

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinischer Immunologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas)

Expression neurobiologischer Gene in primären humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Sebastian Jörg Schaub

2005

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Kurt Gottmann

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Herbert Jörg Schaub und Marina Ruth Elisabeth Schaub-Müller, meiner Großmutter Elisabeth Müller-Leyen und meiner Großtante Lotte Leyen, meiner Ratgeberin in allen Lebenslagen, Helga Meisgen-Gonski, und allen anderen, die mir am Herzen liegen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	10
1.1 Adulte Stammzellen.....	10
1.2 Die adulte hämatopoetische CD34+ Stammzelle.....	13
1.3 Das Differenzierungspotenzial der CD34+ hämatopoetischen Stammzelle.....	15
1.4 Genexpressionsanalysen bei CD34+ hämatopoetischen Stammzellen.....	22
1.5 Ziel der Arbeit.....	23
2. Material und Methodik.....	25
2.1 Zellen.....	25
2.1.1 Leukapherese.....	25
2.1.2 Dichtegradientenzentrifugation.....	25
2.1.3 Immunmagnetische Isolation von CD34+ Zellen.....	26
2.2 Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz.....	28
2.2.1 Durchflusszytometrie.....	28
2.2.2 Bestimmung des Anteils CD34+ Zellen.....	29
2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz.....	30
2.2.4 Zweifarbenimmunfluoreszenz.....	31
2.3 RNA-Isolation, photometrische Konzentrationsbestimmung, reverse Transkription, und Hybridisierung auf Nylon cDNA- Arrays.....	31
2.3.1 RNA-Isolation mit Rneasy Mini Kit.....	31

2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.3.3	Reverse Transkription von RNA für Hybridisierungsexperimente.....	33
2.3.4	Hybridisierung auf Nylon cDNA-Arrays.....	34
2.4	Quantifizierung, Normalisierung und statistische Auswertung....	34
2.5	RNA-Isolation, Quantitative „Real-Time“ Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	35
2.5.1	RNA-Isolation mit StrataPrep Total RNA Microprep Kit.....	35
2.5.2	Reverse Transkription von RNA für „Real-Time-RT-PCR“.....	37
2.5.3	Quantitative „Real-Time“-RT-PCR.....	38
2.5.3.1	Prinzip.....	38
2.5.3.2	Detektion der PCR-Produkte mit SYBR-Green.....	39
2.5.3.3	„Primer“-Auswahl.....	40
2.5.3.4	„Primer“-Sequenzen.....	41
2.5.3.5	Pipettierung der PCR.....	43
2.5.3.6	Schmelzkurvenanalyse (melting curve analysis).....	44
2.5.3.7	Agarosegelelektrophorese.....	46
3.	Ergebnisse.....	47
3.1	Genexpressionsanalysen mit spezialisierten cDNA-Arrays.....	47
3.2	Bestätigungsexperimente mit quantitativer RT-PCR.....	49
3.2.1	Rezeptoren.....	50
3.2.2	Ionenkanäle.....	52
3.2.3	Sonstige.....	53
3.3	Differenzielle Expression des Zelladhäsionsmoleküls Dystroglycan 1 im Knochenmark (KM) und peripheren Blut (PB).....	54
3.4	Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten.....	57

3.5	Nachweis der Proteinexpression von G-Protein-gekoppelten neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auf humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse.....	61
3.6	Nachweis der Proteinexpression von neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auf humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstadium.....	62
4.	Diskussion.....	65
4.1	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren.....	66
4.1.1	Die hormonabhängige cAMP-Kaskade.....	66
4.1.2	Die hormonabhängige IP ₃ -Kaskade.....	69
4.1.3	Rezeptoren.....	71
4.1.4	Differenzierungsabhängige Proteinexpression von neurobiologischen Rezeptoren auf CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.....	82
4.2	Tyrosinkinase-Rezeptoren.....	83
4.3	Rezeptorformierungs- und Mediatorproteine.....	85
4.4	Ionenkanäle.....	86
4.5	Proteine des Zytoskeletts, des Vesikelapparates und Zelladhäsionsmoleküle.....	87
4.6	Ausblick.....	91
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Literaturverzeichnis.....	95
7.	Lebenslauf.....	107
8.	Danksagung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ak	Antikörper
AKAP75	Protein Kinase A Anchor Protein
Anm.	Anmerkung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CP	crossing point
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCP	Crossing-Point-Differenz
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dF	Fluoreszenzdifferenz
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Temperaturdifferenz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acetat)
EPCs	endotheliale Vorläuferzellen
Eph	Ephrin
et al.	et alii
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter = Durchflusszytometrie
F _c R	Cristallizable Fragment-Rezeptor

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	6-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Human Leukocyte Antigen
5-HT	5-Hydroxytryptamin (=Serotonin)
Ig	Immunglobuline
IGF-1	Insulin-Like-Growth-Factor 1
IP ₃	Inositoltrisphosphat
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
MNCs	mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Nr.	Nummer
NSF	N-ethylmaleinimide-Sensitive Factor
OD	optische Dichte
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCN	Potassium Channel
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerytherin
PIP ₂	Phosphoinositolbisphosphat
PNS	peripheres Nervensystem
PSD-95	Postsynaptic Density Protein-95
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase hemmendes Enzym
RT	Reverse Transkription / Raumtemperatur
SDF-1	stromal-derived factor

s.o.	siehe oben
SSC	Sideward Scatter
STH	Somatotropes Hormon
Syn.	Synonym
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VAMP	Vesicle Associated Membrane Protein
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Stammzellen sind nicht-spezialisierte Zellen mit dem Potenzial, sich in verschiedenartige Zelltypen zu differenzieren, eine Eigenschaft, die als „Pluripotenz“ bezeichnet wird. Hierin unterscheiden sich Stammzellen von den sogenannten „Somazellen“, spezialisierten Körperzellen, die Bestandteil eines Organs oder Gewebes und bereits differenziert sind. Ihr Potenzial bleibt begrenzt auf die Fähigkeit, sich wieder in gleichartig spezialisierte Zellen zu teilen. Stammzellen sind nicht nur in der Lage, sich selbst zu vermehren (=Selbsterneuerung), ohne ihre Pluripotenz einbüßen zu müssen, sondern auch sich in organspezifische Zellen zu differenzieren [1]. In Abhängigkeit von ihrer ontogenetischen Herkunft unterscheidet man embryonale von fetalen und adulten Stammzellen.

Je nach Differenzierungspotenzial unterscheidet man „totipotente“ Stammzellen, die imstande sind, einen ganzen Organismus hervorzubringen, von „pluripotenten“ Stammzellen, die in der Lage sind, sich zu bestimmten Geweben oder Organen zu differenzieren. Nach dem heutigen Wissensstand endet die „Totipotenz“ einer befruchteten Eizelle im 8-Zellenstadium [2,3]. Dies bedeutet, dass jede der 8 Zellen das Potenzial besitzt, sich zu einem kompletten Organismus zu entwickeln. Im Zuge der Embryonalentwicklung spezialisieren sich die Zellen jedoch immer mehr, so dass ihre Differenzierungsfähigkeit abnimmt. Die Zellen gehen dementsprechend mit zunehmendem Alter von einer „Totipotenz“ in eine „Pluripotenz“ über.

1.1 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind teilungsfähige Zellen, die bislang in verschiedenen Organen des erwachsenen Organismus und im Nabelschnurblut von Neugeborenen gefunden wurden. Zu diesen Organen zählen mitunter das Knochenmark [1,4-7], Leber [7,8], Lunge [9,10] Darm [11,12] und Plattenepithel der Haut [13-15], Skelettmuskulatur [16-20], Herzmuskulatur [21-23], Endothel [24-28], Gehirn [29-35], Kornea,

Retina [36-38], und Pankreas [39,40]. Im Vergleich zu embryonalen Stammzellen sind adulte Stammzellen nur begrenzt vermehrungs- und differenzierungsfähig. Ihre physiologische Funktion besteht darin, die „Homöostase der Zellzahl“ betreffender Gewebe aufrechtzuerhalten, also abgestorbene Zellen zu ersetzen. Daher kommen sie vor allem in Geweben mit hohem Zellumsatz vor, wie z.B. Haut, Dünndarm und Knochenmark. Die Zahl adulter blutbildender Stammzellen im Knochenmark ist sehr gering (etwa 1 auf 10.000-15.000 Zellen), kann jedoch durch die Gabe von Wachstumsfaktoren (Zytokinen) auf das 100fache erhöht werden [1,6]. Da die Blutbildung ein fortlaufender Prozess ist, befinden sich im Knochenmark neben hämatopoetischen Stammzellen gleichzeitig Vorläuferzellen, sogenannte Progenitorzellen, deren Differenzierung bereits weiter vorangeschritten ist. Die Stammzellen des Darmes sitzen ortsgebunden in kleinen Schleimhautfalten. Neben der Regeneration epithelialer und mesenchymaler Zelllinien spielen sie auch eine Rolle bei der Entstehung kolorektaler Neoplasien [12]. Die Stammzellen der Skelettmuskulatur werden als „Satellitenzellen“ bezeichnet und teilen sich verletzungsbedingt, also getriggert durch besondere äußere Einflüsse. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass die Aktivität bestimmter Enzyme und die zelluläre Ausstattung mit spezifischen Transkriptionsfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation von Satellitenzellen nehmen [16,17]. Lange Zeit war die Wissenschaft der Auffassung, Herzmuskulatur besäße keine eigenen Stammzellen. Neuere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass dies nicht der Fall ist, sondern lediglich der durch Stammzellen eingeleitete Regenerationsprozess infarzierten Myokardgewebes zu kurz andauert, um eine funktionelle Heilung zu ermöglichen [21].

Auch das Gehirn besitzt adulte Stammzellen. Diese konnten bisher in Hirnregionen wie dem Hippokampus und der subventrikulären Zone nachgewiesen werden [29]. Ähnlich den hämatopoetischen Stammzellen scheinen sie ein größeres Differenzierungspotenzial zu besitzen als zunächst angenommen und spielen darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Hirntumoren der subventrikulären Zone [30,35]. Im Rahmen der Ophthalmologie bzw. ophthalmologischen Chirurgie

ist die Bedeutung der kornealen Stammzelle, der sogenannten „Limbusstammzelle“, für die Aufrechterhaltung des Kornealepithels bereits lange bekannt. Neuerdings wird das Wissen um ihre Regenerationsfähigkeit auch klinisch genutzt zur Therapie schwerer Hornhautverletzungen durch Stammzelltransplantation in den betroffenen Hornhautbezirk [36]. Ähnlich verhält es sich mit der Netzhaut des Auges, die ebenfalls eigene retinale Stammzellen besitzt, welche aufgrund ihres hohen Regenerationsvermögens imstande sind, verletztes retinales Epithel zu ersetzen [37]. Auch das Pankreas besitzt organeigene Stammzellen, und zwar insbesondere im Bereich des pankreatischen Gangsystems. Die Wissenschaft verspricht sich für die Zukunft von diesen Zellen einen natürlichen Ersatz für die beim Diabetes mellitus Typ 1 autoimmunologisch zerstörten Langerhans'schen Inseln, welche innerhalb dieses Organs die Insulin- produzierenden β -Zellen beherbergen. Neueste Arbeiten konnten zeigen, dass die pankreatische duktales Stammzelle zumindest im Reagenzglasmodell zur Differenzierung in Insulin- produzierende Zellen befähigt werden kann [39,40].

Wie die obigen Ausführungen belegen, genießen „Stammzellen“ heutzutage, unabhängig von ihrer z.T. sehr unterschiedlichen physiologischen Herkunft, höchstes naturwissenschaftliches Interesse. Ihre Gemeinsamkeit besteht in ihrem außerordentlichen Regenerationsvermögen, von dem ausgehend sich die gegenwärtige medizinische Wissenschaft die Erschließung neuer Therapieoptionen in der Behandlung verschiedenster Krankheiten erhofft. Die sorgfältige molekularbiologische Untersuchung dieser Zellen bildet dabei eine unerlässliche Grundlage.

1.2 Die adulte hämatopoetische CD34+ Stammzelle

Die adulte hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle ist charakterisiert durch einen spezifischen Oberflächenmarker, das CD34-Antigen [1,41]. CD34 ist ein hoch- glykolysiertes Transmembranprotein von 115 kDa, das durch eine Vielfalt von Kinasen phosphoryliert werden kann [1,42]. Bisher sind keine Liganden des CD34 bekannt und seine physiologische Funktion bleibt ebenfalls ungewiss. Neben hämatopoetischen Stammzellen exprimieren auch Endothel- und einige Stromazellen CD34 auf ihrer Oberfläche, was die Vermutung nahe legt, dass diese Zellen möglicherweise auf eine gemeinsame mesenchymale Stammzelle zurückgehen [1,43]. Neben dem CD34-Antigen gibt es noch weitere differenzierungsabhängige Oberflächenmarker hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen, wie beispielsweise „CD38“, oder „HLA-DR“ (vgl. Abb.1). Die Expression der beiden letztgenannten steigt mit zunehmender Reifung bzw. Liniendetermination der hämatopoetischen Stammzelle [1,44-47]. Ein weiteres hämatopoetische Stammzellen kennzeichnendes Oberflächenmolekül ist „Thy-1“. Dieses verhält sich in seiner differenzierungsabhängigen Expressionshöhe zu den beiden anderen umgekehrt proportional. Das bedeutet, dass die Thy-1-Expression auf unreifen, undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen besonders hoch ist [1,48]. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die spezifisch gegen jene Oberflächenantigene gerichtet sind, und den Einsatz durchflusszytometrischer Verfahren, lassen sich hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen auf diese Weise relativ unkompliziert anhand der Expressionshöhe der unterschiedlichen Oberflächenmarker in unreife frühe und liniendeterminierte reifere Zellen unterscheiden [49]. Die Unterscheidung in unreife und reife Stammzellen spielt eine besonders große Rolle bei der Frage nach der Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen, wobei unreiferen Stammzellen in aller Regel eine größere Differenzierungsfähigkeit zugeschrieben wird. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die differenzierungsabhängige Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern der unreifen und reiferen liniendeterminierten hämatopoetischen Stammzelle.

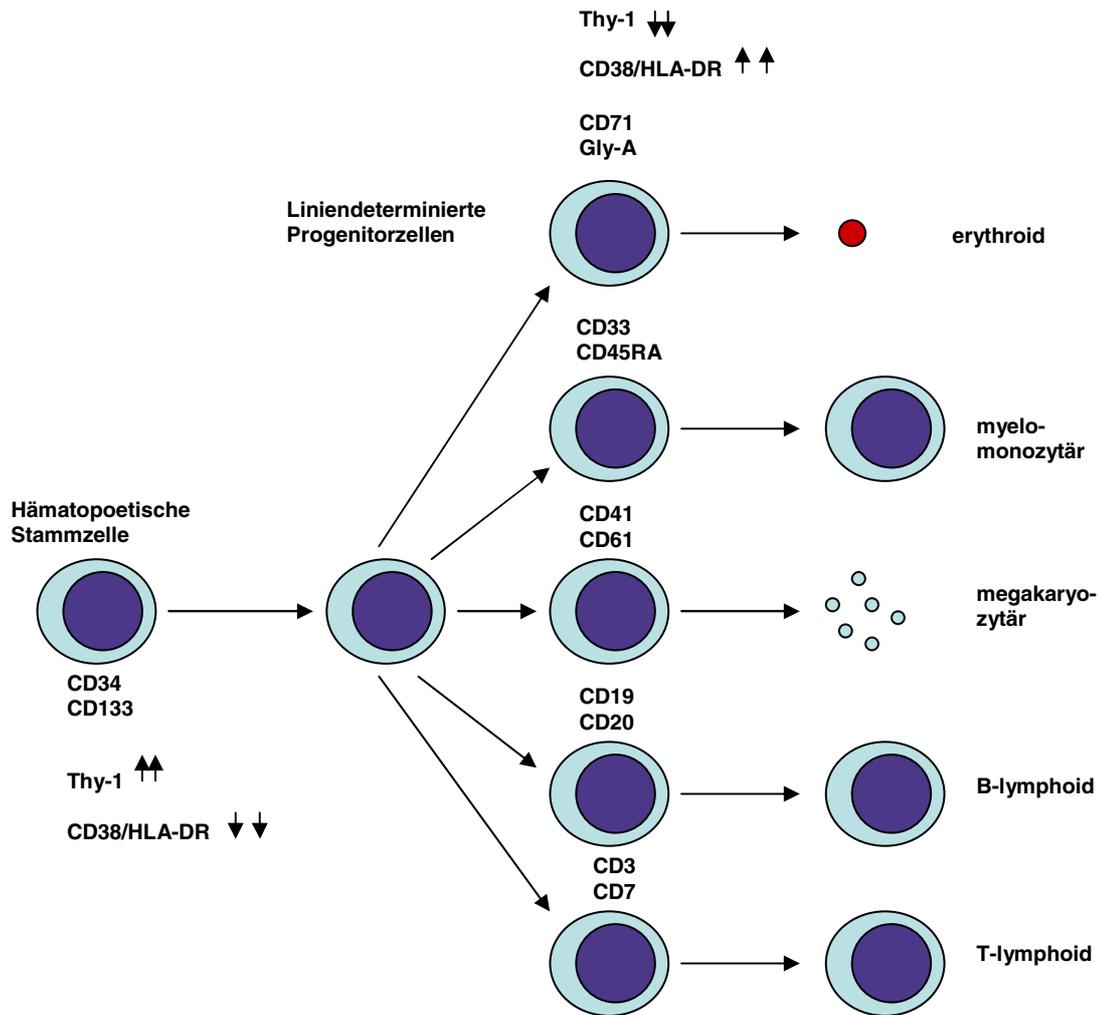


Abb.1: Unterschiedliche Liniendetermination und differenzierungsabhängige Zellmarker-Expression der CD34+ hämatopoetischen Stammzelle.

Humane CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen sichern die lebenslange Versorgung des Organismus mit reifen Blutzellen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen individuellen Bedürfnissen und Umständen, in denen sich der Organismus befindet. Die Hämatopoese ist ein durch verschiedene Wachstumsfaktoren (=Zytokine) präzise regulierter Prozess, der auf dem Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung (self-renewal) und zytokingesteuerter Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in die verschiedenen Blutzelllinien beruht. Die CD34+ Stammzelle bildet somit den Ausgangspunkt für die Produktion sämtlicher Blutzellen. Sie ist „pluripotent“. In Abhängigkeit von den aktivierenden Zytokinen kann die CD34+ hämatopoetische Stammzelle sowohl den Weg der myeloischen als auch der lymphatischen Differenzierung einschlagen [1,4-6]. Aus der myeloischen Differenzierungsreihe entstehen

Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und sämtliche Typen von Granulozyten. Aus der lymphatischen Differenzierungsreihe entstehen über die Vorstufe der „Lymphatischen Vorläuferzelle“ im Knochenmark B-Lymphozyten und Plasmazellen und im Thymus T-Lymphozyten. Die Fähigkeit der CD34+ hämatopoetischen Stammzelle zur Blutzellerneuerung bzw. zur Wiederauffüllung des Stammzellproliferations- und Reservepools des Knochenmarks wird klinisch zur Regeneration der Hämatopoese von Patienten mit hämatologischen Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen genutzt, die zuvor zytotoxisch behandelt wurden [50-54]. Hierbei werden dem Patienten im Rahmen einer autologen oder allogenen Transplantation Stammzellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut transplantiert. Die Stammzellen können sowohl aus dem peripheren Blut von Fremd Spendern (=allogen) als auch vom Patienten selbst (=autolog) in kompletter Remission gewonnen werden. Gewöhnlich sind weniger als 0,01% der Leukozyten im peripheren Blut CD34-positiv. Bei der Rekonstitution des Knochenmarks nach zytotoxischer Therapie kommt es zur Mobilisierung von CD34+ Zellen ins periphere Blut. Die Zahl CD34+ Zellen im peripheren Blut kann durch die zusätzliche Gabe von hämatopoesestimulierenden Wachstumsfaktoren, wie G-CSF (=Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor) um das etwa 100fache erhöht werden. Auch die alleinige Gabe von G-CSF ohne vorausgegangene Chemotherapie führt zur Mobilisierung von CD34+ Zellen. Dieses Verfahren kommt bei der allogenen Spende zum Einsatz. Anschließend können sie per Leukapherese aus dem Blut gewonnen, angereichert und transplantiert werden [54].

1.3 Das Differenzierungspotenzial der CD34+ hämatopoetischen Stammzelle

Gegenwärtig werden hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks therapeutisch in der Behandlung hämatologischer Neoplasien eingesetzt, um Knochenmark, welches durch den Einsatz von Chemo- oder Strahlentherapie zerstört wurde, wieder neu aufzubauen [50-54]. Im

Widerspruch zu der bisherigen Vorstellung, die Eigenschaften der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle seien einzig und allein auf Blutzelldifferenzierung und Selbsterneuerung beschränkt, lassen die Ergebnisse neuerer Studien hoffen, dass das Differenzierungspotenzial adulter Knochenmarksstammzellen vielleicht auch beim Menschen größer ist als bisher angenommen. Sollte sich die Vermutung bestätigen, dass hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen unter bestimmten Voraussetzungen auch beim Menschen möglicherweise in die Lage versetzt werden können, in nicht-hämatopoetische Zelltypen zu differenzieren, würde dies völlig neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von degenerativen Erkrankungen, wie z.B. Herzinfarkten und Schlaganfällen eröffnen. Auf diese Weise hätte man in den hämatopoetischen Stammzellen einen natürlichen Zellersatz gefunden, für jene Zellen, die im Zuge solcher Erkrankungen irreversibel geschädigt worden sind. Es gibt in diesem Zusammenhang bereits eine Reihe von Arbeiten, die das Differenzierungspotenzial von Stammzellen des Knochenmarks am Tiermodell untersuchten.

Jiang Y et al. berichteten 2002 von der Beobachtung, dass sich in eine frühe Blastozyste injizierte multipotente Progenitorzellen des Knochenmarks sowohl zu Blutzellen als auch zu Leber-, Lungen- und Darmepithelzellen differenzieren [55]. *Lagasse et al.* entdeckten bereits zwei Jahre zuvor, dass hochgereinigte hämatopoetische Stammzellen im Mausmodell in der Lage sind, sich zu Hepatozyten *in vivo* zu differenzieren [56]. *Mezey et al.* gelang es im Jahre 2000 zu zeigen, dass transplantierte adulte Knochenmarksstammzellen das Potenzial besitzen, zu Zellen zu differenzieren, die Neuronen-spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren [57]. Im gleichen Jahr bewiesen *Sanchez-Ramos et al.*, dass es möglich ist, unter speziellen kulturellen Bedingungen adulte Stromazellen des Knochenmarks bei Maus und Mensch *in vitro* zur Differenzierung in Nervenzellen-ähnliche Zellen zu bewegen, die den neuronalen Marker NeuN (neuronal nuclear protein), so wie GFAP (glial fibrillary acidic protein) exprimieren [58]. Zwei Jahre später entdeckten *Hess et al.*, dass transplantierte Knochenmarkszellen die Fähigkeit

besitzen, sich unter ischämischen Bedingungen des Gehirns sowohl zu Endothelzellen zu differenzieren als auch zu NeuN-exprimierenden Zellen [59,60]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wiesen *Goolsby et al.* 2003 nach, dass CD34+ hämatopoetische Progenitorzellen der Maus neben der Expression von NeuN noch weitere Neurogene exprimieren, wie den neurogenen Transkriptionsfaktor Pax-6, Neurofilament H, GAD65 (Glutamatdekarboxylase 65), sowie CNPase (zyklische Nukleotidphosphohydrolase) [61]. *Zhao et al.* unternahmen 2002 den Versuch, humane mononukleäre Zellen (MNCs) aus dem Knochenmark in den Cortex von Ratten zu implantieren, die einen experimentellen Schlaganfall erlitten hatten. Sie beobachteten in der Folge eine dramatische Verbesserung der sensomotorischen Funktionen dieser Ratten [62]. Die histologische Analyse ergab darüber hinaus, dass die transplantierten humanen MNCs Marker für Astrozyten, Oligodendrogliazellen und Nervenzellen exprimierten, wodurch es möglicherweise zur Vermittlung eines Proliferations- und Migrationsreizes gekommen war. *Orlic et al.* führten 2001 erste Verlaufsbeobachtungen von experimentell induzierten Myokardinfarkten bei Mäusen durch, von denen jeweils eine Gruppe mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF behandelt wurde. Die G-CSF stimulierte Mäusepopulation zeigte im Gegensatz zur Vergleichsgruppe eine signifikante Senkung von Mortalität, Infarktgröße, Dilatation des Herzens und diastolischem Stress, sowie eine Zunahme der Ejektionsfraktion nach einem definierten Zeitraum. Histologisch wurde die Bildung neuer Kardiomyozyten und vaskulärer Strukturen beobachtet [63-66]. In Anlehnung u.a. an die Ergebnisse der Arbeiten von *Orlic et al.* unternahmen *Strauer et al.* 2001 den ersten „humanen“ Versuch einer autologen intramyokardialen Transplantation von mononukleären Zellen des Knochenmarks via Perkutaner Transluminale Koronarangioplastie (PTCA) in das infarzierte Myokardareal über die wiedereröffnete Arterie. 10 Wochen nach dem Eingriff wurde mit Hilfe verschiedener diagnostischer Verfahren festgestellt, dass sich das transmurale Infarktareal verkleinert hatte, während Ejektionsfraktion und Cardiac Index (Herzminutenvolumen bezogen auf die Körperoberfläche) angestiegen

waren, wodurch es zu einer erheblichen Perfusionsverbesserung des ischämischen Myokardareals gekommen war [67].

Auch in der Therapie genetischer Erkrankungen der Skelettmuskulatur und des Diabetes mellitus Typ 1 erhofft sich die heutige Wissenschaft durch den Einsatz von Stammzellen neue Möglichkeiten: Genährt wird diese Hoffnung durch Arbeiten, wie beispielsweise von *Ferrari et al.*. Bereits 1998 beobachteten diese, dass gentechnisch markierte Knochenmarkszellen nach Transplantation in das Knochenmark von immunkompromittierten Mäusen, gezielt in Gebiete experimentell induzierter Muskeldegeneration einwandern, eine myogene Differenzierung durchlaufen und zur Regeneration von zerstörten Muskelfasern beitragen [68]. Bisher konnte jedoch nicht genau geklärt werden, welcher Stammzellsubtyp ein solches „myogenes Potenzial“ besitzt. Die Arbeiten von *Bossolasco et al.* und *Doyonnas et al.* nehmen sich dieser Frage an: Während erstere einen CD45+ Stammzellsubtyp mit dem Potenzial zur myogenen Differenzierung identifizierten, erklärten letztere, dass hämatopoetische Stammzellen über myelomonozytäre Vorläuferzellen ihren Beitrag zur Regeneration von Skelettmuskulatur leisten [69,70]. *Ojima K et al.* machten darüber hinaus einen besonderen Typ der sogenannten „Side Population-Zellen“, einer Untergruppe hämatopoetischer Stammzellen, den „Mac-1 niedrig-positiven frühen myeloiden Zelltyp“ für sein myogenes Regenerationspotenzial verantwortlich [71]. Das große wissenschaftliche Interesse an hämatopoetischen Stammzellen im Hinblick auf die Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 liegt in der Hoffnung begründet, aus ihnen neue Inselzellen zu erzeugen. Da sie außerdem laut neuester Studien die Fähigkeit zu besitzen scheinen, eine Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen zu vermitteln, könnte durch ihren Einsatz in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 das Problem der vorausgehenden medikamentösen Immunsuppression und sämtlicher damit verbundener Risiken und Nebenwirkungen umgangen werden [72-74]. *Steptoe et al.* stellten in diesem Zusammenhang eine Möglichkeit vor, mit der man hämatopoetische Stammzellen dazu veranlassen kann, eine Autoimmuntoleranz zu induzieren. Die Forscher transplantierten

hämatopoetische Stammzellen, die für Proinsulin als Antigen kodieren und ließen dieses durch ruhende Antigenpräsentierende Zellen (APCs) exprimieren. Auf diese Weise verhinderten sie die Entstehung eines spontanen Autoimmundiabetes in den betreffenden Versuchstieren [75]. Eine Möglichkeit, die vielleicht bald auch Einsatz beim Menschen findet. Eine weitere vielversprechende Arbeit auf diesem Gebiet ist die von *Hess et al.*, die Mäusen mit experimentell induziertem Bauchspeicheldrüsenschaden adulte Knochenmarksstammzellen transplantierten, die den Stammzellfaktor „c-kit“ exprimierten. Die Folgen waren eine reduzierte Hyperglykämie, sowie ein Proliferationsschub pankreatischer Empfängerzellen in Gegenwart der transplantierten Knochenmarksstammzellen [76,77]. *Cui HF* und *Bai ZL* stellten des Weiteren fest, dass sowohl die Transplantation von Knochenmarksstammzellen als auch ihre Mobilisation durch Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren zu einer reduzierten Mortalität bei Mäusen mit experimentell induzierter akuter Pankreatitis führt [78]. *Kim et al.* gelang es schließlich, aus embryonalen Stammzellen der Maus in vivo funktionierende und transplantierbare reife pankreatische inselähnliche Zellverbände zu züchten, deren zytologische Untersuchung reife pleomorphe Sekretgranula offenbarte und die sowohl in vitro als auch in vivo in der Lage waren, hohe Blutzuckerspiegel zu senken [79]. Eine weitere sehr vielversprechende Arbeit ist die Arbeit von *Kögler et al.*[80]. Den Forschern gelang es kürzlich, eine völlig neue CD45-negative pluripotente somatische Zellpopulation, die USSC (uneingeschränkte somatische Stammzelle), aus menschlichem Nabelschnurblut zu isolieren. Zellen dieser Zellpopulation zeigten in vitro eine homogene Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, hämatopoetische und neuropoetische Zellen, inklusive Astrozyten und Nervenzellen, mit dem Potenzial zur Expression von Neurofilament, Natriumkanälen und verschiedenen Neurotransmitter-Phänotypen. Auch in vivo zeigten sie u.a. das Potenzial zur Osteogenese und Chondrogenese.

