



Einfluss der Neuropeptide Orexin A und Orexin B auf humane CD34⁺ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ron Patrick Cadeddu

aus Oberhausen

Düsseldorf, Januar 2015

aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Rainer Haas)

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. R. Haas
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2015

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Präsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen:

4th International Meeting des Kompetenznetzwerks Stammzellforschung NRW, 2007, Düsseldorf, Deutschland

Cadeddu RP, Bruns I, Buest S, Brünnert D, Singh R, Kronenwett R, Haas R, Czibere A, Kobbe G. OREXIN A AND OREXIN B INHIBIT COLONY FORMATION OF CD34⁺ STEM AND PROGENITOR CELLS AND ACTIVATE ERK-PHOSPHORYLATION.

Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2008, Wien, Österreich

Cadeddu RP, Bruns I, Buest S, Brünnert D, Singh R, Kronenwett R, Haas R, Czibere A, Kobbe G. OREXINS PLAY A FUNCTIONAL ROLE IN CD34⁺ STEM AND PROGENITOR CELL ADHESION AND DIFFERENTIATION.

Onkologie 2008; 31 (Suppl. 4): 143. Abstract P411

50st Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2008, San Francisco, USA

Bruns I, **Cadeddu RP**, Buest S, Goerke B, Fischer JC, Selbach O, Steidl U, Kronenwett R, Haas R, Kobbe G, Czibere A. THE NEUROPEPTIDES OREXIN A AND B HAVE AN IMPACT ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN CD34⁺ STEM AND PROGENITOR CELLS.

Blood 2008; 112(11): 498. Abstract 1393.

Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2009, Heidelberg/Mannheim, Deutschland

Cadeddu RP, Czibere A, Büst S, Wilk M, Koch A, Goerke B, Fischer JC, Kronenwett R, Kobbe G, Haas R, Bruns I. THE NEUROPEPTIDES OREXIN A AND B PLAY A ROLE IN THE REGULATION OF HUMAN CD34⁺ BLOOD STEM AND PROGENITOR CELLS.

Onkologie 2009; 32 (Suppl. 4): 217. Abstract P776

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das hämatopoietische System	1
1.1.1 Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (HSC/HPC).....	1
1.1.2 Die hämatopoietische Stammzellnische	3
1.2 Das orexinerge System.....	7
1.2.1 Physiologische und zelluläre Effekte von Orexin	10
2 ZIELSETZUNG.....	13
3 MATERIAL & METHODEN	14
3.1 Verwendete Materialien	14
3.1.1 Chemikalien, Kits und Substanzen.....	14
3.1.2 Antikörper	16
3.1.3 Geräte.....	17
3.1.4 Verbrauchsmaterial	19
3.2 Methoden in der Zellkultur	19
3.2.1 Zellkulturmedien	19
3.2.2 Zelllinie AFT024.....	21
3.2.3 Isolierung von CD34 ⁺ Zellen.....	22
3.2.4 Präparation der AFT024 Platten	23
3.2.5 Funktionelle Analysen in der Zellkultur	24
3.2.5.1 Colony-Forming Cell (CFC)-Ansatz.....	24
3.2.5.2 Myeloischer Differenzierungsansatz (LTC-IC-Ansatz).....	25
3.2.5.3 Analysen zur Polarität	26
3.2.5.4 Analysen zur Adhäsion.....	26
3.2.5.5 Analysen zur Migration.....	27

