049
D49547	40-kDa heat-shock protein 1 (HSP40)	0,593						2,26							0,262
M25627	glutathione S-transferase A1 (GTH1; GSTA1)	0,576						2,15							0,268
X08020	glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1)	0,398						2,07							0,192
X51757	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein	0,237						1,91							0,124
X54079	27-kDa heat shock protein (HSP27)	3,323						0,56							5,961
transcription															
U76638	BRCA1-associated ring domain protein 1 (BARD1)	0,114						4,75							0,024
M97935	STAT1	0,427						4,56							0,094
M97934	STAT2	0,292						3,98							0,073
U78773	transcription intermediary factor 1 beta (TIF1B)	0,151						2,68							0,056
L14754	DNA-binding protein SMBP-2	0,176						2,40							0,074
D26121	ZFM1 protein [alternatively spliced]	0,420						2,24							0,188
U15306	transcriptional repressor NF-X1	0,316						2,18							0,145
L34673	DNA-binding protein HIP116	0,161						2,06							0,078
M58603	paired box protein 5 (PAX5)	0,488						1,97							0,247
U35143	retinoblastoma-binding protein 7 (RBBP7)	0,343						1,86							0,184
Y10479	E2F transcription factor 3 (E2F3)	0,349						1,79							0,195

7. Anhang

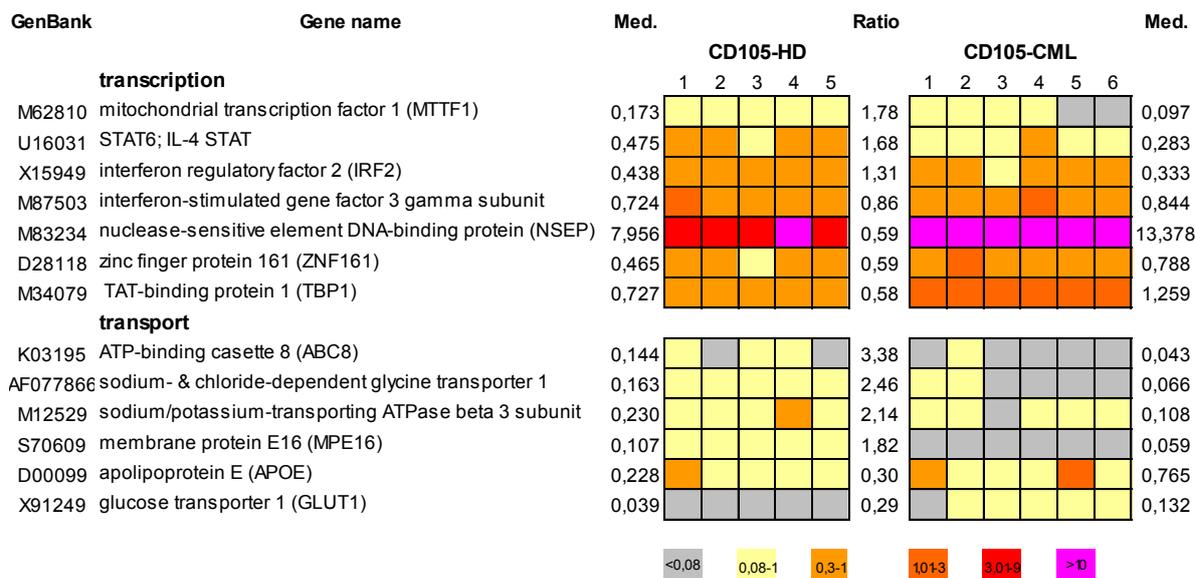


Abbildung 7.2: Darstellung differentiell exprimierter Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen.

Analysiert wurden 5 Proben von gesunden Spendern und 6 Proben von CML-Patienten in der chronischen Phase. Die relative Expressionsstärke ist farbkodiert dargestellt. Angegeben sind die Mediane der Proben, sowie deren Verhältnis (HD/CML) zueinander. Die Bezeichnung der Gene erfolgt nach der HUGO-Nomenklatur. HD: Healthy Donor (gesunder Spender). **SKP**: proteinases, inhibitors

8. Literaturverzeichnis

Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL (1998)

Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells
Biochem Biophys Res Commun. Volume 247(1):33-37

Ader M, Schachner M, Bartsch U (2004)

Integration and differentiation of neural stem cells after transplantation into the demyelinated central nervous system of adult mice
Eur J Neurosci. Volume 20(5):1205-1210