Im Gegensatz zu der Fülle von Arbeiten, die das Transdifferenzierungsmodell hämatopoetischer Stamm- und

Progenitorzellen unterstützen, gibt es ebenso eine Vielzahl anderer Arbeiten, die dieses in Frage stellen. Beispiele hierfür sind die Arbeiten von *Terada et al.* [81] und *Ying et al.* [82]. Beide gelangen zu dem Ergebnis, dass der scheinbaren „Transdifferenzierung“ hämatopoetischer Stammzellen „spontane Zellfusionen“ zugrunde liegen könnten. *Terada et al.* zeigten beispielsweise, dass gewöhnliche Zellen aus dem Knochenmark einer Maus, die *in vitro* zusammen in Kultur mit embryonalen Knochenmarksstammzellen gehalten und mit Wachstumsfaktoren behandelt werden, in der Lage sind, mit embryonalen Stammzellen zu fusionieren. Anschließend beobachteten sie, dass die fusionierten Knochenmarkszellen, wenn sie mit anderen Zellen zusammen in Kultur gehalten werden, den Phänotyp der Empfängerzellen entwickeln. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten *Ying et al.*, die Gehirnzellen der Maus mit embryonalen Stammzellen der Maus co-kultivierten und pluripotente Hybridzellen erhielten, ebenfalls mit dem Potenzial, sich in verschiedene Zelltypen zu entwickeln. Eine weitere Arbeit, welche Zweifel an der Plastizität von adulten hämatopoetischen Stammzellen aufkommen lässt, ist die von *Wagers et al.* [83]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Transplantation einzelner Fluoreszenz-markierter hämatopoetischer Stammzellen in zuvor tödlich bestrahlte Tiere chimäre Organismen erzeugt. Während die transplantierten Stammzellen kontinuierlich zum Wiederaufbau der chimären Leukozytopoese im peripheren Blut beitrugen, war kein wachstumsfördernder Effekt auf nicht-hämatopoetische Gewebe, wie Gehirn, Niere, Darm, Leber oder Muskulatur nachweisbar. Schließlich wurde auf Proteinebene die Beobachtung gemacht, dass sich der experimentell erzeugte Chimärismus ausschließlich auf hämatopoetische Zellen beschränkte. Die Schlussfolgerung dieser Forschungsgruppe war, dass auf dem Hintergrund ihrer Beobachtungen, eine „Transdifferenzierung“ zirkulierender hämatopoetischer Stamm- oder Progenitorzellen als ein extrem seltenes Ereignis angesehen werden muss. Zu einem ähnlichen Schluss kamen *Balsam et al.*, die hämatopoetische Stammzellen transgener Mäuse mit einem Farbstoff markierten und direkt in ischämisches Myokard von Wildtyp-Mäusen injizierten. Die wenigen Zellen, die nach einem Zeitraum von 30 Tagen

aufgrund des Farbstoffes noch identifiziert werden konnten, exprimierten hauptsächlich spezifische hämatopoetische Zellmarker wie CD45 oder Gr-1, jedoch keine herzwgebesspezifischen Zellmarker. Die Forscher kamen somit zu dem Schluss, dass hämatopoetische Stammzellen auch in der Umgebung ischämischer Herzmuskulatur einzig und allein hämatopoetischen Zellschicksalen unterworfen sind [84]. Geteilt wird diese Ansicht außerdem von *Murry et al.*, die hämatopoetische Stammzellen sowohl in gesunde als auch in vorgeschädigte Mäuseherzen transplantierten und mit Hilfe gentechnischer Methoden das Zellschicksal der transplantierten Stammzellen verfolgten. Dabei machten sie die Entdeckung, dass die Kardiomyozytenzahl in den untersuchten Mäuseherzen unverändert blieb. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in infarzierte Herzmuskelareale schien dementsprechend keinen Einfluss auf die Kardiomyozytenzahl zu haben [85]. Die Publikationen von *Ratajczak et al.* und *Pituch-Noworolska et al.* bieten eine alternative Erklärung für das gleichzeitige Vorkommen hämatopoetischer Stammzellen im Muskelgewebe und früher myoider Progenitorzellen im Knochenmark. Die Forscher fanden heraus, dass Stammzellen der Muskulatur, hier sind insbesondere die Satellitenzellen zu nennen, einen funktionell aktiven CXCR4-Rezeptor an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dessen spezifischer Ligand SDF-1 (stromal-derived factor 1), ein Chemokin, ist in der Lage sowohl Progenitorzellen der Muskulatur als auch Progenitorzellen des Knochenmarks anzulocken. Folglich gibt es auch unter den Progenitorzellen des Knochenmarks solche, die diesen Rezeptor exprimieren. Laut *Ratajczak et al.* und *Pituch-Noworolska et al.* konkurrieren beide Progenitorzelltypen um SDF-1 positive Nischen in Knochenmark und Muskulatur. Auf diese Weise erklären sich die Forscher das simultane Vorkommen beider Stammzelltypen in Knochenmark und Muskulatur [86,87]. Zu guter Letzt seien noch die Arbeiten von *Choi et al.* und *Mathews et al.* erwähnt, die beide die Differenzierungsfähigkeit von Knochenmarkszellen in pankreatische β -Zellen untersuchten. Beide Forscherteams waren sich zum Schluss ihrer Nachforschungen einig, dass Knochenmarkszellen nicht zur Transdifferenzierung in Insulin sezernierende β -Zellen des

Pankreas fähig sind. Mathews et al. beobachteten jedoch, dass zumindest eine verletzungsbedingte Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen (EPCs) des Knochenmarks ins Pankreas vorkommen kann. In diesem Fall könne, laut Mathews et al., über die EPC-vermittelte Neovaskularisation des Pankreas eine Regeneration nicht-terminal geschädigter β -Zellen erreicht werden [88,89].

Wie die obigen Ausführungen zeigen, wird das Differenzierungspotenzial der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle wissenschaftlich kontrovers diskutiert. Es zeigt sich, dass ein besseres molekulares Verständnis der kommunikativen Fähigkeiten und Signalvermittlungsvorgängen von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen vonnöten ist, um herauszufinden unter welchen Umständen Transdifferenzierung - wenn überhaupt - stattfinden kann.

1.4 Genexpressionsanalysen bei CD34+ hämatopoetischen Stammzellen

Im Rahmen kürzlich veröffentlichter Studien über vergleichende Genexpressionsanalysen von humanen CD34+ Zellen des peripheren Blutes (PB) und des Knochenmarks (KM) führte unsere Forschungsgruppe Gen-Chip-Analysen mittels cDNA-Array-Technologie durch [5]. Dabei wurde die Entdeckung gemacht, dass KM-CD34+ hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu PB-CD34+ Zellen insbesondere solche Gene stärker exprimieren, welche Zellzyklus und DNA-Synthese vorantreiben, wie Prothymosin- α und DBPA (DNA-bindendes Protein A), wohingegen wandernde PB-CD34+ Zellen insbesondere differenzierungshemmende Gene, wie GATA-2 und N-myc, sowie Apoptose-induzierende Gene, wie z.B. Caspasen, stärker exprimierten. Neben der Entdeckung einer höheren Zellzyklusaktivität und geringeren Aktivität von Zellzyklus-hemmenden Genen von Knochenmarksstammzellen im Vergleich zu Stammzellen des peripheren Blutes, gelang unserer Forschungsgruppe außerdem der Nachweis der

Expression von Genen, die bislang vorwiegend im Zusammenhang mit neurobiologischen zellulären Funktionen Erwähnung gefunden hatten. Animiert vor allem durch die Ergebnisse der Arbeiten von *Terskikh et al.* und *Ivanova et al.* [90,91] sahen wir uns veranlasst, spezialisierte cDNA-Arrays anzuwenden, die die Expression von 588 Genen mit bekannten neurobiologischen Funktionen in CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen des Menschen untersuchen sollten. Terskikh et al. und Ivanova et al. lieferten die ersten Beweise dafür, dass sich die genetischen Programme der Hämatopoese und Neuropoese bei Mäusen überlappen. Beide stellten fest, dass adulte hämatopoetische Stammzellen der Maus teilweise die gleichen Gene exprimieren, wie neuropoetische Stammzellen der Maus. Es handelte sich hierbei um Gene, die nicht in reifen Nervenzellen zu finden sind. Ivanova et al. verglichen darüber hinaus Genexpressionsprofile von hämatopoetischen Stammzellen der Maus und des Menschen und entdeckten, dass beide hämatopoetischen Stammzelltypen teilweise dieselben Genprodukte hervorbringen.

1.5 Ziel der Arbeit

In Anlehnung an die Arbeiten von Terskikh et al. und Ivanova et al. [90,91] war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob eine Überlappung der genetischen Programme von Hämatopoese und Neuropoese auch beim Menschen zu konstatieren ist. Hierfür sollten Genexpressionsanalysen an angereicherten humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie unter Verwendung spezialisierter neurobiologischer Arrays durchgeführt werden. Bei der Auswertung sollte der Schwerpunkt insbesondere auf Nervensystem-spezifische G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen und -phosphatasen, Rezeptor-Assembly- und Mediatorproteine, spannungs- und ligandengesteuerte Ionenkanäle, Proteine des Zytoskeletts und Vesikelapparates, Adhäsionsmoleküle und Nervenwachstumsfaktoren gelegt werden. Schließlich sollten besonders

interessant erscheinende Gene ausgewählt und deren Expression sowohl auf mRNA-Ebene mittels „Real-Time“ RT-PCR als auch auf Proteinebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie und indirekter Immunfluoreszenz untersucht werden.

2. Material und Methodik

2.1 Zellen

Primäre humane mononukleäre Zellen (MNCs) wurden sowohl aus dem Knochenmark (KM) als auch aus dem peripheren Blut (PB) gewonnen. Nach Aufklärung und Einverständniserklärung von 4 gesunden Spendern, einen Teil der für die allogene Transplantation gespendeten Zellen auch für wissenschaftliche Zwecke nutzen zu dürfen, gewannen wir humane MNCs mittels Leukapherese aus dem PB. Die aus dem KM stammenden humanen MNCs wurden durch Beckenkammpunktion von 2 gesunden freiwilligen Spendern gewonnen.

2.1.1 Leukapherese

Für die Gewinnung von CD34+ Zellen aus dem PB wurden die Spender mit 12 µg pro Kilogramm Körpergewicht (KG) humanem rekombinanten G-CSF (Granulocyte- Colony Stimulating Factor; NEUPOGEN, Amgen, Thousand Oaks, U.S.A.) über 5 Tage stimuliert. Die Verabreichung von G-CSF bewirkt eine Mobilisierung CD34+ hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut. Anschließend wurden die mobilisierten Zellen mit einem CobeSpectra-Apheresesystem (Gambro BCT, Planegg-Martinsried, Deutschland) geerntet. Die Spender mobilisierten zwischen 5×10^6 und 11×10^6 CD34+ Zellen pro Kilogramm KG.

2.1.2 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient dazu, die mononukleäre Zellfraktion zu isolieren. Die KM-Punktate wurden 1:1 mit PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt. Leukaphereseprodukte wurden hingegen 1:10 verdünnt. 15 ml Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen)

wurden anschließend vorsichtig, bei schräg gehaltenem Röhrchen, mit der Zellsuspension überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei 1500 U/min (Multifuge1 S-R, Heraeus; Kendro Laboratory Products) wurde der die MNCs enthaltende Interphasering sorgfältig abpipettiert und in ein frisches Röhrchen überführt. Die Zellen wurden in 50 ml PBS resuspendiert und 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet mit 20-30 ml PBS resuspendiert. Die resultierende Zellfraktion wurde dann einer erneuten Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Nach erneuter Resuspension und Aufnahme der Zellen in einem Volumen von 20-30 ml PBS folgte die automatische Zellzählung (Beckmann Coulter Micro-Diff. II, Europark Fichtenhain B1347807 Krefeld) [92].

2.1.3 Immunmagnetische Isolation von CD34+ Zellen

CD34+ Zellen wurden durch eine Positivselektion mit Hilfe des immunmagnetischen Separationssystems MidiMACS unter Verwendung des „Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gewonnen [93]. Dazu wurden jeweils 10^8 MNCs mit 300 μ l MACS-Anreicherungspuffer (1 x PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % BSA), 100 μ l F_cR-Blocking-Reagenz und 100 μ l ferromagnetisch konjugierter CD34-Antikörper (MicroBeads; Klon QBEND/10; Miltenyi Biotec) sorgfältig resuspendiert und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (siehe Abb. 2). Im nächsten Schritt wurden dann die AK-markierten humanen MNCs durch Zugabe von 10-20facher Menge des im Röhrchen enthaltenen Gesamtvolumens an MACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 1500 U/min (Multifuge1 S-R, Heraeus; Kendro Laboratory Products) zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die MNCs, unter denen sich jetzt immunmagnetisch markierte hämatopoetische CD34+ Stamm- und Progenitorzellen befanden, erneut im 10-20fachen Ausgangsvolumen an MACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Die Säule wurde im Magneten eingespannt und wurde vor dem Auftragen der Zellen zunächst mit 3 ml

MACS-Puffer äquilibriert. Nach Auftragung der Zellen auf die Säule folgte ein dreifacher Waschvorgang mit jeweils 3 ml Pufferlösung, bevor die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die CD34+ Zellfraktion durch Spülung mit 5 ml Pufferlösung eluiert wurde (siehe Abb. 2). Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurde die Positivfraktion ein zweites Mal auf eine Säule aufgetragen und die Waschvorgänge (s.o.) wiederholt, wobei im letzten Schritt zur Separation der CD34+ Zellfraktion statt 5 ml Pufferlösung 3 ml verwendet wurden. Die durchflusszytometrisch bestimmte Reinheit der immunmagnetisch angereicherten CD34+ Stamm- und Progenitorzellen lag zwischen 96 und 99 %.

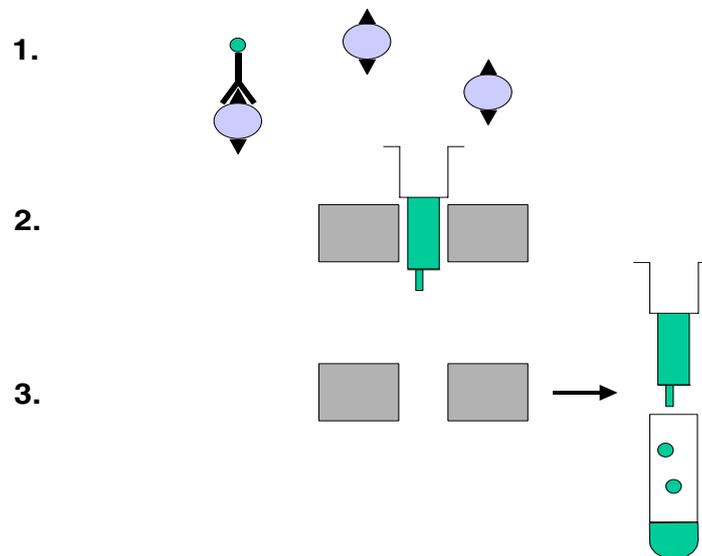


Abb. 2: Experimentelles Vorgehen bei der immunmagnetischen CD34+ Zellisolation.

1. Markierung CD34+ hämatopoetischer Stammzellen mit ferromagnetisch konjugierten Anti-CD34-Antikörpern (MACS MicroBeads)
2. Positivselektion mit einer MACS-Säule
3. Herausnahme der Säule aus dem Magnetfeld und anschließende Elution der CD34+ Zellfraktion

2.2 Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

2.2.1 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte mit einem Becton Dickinson FACScan (Heidelberg), der einen 2-W Argon-Ionen-Laser enthält. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Programmes „Cell Quest“ (Becton Dickinson) ausgewertet.

Zum Prinzip: Die Zellen werden vom Argon-Ionen-Laser bestrahlt, wodurch diese Streulicht entsenden, welches gemessen werden kann. Durch die Laserbestrahlung entsteht sowohl eine Vorwärtsstreustrahlung, der sogenannte FSC (forward scatter), und eine Seitwärtsstreustrahlung, der SSC (sideward scatter). Die Vorwärtsstreustrahlung (FSC) stellt ein Maß für die Größe der Zellen dar, die Seitwärtsstreustrahlung (SSC) ein Maß für die Granularität der Zellen. Wenn an die Zellen Fluoreszenzgekoppelte Antikörper gebunden sind, wird der Farbstoff durch den Laser angeregt, so dass dieser Licht einer anderen Wellenlänge emittiert, welches durch das Gerät gemessen wird.

Für die Analyse der indirekten Immunfluoreszenz wurde eine Darstellung als FL-1/SSC Dot Plot („Punktwolken-Diagramm“) gewählt. Dies bedeutet, dass auf der y-Achse die FITC-Fluoreszenz (Fluoresceinisothiocyanat) und auf der x-Achse das SSC in relativen Einheiten angegeben wurde, nachdem bereits zuvor von der Cell-Quest-Software eine Fluoreszenzintensitäts-Mittelwertanalyse erfolgt war. Der FITC- bzw. Rhodamin- Grenzwert in der Zweifarbenimmunfluoreszenz, welcher die rezeptorpositive Zellfraktion von der rezeptornegativen trennte, lag bei 10^1 relativen Einheiten. Die Darstellung der Zweifarbenimmunfluoreszenz erfolgte über einen FL-2 / FL-1 Dot Plot. Auf diese Weise wurde die relative Rhodaminfluoreszenz auf der y-Achse, die relative FITC-Fluoreszenz auf der x-Achse angegeben.

2.2.2 Bestimmung des Anteils CD34+ Zellen

Nach immunmagnetischer Anreicherung erfolgte die Reinheitsbestimmung der CD34+ Zellfraktion durch Immunfluoreszenzfärbung. Hierzu wurden zwischen 1×10^5 und 1×10^6 Zellen in 50 μl PBS mit 10 μl eines monoklonalen, PE (Phycoerytherin)-gekoppelten Anti-CD34-Antikörpers (Klon 8G12, Becton Dickinson, Heidelberg) versetzt und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein isotyp-identischer monoklonaler Anti-IgG1-PE-Antikörper diente als Kontrolle. Nach Inkubation wurde mit 1000 μl PBS gewaschen, 5 min bei 1600 U/min (Multifuge1 S-R, Heraeus; Kendro Laboratory Products) zentrifugiert, der Überstand verworfen und in einem Volumen von 300 μl PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit einem Becton Dickinson FACScan (Heidelberg).

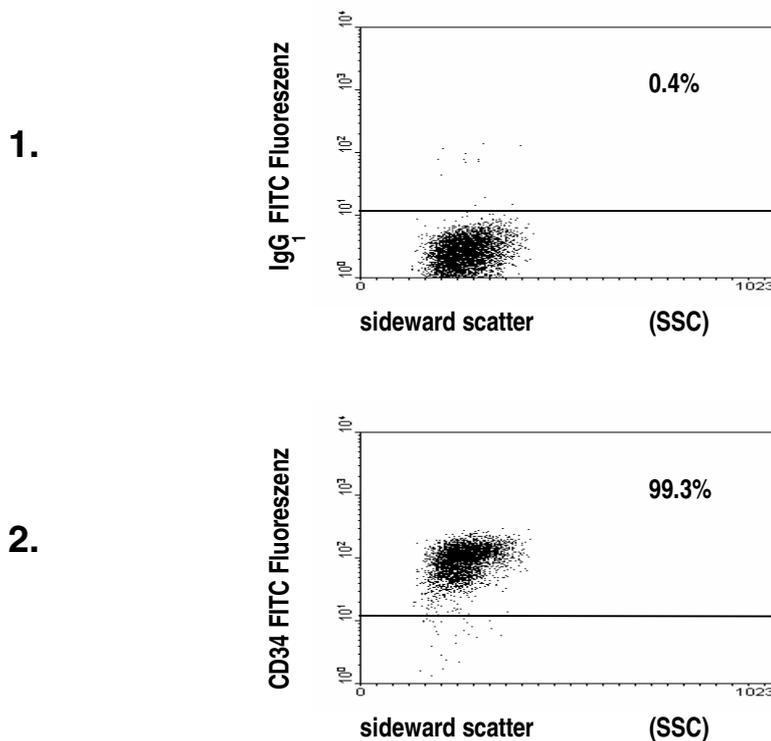


Abb. 2: Reinheit von immunmagnetisch angereicherten CD34+ Zellen.

1.: Darstellung der FITC-Fluoreszenz der IgG1- Isotypkontrolle in Abhängigkeit vom SSC. Die waagerechte Linie im Bild stellt die Fluoreszenz- Intensitätsschwelle dar, die CD34-negative und -positive Zellfraktion voneinander trennt. Die Einstellung des Schwellenwertes orientiert sich an den Bindungseigenschaften des Isotyps. Die Prozentzahl rechts oben im Bild gibt den Anteil der Zellen wieder, bei denen es

zu einer unspezifischen Bindung des eingesetzten AK gekommen ist.

2.: Darstellung der CD34+ FITC- Fluoreszenz in Abhängigkeit vom SSC.

Die Prozentzahl rechts oben im Bild gibt den prozentualen Anteil der immunmagnetisch angereicherten CD34+ Zellen wieder. Der Anteil CD34+ Zellen ergibt sich aus der Differenz des Anteils gemessener CD34+ Zellen abzüglich des Anteils derjenigen Zellen, bei denen es zu einer unspezifischen Bindung des eingesetzten IgG1-Isotyps gekommen ist, also $99,3\% - 0,4\% = 98,9\%$ Anteil CD34+ Zellen.

2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Proteinexpressionsanalyse von Oberflächenrezeptoren wurden 1×10^5 hochangereicherte CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen pro Ansatz in 50 μl PBS aufgenommen und mit jeweils 10 μl polyklonalen Ziegen-IgG-Antikörpern versetzt. Diese Primärantikörper der Ziege waren spezifisch gegen humane Oberflächenrezeptoren gerichtet. Diese waren im Einzelnen: Opioid-Rezeptor $\mu 1$, Opioid-Rezeptor $\kappa 1$, Adenosin A2b-Rezeptor, Serotonin (5-HT) 1F-Rezeptor, CRH-Rezeptor 1, sowie die Orexin-Rezeptoren 1+2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg). Ein Isotyp-identischer FITC-konjugierter Ziege-IgG1 diente als Kontrolle. Nach Inkubation, Waschen mit PBS, Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes, wurden die Zellen mit jeweils 10 μl FITC-konjugierten Esel-Anti-Ziege-Sekundärantikörpern versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde abermals mit 1000 μl PBS gewaschen und für 5 min bei 1600 U/min (Multifuge1 S-R, Heraeus; Kendro Laboratory Products) zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde jeder Ansatz mit 300 μl PBS für die durchflusszytometrische Messung resuspendiert. Die Expressionsstärke wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen.

2.2.4 Zweifarbenimmunfluoreszenz

Für die Zweifarbenimmunfluoreszenz von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen verwendeten wir pro Ansatz und 1×10^5 Zellen:

10 μ l polyklonale, spezifisch gegen die unter 2.2.3 erwähnten Rezeptoren gerichtete Ziegen-IgG-Primärantikörper und 10 μ l Rhodamin-gekoppelte Esel-Anti-Ziege-IgG-Sekundärantikörper (Santa Cruz Biotechnology Inc.) für die Zweitfärbung, sowie 10 μ l monoklonale FITC-konjugierte Anti-CD38-AKs (Klon HB7, Becton Dickinson), die ebenfalls bei der Zweitfärbung hinzugefügt wurden. Als Kontrolle diente ein Isotyp-identischer Rhodamin-gekoppelter-Ziegen-IgG1. Ansonsten entsprach der Arbeitsablauf dem der indirekten Immunfluoreszenz, wie unter 2.2.3 dargestellt. Der Vorteil der FITC/Rhodamin-Kombination besteht darin, dass die Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe in der Durchflusszytometrie nicht interferieren.

2.3 RNA-Isolation, photometrische Konzentrationsbestimmung, reverse Transkription und Hybridisierung auf Nylon cDNA-Arrays

2.3.1 RNA-Isolation mit Rneasy Mini Kit

Für die cDNA-Array-Analysen wurde die RNA mit Hilfe des Rneasy Mini Kits (Qiagen AG, Hilden) isoliert.

Nach Zentrifugation von 1×10^6 bis 4×10^6 CD34+ Zellen bei 1.000 U/min für 5 min (Multifuge1 S-R, Heraeus; Kendro Laboratory Products) und Verwerfen des Überstandes, wurden die Zellen in 350 μ l RLT-Puffer (Bestandteil des Kits und versetzt mit 10 μ l/ml β -Mercaptoethanol) aufgenommen und durch 1-minütiges kräftiges „Vortexen“ lysiert, so dass keinerlei Zellklumpen mehr sichtbar waren. Anschließend wurden 350 μ l Ethanol 70 % hinzugegeben und mit einer Pipette vermischt. Die 700 μ l umfassende Probe wurde jetzt auf die Rneasy-Zentrifugationssäule

aufgetragen und für 30s bei 10.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Als Nächstes wurde die Säule in ein Sammelröhrchen gestellt und durch Zugabe von 650-700 µl RW1 Puffer mittels Zentrifugation für 30s bei 10.000 U/min gewaschen. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und der Waschschrift unter Verwendung eines neuen Röhrchens wiederholt; dieses Mal jedoch mit 500 µl RPE- Waschpuffer. Es folgte der nun letzte Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer bei maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit für 2 Minuten. Die jetzt völlig trockene Säule wurde vorsichtig entnommen, mit 40 µl RNase freiem Wasser versetzt, und die RNA unter einminütiger Zentrifugation bei 10.000 U/min eluiert. Sowohl die RNA-Menge als auch die Reinheit wurden anschließend anhand der optischen Dichte (OD) der RNA bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt. Die RNA-Proben wurden schließlich für weitergehende Hybridisierungsexperimente in 2 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst. Die Menge der gewonnenen RNA schwankte zwischen 600 ng und 5 µg.

2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösungen erfolgte zunächst eine spektralphotometrische Messung bei einer Absorption von 260 nm. Hierzu wurde beispielsweise 1 µl RNA in 400 µl destilliertem Wasser verdünnt. Die Konzentration ergab sich dann wie folgt aus der Messung:

$$OD_{260nm} \times \text{Verdünnung} \times 0,04 = \text{mg RNA/ml}$$

Die Grundlage hierfür liefert das *Lambert-Beer'sche Gesetz* :

$$E = \epsilon \times c \times d$$

E = Extinktion, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Lösung, d = Schichtdicke der Küvette

Der Extinktionskoeffizient ϵ beträgt $1000 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Da die Schichtdicke d der Küvetten standardmäßig 1 cm beträgt, gleicht die Extinktion E dem Produkt aus molarem Extinktionskoeffizient ϵ und Konzentration c der Lösung. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$, bei einzelsträngiger RNA und DNA $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ und bei kleineren Oligonukleotiden $33 \text{ }\mu\text{g/ml}$. Für die Feststellung eventuell vorliegender Verunreinigungen wurde die OD zusätzlich bei 280 nm gemessen, und die Ratio $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ bestimmt. Die ideale Ratio für RNA liegt zwischen 1,8 und 2,0 und die für DNA zwischen 1,8 und 1,95. Ist der Wert kleiner, so kann dies auf Verunreinigungen durch Proteine hinweisen.

2.3.3 Reverse Transkription von RNA für Hybridisierungsexperimente

Die reverse Transkription, Hybridisierung der Arrays und die statistische Auswertung der Hybridisierungsexperimente wurde in der „Core Facility“ der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von dafür ausgebildeten Mitarbeitern durchgeführt.

Die reverse Transkription von RNA für Hybridisierungsexperimente beinhaltete den Einsatz eines Gen-spezifischen CDS-Primermix. Dieser Mix enthielt ausschließlich Primer, welche spezifisch für die Gene waren, die auf dem für die Hybridisierungsexperimente eingesetzten Atlas Human 1.2 IArray (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) vorhanden sind. Dadurch, dass nur cDNAs von den Genen synthetisiert wurden, die auch auf dem eingesetzten Atlas 1.2 IArray vorhanden sind, konnte die Sensitivität der Experimente erhöht werden, da die Komplexität des resultierenden cDNA-Pools auf diese Weise reduziert wurde. Die Sensitivität wurde zusätzlich gesteigert, indem ein höheres Primermix-Volumen als das vom Hersteller angegebene pro Probe verwendet wurde. In unserem Falle waren dies $1,5 \text{ }\mu\text{l}$ CDS-Primermix statt $1 \text{ }\mu\text{l}$.

2.3.4 Hybridisierung auf Nylon cDNA- Arrays

Während des Vorgangs der reversen Transkription wurde die entstehende doppelsträngige cDNA für die Hybridisierung radioaktiv markiert, und zwar mit 35 μCi (1,295 MBq) α - ^{32}P -dATP pro Reaktion [5]. Die auf diese Weise markierte cDNA wurde jetzt säulenchromatographisch gereinigt, um ungebundenes Substrat zu entfernen. Die Proben wurden anschließend durch Inkubation mit 0,1 M NaOH für 20 min bei 68°C denaturiert und mit 0,5 M NaH_2PO_4 neutralisiert. Als nächstes wurde humane $\text{C}_0\text{t-1-cDNA}$ (Qiagen) hinzugefügt, um unspezifische cDNA-Bindungen zu reduzieren. Die cDNA-Arrays wurden darüber hinaus 30 min lang mit 0,5 mg Lachssperma-DNA (Clontech) prähybridisiert, um potenzielle Hintergrundbindungen mit der Nylonmembran zu minimieren. Die radioaktiv markierten cDNA-Proben wurden dann mit den Nylon-cDNA-Arrays bei 68°C und konstanter Rotation in einem Hybridisierungsofen (ThermoHybaid, Heidelberg) über 20 Stunden hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays, entsprechend den Herstellervorgaben, einem sorgfältigen Waschvorgang unterzogen. Die gewaschenen Arrays wurden in Plastikumschläge gehüllt und für 24 bis 96 Stunden, je nach Aktivität der Probe, auf PhosphorImager-Screens (FujiFilm, Düsseldorf) ausgelegt.