3.3 Immunohistochemische Analysen	28
3.3.1 Extrazelluläre Markierung mit Antikörpern	28
3.3.2 Intrazelluläre Markierung mit Antikörpern.....	28
3.3.3 Durchflusszytometrie	29
3.3.3.1 Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten	30
3.3.3.2 Färbung der Orexinrezeptoren auf CD34 ⁺ HSPC-Subsets.....	30
3.3.3.3 Bestimmung apoptotischer CD34 ⁺ HSPC mittels Antikörperfärbung gegen Annexin V und <i>aktivierte</i> -Caspase 3	32
3.3.3.4 Messung von intrazellulärem Kalzium im Durchflusszytometer	32
3.4 Proteinchemische Methoden	35
3.4.1 Proteinisolation mittels Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion.....	35
3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	36
3.4.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	36
3.4.3.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
3.4.3.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen	38
3.4.3.3 Immunodetektion mit dem NBT/BCIP-Detektionssystem	39
4 ERGEBNISSE	41
4.1 Die Orexinrezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark ...	41
4.1.1 Die Expression der Rezeptoren auf frühen und späten Progenitoren	41
4.1.2 Die Expression der Rezeptoren auf Subsets	42
4.2 Funktionelle Untersuchungen von CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark nach Stimulation mit Orexin A und Orexin B	45
4.2.1 Analysen zur Adhäsionsfähigkeit	45
4.2.2 Analysen zur Migrationsfähigkeit.....	48
4.2.3 Analysen zur morphologischen Polarität	50
4.2.4 Analysen zum programmierten Zelltod (Apoptose)	51
4.2.5 Analysen zur Proliferation.....	53

4.3 Untersuchungen zur Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark nach Stimulation mit Orexin A und Orexin B.....	54
4.3.1 Analysen zur Differenzierungskapazität von CD34 ⁺ HSPC mittels des CFC-Ansatzes.....	55
4.3.2 Analysen zur Selbsterneuerungsfähigkeit von CD34 ⁺ HSPC mittels des LTC-IC-Ansatzes.....	58
4.4 Untersuchungen zur Signalübermittlung in CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark nach Stimulation mit Orexin A und Orexin B	60
4.4.1 Analysen zum intrazelluläres Kalzium ([Ca ²⁺] _i)	61
4.4.1.1 Auswirkungen von Orexin-Stimulation auf den intrazellulären Kalziumspiegel von CD34 ⁺ HSPC.....	61
4.4.1.2 Auswirkungen von Orexin-Stimulation auf das SDF1-vermittelte Kalziumsignal in CD34 ⁺ HSPC	62
4.4.2 Untersuchungen zum intrazellulären cAMP ([cAMP] _i)	64
4.5 Prepro-Orexin in CD34⁺ HSPC und in der Nische	65
4.5.1 Prepro-Orexin in KM-Stanzen.....	66
4.5.2 Prepro-Orexin in CD34 ⁺ HSPC.....	67
4.5.2.1 Mikroskopische Analysen zu Prepro-Orexin in CD34 ⁺ HSPC	67
4.5.2.2 Durchflusszytometrische Analysen zu Prepro-Orexin in CD34 ⁺ HSPC	68
4.5.2.3 Western Blot Nachweis von Prepro-Orexin in CD34 ⁺ HSPC	69
5 DISKUSSION.....	71
5.1 Orexinrezeptoren werden in den verschiedenen CD34⁺ HSPC-Subsets unterschiedlich stark exprimiert.....	72
5.2 Orexine haben funktionelle Auswirkungen auf CD34⁺ HSPC.....	73
5.2.1 Orexine vermindern die Polarität, Adhäsions- und Migrationsrate.....	73
5.2.2 Orexine reduzieren das SDF1-abhängige Ca ²⁺ -Signal und erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel.....	74
5.2.3 Orexine verschieben das Gleichgewicht von Selbsterneuerung und Differenzierung	75

5.2.4	Orexine haben keinen Einfluss auf die Proliferation oder Apoptose.....	77
5.2.5	Orexinrezeptoren sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt	77
5.3	CD34⁺ HSPC exprimieren Prepro-Orexin	81
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.1	Summary	88
7	ANHANG.....	89
7.1	Literaturverzeichnis.....	89
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	99
7.3	Tabellenverzeichnis	101
	DANKSAGUNG	102
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	103

Abkürzungen

0-9

7-TM-Rezeptor	7-Transmembran Rezeptor
7AAD	7-Amino-Actinomycin D

A

A. dest.	destilliertes Wasser	<i>Aqua destillata</i>
AK	Antikörper	
AMG	aorto-gonado-mesonephronale Region	
Ang-1	Angiopoietin 1	
APC	Allophycocyanin	
APS	Ammoniumpersulfat	
AS	Aminosäure(n)	
atm	Atmosphären [1 atm $\approx$ 0,99 bar]	
ATP	Adenosintriphosphat	