Asahara T, Kawamoto A (2004)

Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis
Am J Physiol Cell Physiol. Volume 287(3):C572-C579 Review

Barbara NP, Wrana JL, Letarte M (1999)

Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily
J Biol Chem. Volume 274(2):584-594

Bazan E, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Alfaro JM, Reimers D, Herranz AS, Paino CL, Serrano AB, Cobacho N, Caso E, Lobo MV (2004)

In vitro and in vivo characterization of neural stem cells
Histol Histopathol. Volume 19(4):1261-1275 Review

Bazzoni G, Carlesso N, Griffin JD, Hemler ME (1996)

Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines
J Clin Invest. Volume 98(2): 521-528

Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, Urbani S, Deledda C, Cellai I, Francini F, Squecco R, Rosati F, Danza G, Gelmini S, Greeve I, Rossi M, Maggi R, Serio M, Peri A (2006)

Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1
Exp Cell Res. Volume 312(13):2592-2604

Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM (1995)

Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages
Blood Volume 85(12):3636-3645

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2002)

Bone marrow stromal cells changes in hematological malignancies
J Clin Pathol. Volume 43:942-946

Björnsson JM, Andersson E, Lundström P, Larsson N, Xu X, Repetowska E, Humphries RK, Karlsson S (2001)

Proliferation of primitive myeloid progenitors can be reversibly induced by HOXA10
Blood Volume 98(12):3301-3308

Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E (2004)

Self-renewal, multipotential, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche
Cell Volume 118(5):635-648

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000)

From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice
Science Volume 290(5497):1775-1779

Brittan M, Wright NA (2004)

Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development
Gut. Volume 53(6) 899-910 Review

Bromberg JF (2001)

Activation of STAT proteins and growth control
Bioessays Volume 23(2):161-169

Boulton M, Albon J (2004)

Stem cells in the eye
Int J Biochem Cell Biol. Volume 36(4):643-657 Review

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP (1998)

Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation
J Bone Miner Res. Volume 13(4):655-663

Cao B, Bruder J, Kovesdi I, Huard J (2004)

Muscle stem cells can act as antigen-presenting cells: implication for gene therapy
Gene Ther. Volume 11(17):1321-1330

Campbell AD, Long MW, Wicha MS (1987)

Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage
Nature Volume 329(6141):744-746

Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM (2006)

Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms.
Nat Biotechnol. Volume 24(9):1115-1122

Carazo-Salas RE, Gruss OJ, Mattaj, IW, Karsset E (2001)

Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly

Nat Cell Biol. Volume 3(3):228-234

Carrara RC, Orellana MD, Fontes AM, Palma PV, Kashima S, Mendes MR, Coutinho MA, Voltarelli JC, Covas DT (2007)

Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant

Braz J Med Biol Res. Volume 40(1):57-67

Caplan AI (1991)

Mesenchymal Stem Cells

J Orthop Res. Volume 9(5):641-650

Chaudhari M, Cornelius JG, Schatz D, Peck AB, Ramiya VK (2001)

Pancreatic stem cells: a therapeutic agent that may offer the best approach for curing type 1 diabetes

Pediatr Diabetes. Volume 2(4):195-202

Chichester CO, Fernandez M, Miguell JJ (1993)

Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts

Cell Adhes Commun. Volume 1(2):93-99

Chong JP, Thömmes P, Blow JJ (1996)

The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication

Trends Biochem Sci. Volume 21(3):102-106

Civin CI, Gore SD (1993)

Antigenic analysis of hematopoiesis: a review

J Hematother. Volume 2(2):137-144 Review

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Sharper JH (1984)

Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells

J Immunol. Volume 133(1):157-165

Conget PA, Minguell JJ (1999)

Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells

J Cell Physiol. Volume 181(1):67-73

Cortez D, Reuther G, Pendergast AM (1997)

The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to- S phase transition in hematopoietic cells

Oncogene Volume 15(19):2333-2342

Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM (1993)

Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells
J Exp Med. Volume 177(5):1331-1342

Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I (2005)

Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers
Histopathology Volume 46(3):256-269

Dai Z, Pendergast AM (1995)

Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity
Genes Dev. Volume 9(21):2569-2582

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997)

Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery
Cell Volume 91(2):231-241

Deans RJ, Moseley AB (2000)

Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses
Exp. Hematol. Volume 28(8): 875-884

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000)