Die Stellen der Platten, auf die die radioaktive Strahlung der Probe traf und somit belichtet wurden, wurden schwarz gefärbt. Die Intensität der „Dots“ spiegelte die von dem untersuchten Gen transkribierte mRNA-Menge wider.

2.4 Quantifizierung, Normalisierung und statistische Auswertung

Die radioaktiven Signale wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers (Fuji, FLA-3000, FujiFilm) unter Verwendung der BAS-Reader 3.01 Software (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. Für die Analyse der Punktintensitäten (dot intensities) wurde die AIDA-Software (Raytest, Straubenhardt) eingesetzt. Nach Subtraktion der unspezifischen

Hintergrundsignale (zustande gekommen durch unspezifische cDNA-Bindung mit der Nylonmembran) wurden die Rohdaten normalisiert. Hierfür wurde eine globalintensitätsbasierte Normalisierungsstrategie verwendet [94]. Der relative Expressionslevel eines jeden Gens wurde als Ratio (absolute Punktintensität / mittlere Intensität der 20 % höchstexprimierten Gene) formuliert. Gene mit schwachem Expressionssignal wurden einer visuellen Prüfung unterzogen.

2.5 RNA-Isolation, quantitative „Real-Time“ Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.5.1 RNA-Isolation mit StrataPrep Total RNA Microprep Kit

Für die RT-PCR erfolgte die RNA-Isolation mit dem „StrataPrep Total RNA Microprep Kit“ (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, U.S.A.), das eine DNase-Verdauung beinhaltet.

Zunächst wurden 100 µl Lysepuffer mit 0,7 µl β-Mercaptoethanol (14,2 M) pro Ansatz und 5×10^5 Zellen gemischt. 100 µl dieser Lysepuffer-β-Mercaptoethanol-Mischung wurden zu jedem Ansatz hinzupipettiert und bis zur Homogenisierung der Zellsuspension entweder „gevortext“ oder manuell mit der Pipette vermischt. Anschließend wurde das Zelllysate mit 100 µl Ethanol 70% versetzt und für 5 s gevortext. Das mit Ethanol versetzte Zelllysate wurde im nächsten Schritt in ein RNA-bindendes spezielles Zentrifugationsröhrchen (Spin Cup) übertragen, welches in einem 2ml-Auffangröhrchen (Collection Tube) saß. Das Zentrifugationsröhrchen wurde nun mit dem Deckel des Auffangröhrchens verschlossen und für 30-60 s in einer Mikrozentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus; Kendro Laboratory Products) bei maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zentrifugationsröhrchen wurde wieder in das Sammelröhrchen zurückgesetzt, 600 µl von einfachem Low-Salt-Waschpuffer (Zugabe von 68 ml Ethanol 100 % in die beiliegende Flasche mit $5 \times$ Low-Salt-

Waschpuffer) hinzugefügt, das Röhrchen verschlossen und die Probe abermals in einer Mikrozentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 30-60 s zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes und Zurücksetzung des Spin Cups in das Sammelröhrchen folgte der dritte Zentrifugationsschritt, wieder bei maximaler Geschwindigkeit, dieses Mal für 2 min, um die Fasermatrix des Zentrifugationsröhrchens zu trocknen. Danach wurde die DNase-Lösung vorbereitet: Hierzu wurden 5 µl von aufgelöster RNase-freier DNase 1 (Die in lyophilisierter Form vorliegende RNase-freie DNase1 wurde bereits bei der Vorbereitung der Reagenzien für die RNA-Isolation mit 290 µl DNase-Rekonstitutionspuffer aufgelöst) vorsichtig mit 25 µl DNase-Verdauungspuffer versetzt. Die DNase-Lösung wurde anschließend direkt auf die Fasermatrix des Spin Cups aufgetragen und dieser verschlossen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C. Schließlich wurden 500 µl von einfachem High-Salt-Waschpuffer (Zugabe von 16 ml Ethanol 100 % in die beiliegende Flasche mit 1,67 X High-Salt-Waschpuffer) auf die Fasermatrix des Zentrifugationsröhrchens aufgetragen, das Röhrchen verschlossen und die Probe bei Maximalgeschwindigkeit für 30-60 s zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen, der Spin Cup zurück in das Sammelröhrchen gesetzt und 600 µl von 1 x Low-Salt-Waschpuffer hinzugefügt. Anschließend wurde wieder bei Maximalgeschwindigkeit (s.o.) für 30-60 s zentrifugiert. Der letzte Arbeitsschritt wurde wiederholt, jedoch dieses Mal mit 300 µl Low-Salt-Waschpuffer und einer Zentrifugationsdauer von 2 min, um die Fasermatrix zu trocknen (s.o.). Der Spin Cup wurde nun in ein 1,5 ml-Sammelröhrchen gesetzt, 30 µl Elutionspuffer (10mM Tris-HCl, pH 7,5) direkt auf die Fiebermatrix aufgetragen, der Spin Cup verschlossen (s.o.) und die Probe für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach für 1 min zentrifugiert. Die gereinigte RNA befand sich jetzt im Elutionspuffer im Spin Cup. Um die RNA-Ausbeute zusätzlich zu erhöhen, konnte der Elutionsschritt wiederholt werden. Der letzte Arbeitsschritt bestand in der photometrischen Bestimmung der RNA-Quantität und -Qualität.

2.5.2 Reverse Transkription von RNA für „Real-Time-RT-PCR“

Die reverse Transkription der isolierten RNA aus den zuvor hochangereicherten CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in eine amplifizierbare komplementäre DNA (cDNA) erfolgte nach einem publizierten Referenz-Protokoll für die „BCR-ABL-Fusionsgenanalyse“ bei chronischer myeloischer Leukämie [95]. Der für die cDNA-Synthese erforderliche Mastermix setzte sich wie folgt zusammen: Pro Aliquot benötigten wir 95 µl 5 x Gibco M-MLV Puffer, 19 µl 4 x dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate 25mM), 10 µl N6 Randomprimer (5mg/ml), 4,75 µl Gibco DTT (0,1mM) und 93 µl RNase- freies Wasser. Aus diesen insgesamt 221,75 µl Mastermix wurden 190 µl entnommen und bei -20°C gelagert. Der Rest wurde verworfen. Zu den 190 µl Mastermix wurden unmittelbar vor jeder reversen Transkription 12 µl M-MLV RT (Gibco, Reverse Transkriptase, 200 U/µl) und 6 µl RNasin (Gibco, RNase- hemmendes Enzym, 40 U/µl) hinzugefügt. Aus diesen 208 µl Mastermix wurden wiederum 21 µl entnommen und zu je 19 µl RNA-Eluat (0,5 µg/µl), welches zuvor bereits bei 65°C für 5 min erhitzt und dann sofort für 7 min auf Eis gestellt worden war, hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Die Proben wurden dann für eine Nacht wahlweise bei 4°C oder bei -20°C gelagert [96].

2.5.3 Quantitative „Real-Time“- RT-PCR

2.5.3.1 Prinzip

Zur Quantifizierung und Detektion einer bestimmten cDNA-Sequenz verwendeten wir die „LightCycler-Technologie“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Diese Technik basiert auf der „Real-Time“-RT-PCR und erlaubt eine kontinuierliche Produktmessung während der gesamten PCR-Amplifikationsperiode [97]. Im Gegensatz dazu steht die konventionelle PCR, bei der nur das amplifizierte Endprodukt analysiert wird. Das „House-Keeping-Gen“ GAPDH (3-Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase) diente uns als externe Kontrolle und Referenz für die relative Quantifizierung. Die PCRs wurden mit dem LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt.

Die PCR selbst unterteilte sich in eine Präinkubationsphase für 8 min bei 95°C, in der die Taq-Polymerase aktiviert wurde. Danach folgte eine 45 Zyklen lange Amplifikationsphase, während der die gewünschten Zielsequenzen in hoher Kopienzahl hergestellt wurden. Die Amplifikationsphase ließ sich weiter unterteilen in eine 15 s dauernde Denaturierungsphase bei 95°C, in der insbesondere die sehr stabilen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren eines Doppelstranges getrennt wurden und auf diese Weise zwei Einzelstränge resultierten. In der Annealingphase bei 52-63°C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer) für 5-10 s konnten sich die ausgewählten Primer an die entsprechende zu amplifizierende Zielsequenz an jeden der beiden cDNA-Einzelstränge anlagern. In der Synthese- oder Elongationsphase für 20 s bei 72°C fand dann schließlich die Amplifikation der gesuchten Zielsequenz statt. Der letzte Schritt bestand in einer Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätsbestimmung des amplifizierten Produktes.

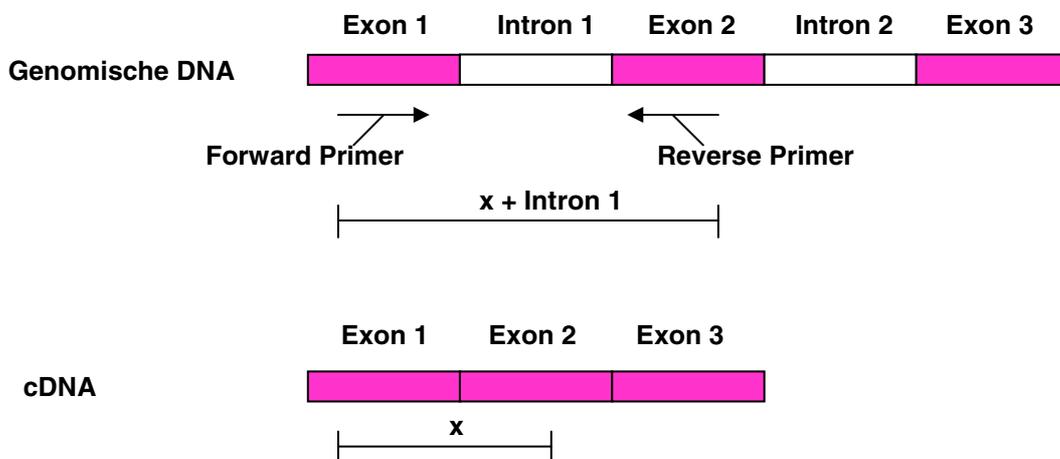
2.5.3.2 Detektion der PCR-Produkte mit SYBR-Green

SYBR-Green ist ein Farbstoffmolekül, welches von sich aus in Lösung bereits geringe fluoreszierende Eigenschaften besitzt, dessen Fluoreszenzintensität jedoch nach Bindung an doppelsträngige DNA um ein Vielfaches erhöht wird. Es wird angeregt durch blaues Licht einer Wellenlänge von 470 nm, welches vom LightCycler abgestrahlt wird, und emittiert grünes Licht einer Wellenlänge von 530 nm, das vom LightCycler gemessen wird. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Produktmenge auch die Bindungsmöglichkeiten für SYBR-Green erhöht werden, so dass die Stärke der Fluoreszenz mit der Menge an vorhandenem Produkt korreliert. Der LightCycler stellt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl in charakteristischen PCR-Kurven mit sigmoidalem Verlauf dar. In diesem Zusammenhang stellt die y-Achse die Fluoreszenzintensität dar und die x-Achse die Zykluszahl. Der Punkt, an dem die PCR-Kurve von einem geraden Verlauf in einen Anstieg übergeht, nennt sich „crossing point“. Diese „crossing points“ (CP) der Real-Time-PCR-Kurven wurden mit Hilfe der LightCycler 3.5 Software bestimmt. Der CP einer PCR-Kurve ist der PCR-Zyklus, bei dem das Maximum der zweiten Ableitung der PCR-Kurve erreicht wird. Die Lage der CPs ist sowohl abhängig von der Menge der eingesetzten cDNA, als auch von der Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens. Je kleiner der CP ist, an dem die PCR-Kurve einen Anstieg im Sinne eines positiven Fluoreszenzsignals erfährt, desto mehr Zielsequenz (target sequence) ist vorhanden. Die Differenz der CPs (Δ CP) von Target und GAPDH-Kontrolle spiegelt den relativen Expressionslevel der Ziel-mRNA einer jeden Probe wieder. Nach Verbrauch aller dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) oder bei Denaturierung der Taq-Polymerase geht die PCR-Kurve in eine Sättigung über. Das Problem bei der Detektion mit SYBR-Green besteht darin, dass SYBR-Green nicht nur an die doppelsträngige DNA des amplifizierten Produktes bindet, sondern an jede Form von doppelsträngiger DNA, also auch an genomische DNA und an Primer-Dimere.

2.5.3.3 „Primer“-Auswahl

Die „Primer“ wurden mit Hilfe der „LightCycler Probe Design“-Software 1.0 (Roche Molecular Biochemicals) ausgewählt. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer nach Möglichkeit so ausgewählt, dass sie auf unterschiedlichen Exons lagen, oder auf einem Übergang von einem Exon zum nächsten lokalisiert waren (siehe Abb. 4).

1. Primer auf unterschiedlichen Exons



2. Exon-übergreifende Primer

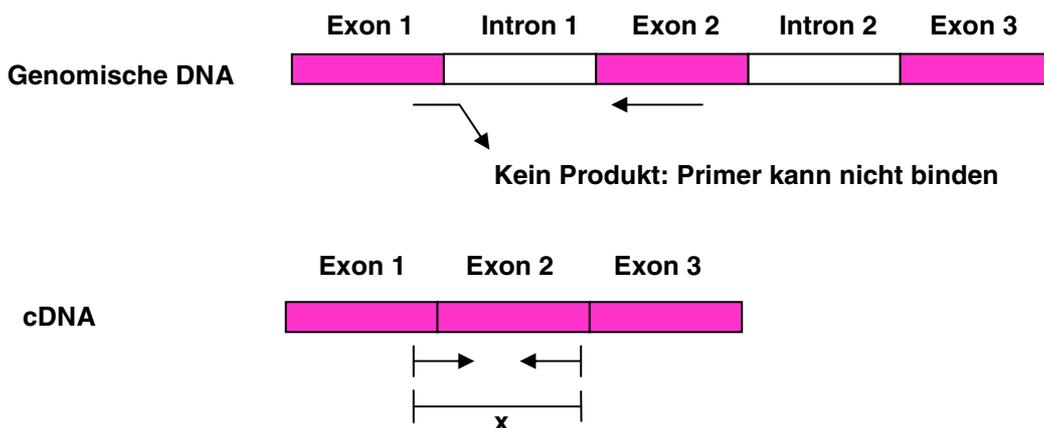


Abb. 4: Prinzip der Primer-Auswahl zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA.

1.: Die Primer werden so gewählt, dass sie auf unterschiedlichen Exons liegen. Dies führt bei Vorliegen einer genomischen DNA-Kontamination dazu, dass das Amplifikationsprodukt x um die Länge des Introns ($x + \text{Intron 1}$) verlängert wird.

Bei einem Amplifikationsprodukt der erwarteten Länge x ist davon auszugehen, dass nur cDNA amplifiziert wurde.

2.: Ein anderes Prinzip stellt die „Exon-übergreifende“ Primerauswahl dar. Mindestens einer der Primer wird so gewählt, dass er auf dem Übergang von einem Exon zum nächsten lokalisiert ist. Das hat zur Folge, dass genomische DNA-Sequenzen nicht amplifiziert werden können, da kein Primer-Annealing stattfinden kann und somit auch kein Amplifikationsprodukt entsteht. Ein Amplifikationsprodukt entsteht nur bei Vorliegen reiner cDNA.

2.5.3.4 „Primer“-Sequenzen

Die Primer sind von ihrer chemischen Struktur her allesamt Oligonukleotide und entstammen dem „Syntheselabor TIB MOLBIOL, Berlin“.

Glycerinaldehyd-P-DH:	GAPDHF 5'-TCC ATg ACA ACT TTg gTA TCG-3' GAPDHR 5'-CTA ATT CTA gTg ggT CAA GAT GTA GC-3' Annealing-Temperatur: variabel Länge des Produktes: 380 bp
Opioid-Rezeptor μ 1:	Opi.rec.muF 5'-TCC gTT gCC CTA ACA g-3' Opi.rec.muR 5'-CCT Cgg TgT ggT ATA TT-3' Annealing-Temperatur: 55°C für 5s Länge des Produktes: 233 bp
GABA B-Rezeptor 1:	GB1F 5'-gTg ggC ATg gCT ATC TAC AAT-3' (Exon 15) GB1R 5'-ACg CTC CTC TTT CTC AgC AAT-3' (Exon 17) Annealing-Temperatur: 60°C für 5s Länge des Produktes: 312 bp

- Serotonin 1F-Rezeptor: **5HT1fwd** 5'-Tgg TgT CCC TCA CTC T-3'
5HT1rev 5'-ACC ACT TgC CCC ATA A-3'
Annealing-Temperatur: 55°C für 5s
Länge des Produktes: **211 bp**
- Adenosin A2b-Rezeptor: **A2b rec(for)** 5'-TTC AAT TTC TTT ggg TgT-3'
A2b rec(rev) 5'-gTT CCg gTA AgC ATA g-3'
Annealing-Temperatur: 54°C für 5s
Länge des Produktes: **330 bp**
- Purinerges P2X₄-Rezeptor: **P2X4 pur.for.** 5'-CTA CgT CAT Cgg gTg g-3'
P2X4 pur.rev. 5'-CgT TgA AAg CTA CgC A-3'
Annealing-Temperatur: 60°C für 10s
Länge des Produktes: **338 bp**
- Kaliumkanal PCN2/SRS4: **PCN2 f** 5'-TgA CCC TTT gCg CAA TgA gT-3'
PCN2 r 5'-AgA TgA CCA ggA Cgg ACA CAA
-3'
Annealing-Temperatur: 60°C für 5s
Länge des Produktes: **317 bp**
- Kaliumkanal KCNA6/SRS6: **KCNA6 fwd** 5'-CAC ggT Agg TTA Cgg g-3'
KCNA6 rev 5'-CCA AgT CCg TTg TCA g-3'
Annealing-Temperatur: 60°C für 5s
Länge des Produktes: **228 bp**
- Synaptobrevin 1/VAMP 1: **VAMPF** 5'-CCT CCT CCT AAC ATg ACC
AgT AA-3' (Exon 2)
VAMPR 5'-AgC ATg ATC ATC ATC TTg CAg
T-3' (Exon 3/4)
Annealing-Temperatur: 60°C für 5s
Länge des Produktes: **233 bp**

Neurotrophin 3: **NT3 S** 5'-ACg gTA CgC ggA gCA TAA gA-3'
 NT3 A 5'-CTC ggA CgT Agg TTT ggg AT-3'
Annealing-Temperatur: 60°C für 5s
Länge des Produktes: **264 bp**

Dystroglycan 1: **Dystro fwd** 5'-CTT ACA gCA gTT TgT ACg-3'
 Dystro rev 5'-CAg TCg ATA Tgg CTT Ag-3'
Annealing-Temperatur: 52°C für 10s
Länge des Produktes: **384 bp**

2.5.3.5 Pipettierung der PCR

Für den Ansatz des Mastermixes gingen wir folgendermaßen vor:

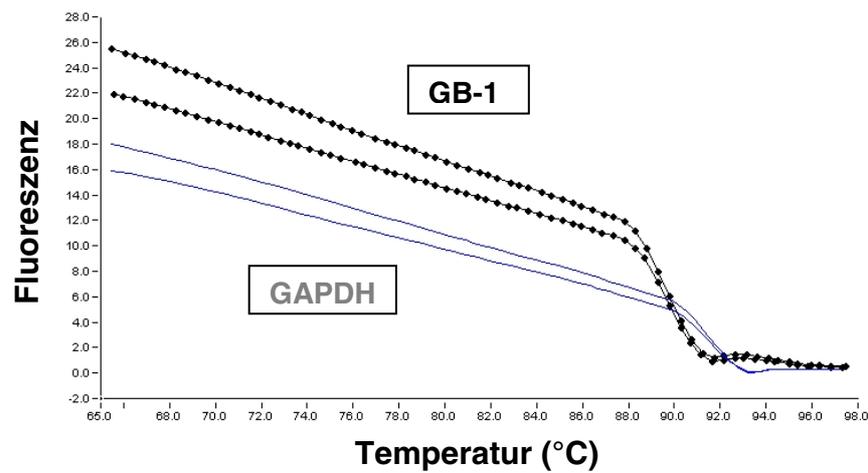
Die mit 1a (enthält den für doppelsträngige DNA spezifischen SYBR-Green I – Farbstoff) und 1b (enthält den Reaktionspuffer, sowie die FastStart-DNA-Taq-Polymerase) bezeichneten Komponenten des LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green Kits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurden kurz zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus; Kendro Laboratory Products) und 60 µl der 1b-Komponente zu 1a hinzugegeben, sorgfältig gemischt und mit Alufolie umwickelt, um den Farbstoff vor Lichteinfall zu schützen. Die in lyophilisierter Form vorliegenden Primer wurden für den Mastermix zunächst entsprechend den Herstellerangaben (Syntheselabor TIB MOLBIOL, Berlin) mit einer Konzentration von 100 µM in destilliertem Wasser (dH₂O) aufgelöst. Die für den Mastermix erforderliche Primerstammlösung hatte eine Konzentration von 10 µM, so dass eine weitere 1 : 10 - Verdünnung mit dH₂O erfolgte. Der Mastermix selbst bestand pro PCR-Ansatz aus: 11,6 µl H₂O, 2,4 µl MgCl₂ (4mM), jeweils 1 µl Sense- und Antisense-Primer (je 10 µM) und 2 µl SYBR-Green-Ansatz. Die 18 µl Mastermix pro PCR-Ansatz wurden nun in die LightCycler-Kapillaren (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) pipettiert, wobei für jedes Gen Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Zu den 18 µl Mastermix kamen 2 µl 1:5 -verdünntes cDNA-Template, so dass die PCR pro Ansatz in einem Gesamtvolumen

von 20 µl durchgeführt wurde. Zum Ausschluss einer Amplifikation genomischer DNA setzten wir zelluläre Ausgangs-RNA als Kontrolle ein.

2.5.3.6 Schmelzkurvenanalyse (melting curve analysis)

Zur Analyse der PCR-Produkte führten wir eine Schmelzkurvenanalyse durch. Die Schmelzkurve gibt die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur wieder. Sie erklärt sich folgendermaßen: Der LightCycler fährt nach stattgehabter PCR die Temperatur wieder langsam auf 95°C hoch, so dass die zu diesem Zeitpunkt nur in doppelsträngiger Form vorliegenden Produkte langsam zu denaturieren beginnen. Dies drückt sich in der Schmelzkurve in einem langsamen Abfall der Fluoreszenzintensität in Richtung y-Achse aus. Dieser Abfall liegt darin begründet, dass mit zunehmender Temperatur und Denaturierung der Amplifikationsprodukte in einzelsträngige Fragmente, die SYBR-Green-Moleküle langsam dissoziieren, da der Farbstoff nur an doppelsträngige DNA binden kann. Der Punkt, an dem die Schmelzkurve einen rasanten Fluoreszenzabfall erfährt („Knick“ in der Kurve), repräsentiert den Schmelzpunkt des jeweiligen Targets, welcher auf der x-Achse abzulesen ist (vgl. Abb.4). Es ist der Punkt, an dem so gut wie alle SYBR-Green-Moleküle dissoziiert sind und das Produkt vorwiegend in einzelsträngiger Form vorliegt. In der Darstellungsform der negativen 1. Ableitung der Schmelzkurve ($-dF/dT$) imponiert der spezifische Schmelzpunkt als Spitzenwert (Peak). Die Schmelztemperatur ist spezifisch für jedes Target und abhängig von der Länge und der Art der Basenzusammensetzung der amplifizierten Target-Sequenz. Aufgrund der Spezifität der Schmelzkurve für jedes zu erwartende Produkt, kann mit ihrer Hilfe gleichzeitig kontrolliert werden, ob tatsächlich nur ein Produkt amplifiziert wurde, oder ob es zusätzlich zu einer Amplifikation von unspezifischem Produkt gekommen ist (erkennbar an weiteren „Peaks“ der negativen 1. Ableitung der Schmelzkurve).

1.



2.

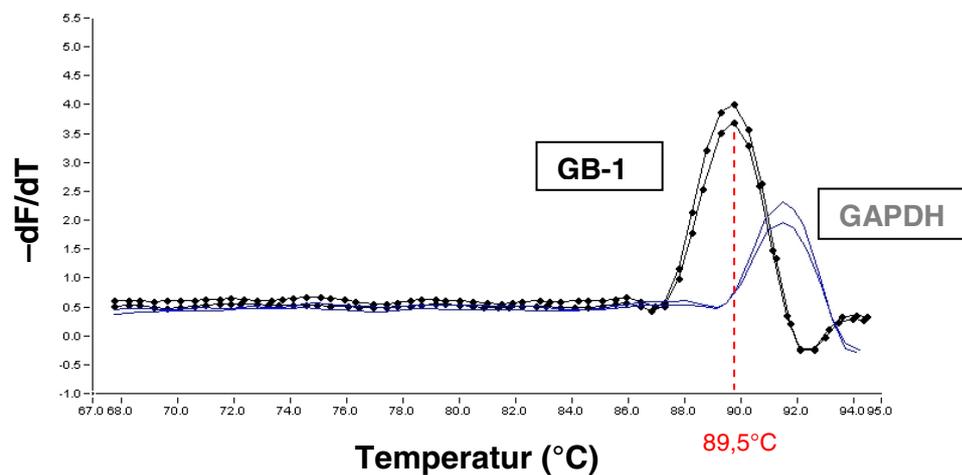


Abb. 5: Beispiel einer Schmelzkurve

1. Darstellung der Schmelzkurve in der konventionellen Form (F/T): Auf der y-Achse ist die Fluoreszenz (F) aufgetragen, auf der x-Achse die Temperatur (T).
2. Darstellung der negativen 1. Ableitung der Schmelzkurve (-dF/dT): Der spezifische Schmelzpunkt ist die Temperatur, bei der die negative 1. Ableitung ihr Maximum hat. Hier im Beispiel beträgt der spezifische Schmelzpunkt für das RT-PCR-Produkt aus der GABA_B-Rezeptor 1-spezifischen PCR (GB-1) etwa 89,5°C.

2.5.3.7 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse der PCR-Produkte setzten wir 1,25 %ige Agarosegele ein. Nur in Ausnahmefällen (z.B. Opioid-Rezeptor μ 1) bei sehr kurzen PCR-Produkten wählten wir eine höhere Gelkonzentration von 1,5 - 1,8 %, um eine bessere Trennung der erwarteten PCR-Produkte der Zielsequenzen von eventuell unspezifisch amplifizierten PCR-Produkten zu gewährleisten. Für ein 1,25%iges Agarosegel benötigten wir: 100 ml 1 x TBE-Puffer (108 g Tris-Puffer, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA aufgelöst in 10 l dH₂O) und 1,25 g Agarose. Die Agarose wurde zunächst in einem Erlenmeyerkolben durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken im Puffer verteilt und anschließend in der Mikrowelle für etwa 5 min bei 300 W erhitzt und gelöst. Nach Gießen und Erstarrung des Agarosegels wurden jeweils 10 μ l der einzelnen Proben (PCR-Produkte) mit 2 μ l Auftragspuffer (Blue/Orange Loading Dye 6 x, Promega Madison, WI, U.S.A.) sorgfältig mit der Pipette auf Parafilm vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurde die „Smart Ladder SF“ (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Sie stellt DNA-Fragmente definierter Länge dar. Die Agarosegele wurden für ungefähr 1 ½ h einer Spannung von 140 mV ausgesetzt und anschließend im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Der letzte Schritt bestand in der Auswertung der Agarosegele mit Hilfe der Quantity I-Software von Bio-Rad mit Hilfe des Gel-Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

3. Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalysen mit spezialisierten cDNA-Arrays

Im Rahmen von Untersuchungen der Genexpressionsprofile primärer humaner CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut mittels cDNA-Array-Technologie hatte unsere Arbeitsgruppe kürzlich die Expression einiger Gene detektiert, die bislang vorwiegend im Kontext neurobiologischer zellulärer Funktionen bekannt waren. Diese Ergebnisse veranlassten uns, spezialisierte cDNA-Arrays zu verwenden, um gezielt die Expression von 588 Genen mit neurobiologischen Funktionen in CD34+ Zellen zu untersuchen. Für die Experimente verwendeten wir hoch angereicherte CD34+ Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark freiwilliger Spender. Die Reinheit lag nach der Anreicherung zwischen 96 % und 99 %. Für die reverse Transkription der Gesamt-RNA der CD34+ Zellen wurde ein Gen-spezifischer CDS-Primermix verwendet, um die Komplexität des resultierenden cDNA-Pools herabzusetzen und auf diese Weise die Sensitivität zu erhöhen. Darüber hinaus wurden „doppelt-gespottete“ cDNA-Arrays verwendet, um die Validität der Genexpressionsanalysen zu steigern (siehe Abb.6). Unter Verwendung des Atlas Human Neurobiology Arrays der Firma Clontech (Heidelberg) war es uns möglich, die mRNA-Expression von elf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, vier Rezeptortyrosin-/serinkinasen, vier Rezeptortyrosinphosphatasen, zwei ligandengesteuerten und fünf spannungsgesteuerten Ionenkanälen, sowie 18 Vesikelfusions- und Motilitätsproteinen nachzuweisen, deren Expression in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen bislang nicht bekannt war.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die von uns mittels cDNA-Array-Technologie in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen gefundenen mRNA-Transkripte.