B

bp	Basenpaar(e)	
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluinsalz	
BF	Basisfluoreszenz	
BFU-E	Kolonie bildender Erythrozyten Vorläufer (<i>burst</i> Form)	<i>burst-forming-unit-erythroid</i>
BPB	Bromphenolblau	
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin	
BSA	Rinderserumalbumin	<i>bovines</i> Serum Albumin

C

°C	Grad Celsius	
Ca ²⁺	Kalzium-Ion	
CAFC		<i>cobblestone-area-forming-cells</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	<i>cyclic adenosine monophosphat</i>
CDx	Differenzierungsmarker	<i>cluster of differentiation molecules</i>
CDx ⁺	CDx positiv	
CDx ^{neg}	CDx negativ	
CDx ^{low}	CDx schwach positiv bis negativ	
CFC	Kolonie formierende Zelle	<i>colony forming cell</i>
CFU-E	Kolonie bildender Erythrozyten Vorläufer	<i>colony-forming-unit-erythroid</i>
CFU-G	Kolonie bildender Granulozyten Vorläufer	<i>colony-forming-unit-granulocyte</i>
CFU-GEMM	Kolonie bildender Granulozyten/ Erythrozyten/Makrophagen/ Megakaryozyten Vorläufer	<i>colony-forming-unit-granulocyte- erythroid-macrophage-megakaryocyte</i>
CFU-GM	Kolonie bildender Granulozyten/ Makrophagen Vorläufer	<i>colony-forming-unit-granulocyte/macrophage</i>
CFU-M	Kolonie bildender Makrophagen Vorläufer	<i>colony-forming-unit-macrophage</i>
CLP	allgemeiner lymphoider Vorläufer	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	allgemeiner myeloider Vorläufer	<i>common myeloid progenitor</i>

CO ₂	Kohlendioxid	<i>Carbon dioxide</i>
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12	
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4	
<u>D</u>		
Da	Dalton	
DAG	Diaglycerin	
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	
<u>E</u>		
ECD	Elektron-gekoppelter Farbstoff	<i>Electron-coupled dye</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
ES	extrazelluläre Schleife	
EtBr	Ethidiumbromid	
EtOH	Ethanol	
EZ	Eppendorf-Tischzentrifuge	
<u>F</u>		
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum	<i>fetal calf serum</i>
FGF4	Fibroblastenwachstumsfaktor 4	<i>fibroblast growth factor 4</i>
FITC	Fluoresceinisothiozyanat	
FLT-3L	FLT-3 Ligand	<i>fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
Fluo4-AM	Fluo4-Acetoxymethylester	
FS	Detektor für Vorwärtstreulicht	<i>forward-scatter</i>
<u>G</u>		
g	Gramm	
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat	
GMP	Granulozyten/Makrophagen Vorläufer	<i>granulocyte/macrophage progenitor</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor	<i>G-Protein coupled receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat	
GZL	Ganzzelllysate	
µg	Mikrogramm	
<u>H</u>		
h	Stunde(n)	
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	
HA	Hyaluronsäure	<i>hyaluronic acid</i>
HBSS	Hank's balanced salt solution	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCL	Salzsäure	<i>Hydrochloride</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	
HPC	hämatopoietische Vorläuferzelle(n)	<i>hematopoietic progenitor cell(s)</i>