The molecular biology of chronic myeloid leukemia
Blood Volume 96(10): 3343-3356 Review

del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997)

Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt
Science Volume 278(5338):687-689

Derynck R, Feng XH (1997)

TGF-beta receptor signaling
Biochem Biophys Acta. Volume 1333(2):F105-F150

Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, Fischer JC, Graef T, Roskopf M, Brors B, Pechtel S, Bork S, Koch A, Baer A, Rohr UP, Kobbe G, Haeseler A, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R (2007)

Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase
Leukemia Volume 21(3): 494-504

Dilly SA, Jagger CJ (1990)

Bone marrow stromal cell changes in haematological malignancies

J Clin Pathol. Volume 43(11):942-946

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Martini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E (2006)

Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement

Cytotherapy Volume 8(4):312-317

Donato R (2001)

S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional role

Int Biochem Cell Biol. Volume 33(7): 637-687 Review

Donato R (2003)

Intracellular and extracellular roles of S100 proteins

Microsc Res Tech. Volume 60(6): 540-551 Review

Duhrsen U, Hossfeld DK (1996)

Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases

Ann Hematol. Volume 73(2):53-70 Review

Dybkaer K, Olesen G, Pedersen FS, Kristensen JS (2001)

Stromal-mediated down-regulation of CD13 in bone marrow cells originating from acute myeloid leukemia patients

Eur J Hematol. Volume 66(3):168-177

Emberley ED, Murphy LC, Watson PH (2004)

S100A7 and the progression of breast cancer

Breast Cancer Res. Volume 6(4): 153-159

van Etten RA (1999)

Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-ABL

Trends Cell Biol. Volume 9(5):179-786 Review

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brian S, Kurzrock R, Kantarjian HM (1999)

The biology of chronic myeloid leukemia

N Engl J Med. Volume 341(3): 164-172

Fang B, Zheng C, Liao L, Han Q, Sun Z, Jiang X, Zhou RC (2005)

Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics

Blood Volume 105(7):2733-2740

Fernandez-Vidal A, Mazars A, Manenti A (2008)

CDC25A: a rebel within the CDC25 phosphatases family?

Anticancer Agents Med Chem. Volume 8(8): 825-831

Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E, Moore SS, Dodson MV (2008)
Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering
Biochem Biophys Res Commun. Volume 368(3):455-457

Ferrajoli A, Fizzotti M, Liberati AM, Grignani F (1996)
Chronic myelogenous leukemia: an update on the biological findings and therapeutic approaches
Crit Rev Oncol Hematol. Volume 22(3): 151-174

Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T (1977)
Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage
Am J Med. Volume 63(1):125-130

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990)
Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells
Blood Volume 75(12):2417-2426

Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali PG, Altomonte M, Maio M (2000)
Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model
Clin Cancer Res Volume 6(5):2037-2043

Forsburg SL (2004)
Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation
Microbiol Mol Biol Rev. Volume 68(1):109-131 Review

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968)
Heterotropic of bone marrow. Analysis of precursor cell for osteogenic and hematopoietic tissues
Transplantation Volume 6(2):230-247

Fuchs E, Tumbar T, Guach G (2004)
Socializing with the neighbors: stem cells and their niche
Cell Volume 116(6):769-778

Gall JG, Pardue ML (1969)
Formation and detection of RNA- DNA hybrid molecules in cytological preparations
Proc Natl Acad Sci USA Volume 63(2):378-381

Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervé P, Charbord P (1993)
Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway
Blood Volume 82(1):66-76

Glück U, Zipori D, Wetzler M, Berrebi A, Shaklai M, Drezen O, Zaizov R, Luria D, Marcelle C, Stark B (1989)

Long-term proliferation of human leukemia cells induced by mouse stroma

Exp Hematol. Volume 17(5):398-404

Gougos A, Letarte M (1988)

Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line

J Immunol. Volume 141(6):1925-1933

Gronthos S, Simmons PJ (1995)

The growth factor requirements of STRO-1-positive human marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro

Blood Volume 85(4):929-940

Golde DW, Burgaleta C, Sparkes RS, Cline MJ (1977)

The Philadelphia chromosome in human macrophages

Blood Volume 49(3):367-370

Guenther UP, Handoko L, Lagerbauer B, Jablonka S, Chari A, Alzheimer M, Ohmer J, Plöttner O, Gehring N, Sickmann A, von Au K, Schuelke M, Fischer U (2009)

IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA typ 1 (DSMA1)