Tabelle 1:

<u>GenBank-Nr.</u>	<u>Name</u>
	Rezeptoren
Y11044	GABA _B -Rezeptor 1
M97759	Adenosin A ₂ B-Rezeptor
U11053	Opioid-Rezeptor κ 1
L25119	Opioid-Rezeptor μ 1
L05597	5-HT 1F-Rezeptor
AF041243	Orexin-Rezeptor 1
AF041245	Orexin-Rezeptor 2
L25124	Prostaglandin E4-Rezeptor
D16826	Somatostatin 4-Rezeptor
M62424	Thrombin-Rezeptor (PAR1)
X72304	CRH 1-Rezeptor
U34587	CRH 2-Rezeptor
M18391	Ephrin A1-Rezeptor (EphA1)
Y00285	Insulin-like Growth Factor 2-Rezeptor
X77533	Activin A-Rezeptor, Typ IIb
U83192	Postsynaptic Density Protein 95 (PSD-95)
D12676	Kollagen Typ I-Rezeptor (CD36)
L11695	Transforming Growth Factor β -Rezeptor 1
M34668	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptor-Typ A
X54134	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptor-Typ E
U10886	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptor-Typ J
X58288	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptor-Typ M
	Ionenkanäle
Y07684	Purinerge P2X ₄ -Rezeptor
Y09561	Purinerge P2X ₇ -Rezeptor
M55514	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, PCN2/SRS4
X17622	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, SRS6
X78520	Spannungsabhängiger Chloridkanal 3
X77197	Spannungsabhängiger Chloridkanal 4
Z67743	Spannungsabhängiger Chloridkanal 7
	Zytoskelett, Motilität, Adhäsion
Z48924	Synaptobrevin 1 (VAMP1)
L37792	Syntaxin 1A
U32315	Syntaxin 3A
U07158	Syntaxin 4A
U77942	Syntaxin 7
U63533	Syntaxin-bindendes-Protein 2
Y09567	Synaptosomal-associated Protein 23 (SNAP23)
U03985	N-ethylmaleimide-sensitiver Faktor (NSF)
U39412	α -SNAP (NSF Attachment Protein)
U18009	Membrane Protein of Cholinergic Synaptic Vesicles (VAT1)

M28209	RAB 1
X79780	RAB 11
U32944	Dynein, leichte Kette
L23958	Dynein, schwere Kette
L36983	Dynamin 2
X98801	Dynactin 1
X15804	Actinin α 1
U00802	Drebrin 1
L19711	Dystroglycan 1

Tab.1: Übersicht über die mit dem Atlas Human Neurobiology Array in humanen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesenen mRNA-Sequenzen.

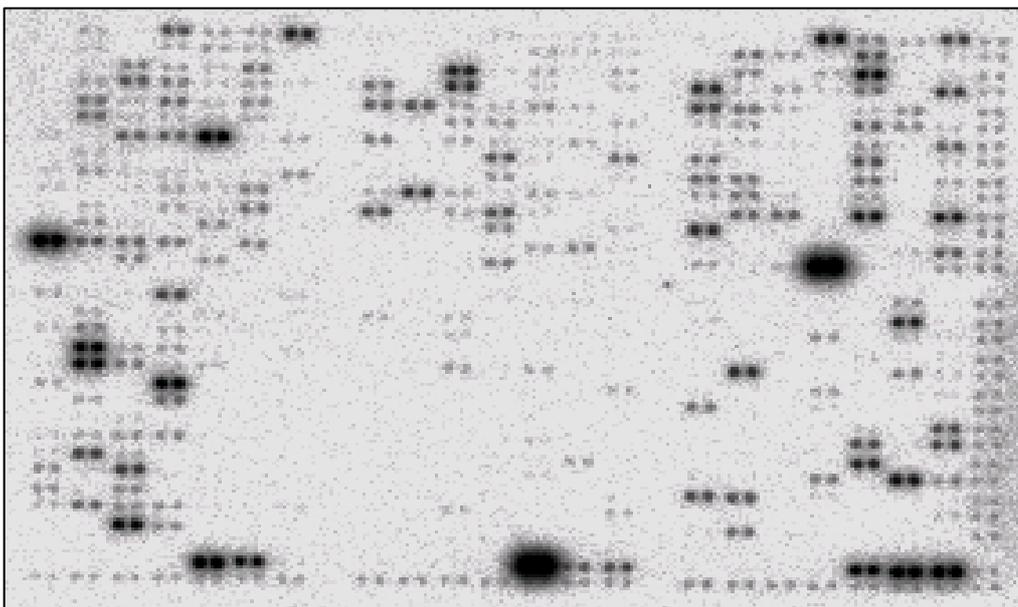


Abb.6 : Atlas Human Neurobiology Array

Abbildung 6 zeigt den Scan eines repräsentativen mit cDNA aus CD34+ Zellen hybridisierten „Neurobiology-Arrays“. Die unterschiedlichen Punktintensitäten (dot-intensities) spiegeln die unterschiedliche Expressionsstärke eines jeden Gens wieder.

3.2 Bestätigungsexperimente mit quantitativer RT-PCR

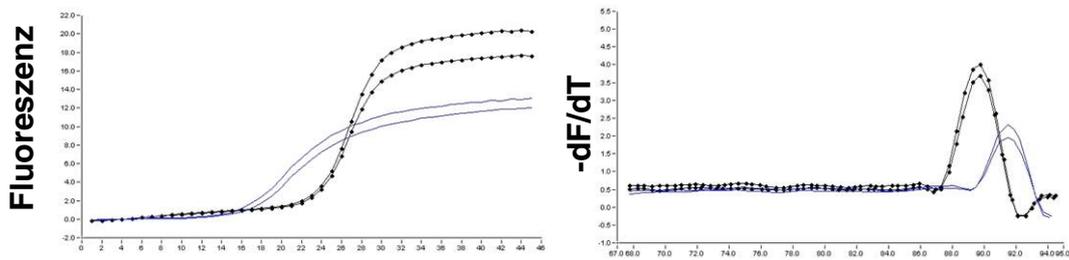
Zur Bestätigung der cDNA-Array-Analysen wurden zehn ausgewählte Gene durch quantitative „Real-Time“-RT-PCR untersucht. Zu diesen Genen zählten Rezeptoren (Abb.7), Ionenkanäle (Abb.8) und sonstige uns interessant erschienenen Gene (Abb.9). Die PCR-Produkte wurden

anschließend durch Agarosegelelektrophorese untersucht, und wir stellten fest, dass bei jeder PCR spezifisches Produkt entstanden war (Abb. 12-17).

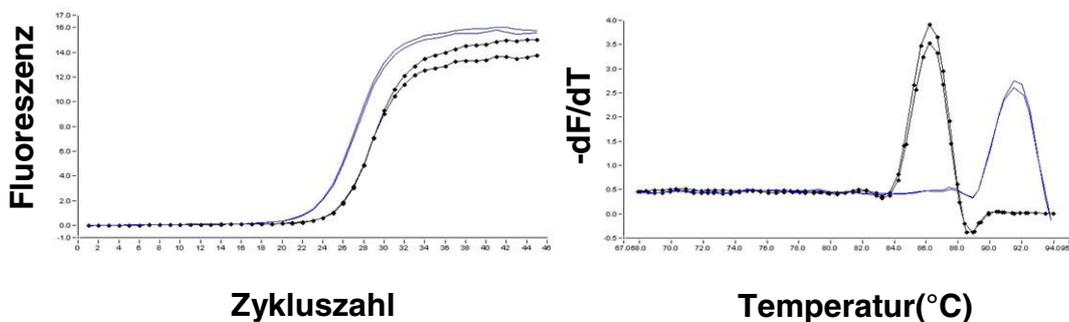
3.2.1 Rezeptoren

So konnten wir mit RT-PCR bestätigen, dass die G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren GABA_B-Rezeptor 1, Serotonin 1F-Rezeptor, Adenosin A_{2B}-Rezeptor und Opioid-Rezeptor μ 1 in CD34+ Zellen auf mRNA-Ebene exprimiert sind (Abb.7). Die im Anschluss an die „Real-Time“-RT-PCR vom LightCycler durchgeführte Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte zeigte für alle untersuchten Gene, ausgenommen des Adenosin A_{2B}-Rezeptors, ein einzelnes Produkt mit einem definierten Schmelzpunkt. Bei der Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte aus der Adenosin A_{2B}-Rezeptor-spezifischen PCR konnten zwei Produkte mit zwei verschiedenen Schmelzpunkten identifiziert werden (Abb.7).

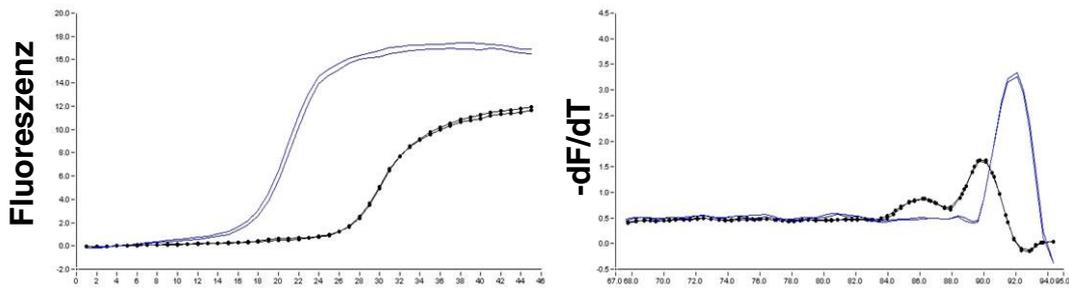
GABA_B-Rezeptor 1



Serotonin 1F-Rezeptor



Adenosin A₂B-Rezeptor



Opioid-Rezeptor μ 1

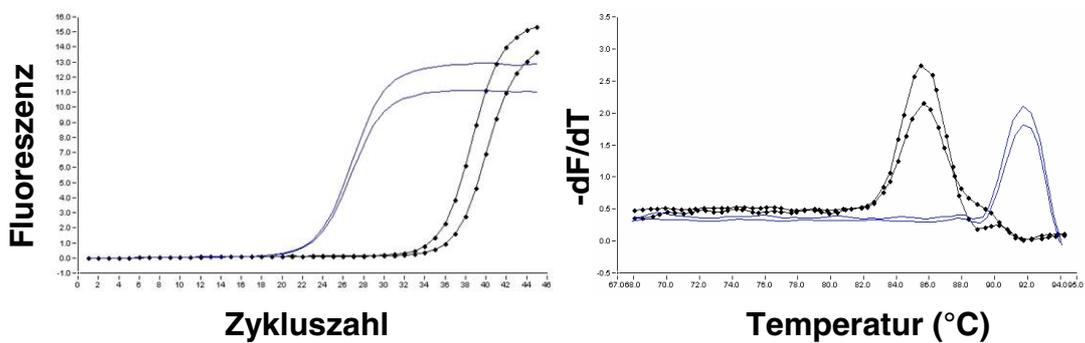


Abb.7: Nachweis der Rezeptorexpression in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit RT-PCR.

Auf der linken Seite sind jeweils repräsentative „Real-Time“-RT-PCR-Kurven der für die angegebenen Rezeptoren spezifischen PCRs gezeigt. Die Fluoreszenz auf der y-Achse ist gegen die Zykluszahl auf der x-Achse aufgetragen.

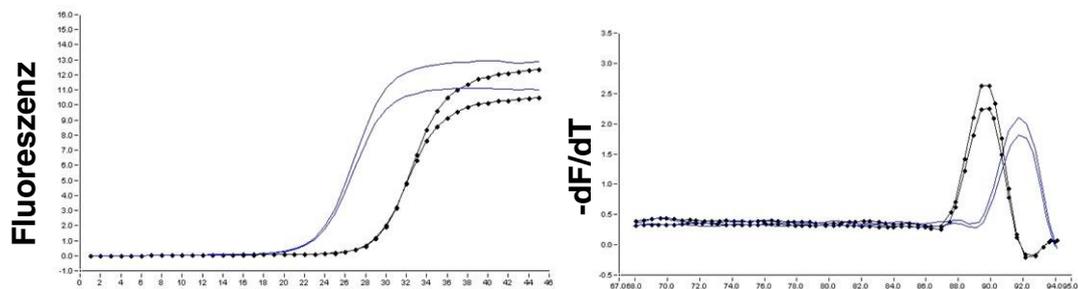
Auf der rechten Seite ist jeweils eine repräsentative Schmelzkurvenanalyse dargestellt. Die Abbildungen zeigen die negative 1. Ableitung (-dF/dT) der Schmelzkurve. In Abhängigkeit von der Temperatur (°C) auf der x-Achse kommt es dabei zur Änderung der Fluoreszenz pro Zeit (-dF/dT) in y-Richtung. Der spezifische Schmelzpunkt eines jeden Produkts ist die Temperatur, bei der die negative 1. Ableitung der Schmelzkurve ihr Maximum besitzt.

In beiden Grafiken entspricht die durchgezogene blaue Kurve dem „House-Keeping-Gen“ GAPDH, die gepunktete schwarze Kurve dem jeweiligen Target.

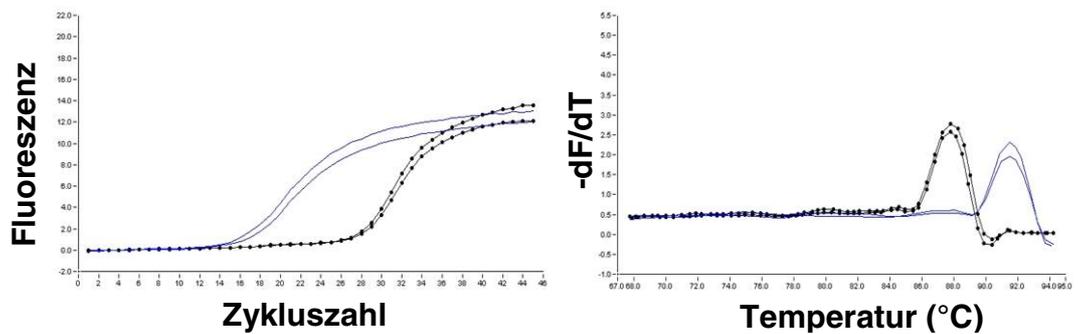
3.2.2 Ionenkanäle

Aus der Gruppe der Gene für Ionenkanäle konnten wir die Expression des Purinergeren P2X₄-Rezeptors, des spannungsabhängigen Kaliumkanals PCN2/SRS4, sowie des spannungsabhängigen Kaliumkanals KCNA6/SRS6 mit quantitativer „Real-Time“-RT-PCR nachweisen (Abb.8). Es sind drei repräsentative PCR-Kurven und Schmelzkurvenanalysen dargestellt. - Details siehe Legende zu Abb.7.

Purinerger P2X₄-Rezeptor



Kaliumkanal PCN2 / SRS4



Kaliumkanal KCNA6 / SRS6

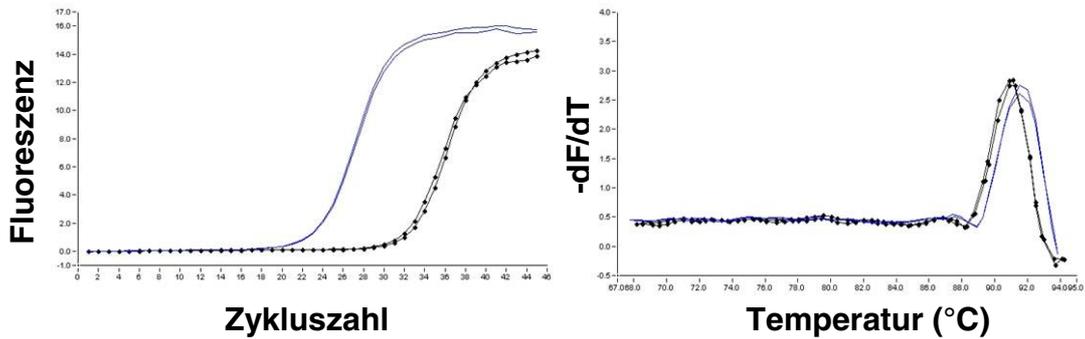
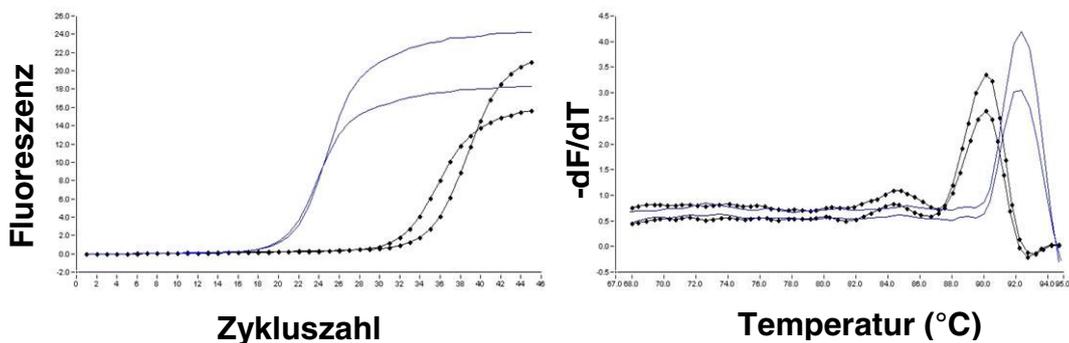


Abb.8: Nachweis der Expression von Genen für Ionenkanäle in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit RT-PCR.

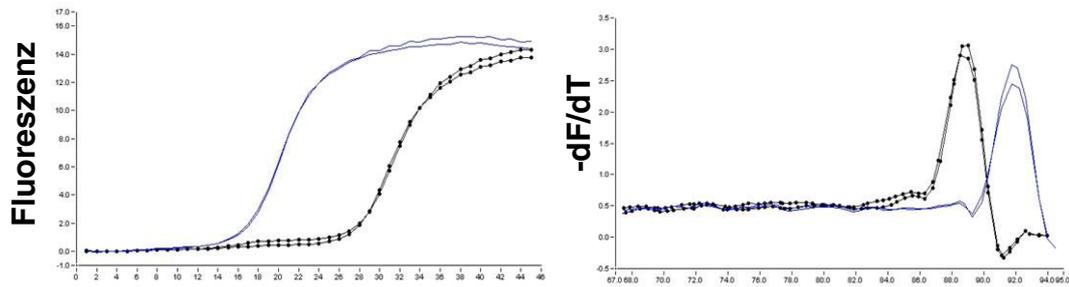
3.2.3 Sonstige

Außerdem bestätigten wir die mRNA-Expression des VAMP1/ Synaptobrevin 1, des Neurotrophin 3 (NT3) und des Dystroglycan 1-Gens mit „Real-Time“-RT-PCR (Abb.9). Es sind drei repräsentative PCR-Kurven und Schmelzkurvenanalysen dargestellt. - Details siehe Legende zu Abb.7.

VAMP1 / Synaptobrevin 1



Neurotrophin 3 (NT3)



Dystroglycan 1

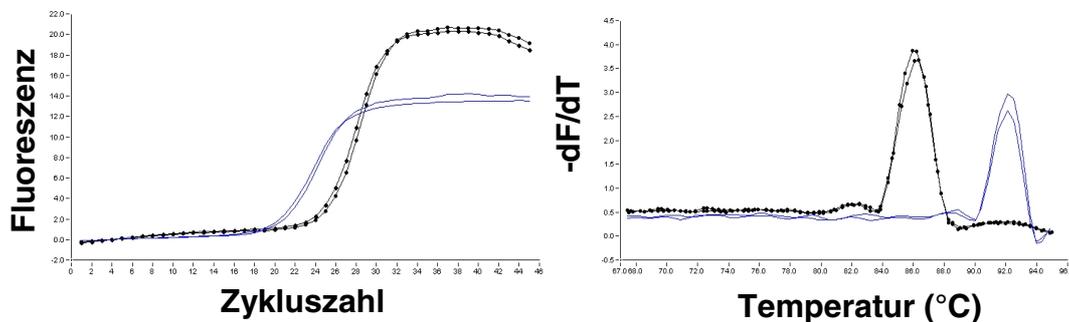


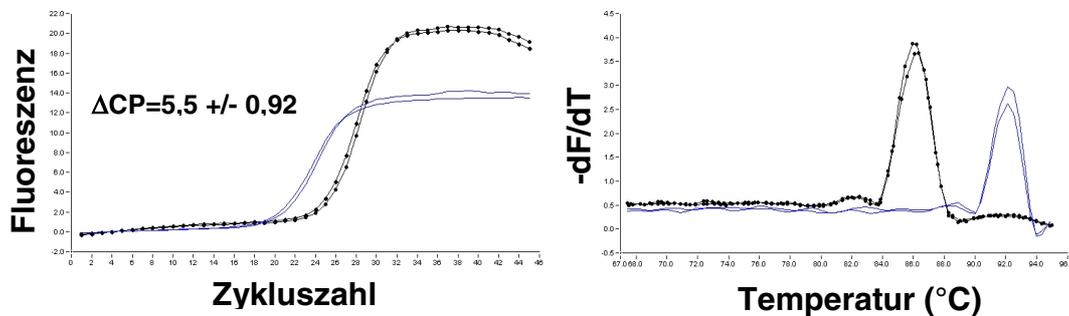
Abb.9: Nachweis der Expression des VAMP1-, Neurotrophin 3- und Dystroglycan 1-Gens in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit RT-PCR.

3.3 Differenzielle Expression des Zelladhäsionsmoleküls Dystroglycan 1 im Knochenmark (KM) und peripheren Blut (PB)

Zelladhäsionsmoleküle dienen der inter-, sowie intrazellulären Signalvermittlung und verankern die Zelle im Zellverband und mit der extrazellulären Matrix. Infolgedessen besitzen sie neben einer „Rezeptorfunktion“ für extrazelluläre Stimuli auch stabilisierende Aufgaben und sind bei der Zellmigration beteiligt. Das Dystroglycan 1 ist ein Adhäsionsmolekül, dessen mRNA-Expression wir in humanen CD34+ Zellen sowohl mit cDNA-Arrays als auch mit quantitativer „Real-Time“-RT-PCR haben nachweisen können. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle bei der Mobilisierung

von CD34+ Zellen aus dem KM in das PB spielen. So weisen beispielsweise die Integrine LFA-1 (Leukozyten-funktionsassoziiertes Molekül 1) und VLA-4 (Very Late Antigen-4) in zirkulierenden CD34+ Zellen eine geringere Expression auf als in ortsständigen CD34+ Zellen des KM [6]. Daher sind wir in unseren Experimenten der Frage nachgegangen, ob beim Dystroglycan 1 ebenfalls eine differenzielle Expression beim Vergleich von CD34+ Zellen aus dem PB und KM vorliegt.

Dystroglycan 1 (KM)



Dystroglycan 1 (PB)

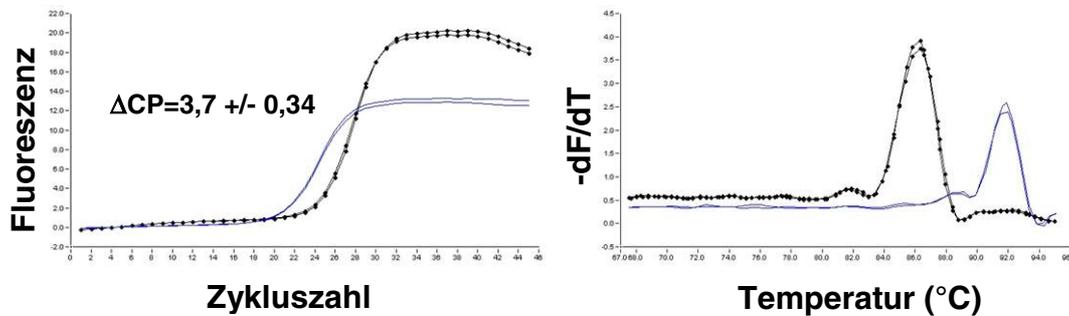


Abb.10: Vergleich der Expressionsstärke des Dystroglycan 1 in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks (KM) und des peripheren Blutes (PB).

Auf der linken Seite sind repräsentative PCR-Kurven dargestellt, auf der rechten Seite die negative 1. Ableitung der Schmelzkurve. Der spezifische Schmelzpunkt ist die Temperatur, bei der die negative 1. Ableitung ihr Maximum besitzt. Die blaue durchgezogene Linie entspricht dem „House-Keeping-Gen“ GAPDH, die gepunktete schwarze Linie dem Dystroglycan 1.

Durch Bestimmung der Differenz der Crossing-Points von Target und House-Keeping-Gen (ΔCP) lässt sich die relative Expressionsstärke ermitteln. Somit entspricht ein kleineres ΔCP einer höheren relativen Expression des Target-Gens und umgekehrt. Aus Abbildung 11 wird ersichtlich, dass man aufgrund kleinerer ΔCP -Werte auf eine höhere Dystroglycan-1-Expression in CD34+ Stamm- und Progenitorzellen des peripheren Blutes als in KM-CD34+ Stammzellen schließen kann. Wenn man eine PCR-Effizienz von 2,0 zugrunde legt, ergaben unsere Messungen eine etwa 3,7-fach höhere Dystroglycan-1-Expression in CD34+ Zellen des peripheren Blutes verglichen mit CD34+ Zellen des Knochenmarks (siehe Abb.11).

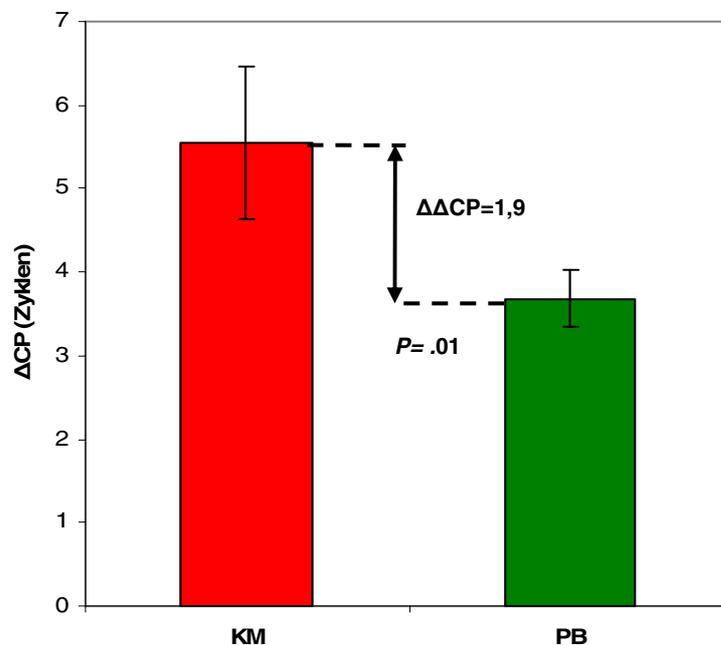


Abb.11: Dystroglycanexpression von KM-CD34+ vs. PB-CD34+ Stamm- und Progenitorzellen.

Abbildung 11 zeigt eine um 1,9 Zyklen geringere Crossing-Point-Differenz (ΔCP) des Dystroglycan 1 in CD34+ Stamm- und Progenitorzellen des peripheren Blutes im Vergleich zu CD34+ Zellen des Knochenmarks. Dieser Wert errechnet sich aus der Differenz der ΔCP s von KM-CD34+ Zellen und PB-CD34+ Stammzellen ($\Delta\Delta CP$) aus 4 untersuchten Zellproben, gekennzeichnet durch den Doppelpfeil. Legt man eine PCR-Effizienz von 2,0 zugrunde, entspricht dies einer 3,7-fach höheren Dystroglycanexpression in CD34+ Zellen des peripheren Blutes ($=PCR\text{-Effizienz}^{\Delta\Delta CP}$). Die Standardabweichung für die Dystroglycanexpression in KM-CD34+ Zellen (KM- ΔCP -SD) beträgt 0,92, die Standardabweichung für die Dystroglycanexpression in PB-CD34+ Zellen (PB- ΔCP -SD) 0,34 [$p < 0,01$].

3.4 Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten

Im Anschluss an jede RT-PCR-Untersuchung führten wir eine Agarosegelelektrophorese durch, um zu überprüfen, ob definierte PCR-Produkte entstanden sind. Die folgenden Abbildungen 12-17 belegen, dass bei den verschiedenen RT-PCRs PCR-Produkte mit der erwarteten Länge entstanden sind. PCR-Produkte sind nur in den Ansätzen entstanden, in die cDNA hinzugefügt wurde. Bei der Zugabe von zellulärer RNA entstand bei keiner der Reaktionen ein spezifisches Produkt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die PCR-Produkte in den cDNA-Ansätzen durch Kontamination mit zellulärer DNA entstanden sind.