HPGM	Wachstumsmedium für hämatopoietische Progenitorzellen	<i>hematopoietic progenitor growth medium</i>
HPP	hoch proliferatives Potential	<i>high proliferative potential</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	Pferdeserum	<i>horse serum</i>
HSA	humanes Serum-Albumin	
HSC	hämatopoietische Stammzelle(n)	<i>hematopoietic stem cell(s)</i>
HSPC	hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzelle(n)	<i>hematopoietic stem- and progenitor-cell(s)</i>
<u>I</u>		
ICAM	zwischenzelluläres Adhäsionsmolekül	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin	
IL-3	Interleukin 3	
IL-6	Interleukin 6	
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's Medium	
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat	
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid	
IS	intrazelluläre Schleife	
<u>K</u>		
kDa	Kilodalton	
Kg	Kilogramm	
<u>L</u>		
L	Liter	
λ	Wellenlänge [nm]	
LDH	Laktatdehydrogenase	
LFA-1	Leukozyten Funktions Antigen (αLβ2-Integrin)	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
Lin ^{neg}	Lineage negativ	
LTBMC	Langzeit-Knochenmarks-Kultur	<i>long-term bone marrow culture</i>
LTC-IC	Langzeitkultur - initiiierende Zelle	<i>long-term culture - initiating cell</i>
μl	Mikroliter	
<u>M</u>		
M	Molar	
mA	Milliampere	
MACS	Magnetpartikel assoziierte Zellsortierung	<i>magneto-bead associated cell-sorting</i>
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer	<i>megakaryocyte/erythrocyte progenitor</i>
MFI	durchschnittliche Fluoreszenz Intensität	<i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Milligramm	
Mg ²⁺	Magnesium-Ion	
MgCl	Magnesiumchlorid	
min	Minute(n)	
ml	Milliliter	
ML-IC	myeloid-lymphoid - initiiierende Zelle	<i>myeloid-lymphoid - initiating cell</i>
mM	Millimolar	
MMP-2	Matrixmetallopeptidase-2	
MMP-9	Matrixmetallopeptidase-9	
MNC	mononukleäre Zellen	<i>mononuclear cells</i>

MPL	Thrombopoietinrezeptor	<i>myeloproliferative leukemia protein</i>
MPP	multipotenter Progenitor	
MRT	Magnetresonanztomographie	
MSC	mesenchymale Stromazelle	<i>mesenchymal stromal cell</i>
μM	Mikromolar	

N

n.a.	nicht angegeben / nicht vorhanden	<i>not available</i>
NaCl	Natriumchlorid	
NaOH	Natriumhydroxid	
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	
ng	Nanogramm	
NK-IC	Natürliche Killerzellen Kultur - initiiierende Zelle	<i>natural killer culture - initiating cell</i>
nM	Nanomolar	
nm	Nanometer	

O

O.D.	Optische Dichte	
OxA	Orexin A	
OxB	Orexin B	
OxR	Orexinrezeptor	

P

PA-Gel	Polyacrylamit-Gel	
PARP1	poly(ADP-ribose)polymerase 1	
PB	peripheres Blut	
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Tween20	<i>phosphate buffered saline + Tween20</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion	<i>polymerase-chain-reaction</i>
PE	Phycoerythrin	
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin Konjugat 7	
Pen	Penicillin	
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Cyanin Konjugat 5.5	
pg	Pikogramm	
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [H ⁺]	
PI ₃	Phosphoinositol-3	
PKC	Proteinkinase C	
PLC	Phospholipase C	
ppm	Teile pro Millionen	<i>parts per million</i>
PPOx	Prepro-Orexin	
PS	Phosphatidylserin	
PTX	Pertussis Toxin	
PVDF	Polyvinylidenfluorid	

Q

q-RT-PCR	quantitative-Echtzeit-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
----------	---------------------------	-----------------------------------

R

RANKL	RANK Ligand	<i>receptor activator of NF-κB Ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure	<i>ribonucleic acid</i>