Hum Mol Genet. Volume 18(7):1288-1300

Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kähler CM, Grünwald K, Stockhammer G, Gabl C, Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G (2000)

Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells

Lancet Volume 355(9216):1688-1691

Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A (1993)

Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells

Blood Volume 81(10):2658-2663

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992)

Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies

Bone Volume 13(1):69-80

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1996)

Cytokine expression by human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 alpha

J Cell Physiol Volume 166(3):585-592

Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI (2007)

Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regeneration medicine
Tissue Eng. Volume 13(8):1799-7808

Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW (2002)

S100 proteins: structure, functions and pathology
Front Biosci. Volume 7: d1356-1368

Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D (2005)

Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer
Clin Cancer Res. Volume 11(14): 5146-5152

Herrero C, Pérez-Simón JA (2010)

Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells
Braz J Med Biol Res. Volume 43(5): 425-430

Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöll E Kähler CM (2004)

CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumor vasculature in non-small cell lung cancer
J Clin Pathol. Volume 57(9):965-969

Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995)

The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF
Cell Volume 81(7):1159-1170

Horvath CM (2000)

STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals
Trends Biochem Sci. Volume 25(10):496-502

Huang S, Terstappen LW (1994)

Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38⁻ hematopoietic stem cells
Blood Volume 83(6):1515-1526

Huang N, Kawano MM, Mahmoud MS, Mihara K, Tsujimoto T, Niwa O, Kuramoto A (1995)

Expression of CD21 antigen on myeloma cells and its involvement in their adhesion to bone marrow stromal cells
Blood Volume 85(12):3704-3712

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA (2006)

Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue

J Cell Biochem Volume 99(5):1285-1297

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002)

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow

Nature Volume 418(6893):41-49

Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M (2006)

In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells

Biochem Biophys Res Commun. Volume 340(2):639-647

Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Freireich EJ (1988)

Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia

Cancer Volume 61:1441-1446

Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R (2006)

Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads

Bone Marrow Transplant Volume 37(10):967-976

Kebelmann-Betzing C, Körner G, Badiali L, Buchwald D, Möricke A, Korte A, Köchling J, Wu S, Kappelmeier D, Oettel K, Henze G, Seeger K (2001)

Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor ALL

Cytokine Volume 23 (1):39-50

Kobari L, Giarratana MC, Pflumio F, Izac B, Coulombel L, Douay L (2001)

CD133⁺ cell selection is an alternative to CD34⁺ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells

J Hematother Stem Cell Res. Volume 10(2):273-281

Krämer A, Löffler H, Bergmann J, Hochhaus A, Hehlmann R (2001)

Proliferating status of peripheral blood progenitor cells from patients with BCR/ABL-positive chronic myelogenous leukemia

Leukemia. Volume 15(1): 62-68

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996)

CD34: structure, biology and clinical utility

Blood Volume 87(1):1-13

Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Bork S, Blanco ED, Roes N, Gräf T, Brors B, Eils R, Maercker C, Kobbe G, Gattermann N, Haas R (2005)

Distinct molecular phenotype of malignant CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia
Oncogene Volume 24(34):5313-5324

Kronenwett R, Haas R (2001)

Molekulare Diagnostik bei Leukämien – Grundlagen für neue Behandlungskonzepte in der Hämatologie
Innovatis 3: 23-30

Kushner J, Bradley G, Young B, Jordan RC (1999)

Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma
J Oral Pathol Med. Volume 28(2):77-81

Kuto F, Nagaoka T, Watanabe Y, Hayashi M, Horasawa Y, Hirasawa Y, Tokuhiko H (1984)

Chronic myelocytic leukemia: ultrastructural histopathology of bone marrow from patients in the chronic phase
Ultrastruct Pathol. Volume 6(4):307-317

Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL (1996)

Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac
Nature Volume 382(6587):177-179

Lan L, Cui D, Nowak K, Derwahl M (2007)

Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require TSH for differentiation into thyrocytes
J Clin Endocrinol Metabol. Volume 92(9):3681-3688

Lanza F, Healy L, Sutherland DR (2001)

Structural and functional features of the CD34 Antigen: an update
J Biol Regul Homeost Agents Volume 15(1):1-13

Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C (1992)

Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen
Eur J Immunol. Volume 22(2):393-397

Laurent E, Talpaz M, Kantarijian H, Kurzrock R (2001)

The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis
Cancer Res. Volume 61(6):2343-2355 Review