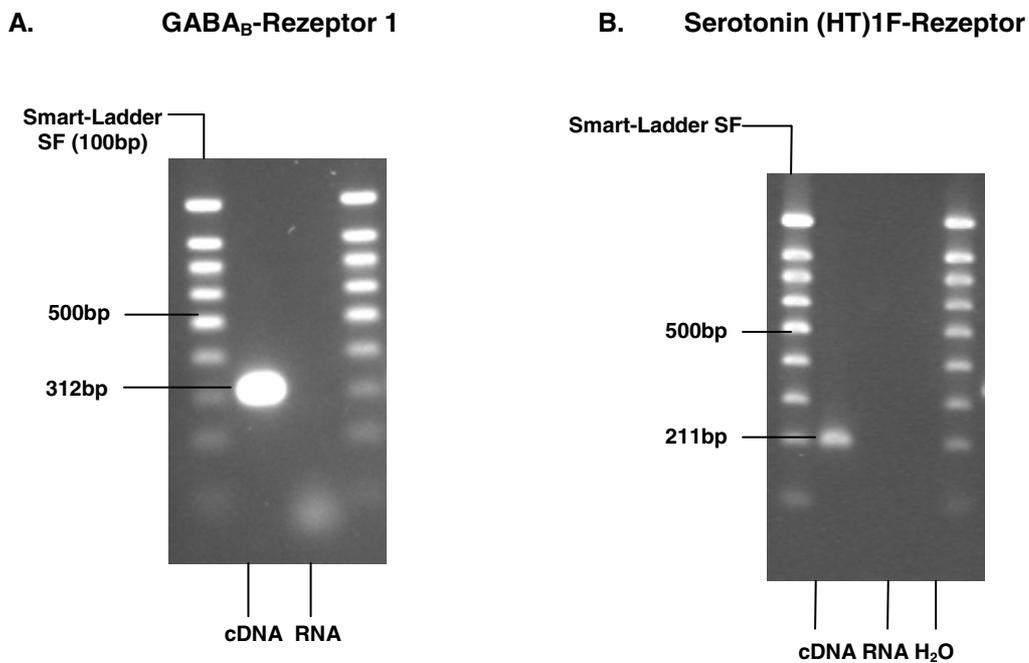


Abb.12: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der GABA_B-Rezeptor 1- und Serotonin (HT)1F-Rezeptor-spezifischen PCR.

C. Adenosin A₂B-Rezeptor

D. Purinernerger P2X₄-Rezeptor

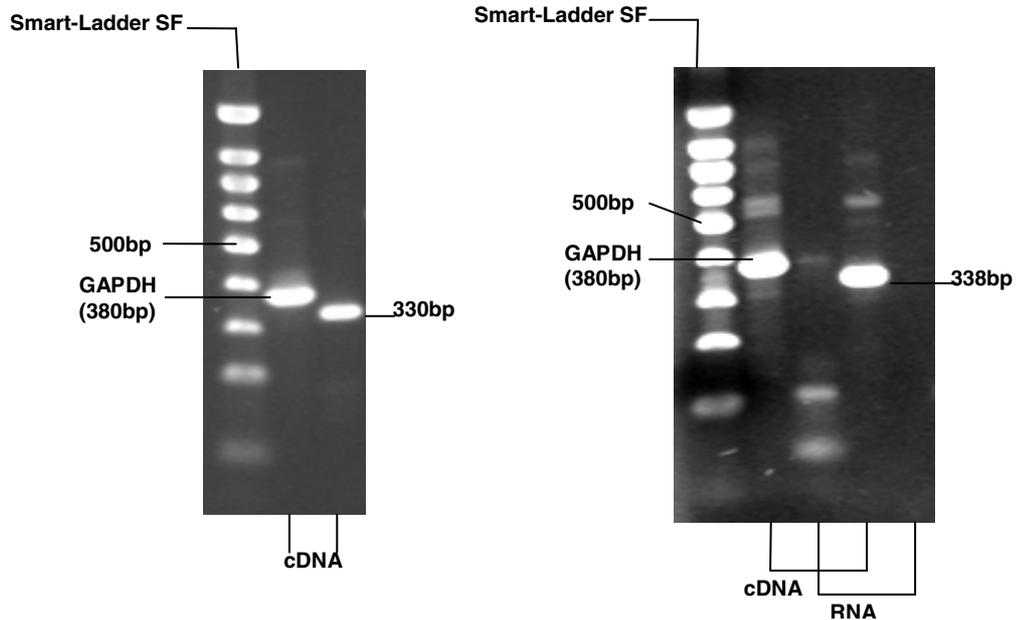


Abb.13: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Adenosin A₂B-Rezeptor- und der Purinergen P2X₄-Rezeptor-spezifischen PCR.

E. Opioid-Rezeptor μ 1

F. Kaliumkanal PCN2/SRS4

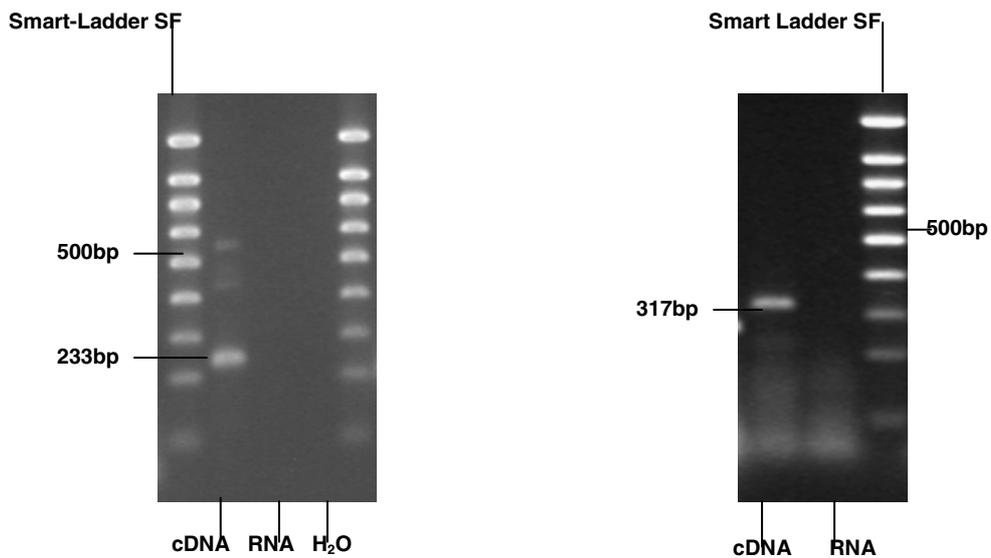
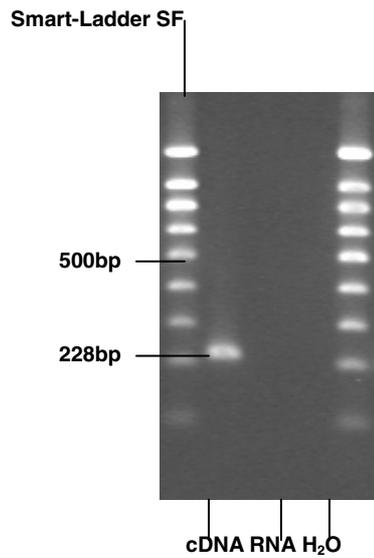


Abb.14: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Opioid-Rezeptor μ 1- und der Kaliumkanal PCN2/SRS4-spezifischen PCR.

G. Kaliumkanal KCNA6/SRS6



H. Vesicle Associated Membrane Protein 1(VAMP1)

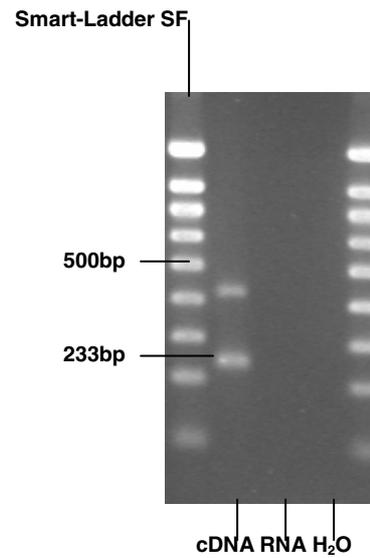
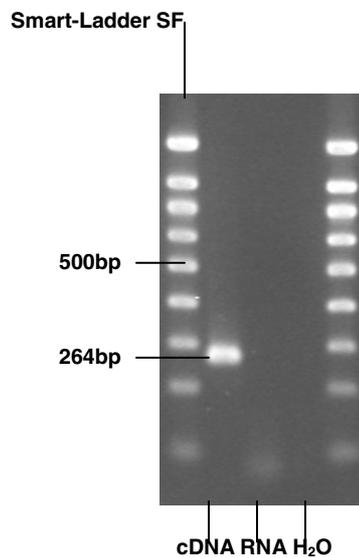


Abb.15: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Kaliumkanal KCNA6/SRS6- und der Vesicle Associated Membrane Protein 1 (VAMP1)/Synaptobrevin-spezifischen PCR.

I. Neurotrophin 3 (NT3)



K. Dystroglycan 1

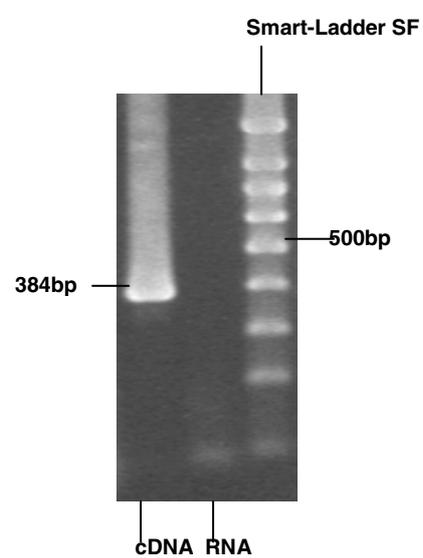


Abb.16: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Neurotrophin 3 (NT3)- und der Dystroglycan 1-spezifischen PCR.

L. Dystroglycan 1 KM-CD34+/ PB-CD34+ Zellen

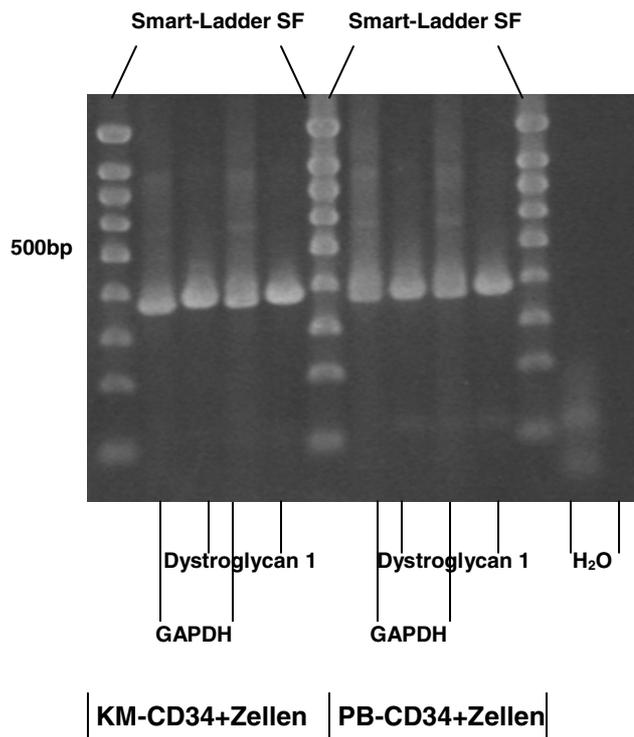


Abb.17: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Dystroglycan 1-spezifischen PCR von cDNA aus KM-CD34+Zellen und PB-CD34+Zellen.

Legende für die Abbildungen 12-17:

Dargestellt sind die Agarosegelelektrophoresen der Produkte aus der „Real-Time“-RT-PCR für die cDNA-Sequenzen der angegebenen Gene. Als Größenmarker wurde die Smart-Ladder SF (100bp-Leiter-DNA) eingesetzt. Die Größe der PCR-Produkte ist am Bildrand angegeben, sowie die 500bp-Leiter-DNA-Bande.

3.6 Nachweis der Proteinexpression von G-Protein-gekoppelten neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auf humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse

Wir untersuchten drei verschiedene Zellproben mittels Durchflusszytometrie auf die Proteinexpression von acht mit den cDNA-Arrays identifizierten G-Protein-gekoppelten neurobiologischen Oberflächenrezeptoren. Hierzu nutzten wir das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. Die CD34+ Zellen wurden in einem ersten Schritt mit Primärantikörpern der Ziege versetzt, die spezifisch gegen die humanen Rezeptoren gerichtet waren. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit FITC-konjugierten Esel-Anti-Ziege-Sekundärantikörpern versetzt, wodurch die Rezeptorexpression mit durchflusszytometrischer Bestimmung der Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte. Auf diese Weise gelang uns der Proteinnachweis des GABA_B-Rezeptors 1, des Adenosin A_{2B}-Rezeptors, des Serotonin (5-HT) 1F-Rezeptors, der Opioid-Rezeptoren μ 1 und κ 1, des CRH-Rezeptors 1, sowie der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 (Abb.18).

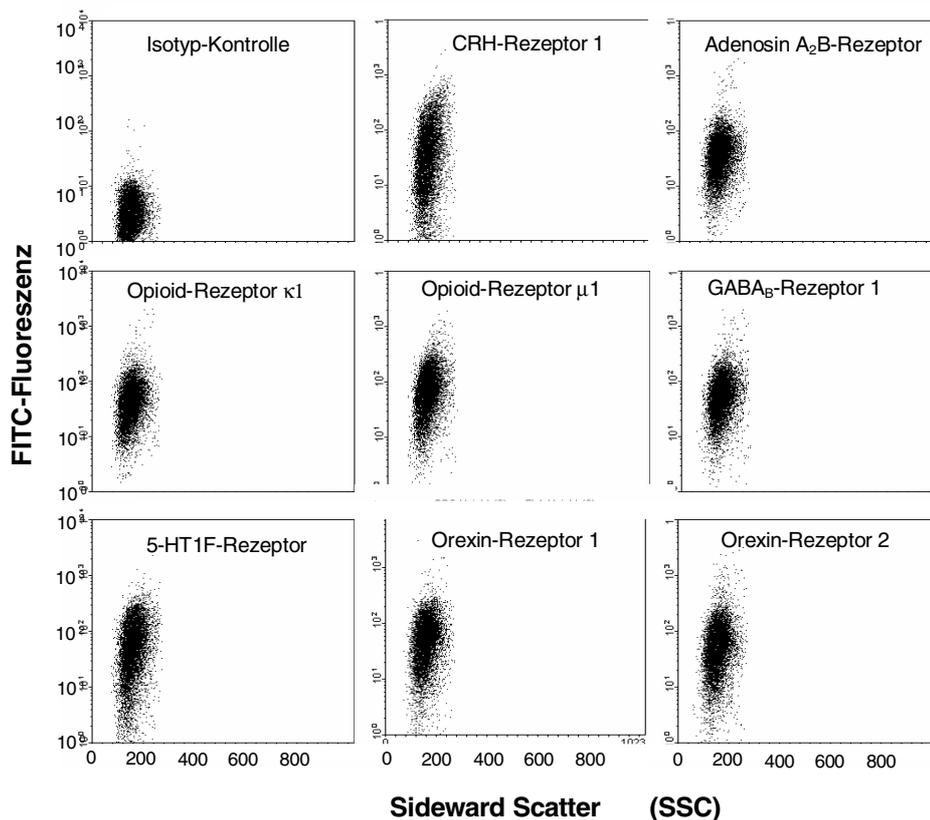


Abb.18: Rezeptorexpressionsnachweis auf humanen CD34+ Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Abbildung 18 zeigt eine repräsentative Untersuchung der angegebenen Rezeptoren auf CD34+ Zellen in der Darstellung als Dot Plot. Die FITC-Fluoreszenz ist auf der y-Achse, der Sideward Scatter (SSC) auf der x-Achse aufgetragen.

3.7 Nachweis der Proteinexpression von neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auf CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstadium

In einem nächsten Schritt untersuchten wir 4 weitere Zellproben auf die Expression der acht G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der CD34+ Zellen. Das Differenzierungsstadium von CD34+ Zellen lässt sich anhand der Expression des CD38-Oberflächenantigens bestimmen. Frühe hämatopoetische Stammzellen weisen eine niedrigere CD38-Expression auf als „reifere“ liniendeterminierte hämatopoetische Progenitorzellen. Zur Bestimmung der Rezeptorexpression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium bedienten wir uns des Prinzips der Zweifarbenimmunfluoreszenz. Die CD34+ Zellen wurden dementsprechend mit FITC- konjugierten Anti-CD38-Antikörpern, oberflächenrezeptorspezifischen Primärantikörpern der Ziege, und Rhodamin (R)- gekoppelten Esel-Anti-Ziege-Sekundärantikörpern versetzt (Abb.19).

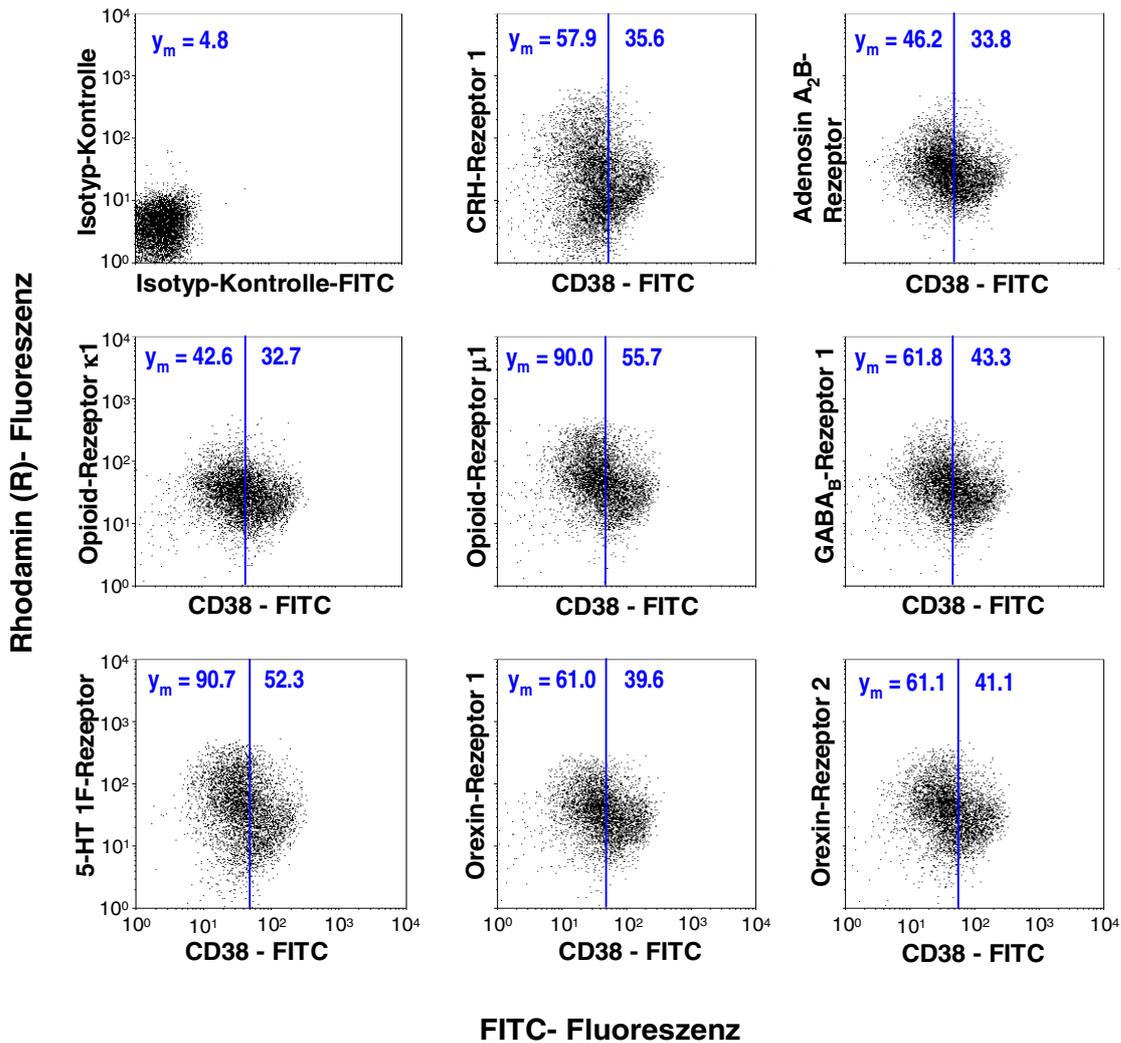


Abb.19: Rezeptorexpression in Abhängigkeit von der CD38-Expression humaner CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen.

Die Darstellung der Rezeptorexpression in der Zweifarbenimmunfluoreszenz erfolgt über einen FL-2 / FL-1 Dot Plot. Die y-Achse gibt die relative Rhodamin-Fluoreszenz an, welche der Höhe der Rezeptorexpression entspricht, die x-Achse die Höhe der CD38-Expression und dementsprechend den Anteil unreiferer CD34+ hämatopoetischer Stammzellen. Zwischen 10^1 und 10^2 Einheiten gemessener relativer CD38-FITC-Fluoreszenz wurde eine vertikale Linie gelegt, die eine CD38-schwachpositive und damit unreifere von einer CD38-hochpositiven reiferen Zellfraktion trennt. Für diese Subpopulationen sind die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (y_m) für die Rhodamin-Fluoreszenz angegeben.

Für CD38^{low} und CD38^{high} wurde jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (y_m) bestimmt, die der Rezeptorexpressionsstärke direkt proportional ist. Der Vergleich der Rezeptorexpression der CD38-schwachpositiven

unreiferen Subpopulation mit der CD38-hochpositiven reiferen Zellpopulation ergab für alle untersuchten Gene eine stärkere Oberflächenrezeptorexpression in den „unreiferen“ frühen CD34+ hämatopoetischen Stammzellen im Vergleich zu den reiferen liniendeterminierten hämatopoetischen Progenitorzellen.

4. Diskussion

Vor kurzem führte unsere Arbeitsgruppe mittels cDNA-Array-Technologie Genexpressionsanalysen an humanen adulten CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes durch. Wir stellten dabei fest, dass neben einer differenziellen Expression von Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-regulierenden Genen, auch Gene exprimiert wurden, die bislang ausschließlich dem Nervensystem zugeschrieben worden waren. Ihre Expression in hämatopoetischen Stammzellen war bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Diese Resultate veranlassten uns, mit Hilfe spezialisierter cDNA-Arrays die Expression von 588 Genen mit bekannten neurobiologischen Funktionen zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Expressionsanalyse von Genen gewidmet, deren Genprodukte innerhalb des zentralen Nervensystems der inter-, sowie intrazellulären Kommunikation dienen. Dazu gehören Rezeptoren, Ionenkanäle, Proteine des Vesikelapparates und Zelladhäsionsmoleküle. Die Ergebnisse, die wir erzielten, stammen von hoch angereicherten CD34+ Stammzellen, deren Reinheit zwischen 96 % und 99 % lag [4].

Mit Hilfe des „Atlas Human Neurobiology Arrays“ (Clontech, Heidelberg) gelang uns der Expressionsnachweis von elf G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, vier Rezeptor-Tyrosin-/ Serin-Kinasen, vier Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen, zwei ligandengesteuerten und fünf spannungsgesteuerten Ionenkanälen, sowie 18 Vesikelfusions- und Motilitätsgenen in primären humanen CD34+ Zellen. Zur Bestätigung der cDNA-Array-Daten und somit einer mRNA-Expression in humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, setzten wir für die cDNA-Amplifikation von insgesamt zehn ausgewählten Genen quantitative „Real-Time“-RT-PCR ein. Die Agarosegelelektrophorese diente uns zur Analyse der spezifischen PCR-Produkte. Darüber hinaus wiesen wir für einige der mit RT-PCR verifizierten Gene sowie einige nur auf dem Atlas Human 1.2 I Array (BD Biosciences Clontech Heidelberg) befindlichen Gene mittels spezifischer Antikörper deren Expression auf Proteinebene nach. Wir

bedienten uns dabei der Methoden der „indirekten Immunfluoreszenz“ und der „Zweifارbenimmunfluoreszenz“.

Die Zweifarbenimmunfluoreszenz eröffnete uns in diesem Zusammenhang zusätzlich die Möglichkeit, auf CD34+ Zellen die Stärke der Proteinexpression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der Zellen zu untersuchen.

Die experimentell verifizierten Gene, sowie einige weitere uns interessant erscheinende Gene sind im Weiteren Gegenstand der Diskussion.

4.1 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren stellen grundsätzlich wichtige molekulare Bestandteile inter-, sowie intrazellulärer Kommunikation dar. G-Proteine bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit [98,99] und vermitteln Signale auf unterschiedliche Art und Weisen. Zwei besonders häufige Signaltransduktionsmechanismen werden im Folgenden näher erklärt.

4.1.1 Die hormonabhängige cAMP-Kaskade

Bei der hormonabhängigen cAMP-Kaskade kommt es zur Bindung des im Blut meist frei vorliegenden physiologischen Liganden (Hormon) an den entsprechenden Rezeptor in der Plasmamembran der Zielzelle. Diese Bindung setzt eine Signalkaskade in Gang. Die Umsetzung der Hormonbindung in die entsprechende Hormonwirkung wird auch als „Transduktion“ bezeichnet. In Abhängigkeit vom Rezeptortyp und dem ihm zugehörigen Liganden kann es sowohl zur Aktivierung eines stimulierenden (G_s) als auch zur Aktivierung eines inhibierenden/inhibitorischen G-Proteins (G_i) kommen. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden unterscheiden sich grundlegend voneinander, so dass auch die durch sie vermittelten Effekte verschieden sind. Wie eingangs bemerkt, bestehen G-Proteine aus 3 Untereinheiten. Sie sind mit der Zytosolseite der Zellmembran verankert. In der

„ruhenden“ inaktiven Form hat die α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) gebunden (Abb.20). Kommt es zur Rezeptorbindung, erfolgt ein Austausch von GDP in Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit, wobei sich β - und γ -Untereinheit von der α -Untereinheit trennen. Man spricht von der „Dissoziation“ des G-Proteins [98].

Im Falle der Aktivierung eines stimulierenden G_s -Proteins reagiert nun die α -Untereinheit des G-Proteins mit einer membranständigen Adenylatcyclase, einem Enzym, welches in der Lage ist, aus zytosolischem Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu bilden. Durch Bindung der Adenylatcyclase an die α -Untereinheit wird diese aktiviert, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt. Die steigende intrazelluläre cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der Proteinkinase A, was die Phosphorylierung von Seryl-, oder Threonylresten von Proteinen des Zytosols, aber auch der Zellmembran nach sich zieht (Abb.21). Die Phosphorylierung wiederum bewirkt eine konsekutive Leitfähigkeitserhöhung der beschriebenen Proteinkanäle für bestimmte Ionen (in diesem Fall v.a. Na^+ -Ionen, aber auch K^+ - und Ca^{2+} -Ionen), wodurch verschiedene zelluläre Effekte hervorgerufen werden können, wie z.B. eine durch einen Na^+ -Ionen-Einstrom hervorgerufene Depolarisation der Zellmembran [98,99]. Beendet wird die Signalkaskade dadurch, dass einerseits GTP wieder zu GDP hydrolysiert wird, andererseits dadurch, dass cAMP durch die Phosphodiesterase zu AMP gespalten wird. Darüber hinaus werden die phosphorylierten Proteine durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert [98].

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Aktivierung eines inhibierenden G_i -Proteins. Hierdurch wird entweder über die Hemmung der Adenylatcyclase, oder über die Aktivierung der Phosphodiesterase der zelluläre Bestand an cAMP reduziert und auf diese Weise die Permeabilität des Rezeptors für K^+ -Ionen erhöht. Der Kaliumausstrom aus der Zelle löst infolgedessen eine Hyperpolarisation der Zellmembran aus. Auf diese Weise entsteht ein inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP) [98,99].

Die Rezeptoren, die wir in der Zellmembran der humanen hämatopoetischen Stammzelle mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen haben, vermitteln ihre Signale größtenteils über inhibierende G_i-Proteine.

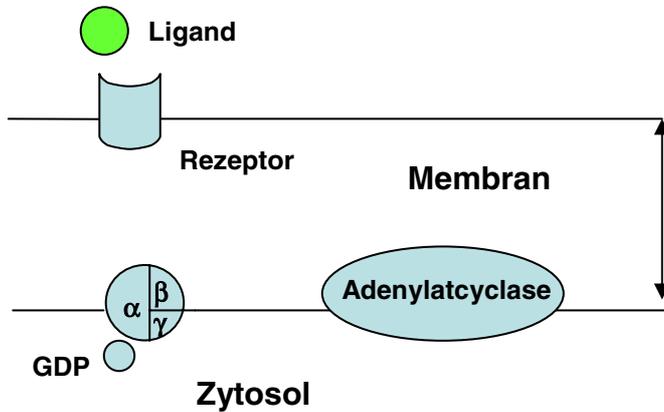


Abb.20: Rezeptor im Ruhezustand

Der Rezeptor liegt in dem Teil der Plasmamembran, der dem Extrazellulärraum am nächsten liegt, während die Adenylatcyclase im zytosolseitigen Teil der Plasmamembran verankert ist. Der Rezeptor befindet sich im Ruhezustand kurz vor Ligandenbindung. Das G-Protein liegt undissoziiert ebenfalls im zytosolseitigen Teil der Plasmamembran vor. Seine α -Untereinheit hat GDP gebunden.

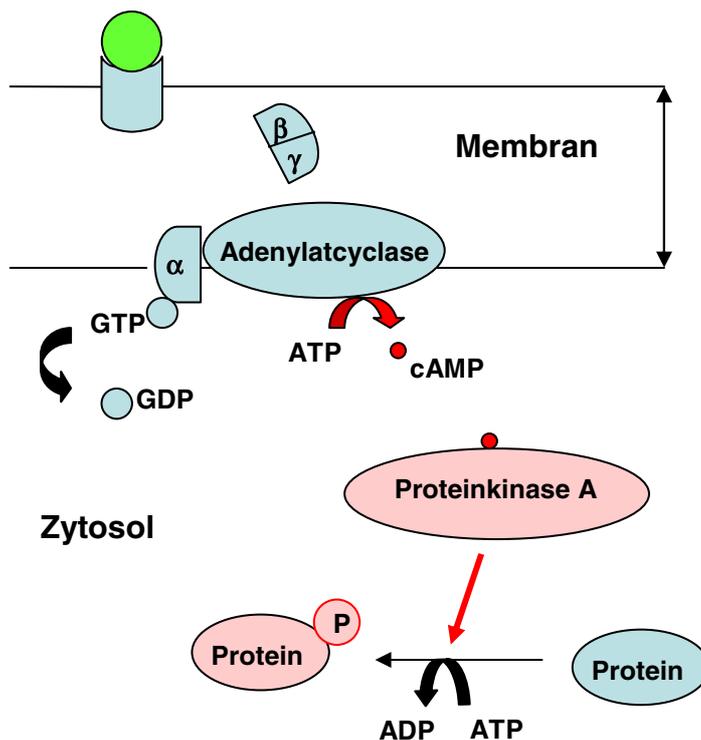


Abb.21: Aktivierter Rezeptor: cAMP-Signalkaskade nach Aktivierung eines stimulierenden G_s-Proteins durch Ligandenbindung des Rezeptors.