RT	Raumtemperatur	
rT	reverse Transkription	
RT-PCR	Echtzeit-PCR	<i>real time PCR</i>
<u>S</u>		
s	Sekunde	
SCF	Stammzellfaktor	<i>stem cell factor</i>
SDF-1		<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
SNS	sympathische Nervensystem	<i>sympatetic nerve system</i>
SS	Detektor für Seitwärtsstreulicht	<i>side-scatter</i>
Stim.	Stimulation	
Strep	Streptomycin	
<u>T</u>		
TBE	Tris-Borat-EDTA	
TCA	Trichloressigsäure	
TE	Tris-EDTA	
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin	
Tie-2	Angiopoietinrezeptor	
TM1-7	α -helikale Untereinheiten 1-7	
TMF	Transformationspuffer	
TPO	Thrombopoietin	
TPS	Thapsigargin	
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
<u>U</u>		
U	Einheit	<i>unit</i>
UMCG	University Medical Center Groningen	
ÜN	über Nacht	
Upm	Umdrehungen pro Minute	
UV	Ultraviolett	
<u>V</u>		
V	Volt	
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsprotein 1	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VLA-4	Integrin $\alpha 4\beta 1$	<i>very late antigen-4</i>
v/v	Volumen pro Volumen	<i>volume per volume</i>
<u>W</u>		
W	Watt	
w/v	Gewicht pro Volumen	<i>weight per volume</i>
<u>XYZ</u>		
z.B.	zum Beispiel	

1 EINLEITUNG

1.1 Das hämatopoietische System

Das hämatopoietische System des Menschen wird durch die zellulären Bestandteile des Blutes gebildet. Es ist maßgeblich an der Immunabwehr beteiligt, versorgt über dies hinaus den kompletten Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen und partizipiert in Form der Thrombozyten auch an der Blutstillung.

Durch die begrenzte Lebensdauer der unterschiedlichen Zellen des menschlichen Blutes, welche zwischen einigen wenigen Tagen (5-10 Tagen bei den Thrombozyten) und einigen Jahren bei bestimmten Leukozyten (z.B. B-Zellen) liegt, muss das hämatopoietische System des Menschen in der Lage sein, über den gesamten Lebenszeitraum des Organismus neue Blutzellen zu bilden und bereit zu stellen. Dabei vollzieht sich die Blutbildung beim erwachsenen Menschen im roten Knochenmark der platten und kurzen Knochen, also hauptsächlich im Becken, im Sternum und in den Wirbelkörpern. Die Blutbildung nimmt hierbei ihren Ursprung in sogenannten hämatopoietischen Stammzellen (HSC), die am Anfang eines hierarchisch gegliederten Ablaufes stehen und an dessen Ende die unterschiedlichen reifen Blutzellen stehen.

1.1.1 Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (HSC/HPC)

Diese HSC sind unreife Zellen, die eine lebenslange Teilungsfähigkeit besitzen und in der Lage sind, durch ein komplexes Zusammenspiel von Selbsterneuerung und Differenzierung die Homöostase, also das Gleichgewicht zwischen Zellverlust und Zellerneuerung, aufrecht zu erhalten (Leblond 1964, Holtzer *et al.* 1978, Robey 2000). Diese Erkenntnisse bezüglich der HSC-Eigenschaften basieren vor allem auf seriellen Transplantationsexperimenten in Mäusen, welche zeigten, dass HSC *in vivo* expandieren (Iscoe und Nawa 1997), indem sie sich zum einen selbst erneuern und zum anderen Tochterzellen (Vorläuferzellen/Progenitoren) hervorbringen, welche dann weiter in reife Blutzellen differenzieren.

Dieses Wechselspiel zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung läuft hierarchisch ab. Dabei entstehen aus den HSC zunächst multipotente hämatopoietische Progenitorzellen (MPP), die zwar noch die volle Differenzierungsfähigkeit der hämatopoietischen Stammzelle besitzen, jedoch über ein geringeres Selbsterneuerungspotenzial verfügen. Aus diesen hämatopoietischen Progenitorzellen entwickeln sich auf der nächsten Hierarchie-Ebene

Vorläuferzellen mit ausschließlich lymphatischem bzw. myeloischen Differenzierungspotential (Kondo *et al.* 1997, Metcalf 1998, Akashi *et al.* 2000).

Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, entstehen aus diesen myeloischen Progenitoren, welche als CMP (common myeloid progenitor) bezeichnet werden, als nächstes entweder sog. Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer (GMP, granulocyte/macrophage progenitor) oder Megakaryozyten/Erythrozyten-Vorläufer (MEP, megakaryocyte/erythrocyte progenitor). Die weitere Differenzierung dieser GMP-Zellen in Granulozyten und Makrophagen wird aufgrund der entstehenden Leukozyten der Leukopoiese zugeordnet, während die weitere Differenzierung der MEP-Zellen zu Megakaryozyten und schließlich Thrombozyten sowie Erythrozyten entsprechend in Thrombopoiese und Erythropoiese unterteilt wird (Manz *et al.* 2002, Lodish 2003). Parallel zur Differenzierung der myeloischen Zellreihe steht am Anfang der ebenfalls zur Leukopoiese gehörenden Lymphopoiese als gemeinsame Vorstufe zunächst der sog. CLP (common lymphoid progenitor). Dieser entwickelt sich im Anschluss über mehrere Übergangsstadien zu reifen B- oder T-Zellen oder zu NK-Zellen (Hahn *et al.* 2008).

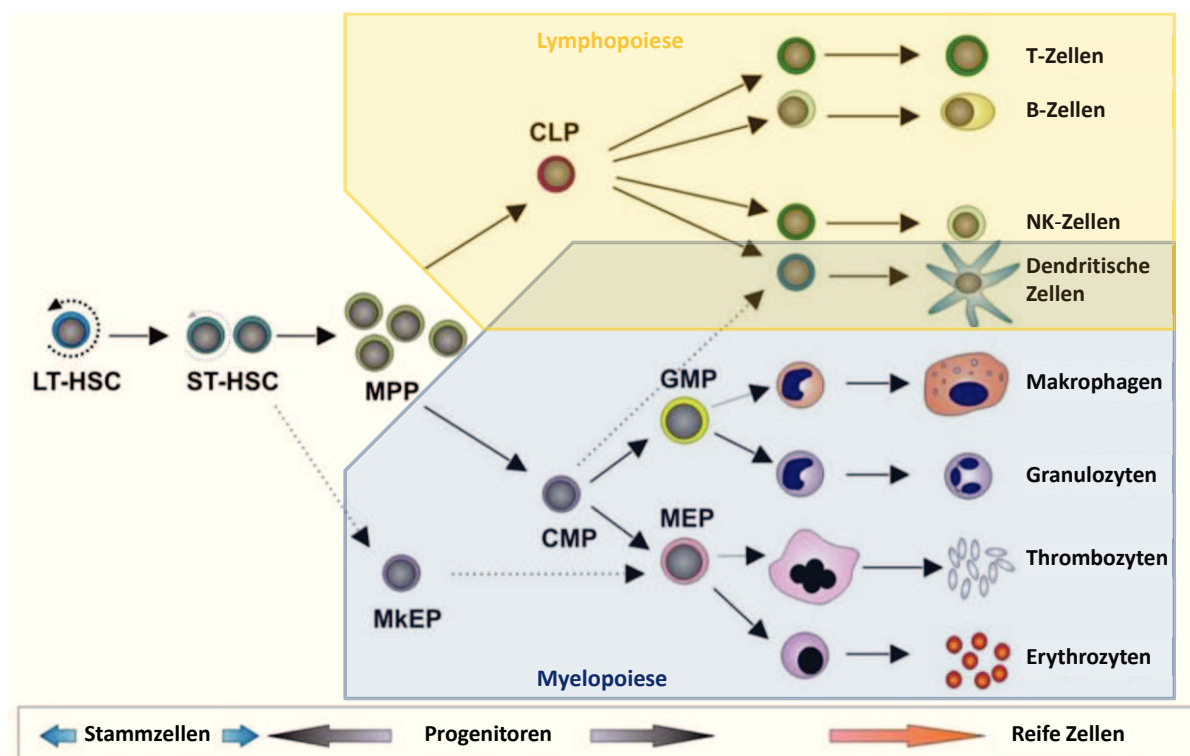


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese (adaptiert nach University Medical Center Groningen (UMCG) 2012)

Der jeweiligen Entscheidung, ob eine Stammzelle sich selbst erneuert oder ausdifferenziert, kommt eine elementare Bedeutung zu, da eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung erhebliche Konsequenzen für den Organismus mit sich

bringt. Bei einer zu hohen Differenzierungsrate würden nicht genug Stammzellen erhalten bleiben, um das hämatopoietische System über die gesamte Lebensdauer des Organismus aufrechtzuerhalten. Bei einer zu hohen Selbsterneuerungsrate hingegen bleiben zu viele unreife Stamm- und Progenitorzellen erhalten, wodurch im Extremfall eine Leukämie entstehen könnte.