Lazzarino M, Morra E, Castello A, Inverardi D, Coci A, Pagnucco G, Magrini U, Zei G, Bernasconi C (1986)

Myelofibrosis in chronic granulocytic leukaemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance

Br J Haematol. Volume 64(2):227-240

Le Blanc K (2006)

Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation
Cytotherapy Volume 8(6): 559-561

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK (2004)

In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells
Hepatology. Volume 40(6):1275-1284

Leitch IJ and Jackson D (1994)

In situ-Hybridisierung
Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin Oxford: 49-105

Lerat H, Lissitzky JC, Singer JW, Keating A, Herve P, Charbord P (1993)

Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures
Blood Volume 82(5):1480-1492

Levy DE, Darnell JE Jr (2002)

Stats: transcriptional control and biological impact
Nat Rev Mol Cell Biol. Volume 3(9):2508-2517 Review

Li J, Meyer AN, Donoghue DJ (1997)

Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation
Proc Natl Acad Sci. USA Volume 94(2):502-507

Li L, Xie T (2005)

Stem cell niche: structure and function
Annu Rev Cell Dev Biol. Volume 21:605-631 Review

Liu J, Li X, Dong GL, Zhang HW, Chen DL, Du JJ, Zheng JY, Li JP, Wang WZ (2008)

In silico analysis and verification of S100 gene expression in gastric cancer
BMC Cancer Volume 8: 261

Lowry WE, Richter L (2007)

Signaling in adult stem cells
Front Biosci. Volume 12:3911-3927 Review

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON (1990)

Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products
Science Volume 247(4946):1079-1082

Luthra MG, Ajani JA, Izzo J, Ensor J, Wu TT, Rashid A, Zhang L, Phan A, Fukami N, Luthra R (2007)

Decreased expression of gene cluster at chromosome 1q21 defines molecular subgroups of chemoradiotherapy response in esophageal cancers
Clin Cancer Res. Volume 13(3): 912-919

Ma Q (2010)

Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implication
Pharmacol Ther. Volume 125(3): 376-393 Review

Machida S, Spangenburg EE, Booth FW (2004)

Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages
Cell Prolif. Volume 37(4):267-277

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998)

Phenotypic and functional comparison of culture of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells
J Cell Physiol. Volume 176(1):57-66

Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA (2000)

Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human marrow-derived multipotential stromal cells
J Cell Physiol. Volume 185(1):98-106

Manabe A, Murti KG, Coustan-Smith E, Kumagai M, Behm FG, Raimondi SC, Campana D (1994)

Adhesion-dependent survival of stromal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells
Blood Volume 83(3):758-766

Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F (2006)

Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow
J Cell Biochem Volume 97(4):744-754

Marquez-Curtis LA, Dobrowsky A, Montano J, Turner AR, Ratajczak J, Janowska-Wieczorek A (2001)

Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures
Br J Hematol. Volume 115(3):595-604

Marshman E, Booth C, Potten CS (2002)

The intestinal epithelial stem cell
Bioessays. Volume 24(1):91-98

Mayer BJ, Baltimore D (1994)

Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase

Mol Cell Biol. Volume 14(5):2883-2894

Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A (2004)

Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart

Circ Res. Volume 95(9):911-921

Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ (2004)

Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal

Curr Opin Cell Biol. Volume 16(6):700-707 Review

Mossi R, Jónsson ZO, Allen BL, Hardin SH, Hübscher U (1997)

Replication factor C interacts with the C-terminal side of proliferating cell nuclear antigen

J Biol Chem. Volume 272(3): 1769-1776

Mossi R, Hübscher U (1998)

Clamping down on clamps and clamp loaders – the eukaryotic replication factor C

Eur J Biochem. Volume 254(2):209-216

Murzina NV, Pei XY, Zhang W, Sparkes M, Vincenta-Garcia J, Pratap JV, McLaughlin SH, Ben-Shahar TR, Verreault A, Luisi BF, Laue ED (2008)

Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46

Structure. Volume 16(7): 1077-1085

Nakauchi H (2004)

Isolation and clonal characterization of hematopoietic and liver stem cells

Cornea Volume 23(Suppl 8):S2-S7

Nath J, Johnson KL 1999

A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects

Biotech Histochem. Volume 75(2):54-78

Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, Kobbe G, Aivado M, Rong A, Free M, Rössig R, Fenk R, Schneider P, Gattermann N, Royer-Pokora B, Haas R, Kronenwett R (2003)

Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation

Eur J Haematol. Volume 70(1): 1-10

Neuringer IP, Randell SH (2004)

Stem cells and repair of lung injuries

Respir Res. 5:6

Nowell PC, Hungerford DA (1960)

A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia
Science **Volume 132**:1497 Abstract

Otto WR (2002)

Lung epithelial stem cells
J Pathol. **Volume 197(4)**:527-535 Review

Owen M (1988)

Marrow stromal stem cells
J Cell Sci Suppl. **Volume 10**:63-76 Review

Park C, Li S, Cha E, Schindler C (2000)

Immune response in Stat2 knockout mice
Immunity **Volume 13(6)**: 795-804

Pawson T, Gish GD (1992)

SH2 and SH3 domains: from structure to function
Cell **Volume 71(3)**:359-362 Review

Penn MS, Zhang M, Deglurkar I, Topol EJ (2004)

Role of stem cell homing in myocardial regeneration
Int J Cardiol. **Volume 95(Suppl 1)**:S23-S25

Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ (1996)

Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium
Proc Natl Acad Sci. USA **Volume 93(4)**:1470-1474

Pfaffl MW (2001)

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR
Nucleic Acids Res. **Volume 29(9)**:e45

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells
Science **Volume 284(5411)**:143-147

Prockop DJ (1997)

Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues
Science **Volume 276(5309)**:71-74

Rameshwar P, Chang VT, Gascón P (1996)

Implication of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF-beta and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis

Br J Haematol. Volume 93(1):22-29

Ridley AJ, Hall A (1992)

The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors

Cell Volume 70(3):389-399

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997)

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction

Anal Biochem. Volume 245(2):154-160

Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabeu C, Sánchez-Madrid F, Teixidó J (1996)

Characterization of TGF- β 1 binding proteins in human bone marrow stromal cells

Br J Haematol. Volume 93(3):507-514

Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M, Cooper MD (1995)

Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow

J Immunol. Volume 154(9):4456-4465

Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB (2005)

Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities

Bull Exp Biol Med Volume 140(1):138-143

Rowley JD (1973)

Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.

Nature Volume 243(5405):290-293

Salama I, Malone PS, Mihaimed F, Jones JL (2008)

A review of the S100 proteins in cancer

Eur J Surg Oncol. Volume 34(4):357-364Review

Satomura K, Derubeis AR, Fedarko NS, Ibaraki-O'Connor K, Kuznetsov SA, Rowe DW, Young MF, Gehron Robey P (1998)

Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells

J Cell Physiol Volume 177(3):426-428

Sattler M, Salgia R (1997)

Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL

Cytokine Growth Factor Rev. Volume 8(1):63-79

Sawyers CL (1999)

Chronic myeloid leukemia

N Engl J Med. Volume 340(17):1330-1340 Review

Sawyers CL, McLaughlin J, Witte O (1995)

Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene

J Exp Med. Volume 181(1):307-313

Schäfer BW, Heizmann CW (1996)

The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology

Trends Biochem Sci. Volume 21(4): 134-140

Schänzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG (2004)

Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor

Brain Pathol. Volume 14(3):237-248

Schiffer CA (2007)

BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia

N Engl J Med. Volume 357(3):258-265

Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D (2004)

Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry

Cancer Res. Volume 64(24): 9018-9026

Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL (1996)

Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia

Oncogene Volume 13(2):247-254

Simmons PJ, Torok-Storb B (1991)

Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1

Blood Volume 78(1):55-62

Song S, Witek RP, Lu Y, Choi YK, Zheng D, Jorgensen M, Li C, Flotte TR, Petersen BE (2004)

Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice

Hepatology Volume 40(4):918-924

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001)

Stem cells find their niche

Nature **Volume 14(6859):98-104** Review

Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R (2003)

Molecular biology of hematopoietic stem cells

Vitam Horm. **Volume 66:1-28** Review

Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP, Fenk R, Kliszewski S, Maercker C, Neubert P, Aivado M, Koch J, Modlich O, Bojar H, Gattermann N, Haas R (2001)

Gen expression profiling identifies significant difference between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells

Blood **Volume 99(6): 2037-2044**

Stein MP, Dong J, Wandinger-Ness A (2003)

Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention

Adv Drug Deliv Rev. **Volume 55(11):1421-1437**

Sun TT, Lavker RM (2004)

Corneal epithelial stem cells: past, present and future

J Investig Dermatol Symp Proc. **Volume 9(3):202-207** Review

Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M (2008)

Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis-cytokinesis, DNA damage response, and development

Curr Opin Cell Biol. **Volume 20(6): 650-660**

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001)

Small GTP-binding proteins

Physiol Rev. **Volume 81(1):153-208** Review

Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gómez-Lechón MJ (2006)

Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells

World J Gastroenterol. **Volume 12(36):5834-5845**

Tarnowski M, Sieron AL (2006)

Adult stem cells and their ability to differentiate

Med Sci Monit. **Volume 12(8):RA154-RA163**

Tavassoli M, Minguell JJ (1991)

Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow

Proc Soc Exp Biol Med. **Volume 196(4):367-373** Review

Thiele J, Kvasnicka HM, Zirbes TK, Flucke U, Niederle N, Leder LD, Diehl V, Fischer R (1998)

Impact of clinical and morphological variables in classification and regression tree-based survival (CART) analysis of CML with special emphasis on dynamic features
Eur J Haematol. Volume 60(1):35-46

Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Schaefer HE (2000)

Histologic and hematological findings in CML
Pathologie 2000 Volume 21(1):39-54

Thiele J, Schmitz B, Fuchs R, Kvasnicka HM, Lorenzen J, Fischer R (1998)

Detection of the bcr/abl gene in bone marrow macrophages in CML and alterations during interferon therapy—a fluorescence in situ hybridization study on trephine biopsies
J Pathol Volume 186(3):331-335

Thomas T, Nowka K, Lan L, Derwahl M (2006)

Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands
Thyroid Volume 16(6):537-544

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998)

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts
Science Volume 282(5391):1145-1147

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003)

Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation
Transplantation Volume 75(3):389-397

Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB (1992)

Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesions to the basement membrane components laminin and collagen type IV
J Clin Invest. Volume 90(4):1232-1241

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002)

The World Health Organisation (WHO) classification of the myeloid neoplasms
Blood Volume 100(7):2292-2302 Review

Varticovski L, Daley G, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC (1991)

Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants
Mol Cell Biol. Volume 11(2):1107-1113

Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring HJ (2003)

Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells

Haematologica **Volume 88(2):126-133**

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD (2005)

Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood

Exp Hematol **Volume 33(11):1402-1416**

Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL, Panoskaltis-Mortari A, Masellis AM (2001)

Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients

Cancer **Volume 91(7):1219-1230**

Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR, Terstappen L (1995)

The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate population of hematopoietic and stromal progenitors

Blood **Volume 85(9): 2422-2435**

Warmuth M, Danhauser-Riedl S, Hallek M (1999)

Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies

Ann Hematol. **Volume 78(2): 49-64 Review**

Winkler J (2003)

Adult neural stem cells: therapeutic potential in neurology

Med Klin. (Munich) **Volume 98 (Suppl 2):27-31**

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997)

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification

Biotechniques **Volume 22(1):130-131, 134-138**

Wöhrer S, Rabitsch W, Shehata M, Kondo R, Esterbauer H, Streubel B, Sillaber C, Raderer M, Jaeger U, Zielinski C, Valent P (2007)

Mesenchymal stem cells in patients with chronic myelogenous leukaemia or bi-phenotypic Ph⁺ acute leukaemia are not related to the leukaemic clone

Anticancer Res **Volume 27(6B):3837-3741**

Wu S, Korte A, Kerbelmann-Betzing C, Gessner R, Henze G, Seeger K (2005)

Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression

Leuk Res. **Volume 29(1): 63-72**

Wu TC (2007)

The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion

Cancer Res. Volume 67(13): 6003-6006 Review

Yao R, Lopez-Beltran A, Maclennan GT, Montironi R, Eble JN, Cheng L (2007)
Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors
Anticancer Res. Volume 27(5A): 3051-3058

Yao ZX, Qin ML, Liu JJ, Chen XS, Zhou DS (2004)
In vitro cultivation of human fetal pancreatic ductal stem cells and their differentiation into insulin-producing cells
World J Gastroenterol. Volume 10(10):1452-1456

Zhang J and Li L (2008)
Stem cell niche: microenvironment and beyond
J Biol Chem. Volume 283(15):9499-9503 Review

Zhang S, Ge J, Sun A, Xu D, Qian J, Lin J, Zhao Y, Hu H, Li Y, Wang K, Zou Y (2006)
Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cell serve as a superior source
J Cell Biochem Volume 99(4):1132-1147