Der physiologische Ligand bindet an seinen Rezeptor, was zur Dissoziation des G-Proteins führt. Die β - und γ -Untereinheit wird abgespalten, wodurch die α -Untereinheit, nachdem sie GDP durch GTP ersetzt hat, mit der Adenylatcyclase reagieren kann. Durch die Bindung der Adenylatcyclase an die α -Untereinheit des G-Proteins, wird diese aktiviert und synthetisiert (Mg^{2+} -abhängig) cAMP aus ATP. cAMP führt schließlich zur Aktivierung einer Proteinkinase A, welche durch Phosphorylierung von Proteinen die Hormonwirkung in der Zelle auslöst.

4.1.2 Die hormonabhängige IP₃-Kaskade

Bei dieser Form der Signaltransduktion kommt es nach Aktivierung eines stimulierenden (chemotaktischen) G-Proteins (hier als G_q-Protein bezeichnet) durch Rezeptorbindung zur konsekutiven Aktivierung einer Phospholipase C, welche Phosphoinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. Bei beiden Substanzen handelt es sich um „Second-Messenger-Botenstoffe“. IP₃ führt schließlich zu einer Calcium (Ca²⁺)-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Abb.22). Der intrazelluläre Anstieg der Calciumkonzentration wirkt als hormonelles Signal und vermittelt beispielsweise die Freisetzung von Sekretvesikeln oder führt zur Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran [99]. Neben solch einem direkten Calciumeffekt, ist Calcium auch in der Lage über die Bindung an Calmodulin, ein calciumbindendes Protein, indirekte Effekte zu vermitteln (Abb.22). Calmodulin ändert calciumabhängig seine räumliche Struktur und ist somit im Komplex mit Calcium in der Lage, durch Phosphorylierung von Membrankanälen über calmodulinabhängige Kinasen, die Leitfähigkeit dieser Membranproteine für bestimmte Ionen, insbesondere Ca²⁺-Ionen, zu erhöhen. Die Dephosphorylierung dieser Membrankanäle bewirkt das entsprechende Gegenteil und hat somit eine Leitfähigkeitsabnahme zur Folge [98,99]. Diacylglycerin ist der zweite „Second-Messenger“ in diesem System. Es aktiviert eine Proteinkinase C, die ihrerseits wiederum bestimmte Membrankanäle phosphoryliert und auf diese Weise deren

Ionenleitfähigkeit beeinflusst. Die Beendigung der IP_3 -Signalkaskade erfolgt ähnlich der cAMP-Kaskade über Inaktivierung der G-Proteine, Dephosphorylierung der phosphorylierten Proteine und Abbau von Calcium und IP_3 , sowie Resynthese von PIP_2 [98]. Auch in der IP_3 -Signalkaskade besteht die Möglichkeit der Aktivierung über inhibierende G_i -Proteine, wodurch die Phospholipase C gehemmt wird, sowie alle durch sie vermittelten Effekte (s.o.).

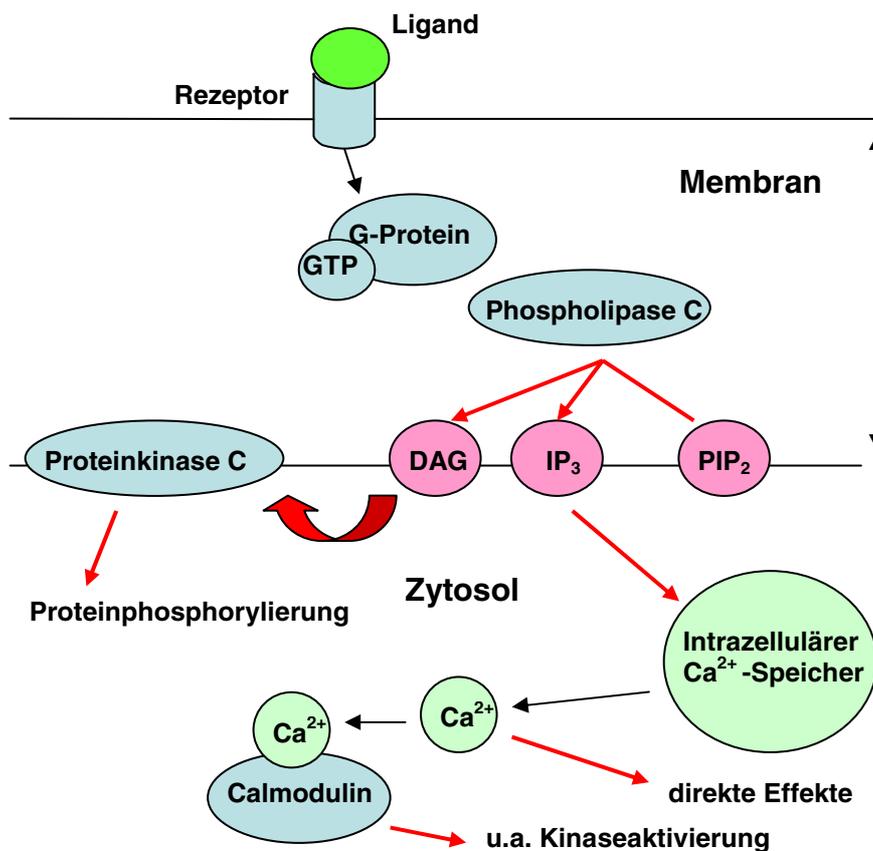


Abb.22: Aktivierter Rezeptor: IP_3 -Kaskade nach Aktivierung eines stimulierenden G_q -Proteins durch Ligandenbindung des Rezeptors.

Bei dieser Form der Signalkaskade bewirkt die Rezeptoraktivierung durch Ligandenbindung eine G-Protein-vermittelte Aktivierung einer Phospholipase C. Dies führt zur Umwandlung von Phosphoinositidbisphosphat in Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin. Diacylglycerin seinerseits bewirkt die Aktivierung einer Proteinkinase C, was zur Proteinphosphorylierung führt. Inositoltrisphosphat ist einerseits in der Lage direkte Calciumeffekte durch Leerung intrazellulärer Calciumspeicher in der Zelle auszulösen, andererseits führt die Kopplung von Calcium an Calmodulin durch Phosphorylierung von Membrankanälen über Calcium-Calmodulin-abhängige Kinasen zu indirekten Calciumeffekten in der Zelle.

4.1.3 Rezeptoren

GABA_B-Rezeptor 1:

Der GABA_B-Rezeptor 1 stellt die Untereinheit 1 eines metabotropen Rezeptors dar, dessen Nachweis uns sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer „Real-Time“-RT-PCR und Agarosegelelektrophorese als auch auf Proteinebene auf humanen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen mittels indirekter Immunfluoreszenz gelang.

Beim GABA_B-Rezeptor handelt es sich um einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus den Untereinheiten 1 und 2. Während der GABA_B-Rezeptor 1 vorwiegend für die Ligandenbindung verantwortlich ist, wird über den GABA_B-Rezeptor 2 die Aktivierung inhibierender G_i-Proteine vermittelt. Trotz der Tatsache, dass der GABA_B-Rezeptor 2 separat aktiviert werden kann, hat sich doch gezeigt, dass die Formierung beider Rezeptoruntereinheiten zu einem Rezeptor für die optimale Funktion des GABA_B-Rezeptors essentiell ist [100,101]. Der natürliche Ligand des GABA_B-Rezeptors ist die γ -Aminobuttersäure (GABA). Sie stellt den wichtigsten Vertreter inhibitorischer Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (ZNS) dar [99-101]. GABA-Rezeptoren kommen somit ubiquitär im ZNS vor, jedoch in unterschiedlicher regionaler Verteilung und Dichte. In besonders hoher Konzentration findet man sie in der Groß- und Kleinhirnrinde und im Corpus striatum [99]. Auch im peripheren Nervensystem (PNS) sind sie vertreten [100]. Neben dem physiologischen Liganden GABA wirkt „Baclofen“, ein Antispastikum, als pharmakologischer Agonist am metabotropen GABA_B-Rezeptor. Neueste Studien sowohl am Tiermodell als auch am Menschen konnten im Übrigen zeigen, dass der GABA_B-Rezeptor durch Stimulation von nicht-sedativen Dosen von Baclofen in der Lage ist, alkoholisches Suchtverhalten so zu beeinflussen, dass das psychische Verlangen nach Alkohol drastisch reduziert wird und auf diese Weise längere Abstinenzzeiten erzielt werden können [102]. GABA_B-Rezeptoren spielen generell eine bedeutende Rolle in der Physiologie des Nervensystems. So sind sie beispielsweise über die Entwicklung inhibitorischer postsynaptischer Potenziale durch

Kaliumionenausstrom aus der Zelle (s.o.) an der Erregungsmodulation von Nervenzellen beteiligt. Darüber hinaus schließen sie präsynaptische spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, wodurch es zu einem Rückgang der Transmitterfreisetzung kommt [98-100]. Schließlich sind sie beteiligt an der Entstehung einer Vielzahl verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie Spastizität [103], Epilepsie [104,105], Schizophrenie [106,107], Angst und Depression [108,109], Schmerz [110] und Opiatabhängigkeit [111].

Über die Bedeutung des GABA_B -Rezeptors 1 für die menschliche Hämatopoese lässt sich bisher nur spekulieren. Möglicherweise deutet seine Expression auf humanen hämatopoetischen CD34+ Stammzellen auf eine potenzielle neuronale Beeinflussung der Hämatopoese hin.

Serotonin (HT-) 1F- Rezeptor:

Der Serotonin (HT-) 1F-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptorsubtyp, der aus einer Familie von mittlerweile 15 identifizierten Rezeptorsubtypen stammt, die wiederum in sieben Subfamilien unterteilt werden können [112]. Analog zum GABA_B -Rezeptor 1 vermittelt er seine Effekte über ein inhibitorisches G_i -Protein. Sein Nachweis gelang uns sowohl auf mRNA-Ebene humaner hämatopoetischer Stammzellen mittels quantitativer RT-PCR und Agarosegelelektrophorese als auch auf Proteinebene mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Serotonin-Rezeptoren sind im Körper weit verbreitet, liegen aber in besonders hoher Konzentration im ZNS vor und dort insbesondere in den Raphe-Kernen des Rhombenzephalon mit Projektionen zum limbischen System, zum Thalamus und Hypothalamus, zum Vorderhirn, Kleinhirn und Rückenmark [98]. Die physiologischen Effekte von Serotonin sind vielfältiger Natur: So beeinflusst Serotonin die Hirndurchblutung und Schlafregulation, hemmt präganglionäre sympathische, dopaminerge, sowie noradrenerge Neurone, hemmt die Nozizeption im Hinterhorn des Rückenmarks und erregt spinale Motoneurone. Gleichzeitig besitzt Serotonin modulierende Effekte auf Ess- und Sexualverhalten, Blutdruck-

und Temperaturregulation, sowie Erbrechen [98]. Nachgewiesen ist die Bedeutung einer Verminderung der Serotoninkonzentration im ZNS für die Entstehung der endogenen Depression [113]. Der Serotonin 1F-Rezeptor im Speziellen spielt vor allem eine bedeutende Rolle bei der zentralen Inhibition neurogener Inflammationskaskaden und nozizeptiver Impulse als pharmakologischer Angriffspunkt in der Migränetherapie [114,115].

Was die Effekte von Serotonin auf die Hämatopoese betrifft, so wurde dem Serotonin bereits vor Jahrzehnten eine hämatopoesestimulierende Wirkung zugesprochen [116,117]. Außerdem fand man heraus, dass Serotonin ebenfalls stimulierend auf die Megakaryozytopoese wirkt, und zwar über einen Rezeptorsubtyp, den Serotonin 2-Rezeptor [118]. Darüber hinaus berichteten *Skurikhin et al.* 2001 von einer Hämatopoeseregulation durch das ZNS auf der Basis zweier Neurotransmittersysteme, dem dopaminergen und dem serotoninergen System in vivo [119]. Nichtsdestotrotz sind die molekularen Grundlagen, die diesem Phänomen zugrunde liegen, noch nicht bekannt. Schließlich beobachteten *Serafeim et al.* 2002/2003, dass Serotonin Burkitt-Lymphom-Zellen, die aus Biopsien gewonnen wurden, zur Apoptose veranlassen kann [120,121].

Adenosin A₂B-Rezeptor:

Der Adenosin A₂B-Rezeptor wirkt über stimulierende G_s-Proteine. Sein Nachweis gelang uns sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mittels RT-PCR und indirekter Immunfluoreszenz.

Adenosin besitzt zweierlei wichtige physiologische Bedeutungen: Einerseits ist Adenosin Hauptbestandteil des intrazellulären Energiestoffwechsels, andererseits physiologischer Ligand spezifischer Plasmamembranrezeptoren, über die es Ionenkanalaktivitäten moduliert und die Neurotransmitterfreisetzung von Serotonin, Dopamin und Acetylcholin herabsetzt. Der Adenosin A₂B-Rezeptor kommt in unterschiedlichen Zellen des Organismus vor, unter anderem in Fibroblasten, in denen er eine Hemmung von Kollagen- und

Proteinsynthese bewirkt, und in Nervenzellen, in denen er neuronale Funktionen unter ATP-Mangelzuständen reguliert [122]. Außerdem spielt er eine bedeutende Rolle im Rahmen der „ischämischen Präkonditionierung“ von u.a. Herz, ZNS und Skelettmuskulatur, sowie für das axonale Wachstum in den Hintersträngen des Rückenmarks [123-125]. Darüber hinaus berichteten *Irnich et al. 2002*, dass ATP via A_2B -Rezeptoren in der Lage ist, die axonale Erregbarkeit menschlicher peripherer Nerven deutlich zu erhöhen [126]. Insgesamt sind vier Typen von Adenosin-Rezeptoren bekannt. Dazu zählen die Adenosin-Rezeptoren A_1 , A_2A , A_2B und A_3 . Im Unterschied zum A_2A -Rezeptor besitzt der A_2B -Rezeptor eine deutlich niedrigere Adenosin-Affinität bei einem erhöhten Vorkommen im Gehirn [122]. Aufgrund der Tatsache, dass Adenosin über die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade eine zentrale Rolle in der Regulation von neuraler Aktivität und Energiestoffwechsel spielt, insbesondere unter Bedingungen, die einen gesteigerten zellulären Energiebedarf nach sich ziehen (z.B. Hypoxie), stellt die Interaktion mit dem Adenosin-Metabolismus ein vielversprechendes Ziel therapeutischer Intervention in der Behandlung von diversen neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen (z.B. Epilepsie, Chorea Huntington, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Depression, Schizophrenie, Drogensucht) dar [127].

Die Hämatopoese betreffend konnten *Pospisil et al.* zeigen, dass ein experimentell hervorgerufener Anstieg extrazellulären Adenosins zu einer erhöhten Zellzyklusaktivität hämatopoetischer Progenitorzellen führt. Mit der erhöhten Zellzyklusaktivität ging gleichzeitig eine Sensibilitätserhöhung für Zellzyklusgifte, wie 5-Fluoruracil, einher [128-130]. Unser Nachweis des A_2B -Rezeptors auf CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen könnte darauf hinweisen, dass der von *Pospisil et al.* nachgewiesene Anstieg der Zellzyklusaktivität hämatopoetischer Progenitorzellen eventuell unter Beteiligung des A_2B -Rezeptors vermittelt wurde. Das Prinzip der Sensibilitätserhöhung hämatopoetischer Zellen gegenüber Zellzyklusgiften durch Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration stellt einen interessanten Aspekt

dar für zukünftige klinische Überlegungen zur Effektivitätserhöhung von hämato-zytotoxischen Therapien.

Opioid-Rezeptor μ 1:

Auch der Opioid-Rezeptor μ 1 zählt zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die ihre Wirkung über inhibitorische G_i -Proteine vermitteln.

Sein Nachweis gelang uns sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer „Real-Time“-RT-PCR und Agarosegelelektrophorese als auch auf Proteinebene mit indirekter Immunfluoreszenz.

Der Opioid-Rezeptor μ 1 kommt, wie alle bisher besprochenen und nachgewiesenen Rezeptoren, in hoher Konzentration im zentralen Nervensystem vor. Er vermittelt die physiologischen sowie pharmakologisch evozierbaren Effekte der supraspinalen Analgesie, der Miosis, Euphorie, Toleranz und Abhängigkeit. Sein physiologischer Ligand ist das endogene Morphin β -Endorphin [131].

Neuere Studien belegen, dass Opioid-Rezeptoren in der Tat hämatopoeseregulierende Wirkungen vermitteln. So beobachteten *Tian M. et al.* im „Knock-Out-Modell“ der Maus, dass Mäuse, denen das Gen des Opioid-Rezeptors μ 1 fehlte, neben einer reduzierten Paarungsbereitschaft einen rapiden Proliferationsschub der erythroiden und myeloischen Blutzellen entwickelten, inklusive eines Anstiegs an multipotenten hämatopoetischen Progenitorzellen sowohl im Knochenmark als auch in der Milz [132]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der Opioid-Rezeptor μ 1 einen wachstumshemmenden Effekt auf liniendeterminierte in ihrer Entwicklung bereits mehr oder weniger festgelegte hämatopoetische Progenitorzellen ausübt. Weitere Arbeiten in diesem Bereich konnten zeigen, dass die Expression von Opioid-Rezeptoren auf peripheren Blutzellen und dort insbesondere auf Zellen des Immunsystems, wie Leukozyten und mononukleären Zellen, die Voraussetzung für die Vermittlung eines peripheren entzündungsassoziierten antinozizeptiven Effektes bildet [133-135]. Der Forschungsgruppe um *Rozenfeld-Granot et al.* gelang 2002 sogar der

Expressionsnachweis des Opioid-Rezeptors μ auf CD34+ hämatopoetischen Stammzellen des Nabelschnurblutes. Die Forscher beobachteten, dass seine Aktivierung durch Enkephaline oder Morphine eine Mitogen-aktivierte-Proteinkinase(MAP)-Signaltransduktionskaskade in Gang setzt. Da diese Signalkaskade mit Proliferations- und Differenzierungssignalen assoziiert ist, schlossen sie auf eine mögliche Beteiligung endogener Morphine bei der hämatopoetischen Stammzellproliferation und Differenzierung [136]. Auf der Grundlage unserer Ergebnisse, die die Existenz des Opioid-Rezeptors μ_1 auf humanen hämatopoetischen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen belegen, lässt sich vermuten, dass endogene Morphine (Endorphine, Enkephaline, Dynorphine) als natürliche Liganden der Opioid-Rezeptoren, möglicherweise auch beim Menschen die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen regulieren.

Opioid-Rezeptor κ_1 :

Der Opioid-Rezeptor κ_1 konnte von uns erstmalig auf Proteinebene humaner CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mit indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Er hat im Vergleich zum Opioid-Rezeptor μ_1 , bis auf die Miosis, die durch ihn vermittelt wird, ein etwas anderes physiologisches Wirkprofil. So wird durch ihn eine spinale Analgesie im Gegensatz zur supraspinalen Analgesie durch den Opioid-Rezeptor μ_1 vermittelt. Außerdem führt seine Aktivierung durch den physiologischen Liganden Dynorphin, ebenfalls ein endogenes Opioid, zur Sedierung und geringen dysphorischen Effekten [131].

Maestroni et al. gelang 1999 im Mausmodell der Nachweis eines durch den Opioid-Rezeptor κ_1 vermittelten hämatopoesesteigernden Effekts [137]. Auf dem Hintergrund der Ergebnisse von *Tian et al.* [132], der eine durch den Opioid-Rezeptor μ_1 hervorgerufene hämatopoesesupprimierende Wirkung ebenfalls bei der Maus hatte feststellen können, liegt die Vermutung nahe, dass auch beim Menschen

Opioid-Rezeptoren bei der Regulation der Hämatopoese in unterschiedlicher Weise Einfluss nehmen könnten. Ob dies tatsächlich der Fall ist, und auf welche Art und Weise dies geschieht, muss in weiteren Studien untersucht werden.

CRH-Rezeptoren 1 und 2:

Die CRH-Rezeptoren 1 und 2 zählen ebenfalls zu der Gruppe von Rezeptoren, die wir erstmalig auf hämatopoetischen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen durch cDNA-Array-Analysen, bzw. im Falle des CRH-Rezeptors 1, mit indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen haben.

CRH-Rezeptoren findet man in besonders hoher Dichte im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus. Sie sind jedoch auch in Lunge, Nebenniere und im Gastrointestinaltrakt anzutreffen. Der physiologische Ligand, das „Corticotropin Releasing Hormone“ (CRH), bewirkt die Freisetzung von Proopiomelanocortin (POMC) aus der Adenohypophyse, aus dem durch „posttranslationale Prozessierung“ Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), α/γ -Melanozytenstimulierendes Hormon (MSH), sowie β -Endorphin entstehen. Das ACTH entfaltet eine besonders starke Wirkung auf die Zona fasciculata der Nebennierenrinde, wo es zur Ausschüttung von Glukokortikoiden (Cortison/Cortisol) in Stress- und Belastungssituationen kommt. Dies führt zum Anstieg des Blutdrucks, der Herzfrequenz und des Herzzeitvolumens, einer Hemmung von Magensaft- und H^+ -Ionen-Sekretion, sowie einer Motilitätsabnahme im Gastrointestinaltrakt (GIT). Appetit und Libido sinken [98]. Glukokortikoide werden darüber hinaus aufgrund ihrer potenten immunsuppressiven Eigenschaften u.a. zur medikamentösen Therapie von Erkrankungen eingesetzt, bei denen es zu überschießenden Reaktionen des Immunsystems kommt. Dies können Erkrankungen des atopischen Formenkreises sein, wie z.B. Asthma bronchiale [131,138], oder chronisch entzündliche Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa [131,139]. Der Mechanismus, der dem immunsuppressiven Effekt zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig geklärt.

Unser Nachweis des CRH-Rezeptors 1 auf humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen weist auf die Möglichkeit einer Glukokortikoid-vermittelten Stressantwort auf Stammzellebene hin.

Wie bereits erwähnt, spielen die CRH-Rezeptoren eine bedeutende Rolle bei stress- und belastungsbezogenen Reaktionen des menschlichen Körpers. So kommt es regelmäßig über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse vermittelt zu Herzfrequenz- und Blutdruckanstieg und herabgesetzter Immunabwehr bei chronischen Formen des Stresses. Während der CRH-Rezeptor 1 jedoch vorwiegend im ZNS lokalisiert ist, besitzt der CRH-Rezeptor 2 seine größte Konzentration in peripheren Organen, wie z.B. der Nebenniere oder des Gastrointestinaltrakts. Wie jedoch *Hiroi et al. 2001* in „Molecular Psychiatry“ an Gehirnen von Suizidopfern haben zeigen können, ist auch der CRH-Rezeptor 2 trotz seiner vornehmlich peripheren Lokalisation in der Lage, besonders in Stress- und Belastungssituationen eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zu bewirken [140]. Darüber hinaus beobachteten *Zouboulis et al. 2002* auch topische stressbezogene Effekte des CRH, die über beide Rezeptortypen vermittelt werden. So berichteten die Forscher von einer CRH-vermittelten Lipogeneseaktivierung in humanen Sebozyten [141]. Diese Entdeckung deutet daraufhin, dass eine kontinuierliche CRH-Freisetzung, wie sie unter Dauerstress auftritt, die Disposition zur Entwicklung verschiedenster Hautkrankheiten signifikant erhöhen kann.

Unsere Entdeckung der CRH-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen verleitet zu der Annahme, dass CRH nicht nur in der Lage ist, über die Ausschüttung von Glukokortikoiden indirekte immunsuppressive Effekte zu vermitteln, sondern auch direkt auf die Hämatopoeseregulation über CRH-Rezeptoren auf hämatopoetischen CD34+ Zellen Einfluss zu nehmen. Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass nach Inkubation von CD34+ Zellen mit CRH, dem natürlichen Liganden der CRH-Rezeptoren, eine signifikante Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel zu erzielen

war. Diese Beobachtung unterstützt neuere Studien, die zeigen konnten, dass CRH-Rezeptoren, neben anderen Rezeptoren im Nervensystem, Signale über inhibitorische G-Proteine vermitteln [142].

Orexin (Hypocretin)-Rezeptoren 1 und 2:

Beide Rezeptoren konnten wir als Protein auf der Zelloberfläche humaner CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mit indirekter Immunfluoreszenz nachweisen.

Es handelt sich hierbei um Rezeptoren für die Orexine (Hypocretine) A+B, die aus einem Vorläuferprotein, dem sogenannten Präproorexin, durch posttranslationale Prozessierung gebildet werden. Orexin-Rezeptoren gelten bis heute als praktisch ausschließlich im Nervensystem vorkommende Proteine und finden sich in besonders hoher Konzentration im lateralen Hypothalamus, dem „Hungerzentrum“, sowie im posterioren Hypothalamus, aber auch im Bulbus olfactorius, im zerebralen Kortex, im Thalamus und Hirnstamm. Extrazerebrale Lokalisationen sind z.B. endokrines Pankreas, Darm, Nebenniere, Hoden [143-145]. Orexine und ihre Rezeptoren besitzen eine bedeutende Rolle bei der Nahrungsregulation im Sinne einer Appetitsteigerung [146]. So erfährt Orexin A *Ouedraogo et al.* zufolge bei Nahrungskarenz eine Hochregulation im lateralen Hypothalamus, aber auch im Darm. Des Weiteren berichten die Forscher von einer glukoseabhängigen Freisetzung von Orexin A aus dem endokrinen Pankreas bei niedrigen Blut-Glukose-Spiegeln [144]. Neueste Arbeiten, wie die von *Karteris et al.*, beschäftigten sich mit der nahrungsabhängigen Expression von Orexin-Rezeptoren im Hypothalamus und der Nebenniere und konnten im Tierversuch zeigen, dass es bei Nahrungsdeprivation, neben einem Anstieg von Präproorexin auf mRNA-Ebene, ebenfalls zu einer Hochregulation der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 im Hypothalamus sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene kommt. Dagegen stellten die Forscher in der Nebenniere eine signifikant herabgesetzte Rezeptordichte fest [147]. Weitere Erkenntnisse der letzten Jahre zeigten außerdem, dass Orexine auch eine blutdruckregulierende Funktion besitzen und den

Schlaf-Wach-Rhythmus, sowie Gefäßtonus und kardiovaskuläre Funktionen beeinflussen, indem sie stimulierend auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse einwirken und insbesondere die Plasmaspiegel von Noradrenalin signifikant anheben [148-150]. Darüber hinaus spielen Orexine und ihre Rezeptoren eine Rolle in der Pathogenese der Narkolepsie, wie zahlreiche neuere Arbeiten zeigen konnten. Eine fehlerhafte Neurotransmission scheint dieser autosomal-dominant vererblichen Krankheit ursächlich zugrunde zu liegen, wahrscheinlich auf dem Boden einer genetischen Mutation von Orexin-Rezeptoren [151-153].

Unser Nachweis von Orexin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von humanen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen deutet auf einen möglichen direkten Einfluss von Orexinen auf die Regulation der Hämatopoese hin. Weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass nach Inkubation von CD34+ Zellen mit den Liganden der Orexin-Rezeptoren, nämlich Orexin A und B, eine signifikante Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentrationen zu erzielen war. Diese Beobachtung unterstützt neuere Studien, die zeigen konnten, dass Orexin-Rezeptoren im Nervensystem ebenfalls Signale über inhibitorische G-Proteine vermitteln [154].

Weitere G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren:

Die Rezeptoren, auf die im Folgenden eingegangen wird, stellen weitere Beispiele G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren dar, deren Expression in CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wir auf mRNA-Ebene mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie nachweisen konnten.

Prostaglandin E4-Rezeptor:

Santangelo et al. zeigten 2000 in einem „Verbrennungs-Sepsis-Modell“, dass Prostaglandin E2 als natürlicher Ligand des Prostaglandin E4-Rezeptors in der Lage ist, die Monozytopoese von Mäusen zu stimulieren und gleichzeitig die Granulopoese zu inhibieren [155]. *Shimozato et al.*

gelang außerdem der Nachweis eines B-Lymphopoese-supprimierenden Effekts des Prostaglandin E2 [156].

Unsere Ergebnisse legen in diesem Zusammenhang die Vermutung nahe, dass die unterschiedlich beobachteten Effekte des Prostaglandins E2 auf Granulo- und Lymphopoese über den Prostaglandin E4-Rezeptor bereits auf einer sehr frühen Stufe der Blutzellendifferenzierung vermittelt werden könnten.