Daher wird das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen über die verschiedenen Progenitoren bis hin zu den reifen Blutzellen durch eine Vielzahl komplexer Mechanismen gesteuert. Diese Steuerungsmechanismen bestehen aus intrinsischen, d. h. der HSC eigenen genetisch wie auch epigenetisch determinierten Programmen, welche Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung regulieren. Dieses intrinsische Programm wiederum kann jedoch durch verschiedene extrinsische Signale beeinflusst werden. Hierzu zählen sowohl humorale Wachstumsfaktoren und Zytokine, als auch rezeptorvermittelte Signale in Form von Interaktionen der HSC mit Matrixproteinen und anderen Zellen (Lam und Adams 2010, Seita und Weissman 2010). Ähnlich wie auch bei anderen gewebespezifischen Stammzellen werden diese extrinsischen Einflüsse durch zelluläre und nicht-zelluläre Bestandteile im Mikromilieu der Stammzellen vermittelt. Im Falle der HSC handelt es sich hierbei um das sog. Knochenmarkmikromilieu, in welchem sich die sog. hämatopoietische Stammzellnische befindet.

1.1.2 Die hämatopoietische Stammzellnische

Während sich die Blutbildung während der Embryofetalphase zunächst in der sog. aorto-gonado-mesonephronalen (AMG) Region und in der Leber und Milz (sog. hepatolienale Phase) vollzieht, so findet die adulte Hämatopoiese nach der Geburt im Knochenmark der platten Knochen statt. Grundlage für diese Verlagerung der Blutbildung ist die Fähigkeit der HSC, über die Blutbahn in das Knochenmark einzuwandern, sich dort einzunisten und das komplette hämatopoietische System zu rekonstituieren (Weissman 2000).

Die Markhöhle des Knochens selber ist der von Gefäßen durchsetzte Hohlraum der Knochenspongiosa, welcher neben den verschiedenen blutbildenden Zellen auch das sogenannte Stroma enthält. Dieses Stroma wird aus speziellen Matrixproteinen und verschiedenen Zellen mesenchymalen Ursprungs gebildet (Lam und Adams 2010). Innerhalb des Knochenmarks kommt insbesondere der endostealen Region eine besondere Bedeutung zu, da sich hier vornehmlich die HSC aufhalten. Somit befinden sich am Endost, also der inneren Knochenhaut, welche die Oberflächen der Markhöhle und der Knochenbälkchen

überzieht, die sogenannten Stammzellnischen. Diese Stammzellnischen werden maßgeblich durch sog. mesenchymale Stamm- oder Stromazellen (MSC) sowie von Osteoblasten und sinusoidalen Endothelzellen geprägt, welche die idealen Bedingungen für die Selbsterneuerung und Differenzierung der hämatopoietischen Stammzellen schaffen und aufrechterhalten (Calvi *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003). Generell werden zwei hämatopoietische Nischen unterschieden. So befindet sich im Bereich der sinusoidalen Blutgefäße des Knochenmarks die vaskuläre Nische, welche hauptsächlich von perivaskulären mesenchymalen Stromazellen und sinusoidalen Endothelzellen gestaltet wird. Die vaskuläre Nische stellt für die hämatopoietischen Stammzellen eine nähr- und sauerstoffreiche Umgebung dar, in welcher die HSC durch die extrinsischen Signale vornehmlich zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung angeregt werden (Abkowitz *et al.* 2003, Kopp *et al.* 2005). Direkt an der Grenzfläche zwischen Knochenmark und Knochen hingegen ist die sogenannte osteoblastäre Nische angesiedelt. Die osteoblastäre Nische wird maßgeblich aus den Osteoblasten des Endosts, phagozytären Makrophagen (Osteomac) und mesenchymalen Stromazellen gebildet.