Zhao Z, Tang X, You Y, Li W, Liu F, Zou P (2006)
Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hemopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia
Leuk Res. Volume 30(8):993-1003

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Nicole Roes
Anschrift: Himmelgeisterstrasse 149
40225 Düsseldorf

E-mail: Nicole.Roes@uni-duesseldorf.de

Geburtsdatum: 1. April 1974
Geburtsort: Erkelenz

Familienstand: ledig

Universitäre Ausbildung:

10/94 – 08/98 Studium der Biologie an der
Universität Kaiserslautern

09/98 – 08/99 Diplomarbeit am
Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

27.08.99 Abschluss als Diplom-Biologin
Note: gut (1,6)

04/00 – 05/06 Studium der Medizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

31.05.2006 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Note: gut (2,49)

12.06.2006 Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeiten:

Seit 15.06.2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Klinik für Unfall- und Handchirurgie
Universitätsklinik Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Diplomarbeit:

09/98-08/99 Wirkungsweise der Adenosin und Homocystein-modulierten
TNF-Cytolyse von Tumorzellen

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Arbeitsgruppe für Immunchemie
Leiter: Prof. Dr. med. Wulf Dröge

Dissertation:

02/2002 Funktionelle Genomanalysen an humanen CD105-positiven
mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

Klinik Für Hämatologie, Onkologie und klinische
Immunologie
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Haas

Präsentation der Ergebnisse im Rahmen von wissenschaftlichen Vorträgen:

10/2002 Altered molecular phenotype of CD105⁺ mesenchymal stem
and progenitor cells in CML
Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft
für Hämatologie und Onkologie, München
Steidl U., **Roes N.**, Fenk R., Rohr U.-P., Neumann F., Kliszewski S., Martin S., Gattermann
N., Haas R., Kronenwett R.

10/2002 Transcriptomal characteristics of CD105⁺ mesenchymal stem
and progenitor cells of human bone marrow
Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft
für Hämatologie und Onkologie, München
Steidl U., Fenk R., Rohr U.-P., **Roes N.**, Martin S., Aivado M., Gattermann N., Kronenwett
R., Haas R.

Publikationen:

08/2005 Distinct molecular phenotype of malignant CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia leukemia
Oncogene Volume 24(34):5313-5324
Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Borg S, Diaz-Blanco ED, **Roes N**, Gräf T, Brors B, Eils R, Maercker C, Kobbe G, Gattermann N, Haas R

9. Curriculum vitae

- 03/2005 Gene expression profiling of Philadelphia chromosome (PH)-
negativ CD34+ hematopoetic stem and progenitor cells of
patients with Ph-positive CML in major molecular remission
during therapy with imatinib
Leukemia Volume 19(3); 458-460
Neumann F, Teutsch N, Kliszewski S, Borg S, Steidl U, Brors B, Schminkus N, **Roes N**,
Gerhing U, Hildebrandt B, Royer-Pokora B, Eils R, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R

Schulische Ausbildung:

- 08/80-06/84 Gemeinschaftsgrundschule der Stadt Hückelhoven
- 08/84-06/90 Städtische Hauptschule II der Stadt Hückelhoven
Abschluss: Sekundarabschluss I – Fachoberschulreife
- 08/90-06/93 Cusanus- Gymnasium der Stadt Erkelenz
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

9. Danksagung

An dieser Stelle ein Dankeschön an all diejenigen, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Kronenwett danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit, die Geduld beim Korrekturlesen sowie die Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Ein Dank geht auch an Dr. med. U. Steidl für die Einarbeitung und Betreuung dieser Arbeit, für seine hilfreichen fachlichen Ratschläge.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas möchte ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie durchführen zu können und sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Abschließend möchte ich mich besonders bedanken bei Simone Borg, Bärbel Junge, Slawomir Kliszewski, Thomas Schröder, Anke Boeckmann, Maren Free, Hildegard Gausmann, Sabrina Pechtel, Elke-Rosenbaum-König und Verena Börger für die äußerst kollegiale, angenehme Arbeitsatmosphäre und stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Diese Arbeit wurde von der Leukämie-Liga e.V. Düsseldorf und der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität finanziell unterstützt.

Mein innigster Dank geht an meine Familie, insbesondere meine Mutter und Ralf, für die Unterstützung, ihre unentwegte Motivation und das Vertrauen in mich.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe, die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt.

Düsseldorf, 15. Juni 2010

(Nicole Roes)