Somatostatin-Rezeptor 4:

Das Somatostatin, der natürliche Ligand dieses Rezeptorsubtyps, wird vorwiegend im Hypothalamus und den D-Zellen des Pankreas, aber auch in verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltrakts gebildet [157]. Sein physiologisches Wirkungsprofil ist vielfältiger Natur. So hemmt Somatostatin nicht nur Insulin- und Glukagonsekretion des Pankreas, sowie Histamin- und Säuresekretion des Magenfundus, wie die Arbeit von *Hirsch et al.* hat zeigen können, sondern auch die systemische Produktion von Somatotropem Hormon (STH) und Insulin-Like-Growth-Factor 1 (IGF-1) [157,158]. STH und IGF-1 werden außerdem mit Angiogenese und Endothelzellproliferation in Zusammenhang gebracht, so dass Somatostatin-Analoga, wie „Octreotid“, zunehmend in der Behandlung von schweren proliferativen Retinopathien eingesetzt werden. In diesem Bereich stellt der Einsatz von Somatostatinanaloga für den Patienten eine nebenwirkungsärmere Therapiealternative zu den gegenwärtig wissenschaftlich anerkannten Therapieverfahren wie der „Panretinalen Laserkoagulation“ oder „Kryotherapie“ dar. Wichtigste mögliche Nebenwirkungen dieser Verfahren sind reduziertes Sehvermögen bei Tag und Nacht und verringertes Sehvermögen im peripheren Gesichtsfeld [159]. Darüber hinaus werden Somatostatinanaloga im Bereich der Gastroenterologie zur medikamentösen Blutstillung von Ösophagusvarizen und im Bereich der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde als konservative Behandlungsalternative zur Radiotherapie von Somatostatin-Rezeptor-positiven Glomustumoren eingesetzt [160,161]. Die Therapie

von Somatostatin-Rezeptor-positiven neuroendokrinen Tumoren stellt ein weiteres Einsatzgebiet von Somatostatinanaloga dar [162,163].

Über die funktionelle Bedeutung des Somatostatin-Rezeptors 4 auf humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen lässt sich im Augenblick nur spekulieren. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu untersuchen, ob über diesen Rezeptortyp eine Hämatopoeseregulation erfolgt. Sollte dies der Fall sein, dann könnte die Existenz dieses Rezeptors auf humanen CD34+ Stammzellen einen interessanten Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie hämatologischer Neoplasien bieten.

4.1.4 Differenzierungsabhängige Proteinexpression von neurobiologischen Rezeptoren auf CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Mit Hilfe der Zweifarbenimmunfluoreszenz haben wir untersucht, ob es in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium hämatopoetischer CD34+ Stamm- und Progenitorzellen einen Unterschied in der Expressionsstärke des CRH-Rezeptors 1, des Adenosin A₂B-Rezeptors, der Opioid-Rezeptoren μ 1 und κ 1, des GABA_B-Rezeptors 1, des Serotonin (HT) 1F-Rezeptors, sowie der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 gibt. Wir haben festgestellt, dass die Expression aller untersuchter Oberflächenrezeptoren auf unreifen CD38-schwachpositiven Stammzellen deutlich stärker war, als auf liniendeterminierten reiferen CD38-hochpositiven Stammzellen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die genannten Rezeptoren insbesondere bei frühen, unreifen CD34+ Zellen eine funktionelle Rolle spielen. Die funktionelle Bedeutung der einzelnen Rezeptoren für die Hämatopoese ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch weitgehend unklar und bedarf weiterführender Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf die Frage nach einer etwaigen Regulation der Hämatopoese über diese Rezeptoren, bzw. die Beeinflussung derselben über externe Gabe von Rezeptoragonisten oder -antagonisten.

Einige weiterführende Untersuchungen konnten bereits belegen, dass enddifferenzierte Blutzellen, wie Monozyten oder Granulozyten, überhaupt keine Expression der beschriebenen Rezeptoren aufwiesen [4]. Dieses Erkenntnis legt den Verdacht nahe, dass die auf CD34+ Zellen nachgewiesenen neurobiologischen Oberflächenrezeptoren insbesondere bei unreifen CD38-schwachpositiven hämatopoetischen Stammzellen eine bisher unbekannte physiologische Rolle spielen und dass zwischen frühen hämatopoetischen und neuronalen Stammzellen eine entwicklungsgeschichtliche Beziehung bestehen könnte. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die genauen Signalwege dieser und der anderen neu beschriebenen Rezeptoren von Neuromediatoren aufzuklären.

4.2 Tyrosinkinase-Rezeptoren

Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören zur Gruppe der nicht-G-Proteingekoppelten-Rezeptoren. Der wahrscheinlich bekannteste Vertreter dieser Gruppe von Rezeptoren ist der „Insulinrezeptor“. Beim Insulinrezeptor handelt es sich um ein tetrameres Transmembranprotein mit zwei extrazellulären α -Untereinheiten mit Bindungsstellen für Insulin und zwei β -Untereinheiten mit einem transmembranalen und einem intrazellulären zytosolischen Anteil. Die β -Untereinheiten besitzen eine Tyrosinkinaseaktivität in ihrem zytosolischen Anteil, die durch Ligandenbindung aktiviert wird und zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Proteine mit SH₂-Domänen sind in der Lage, an die Phosphotyrosinreste des Rezeptors zu binden und werden auf diese Weise aktiviert (Abb.23). Es folgt eine mehr oder weniger lange Phosphorylierungskaskade, die in einer Änderung der Genexpression mündet [98,157].

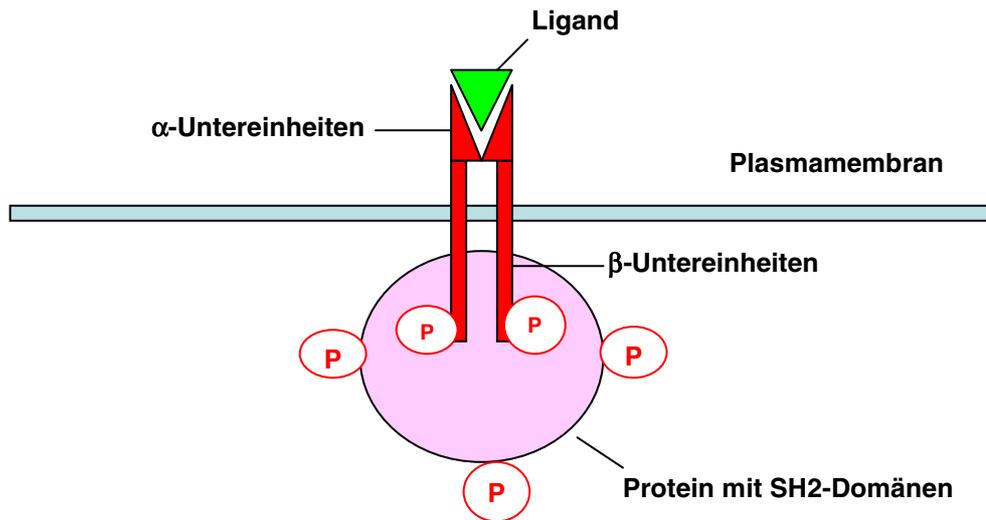


Abb.23: Aufbau eines Tyrosinkinase-Rezeptors

Die Bindung des Liganden durch die α -Untereinheiten führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors im Bereich der β -Untereinheiten, welche ihrerseits in der Lage sind, Proteine mit SH₂-Domänen zu binden. Dies führt zur Aktivierung einer Phosphorylierungskaskade, die u.a. modulierend auf die Genexpression einwirkt.

Zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren, deren Nachweis uns in hämatopoetischen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen auf mRNA-Ebene mit cDNA-Array-Technologie gelang, gehört der Ephrin-A1-Rezeptor (Eph A1), wie auch seine membrangebundenen Liganden Ephrin-A3 und Ephrin-A4. Ephrin-Rezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, sind Schlüsselsubstanzen für die Sicherstellung neuronaler Gewebsorganisation [164]. Die Gewebsorganisation wird über Signalkaskaden zur Kontrolle von axonaler Aussprossung, Zellmigration und Aufrechterhaltung von Zellgrenzen erreicht. Darüber hinaus regulieren Eph- Rezeptoren und -Proteine auch Zellform und Zellmotilität und sind bei Gewebsverletzungen und Tumormetastasierung involviert [165]. Die Arbeiten von *Gale et al. 2001* und *Ogawa et al. 2000* zeigten weiterhin eine tragende Rolle von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Proteinen bei Angiogenese und Tumorneovaskularisationen [166,167]. Eine zusätzliche besondere Eigenschaft des Ephrin-Rezeptor- / Liganden- Systems ist die Wahrnehmung bidirektionaler Signalwege. Das bedeutet, dass die membrangebundenen Ephrin-Proteine nicht nur als Liganden für Eph-Rezeptoren fungieren, sondern selbst Rezeptoreigenschaften wahrnehmen, indem sie zur Signaltransduktion in der Lage sind [168].

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch humane CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen Ephrin-Rezeptoren und Ephrine zur Signaltransduktion und Adhäsion nutzen (Abb.24).

4.3 Rezeptorformierungs- und Mediatorproteine

Neben der Expression von Oberflächenrezeptoren auf CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, konnten wir ebenso die Expression von Genen beobachten, die beim „Receptor-Assembly“, also der Formierung des Rezeptors aus einzelnen Untereinheiten, und der Signalintegration eine wichtige Rolle spielen (Abb.24). In diesem Zusammenhang ist das Postsynaptic Density Protein-95 (PSD-95) zu erwähnen, dessen Expression wir in hämatopoetischen Stammzellen auf mRNA-Ebene mit cDNA-Array Technologie nachweisen konnten. Es ist bekannt, dass PSD-95 mit Rezeptoren assoziiert ist, die in der postsynaptischen Membran von Nervenzellen zu finden sind. Zusammen mit anderen PSD-Proteinen bildet das PSD-95 einen Proteinkomplex in der postsynaptischen Membran von Neuronen, die sogenannte „postsynaptische Dichte“, deren Aufgaben die Signaltransduktion, die zytoskelettale Verankerung, sowie „Receptor-Trafficking“ und Rezeptorformierung umfassen [169,170].

Darüber hinaus gelang uns der Nachweis von Protein Kinase A Anchor Protein 75 (AKAP75) in CD34+ Zellen mittels cDNA-Array-Technologie. AKAP75 verankert die Proteinkinase A mit der postsynaptischen Dichte und erhöht auf diese Weise die am Zellkern eintreffenden cAMP-Signale [171]. Darüber hinaus spielt AKAP75 eine bedeutende Rolle bei der Integration von Signalen aus den verschiedensten Transduktionskaskaden neuronaler Zellen [172].

Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich humane CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen komplexer Signaltransduktionsmechanismen bedienen, die denen von Nervenzellen ähneln.

4.4 Ionenkanäle

Kürzlich wurde von *Rivera et al.* festgestellt, dass intrazelluläre Ionenkonzentrationen eine zentrale Rolle für die neuronale Signalgebung und Reifung spielen [173]. *Shirihai et al.* konnten des Weiteren zeigen, dass die Expression zweier einwärts gerichteter Kaliumkanäle eine notwendige Voraussetzung für die Zytokin-induzierte Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen darstellt [174,175]. Alles in allem verkörpern Ionenkanäle, ebenso wie Rezeptoren, wichtige Mediatoren intra- und extrazellulärer Signalvermittlung und sind außerdem durch neuromuskuläre Erregungsübertragung und elektromechanische Koppelung wesentlich an der Bewegungsentstehung im muskuloskelettalen System beteiligt [98]. Es gelang uns im Rahmen unserer Untersuchungen, einige Vertreter dieser Gruppe auf mRNA-Ebene humaner CD34+ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen durch quantitative „Real-Time“-RT-PCR und Agarosegelelektrophorese bzw. cDNA-Array-Technologie nachzuweisen.

Wir konnten zwei Klassen von Ionenkanälen nachweisen (Abb.24). Dabei handelt es sich einerseits um die Klasse der „spannungsabhängigen Ionenkanäle“. Dazu zählen die Kaliumkanäle PCN2/SRS4 und KCNA6/SRS6, sowie die Chloridkanäle 3,4 und 7. Es handelt sich dabei um Ionenkanäle, die in Abhängigkeit vom Membranpotential ihre Permeabilität für bestimmte Ionen verändern. So führt beispielsweise eine Depolarisation der Zellmembran zur Öffnung von Kaliumkanälen, eine Repolarisation schließt die Kanäle wieder [98]. Daneben gelang uns der Nachweis von Vertretern der „ligandenabhängigen Ionenkanäle“. Zu dieser Klasse von Ionenkanälen zählen die purinergen Rezeptoren P2X₄ und P2X₇. Diese Rezeptoren werden durch Bindung von ATP aktiviert, wodurch es zur nicht-selektiven Öffnung von Kationenkanälen kommt. Es resultiert eine Leitfähigkeitszunahme für Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Ionen [176]. *Surprenant et al.* und *Nijweide et al.* konnten zeigen, dass über den purinergen Rezeptor P2X₇ zytotoxische Effekte vermittelt werden können, die zur Zerstörung von hämatopoetischen Stammzellen führen. So bewirkt

die Bindung von ATP die Formierung einer Membranpore, die die Zellmembran hämatopoetischer Stammzellen für zuvor nicht-permeable toxische Reagenzien durchlässig macht [177,178]. Die kürzlich von *Cabrini et al.* veröffentlichte Arbeit berichtet vom Nachweis eines funktionsfähigen humanen P2X₇-Rezeptors auf humanen leukämischen Lymphozyten. Da der P2X₇-Rezeptor häufig mit klonalen hämatologischen Erkrankungen, wie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) assoziiert ist, wo er Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose nimmt, könnte der Effekt extrazellulären ATPs auf den P2X₇-Rezeptor einen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung hämatologischer Neoplasien bieten [179].

Unsere Ergebnisse, und zwar insbesondere die Entdeckung spannungsgesteuerter Ionenkanäle auf humanen hämatopoetischen Stammzellen, legen nahe, dass CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen des Menschen möglicherweise umfassendere elektrophysiologische Eigenschaften besitzen. Unsere Arbeit bietet die molekulare Grundlage für die funktionelle Untersuchung dieser Eigenschaften, z.B. mit der „patch-clamp“-Technik.

4.5 Proteine des Zytoskeletts, des Vesikelapparates und Adhäsionsmoleküle

Die Aufnahme und Weiterleitung von Rezeptor-vermittelten Signalen, z.B. in Form von Botenstoffen, wie Neurotransmittern und Hormonen, ist im Nervensystem eng an ein für diese Aufgaben spezialisiertes Zytoskelett gebunden. Nur auf der Grundlage dieses spezialisierten Grundgerüsts der Zelle, sind Vorgänge wie Endo- und Exozytose und gerichteter intrazellulärer Vesikel- und Molekültransport überhaupt möglich. Das Zytoskelett bildet folglich die Voraussetzung für die interzelluläre Kommunikation. Während die molekularen Bausteine hierfür in Zelltypen wie Nervenzellen und Epithelzellen bereits eingehend untersucht wurden,

ist darüber bei humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen kaum etwas bekannt.

Wir konnten mittels cDNA-Array Technologie und quantitativer RT-PCR die Expression einer Vielzahl von Genen, die am Molekültransport teilnehmen, nachweisen (Abb.24). Eines dieser Gene, dessen Expression wir mit quantitativer RT-PCR bestätigen konnten, ist das Synaptobrevin 1 (Syn.: Vesicle Associated Membrane Protein 1). Es handelt sich hierbei um ein Protein des Vesikelapparates, dessen bekannte Lokalisation die motorische Endplatte darstellt. Dort kommt es durch Aktionspotential-induzierte Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle zu einer Abdissoziation des VAMP1 von den synaptischen Vesikeln. Auf diese Weise wird den transmitterhaltigen Vesikeln die Fusion mit der präsynaptischen Membran ermöglicht und der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt entleert [98]. Weitere essentielle Bestandteile des Vesikelfusionsapparates sind die Syntaxine 1A, 3A, 4A und 7, das Syntaxin Binding Protein 2, das Synaptosomal Associated Protein 23 (SNAP23), der N-ethylmaleinimide-Sensitive Factor (NSF) und α -SNAP (NSF- Attachment Protein). In diese Kategorie gehört auch das Membrane Protein of Synaptic Vesicles (VAT1), sowie Clathrin, Clathrin-associated Proteins und Clathrin Coat Assembly Proteins, die allesamt Bestandteile von Vesikelmembranen darstellen und deren Expression in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von uns erstmalig nachgewiesen wurde. Darüber hinaus fanden wir die Expression einer Vielzahl an RAB-Genen (RAB1, 11A, 11B, 27A, 27B, 32, 35, GDP Dissociation Inhibitor 1 und 2). Die RAB-Proteine ermöglichen der Zelle einen gerichteten Vesikeltransport entlang zytoskelettaler Strukturen und vermitteln die Vesikelbindung an die Zielmembran als ersten Schritt der Vesikelfusion [180]. Des Weiteren konnten wir die Expression von Genen in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zeigen, die Bestandteile des zytoskelettalen Bewegungsapparates sind, wie Dynein, Dynamin 2, Dynactin 1, α -Actinin und Drebrin 1.

Eine weitere interessante Entdeckung stellt die Expression des Adhäsionsmoleküls Dystroglycan in CD34+ hämatopoetischen

Stammzellen dar. Es handelt sich hierbei um ein heterodimeres Transmembranprotein, welches aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Die α -Untereinheit stellt die extrazelluläre Domäne des Dystroglycans dar, welche als Rezeptor für Bestandteile der extrazellulären Matrix fungiert. Die β -Untereinheit liefert die Transmembrandomäne, die Verbindung zum Zytoskelett der Zelle. Laminin-1 und -2, sowie Perlecan und Agrin sind Beispiele für extrazelluläre Matrixkomponenten, die an die α -Untereinheit des Dystroglycan binden. Dystroglycan spielt insbesondere eine Rolle bei der „Verankerung“ von Muskelzellen in der extrazellulären Matrix über Dystrophin, einem Bestandteil des Zytoskeletts der Muskelzelle [181-183]. Wir stellten mit Hilfe quantitativer Real-Time-RT-PCR eine starke Expression der α -Untereinheit des Dystroglycans (Dystroglycan 1) in humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen fest. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Dystroglycan 1 eine Rolle bei der Adhäsion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen spielen könnte. Daher untersuchten wir die differenzielle Expression des Dystroglycan 1 in zirkulierenden CD34+ Zellen des peripheren Blutes und CD34+ Zellen des Knochenmarkes. Wir stellten eine 3,7-fach höhere Dystroglycanexpression bei den zirkulierenden Stammzellen des peripheren Blutes fest (Abb.10/11). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass Dystroglycan 1 möglicherweise als eine Art „molekularer Anker“ eine Rolle für die Mobilität CD34+ Zellen spielt. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass Dystroglycan einen Rezeptor für Arenaviren darstellt. Zu dieser Gruppe gehören Viren, wie z.B. das Lympozytische Choriomeningitis-Virus (LCM), das Lassa-Fieber-Virus, sowie das New World Clade C -Virus [184,185]. Es ist seit langer Zeit bekannt, dass das hämatopoetische Stammzellkompartiment unter systemischer LCM-Virusinfektion einer generalisierten Suppression unterliegt, ohne dass die molekularen Hintergründe dieser Entdeckung bekannt sind [186,187]. Unsere Ergebnisse weisen auf die Möglichkeit einer direkten Dystroglycan-vermittelten Arenavirusinfektion CD34+ hämatopoetischer Stammzellen hin, die ein Hämatopoeseversagen nach sich ziehen kann.

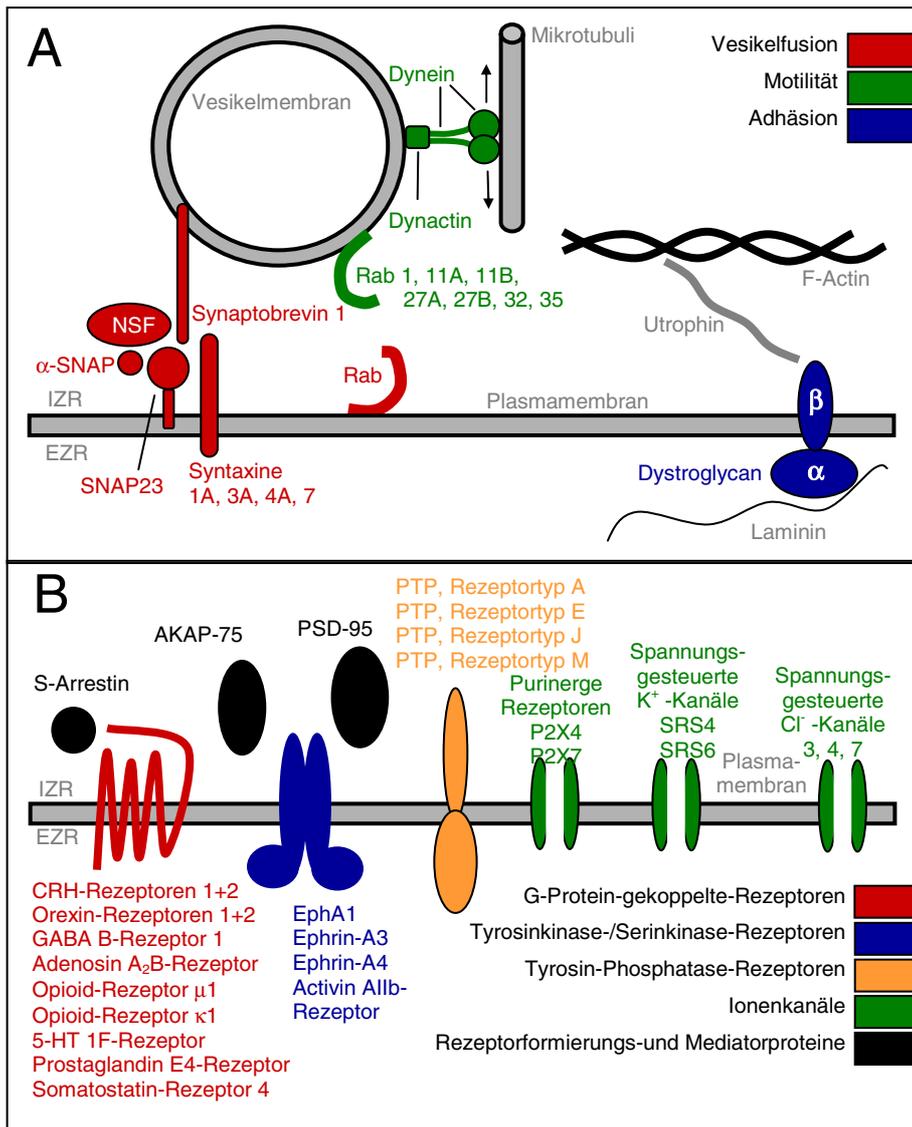


Abb.24: Schematischer Überblick über verschiedene in primären humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimierte neurobiologische Gene.

Alle von uns erstmalig in humanen CD34+ Zellen nachgewiesenen Gene sind farbig markiert. Intrazellularraum und Extrazellularraum sind gekennzeichnet.

(A) Motilitäts- und zytoskelettale Gene.

(B) Rezeptoren und Ionenkanäle.

4.6 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, adulte CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen des Menschen bezüglich der Expression von neurobiologischen Genen molekular zu charakterisieren. Wir entdeckten die Expression von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, Tyrosinkinase-Rezeptoren, Rezeptorformierungs- und Mediatorproteinen, spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanälen, Proteinen des Zytoskeletts, des Vesikelapparates, Adhäsionsmoleküle und Nervenwachstumsfaktoren.

Der nächste Schritt besteht darin, die funktionelle Bedeutung dieser Gene für die CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle zu untersuchen. In weiterführenden funktionellen Experimenten soll der Einfluss von Rezeptoragonisten und -antagonisten auf Zellproliferation, Apoptose, klonogenes Wachstum, cAMP-Konzentration und intrazelluläre Calciumkonzentration in CD34+ Zellen untersucht werden. Neurophysiologische Experimente mit der „patch-clamp“-Technik können der Bestimmung elektrophysiologischer Aktivität einzelner Ionenkanäle dienen. Erste weiterführende Experimente zeigten unter Stimulation mit CRH und Orexin A oder Orexin B einen signifikanten cAMP-Konzentrationsabfall in CD34+ Zellen, der beweist, dass die auf humanen CD34+ Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesenen an inhibitorische G-Proteine gekoppelten CRH- und Orexin-Rezeptoren funktionell aktiv sind [4].

Ein weiterer zukünftiger Forschungsschritt könnte darin bestehen, zu untersuchen, ob diese in CD34+ Zellen vorkommenden funktionell aktiven neurobiologischen Rezeptoren in der Pathogenese von klonalen Knochenmarkserkrankungen, wie der chronischen myeloischen Leukämie (CML), der Polycythämia vera (PV), oder der essentiellen Thrombocythämie (ET) eine Rolle spielen. Zweifelsohne sind darüber hinaus zahlreiche weitere Untersuchungen der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle des Menschen bezüglich Differenzierungsfähigkeit, Koloniebildungsfähigkeit, Proliferationsaktivität

und Apoptosefähigkeit vonnöten, möchte man ein umfassenderes Verständnis von der biologischen Leistungsfähigkeit dieses Zelltyps entwickeln.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit soll dazu beitragen, ein umfassenderes Verständnis für die gegenwärtig in ihrem Ausmaß noch ungeklärte biologische Leistungsfähigkeit der humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle zu entwickeln. Nachdem kürzlich überlappende genetische Programme von hämatopoetischen und neuropoetischen Zellen bei Mäusen beschrieben wurden [90], sahen wir uns veranlasst, diese Entdeckung auch für humane CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zu überprüfen. Wir untersuchten somit primäre humane hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen mit Hilfe von spezialisierten cDNA-Arrays, „Real-Time“-Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Durchflusszytometrie. Dabei konzentrierten wir uns vor allem auf die Expression von Genen, die bislang vorwiegend aus der Neurobiologie bekannt waren. Auf diese Weise gelang uns der spezifische Nachweis von mRNA-Sequenzen von Vesikelfusions- und Motilitätsgenen, liganden- und spannungsabhängigen Ionenkanälen und Rezeptorkinasen und -phosphatasen in CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen des Menschen. Darüber hinaus fanden wir sowohl mRNA- als auch Proteinexpression einer Reihe von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, wie dem GABA_B-Rezeptor 1, dem Adenosin A_{2B}-Rezeptor, dem Serotonin (5-HT) 1F-Rezeptor, den Opioid-Rezeptoren μ 1 und κ 1, dem CRH-Rezeptor 1, sowie den Orexin (Hypocretin)-Rezeptoren 1 und 2. Mit Hilfe der Zweifarbenimmunfluoreszenz gelang uns die Bestimmung der differenzierungsabhängigen Expressionsstärke der G-Protein-gekoppelten-Oberflächenrezeptoren. Dabei stellten wir fest, dass die Rezeptorexpression in unreiferen CD38_{low} hämatopoetischen Stammzellen höher ist, als in reiferen CD38_{high} Stammzellen. Diese Beobachtung brachte uns zu dem Schluss, dass diese Rezeptoren offensichtlich eine besondere Rolle in der Ontogenese von frühen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu spielen scheinen. Weiterführende Untersuchungen konnten die funktionelle Aktivität einiger der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Rezeptoren bereits

belegen. Unser Nachweis einer Expression von mehreren funktionell aktiven neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auf CD34+ Zellen deutet auf eine potenzielle molekulare Wechselbeziehung zwischen hämatopoetischen und neuronalen Signalmechanismen hin und unterstützt auf molekularer Ebene das Modell einer möglichen neuronalen Regulation von unreifen frühen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bildeten die Grundlage für eine Publikation in der internationalen Fachzeitschrift „BLOOD“ [4].

6. Literaturverzeichnis:

1. Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R. "Molecular Biology of Hematopoietic Stem Cells" *Vitam Horm.* 2003;66:1-28.
2. Pan G J, Chang Z Y, Schöler H R. "Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4" *Review Cell Research.* 2002;12(5-6):321-91.
3. Pesce M, Anastassiadis K, Schöler H R. "Oct-4: Lessons of Totipotency from Embryonic Stem Cells" *Cells Tissues Organs* 1999;165:144-52.
4. Steidl U, Bork S, Schaub S, et al. "Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators" *Blood.* 2004; 104(1): 81-8.
5. Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP, et al. "Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells" *Blood.* 2002;99:2037-44.
6. Kronenwett R, Martin S, Haas R. "The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells" *Stem Cells.* 2000;18(5):320-30.
7. Nakauchi H. "Isolation and clonal characterization of hematopoietic and liver stem cells" *Cornea.*2004;23(8):S2-7.
8. Song S, Witek RP, Lu Y, et al. "Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy" *Hepatology.* 2004;40(4):918-24.
9. Neuringer I P, Randell S H. "Stem cells and repair of lung injuries" *Respir Res.* 2004;5(1):6.
10. Otto WR. "Lung epithelial stem cells" *J Pathol.* 2002;197(4):527-35.
11. Marshman E, Booth C, Potten CS. "The intestinal epithelial stem cell" *Bioessays.* 2002;24(1):91-8.
12. Brittan M, Wright NA. "Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development" *Gut.* 2004;53(6):899-910.
13. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, et al. "Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche" *Cell.* 2004;118(5):635-48.
14. Christiano AM. "Epithelial stem cells:stepping out of their niche" *Cell.* 2004;118(5):530-2.
15. Alonso L, Fuchs E. "Stem cells of the skin epithelium" *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 Suppl 1:11830-5.
16. Mendias CL, Tatsumi R, Allen RE. "Role of cyclooxygenase-1 and -2 in satellite cell proliferation, and fusion" *Muscle Nerve.* 2004;30(4):497.
17. Lee HJ, Goring W, Ochs M, et al. "Sox15 is required for skeletal muscle regeneration" *Mol Cell Biol.* 2004;24(19):8428-36.
18. Oustanina S, Hause G, Braun T. "Pax 7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification" *EMBO J.* 2004;23(16):3430-9.

19. Machida S, Spangenburg EE, Booth FW. "Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages" *Cell Prolif.* 2004;37(4):267-77.
20. Cao B, Bruder J, Kovesdi I, Huard J. "Muscle stem cells can act as antigen-presenting cells: implication for gene therapy" *Gene Ther.* 2004;11(17):1321-30.
21. Penn MS, Zhang M, Deglurkar I, Topol EJ. "Role of stem cell homing in myocardial regeneration" *Int J Cardiol.* 2004;95 Suppl 1:S23-5.
22. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. "Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart " *Circ Res.* 2004 [Epub].
23. Oh H, Chi X, Bradfute SB, et al. "Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells" *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:182-9.
24. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood" *J Clin. Invest.* 2000;105(1):17-9.
25. Ashara T, Masuda H, Takahashi T, et al. "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization" *Circ Res.* 1999;85(3):221-8.
26. Wang L, Li L, Shojaei F, et al. "Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties" *Immunity.* 2004;21(1):31-41.
27. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. "CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the vasculature in non-small cell lung cancer" *J Clin Pathol.* 2004;57(9):965-9.
28. Ashara T, Kawamoto A. "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis" *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(3):C572-9.
29. Winkler J. "Adult neural stem cells: therapeutic potential in neurology" *Med Klin (Munich).* 2003;98 Suppl 2:27-31.
30. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo" *Science.* 1999;283(5401):471.
31. Mauter AE, Liu J, Brandewiede J, et al. "Regional energy metabolism following short-term neural stem cell transplantation into the injured spinal cord" *J Mol Neurosci.* 2004;24(2):227-36.
32. Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, et al. "Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor" *Brain Pathol.* 2004;14(3):237-48.
33. Bazan E, Alonso FJ, Redondo C, et al. "In vitro and in vivo characterization of neural stem cells" *Histol Histopathol.* 2004;19(4):1261-75.
34. Ader M, Schachner M, Bartsch U. "Integration and differentiation of neural stem cells after transplantation into dysmyelinated central nervous system of adult mice" *Eur J Neurosci.* 2004;20(5):1205-10.
35. Uchida K, Mukai M, Okado H, Kawase T. "Possible oncogenicity of subventricular

- zone neural stem cells: case report" *Neurosurgery*. 2004;55(4):977-87.
36. Boulton M, Albon J. "Stem cells in the eye" *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):643-57.
37. Chacko DM, Das AV, Zhao X, et al. "Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina" *Vision Res*. 2003;43(8):937-46.
38. Sun TT, Lavker RM. "Corneal epithelial stem cells: past, present and future" *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9(3):202-7.
39. Yao ZX, Qin ML, Liu JJ, et al. "In vitro cultivation of human fetal pancreatic ductal stem cells and their differentiation into insulin-producing cells" *World J Gastroenterol*. 2004;10(10):1452-6.
40. Chaudhari M, Cornelius JG, Schatz D, et al. "Pancreatic stem cells: a therapeutic agent that may offer the approach for curing type 1 diabetes" *Pediatr Diabetes*. 2001;2(4):195-202.
41. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, et al. "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells" *J Immunol*. 1984;133(1):157-65.
42. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. "Structural and functional features of the CD34 antigen: an update" *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001;15(1):1-13.
43. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells" *Blood*. 1990;75(12):2417-26.
44. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, et al. "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro" *Blood*. 1989;74(5):1563-70.
45. Terstappen LW, Huang S, Safford M, et al. "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells" *Blood*. 1991;77(6):1218-27.
46. Weilbaecher K, Weissman I, Blume K, Heimfeld S. "Culture of phenotypically defined hematopoietic stem cells and other progenitors at limiting dilution on Dexter monolayers" *Blood*. 1991;78(4):945-52.
47. Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, et al. "Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(4):1470-4.
48. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. "Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells" *J Exp med*. 1993;177(5):1331-42.
49. Civin CI, Gore SD. "Antigenic analysis of hematopoiesis: a review" *J Hematother*. 1993;2(2):137-44.
50. Haas R, Witt B, Mohle R, et al. "Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support" *Blood*. 1995;85:3754-61.
51. Haas R, Mohle R, Fruhauf S, et al. "Patient characteristics associated with

- successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma" *Blood*. 1994;83:3787-94.
52. Kobbe G, Germing U, Aivado M, et al. "Treatment of secondary myelodysplastic syndrome (MDS) after heart transplantation with chemotherapy and non-myeloablative stem cell transplantation" *Transplantation*. 2002;74:1198-200.
53. Kobbe G, Schneider P, Aivado M, et al. "Reliable engraftment, low toxicity, and durable remissions following allogeneic blood stem cell transplantation with minimal conditioning" *Exp.Hematol*. 2002;30:1346-53.
54. Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R. "Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF" *Exp Hematol*. 1993;21(4):508-14.
55. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow" *Nature*. 2002;418:41-49.
56. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo" *Nat Med*. 2000;6:1229-34.
57. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow" *Science*. 2000;290:1779-82.
58. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro" *Exp Neurol*. 2000;164(2):247-56.
59. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carrol J, Brailer J, Carothers J. "Blood into Brain after stroke" *Trends Mol Med*. 2002 ;8:452-3.
60. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. "Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke" *Stroke*. 2002;33(5):1362-8.
61. Goolsby J, Marty MC, Heletz D, et al. "Hematopoietic progenitors express neural genes" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):14926-31.
62. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al. "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into ischemic brain of rats" *Exp Neurol*. 2002;174:11-20.
63. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10344-49.
64. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. "Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium" *Pediatr Transplant*.2003;7 Suppl 3:86-8.
65. Orlic D "Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model" *Int J Hematol*. 2002;76 Suppl 1:144-5.
66. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium" *Nature*. 2001;410(6829):701-5.
67. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, et al. "Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction" *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126(34-35):931.

68. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. "Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors" *Science*. 1998;279(5356):1528-30.
69. Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, et al. "Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells" *Exp Cell Res*. 2004;295(1):66-78.
70. Doyonnas R, LaBarge M A, Sacco A, et al. "Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(37):13507-12.
71. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, et al. "Mac-1(low) early myeloid cells in the bone marrow-derived fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration" *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(4):1050-61.
72. Burt RK, Oyama Y, Traynor A, Kenyon NS. "Hematopoietic stem cell therapy for type 1 diabetes: induction of tolerance and islet cell neogenesis" *Autoimmun Rev*. 2002;1(3):133-8.
73. Street CN, Rajotte RV, Korbitt GS. "Stem cells: a promising source of pancreatic islets for transplantation in type 1 diabetes" *Curr Top Dev Biol*. 2003;58:111-36.
74. Bretzel RG, Eckhard M, Brendel MD. "Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus" *Panminerva Med*. 2004;46(1):25-42.
75. Steptoe RJ, Ritchie JM, Harrison LC. "Transfer of hematopoietic stem cells encoding autoantigen prevents autoimmune diabetes" *J Clin Invest*. 2003;111(9):1357-63.
76. Hess D, Li L, Martin M, et al. "Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration" *Nat Biotechnol*. 2003;21(7):763-70.
77. Ronnstrand L. "Signal transduction via the stem cell factor receptor / c-Kit" *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(19-20):2535-48.
78. Cui HF, Bai ZL. "Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis" *World J Gastroenterol*. 2003;9(10):2274-7.
79. Kim D, Gu Y, Ishii M, et al. "In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell" *Pancreas*. 2003;27(2):e34-41.
80. Kögler G, Sensken S, Airey J A, Trapp T, et al. "A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential" *J Exp Med*. 2004;200(2):123-135.
81. Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion" *Nature*. 2002;416(6880):485-7.
82. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. "Changing potency by spontaneous fusion" *Nature*. 2002;416(6880):545-8.
83. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells" *Science*. 2002;297(5590):2256-9.
84. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. "Haematopoietic stem cells adopt

- mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium" *Nature*. 2004;428(6983):668-73.
85. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. "Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes in myocardial infarcts" *Nature*. 2004;428(6983):664-8.
86. Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, et al. "Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles" *Stem Cells*. 2003;21(3):363-71.
87. Pituch-Noworolska A, Majka M, Janowska-Wieczorek A, et al. "Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity" *Folia Histochem Cytobiol*. 2003;41(1):13-21.
88. Choi JB, Uchino H, Azuma K, et al. "Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells" *Diabetologia*. 2003;46(10):1366-74.
89. Mathews V, Hanson PT, Ford E, et al. "Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury" *Diabetes*. 2004;53(1):91-8.
90. Terskikh AV, Easterday MC, Li L, et al. "From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7934-39.
91. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, et al. "A stem cell molecular signature" *Science*. 2002;298:601-4.
92. Steidl U, Haas R, Kronenwett R. "Intercellular adhesion molecular 1 on monocytes mediates adhesion as well as trans-endothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides" *Ann Hematol*. 2000;79(8):414-23.
93. Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M, et al. "Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset" *Blood*. 1998;91(3):852-62.
94. Beißbarth T, Fellenberg K, Brors B, et al. "Processing and quality control of DNA array hybridization data" *Bioinformatics*. 2000;16(11):1014-22.
95. Cross NC, Melo JV, Feng L, Goldman JM. "An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders" *Leukemia*. 1994;8(1):186-9.
96. Kronenwett R, Graf T, Nedbal W, et al. "Inhibition of angiogenesis in vitro by alphav integrin-directed antisense oligonucleotides" *Cancer Gene Ther*. 2002;9(7):587-96.
97. Rohr U, Wulf M, Stahn S, Steidl U, et al. "Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR" *J Virol Methods*. 2002;106(1):81-8.
98. Klinke R, Silbernagl S "Lehrbuch der Physiologie, 2.Auflage" 1996;31-4;47-58;59-78;80-96;460- 69;477-81.
99. Zilles K, Rehkämper G "Funktionelle Neuroanatomie, 3.Auflage" 1998;341-71.

100. Binet V, Goudet C, Brajon C, et al. "Molecular mechanisms of GABA_B receptor activation: new insights from the mechanism of action of CGP7930, a positive allosteric modulator" *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt5):871-2.
101. Pin JP, Kniazeff J, Binet V, et al. "Activation mechanism of the heterodimeric GABA_B receptor" *Biochem Pharmacol.* 2004;68(8):1565-72.
102. Colombo G, Addolorato G, Agabio R, et al. "Role of GABA(B) receptor in alcohol dependence: reducing of baclofen on alcohol intake and alcohol motivational properties in rats and amelioration of alcohol withdrawal syndrome and alcohol craving in human alcoholics" *Neurotox Res.* 2004;6(5):403-14.
103. Abbruzzese G. "The medical management of spasticity" *Eur J Neurol.* 2002;9 Suppl 1:30-4; discussion 53-61.
104. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, et al. "Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1))" *Neuron.* 2001;31(1):47-58.
105. Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, et al. "Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice" *Mol Cell Neurosci.* 2001;17(6):1059-70.
106. Mizukami K, Ishikawa M, Hidaka S, et al. "Immunohistochemical localization of GABA B receptor in the entorhinal cortex and inferior temporal cortex of schizophrenic brain" *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002;26(2):393-6.
107. Mizukami K, Sasaki M, Ishikawa M, et al. "Immunohistochemical localization of gamma-aminobutyric acid(B) receptor in the hippocampus of subjects with schizophrenia" *Neurosci Lett.* 2000;283(2):101-4.
108. Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, et al. "Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behaviour" *Neuropsychopharmacology.* 2004;29(6):1050-62.
109. Sands SA, Reisman SA, Enna SJ. "Effects of antidepressants on GABA(B) receptor function and subunit expression in rat hippocampus" *Biochem Pharmacol.* 2004;68(8):1489-95.
110. Balerio GN, Rubio MC. "Baclofen analgesia: involvement of the GABAergic system" *Pharmacol Res.* 2002;46(3):281-6.
111. Tao R, Auerbach SB. "GABAergic and glutamatergic afferents in the dorsal raphe nucleus mediate morphine-induced increases in serotonin efflux in the rat central nervous system" *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(2):704-10.
112. Gerhardt CC, van Heerikhuizen H. "Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors" *Eur J Pharmacol.* 1997;334(1):1-23.
113. Zangen A, Nakash R, Overstreet DH, Yadid G. "Association between depressive behaviour and absence of serotonin-dopamine interaction in the nucleus accumbens" *Psychopharmacology (Berl.).* 2001;155(4):434-9.
114. Shephard S, Edvinsson L, Cumberbatch M, et al. "Possible antimigraine mechanisms of action of the 5HT_{1F} receptor agonist LY334370" *Cephalalgia* 1999;19(10):851-8.

115. Xu YC, Johnson KW, Phebus LA, et al. "N-[3-(2-Dimethylaminoethyl)-2-methyl-1H-indol-5-yl]-4-fluorobenzamide: a potent, selective, and orally active 5-HT(1F) receptor agonist potentially useful for migraine therapy" *J Med Chem* 2001; 44(24):4031-4.
116. Pukhal'skaia Ech, Golubkova SN. "Proliferative reaction of rat bone marrow to serotonin administration" *Med Radiol (Mosk)*. 1967;12(2):47-54.
117. Lowy PH, Keighley G, Cohen NS. "Stimulation by serotonin of erythropoietin-dependent erythropoiesis in mice" *Br J Haematol*. 1970;19(6):711-8.
118. Yang M, Srikiatkachorn A, Anthony M, Chong BH. "Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT2 receptor" *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7(2):127-33.
119. Skurikhin EG, Dygai AM, Suslov NI, et al. "Role of the central nervous system in hemopoiesis regulation during experimental neuroses" *Bull Exp Biol Med* 2001;131(1):33-7.
120. Serafeim A, Grafton G, Chamba A, et al. "5-Hydroxytryptamine drives apoptosis in biopsylake Burkitt lymphoma cells: reversal by selective serotonin reuptake inhibitors" *Blood*. 2002;99(7):2545-53.
121. Serafeim A, Holder MJ, Grafton G, et al. "Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells" *Blood*. 2003;101(8):3212-9.
122. Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA, Shine J. "Molecular cloning of an adenosine A2b receptor from human brain" *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187(1):86-93.
123. Hawaleshka A, Jacobsohn E. "Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications" *Can J Anaesth* 1998;45(7):670-82.
124. Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, et al. "Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor" *Nature* 2000;407(6805):747-50.
125. Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M. "Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation" *Science* 2001;291(5510):1976-82
126. Irnich E, Tracey DJ, Poten J, et al. "ATP stimulates peripheral axons in human, rat and mouse-differential involvement of A(2B) adenosine and P2X purinergic receptors" *Neuroscience* 2002;110(1):123-9.
127. Haas HL, Selbach O. "Functions of neuronal adenosine receptors" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362(4-5):375-81.
128. Pospisil M, Hofer M, Vacek A, et al. "Drugs elevating extracellular adenosine enhance cell cycling of hematopoietic progenitor cells as inferred from the cytotoxic effects of 5-fluorouracil" *Exp Hematol*. 2001;29(5):557-62.
129. Hofer M, Pospisil M, Weiterova L, et al. "Combination of drugs elevating extracellular adenosine with granulocyte colony-stimulating factor promotes granulopoietic recovery in the murine bone marrow after 5-fluorouracil treatment" *Physiol Res*

- 2001;50(5):521-4.
130. Hofer M, Pospisil M, Znojil V, et al. "Drugs elevating extracellular adenosine promote regeneration of haematopoietic progenitor cells in severely myelosuppressed mice: their comparison and joint effects with the granulocyte colony-stimulating factor" *Eur J Haematol* 2002;68(1):4-11.
131. Karow T, Lang R. "Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9.Auflage" 2001;276-85;313-14;445-49.
132. Tian M, Broxmeyer HE, Fan Y, et al. "Altered hematopoiesis, behaviour, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice" *J Exp Med* 1997;185(8):1517-22.
133. Cadet P, Mantione K, Bilfinger TV, Stefano GB. "Real-time RT-PCR measurement of the modulation of Mu opiate receptor expression by nitric oxide in human mononuclear cells" *Med Sci Monit.* 2001;7(6):1123-8.
134. Mousa SA. "Morphological correlates of immune-mediated peripheral opioid analgesia" *Adv Exp Med Biol.* 2003;521:77-87.
135. Brack A, Rittner HL, Machelska H, et al. "Endogenous peripheral antinociception in early inflammation not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression" *Pain.* 2004;108(1-2):67-75.
136. Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N, et al. "MAP kinase activation by mu opioid receptor in cord blood CD34(+)/CD38(-) cells" *Exp Hematol.* 2002; 30(5):473-80.
137. Maestroni GJ, Zammaretti F, Pedrinis E. "Hematopoietic effect of melatonin involvement of type I kappa-opioid receptor on bone marrow macrophages and interleukin-1" *J Pineal Res* 1999;27(3):145-53.
138. Tantisira KG, Lake S, Silverman ES, et al. "Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids" *Hum Mol Genet.* 2004;13(13): 1353-9.
139. D'Hains G, Hiavaty T. "Advances in medical therapy for Crohn's disease" *Curr Gastroenterol Rep.* 2004;6(6):496-505.
140. Hiroi N, Wong ML, Licinio J, et al. "Expression of corticotropin releasing hormone receptors type I and type II mRNA in suicide victims and controls" *Mol Psychiatry.* 2001;6:540-546.
141. Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N, et al. "Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7148-7153.
142. Blank T, Nijholt I, Grammatopoulos DK, et al. "Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signalling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning" *J Neurosci.* 2003;23:700-07.
143. Smart D, Jerman J. "The physiology and pharmacology of the orexins" *Pharmacol Ther.* 2002;94(1-2):51-61.

144. Ouedraogo R, Naslund E, Kirchgessner AL. "Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas" *Diabetes* 2003;52(1):111-7.
145. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. "Functions of the orexinergic/hypocretinergic system" *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283(6): C1567-91.
146. Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, Blundell JE. "Orexins and appetite regulation" *Neuropeptides.* 2002;36(5):303-25.
147. Karteris E, Machado RJ, Chen J, et al. "Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex" *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(6):E1089-100.
148. Shirasaka T, Nakazato M, Matsukara S, et al. "Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats" *Am J Physiol.* 1999;277(6 Pt 2):R1780-5.
149. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, et al. "Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain" *Brain Res.* 1999;831(1-2):248-53.
150. Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M. "Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues" *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):72-87.
151. Baumann C, Bassetti C. "The neurotransmitter, hypocretin. An overview" *Nervenarzt.* 2004;75(4):317-23.
152. Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E. "The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy" *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:283-313.
153. Brown RE. "Involvement of hypocretins/orexins in sleep disorders and narcolepsy" *Drug News Perspect.* 2003;16(2):75-9.
154. Hoang QV, Bajic D, Yanagisawa M, et al. "Effects of orexin (hypocretin) on GIRK channels" *J Neurophysiol.* 2003;90:693-702.
155. Santangelo S, Shoup M, Gamelli RL, Shankar R. "Prostaglandin E2 receptor antagonist (SC-19220) treatment restores the balance to bone marrow myelopoiesis after burn sepsis" *Trauma* 2000;48(5):826-30.
156. Shimosato T, Kincade PW. "Prostaglandin E(2) and stem cell factor can deliver opposing signals to B lymphocyte precursors" *Cell Immunol* 1999;198(1):21-9.
157. Löffler G. "Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 3.Auflage" 1999;466-68;487-92;608-12.
158. Hirsch AB, McCuen RW, Arimura A, Schubert ML. "Adrenomedullin stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in the fundus of the stomach" *Regul Pept* 2003;110(3):189-195.
159. B Grant M, Caballero S. "Somatostatin analogues as drug therapies for retinopathies" *Drugs Today (Barc)* 2002;38(11):783-91.
160. Herold G. und Mitarbeiter. "Innere Medizin; Eine vorlesungsorientierte Darstellung" 2002;458-63.
161. Kau R, Arnold W. "Somatostatin receptor scintigraphy and therapy of neuroendocrine (APUD) tumors of the head and neck" *Acta Otolaryngol.* 1996; 116(2):345-9.

162. Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, Jensen RT. "Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells" *Curr Pharm Des* 2003;9(6):495-509.
163. Hofland LF, Lambert SW. "The Pathophysiological Consequences of Somatostatin Receptor Internalization and Resistance" *Endocr Rev* 2003;24(1):28-47.
164. Kalo MS, Pasquale EB. "Signal transfer by Eph receptors" *Cell Tissue Res*. 1999;298(1):1-9.
165. Boyd AW, Lackmann M. "Signals from Eph and ephrin proteins: a developmental tool kit" *Sci STKE*. 2001;2001(112):RE20.
166. Gale NW, Baluk P, Pan L, et al. "Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells" *Dev Biol*. 2001;230(2):151-60.
167. Ogawa K, Pasqualini R, Lindberg RA, et al. "The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization" *Oncogene*. 2000;19(52):6043-52.
168. Huai J, Drescher U. "An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein" *J Biol Chem*. 2001;276(9):6689-94.
169. Sheng M. "Molecular organization of the postsynaptic specialization" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7058-61.
170. Kennedy MB. "Signal-processing machines at the postsynaptic density" *Science*. 2000;290(5492):750-4.
171. Feliciello A, Li Y, Avvedimento EV, Gottesmann ME, Rubin CS. "A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signaling to the nucleus" *Curr Biol*. 1997;7(12):1011-4.
172. Feliciello A, Gottesmann ME, Avvedimento EV. "The biological functions of A-kinase anchor proteins" *J Mol Biol*. 2001;308(2):99-114.
173. Rivera C, Voipio J, Payne JA, et al. "The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation" *Nature*. 1999;397(6716):251-5.
174. Shirihai O, Merchav S, Attali B, Dagan D. "K⁺ channel antisense oligodeoxynucleotides inhibit cytokine induced expansion of human hemopoietic progenitors" *Pflugers Arch*. 1996;431(4):632-8.
175. Shirihai O, Attali B, Dagan D, Merchav S. "Expression of two inward rectifier potassium channels is essential for differentiation of primitive human hematopoietic progenitor cells" *J Cell Physiol*. 1998;177(2):197-205.
176. North RA, Surprenant A. "Pharmacology of cloned P2X receptors" *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:563-80.
177. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, et al. "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)" *Science*. 1996;272(5262):735-8.
178. Nijweide PJ, Modderman WE, Hagens CE. "Extracellular adenosine triphosphate. A shock to hemopoietic cells" *Clin Orthop Relat Res*. 1995;(313):92-

- 102.
179. Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, et al. "A His-155 to Tyr Polymorphism Confers Gain-of-Function to the Human P2X7 Receptor of Human Leukemic Lymphocytes" *J Immunol.* 2005;175(1):82-9.
180. Rodriguez-Gabin AG, Almazan G, Larocca JN. "Vesicle transport in oligodendrocytes: probable role of Rab40c protein" *J Neurosci Res.* 2004;76(6):758-70.
181. Cote PD, Moukhles H, Carbonetto S. "Dystroglycan is not required for localization of dystrophin, syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase at the sarcolemma but regulates integrin alpha 7B expression and caveolin-3 distribution" *J Biol Chem.* 2002;277(7):4672-9.
182. Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, et al. "Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis" *J Cell Sci.* 2002;115(Pt7):1487-96.
183. Bixby JL, Baerwald-De la Torre K, Wang C, et al. "A neuronal inhibitory domain in the N-terminal half of agrin" *J Neurobiol.* 2002;50(2):164-79.
184. Cao W, Henry MD, Borrow P, et al. "Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus" *Science.* 1998;282(5396):2079-81.
185. Spiropoulou CF, Kunz S, Rollin PE, et al. "New World arenavirus clade C, but not clade A and B virus utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor" *J Virol.* 2002;76(10):5140-6.
186. Bro-Jorgensen K, Knudtson S. "Changes in hemopoiesis during the course of acute LCM virus infection in mice" *Blood.* 1977;49(1):47-57.
187. Thomsen AR, Pisa P, Bro-Jorgensen K, Kiessling R. "Mechanisms of lymphocytic choriomeningitis virus-induced hemopoietic dysfunction" *J Virol.* 1986;59(2):428-33.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Schaub

Vorname(n): Sebastian Jörg

Geburtsdatum/-ort: 22.09.1977 in Neuss

Familienstand: ledig

Vater: Oberstudienrat
Herbert Jörg Schaub, geboren am
08.10.1943 in Wurzen

Mutter: Realschullehrerin
Marina Ruth Elisabeth Schaub-Müller,
geboren am 05.04.1946 in Burscheid

Schulbildung:

1984-1988 Erich-Kästner-Grundschule Dormagen/Horrem

1988-1997 Bettina-von-Arnim-Gymnasium Dormagen

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

11/97-11/98 Fernmeldeaufklärungsregiment 940
Daun/Eifel

Hochschulbildung:

10/98 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Studiengang: Humanmedizin

08/00 Physikum

08/01 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/04 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung

04/05 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

8. Danksagung

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater danken, Herrn PD Dr. med. Ralf Kronenwett, für sein Engagement, seine große Geduld und Großzügigkeit, die er mir trotz vielfältiger Belastung in Klinik und Forschung stets entgegenbrachte, sowie seine fortwährende Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik, die das Erscheinungsbild dieser Arbeit entscheidend prägte.

Ein ganz besonderer Dank geht an den wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. med. Ulrich Steidl, der mich nicht nur ausgezeichnet in die Methoden der quantitativen Real-Time-RT-PCR und Durchflusszytometrie, sowie der immunmagnetischen Zellisolation eingearbeitet hat, sondern mich auch in schwierigen Momenten stets zu motivieren wusste, wie kein anderer, und dabei trotz größter Doppelbelastung durch Klinik und Forschung immer Ansprechpartner war. Ohne ihn wäre die Publikation der Ergebnisse dieser Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas möchte ich danken für das Vertrauen, das er mir bei der Annahme dieser Arbeit als Leiter der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie entgegenbrachte, sowie für die stets positive Wertschätzung und das Interesse an der Arbeit sämtlicher Doktoranden seiner Abteilung.

Simone Bork möchte ich als Mitglied unserer Arbeitsgruppe danken für die Weiterführung unserer Forschungsarbeit, sowie für ihre ständige Hilfs- und Kooperationsbereitschaft. Sie trägt entscheidenden Anteil daran, dass wir unsere Ergebnisse veröffentlichen konnten.

Des Weiteren möchte ich Thomas Schröder, ebenfalls Mitglied unserer Arbeitsgruppe, für seine außerordentliche Kooperations- und Hilfsbereitschaft danken. Aufgrund seiner wissenschaftlichen Ergebnisse trägt auch er Anteil an der Veröffentlichung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Dr. med. Oliver Selbach vom Institut für Neurophysiologie und Prof. Dr. med. Helmut L. Haas, Leiter des Instituts für Neurophysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und interessante Anregungen.

Ebenso großer Dank für erfolgreiche Zusammenarbeit gebührt Janette Seres und Prof. Dr. med. Stefan R. Bornstein aus der Klinik für Endokrinologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie Dr. med. Christian Maercker und Peter Neubert vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung in Berlin und Heidelberg.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. med. Ulrich-Peter Rohr, Dr. med. Roland Fenk, Dr. med. Manuel Aivado und Prof. Dr. med. Norbert Gattermann aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für ausgesprochen kollegiale, aufmerksame und interessierte Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen unseres Institutes.

Abschließend möchte ich mich besonders bedanken bei Nicole Roes, Bärbel Junge, Astrid Rong, Susanne Stahn, Slawomir Kliszewski, Anke Boeckmann, Maren Free, Hildegard Gaussmann, Sabrina Prechtel und Elke Rosenbaum-König für die ständige Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen und die äußerst kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre, an die ich mich gerne zurückerinnern werde und in der es eine Freude war zu arbeiten.

Zusammenfassung (Abstract)

Diese Arbeit soll dazu beitragen, ein umfassenderes Verständnis für die gegenwärtig in ihrem Ausmaß noch ungeklärte biologische Leistungsfähigkeit der humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle zu entwickeln. Nachdem kürzlich überlappende genetische Programme von hämatopoetischen und neuropoetischen Zellen bei Mäusen beschrieben wurden [90], sahen wir uns veranlasst, diese Entdeckung auch für humane CD34⁺ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zu überprüfen. Wir untersuchten somit primäre humane hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen mit Hilfe von spezialisierten cDNA-Arrays, „Real-Time“-Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Durchflusszytometrie. Dabei konzentrierten wir uns vor allem auf die Expression von Genen, die bislang vorwiegend aus der Neurobiologie bekannt waren. Auf diese Weise gelang uns der spezifische Nachweis von mRNA-Sequenzen von Vesikelfusions- und Motilitätsgenen, liganden- und spannungsabhängigen Ionenkanälen und Rezeptorkinasen und -phosphatasen in CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen des Menschen. Darüber hinaus fanden wir sowohl mRNA- als auch Proteinexpression einer Reihe von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, wie dem GABA_B-Rezeptor 1, dem Adenosin A_{2B}-Rezeptor, dem Serotonin (5-HT) 1F-Rezeptor, den Opioid-Rezeptoren μ 1 und κ 1, dem CRH-Rezeptor 1, sowie den Orexin (Hypocretin)-Rezeptoren 1 und 2. Mit Hilfe der Zweifarbenimmunfluoreszenz gelang uns die Bestimmung der differenzierungsabhängigen Expressionsstärke der G-Protein-gekoppelten-Oberflächenrezeptoren. Dabei stellten wir fest, dass die Rezeptorexpression in unreiferen CD38_{low} hämatopoetischen Stammzellen höher ist als in reiferen CD38_{high} Stammzellen. Diese Beobachtung brachte uns zu dem Schluss, dass diese Rezeptoren offensichtlich eine besondere Rolle in der Ontogenese von frühen CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu spielen scheinen. Weiterführende Untersuchungen konnten die funktionelle Aktivität einiger der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Rezeptoren bereits belegen. Unser Nachweis einer Expression von mehreren funktionell aktiven neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auf CD34⁺ Zellen deutet auf eine potenzielle molekulare Wechselbeziehung zwischen hämatopoetischen und neuronalen Signalmechanismen hin und unterstützt auf molekularer Ebene das Modell einer möglichen neuronalen Regulation von unreifen frühen CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bildeten die Grundlage für eine Publikation in der internationalen Fachzeitschrift „BLOOD“ [4].