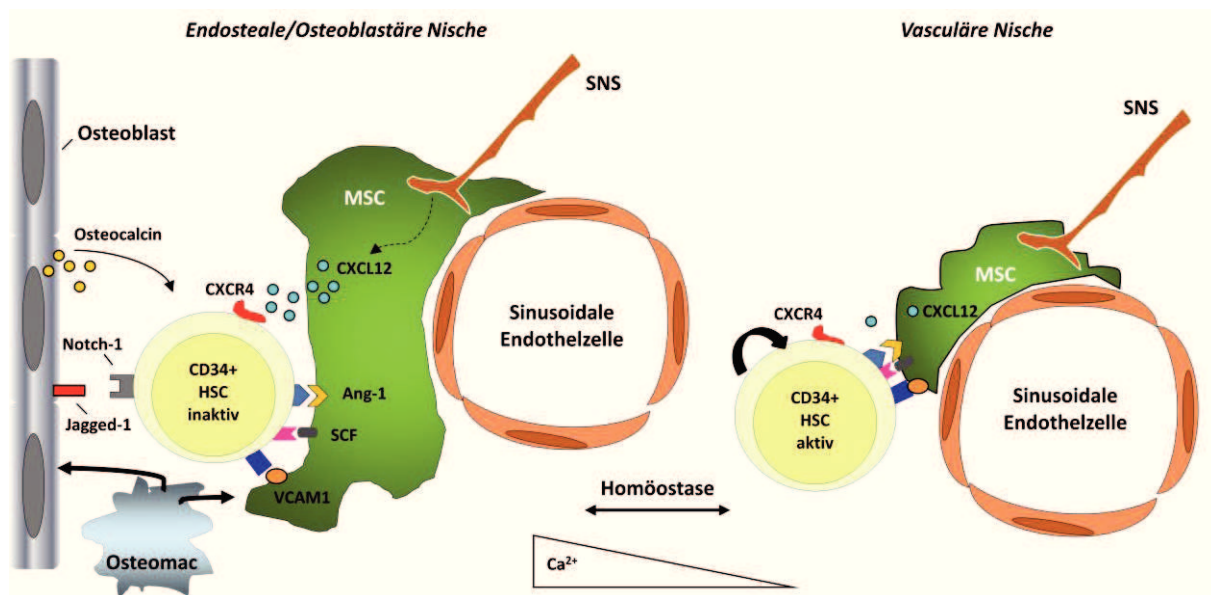


Abbildung 1.2: Schematische Gegenüberstellung der osteoblastären und vaskulären Nische (adaptiert nach Ehninger und Trumpp 2011)

Ihr Milieu ist vergleichsweise nährstoff- und sauerstoffarm und geprägt durch den engen Kontakt zwischen Osteoblasten auf der einen Seite und den HSC auf der anderen Seite. Basierend auf diesem engen räumlichen Kontakt sorgt die wechselseitige Interaktion zwischen Nischenbestandteilen und HSC dafür, dass die HSC in der osteoblastären Nische

eher ruhend sind, d. h. dass Proliferation und Differenzierung der HSC vornehmlich unterdrückt sind.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen ist ihre Fähigkeit zu wandern. Dies ermöglicht ihnen zum einem, aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu migrieren, zum anderen können sie auch wieder in das Knochenmark zurückkehren, ein Vorgang, der Homing genannt wird. Auch für die Steuerung der HSC-Migration sind Nischenbestandteile, und hier vor allem Osteoblasten und MSC von essentieller Bedeutung. Diese sezernieren verschiedene Signalmoleküle, welche Migration und Homing der HSC regulieren. Diese Eigenschaft kann man heutzutage auch therapeutisch für die Gewinnung von peripheren Blutstammzellen für autologe und allogene Transplantationen nutzen. So führt die Gabe von G-CSF zur Mobilisierung von hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Auf zellulärer Ebene wird dieser mobilisierende Effekt von G-CSF durch die proteolytische Spaltung von SDF-1 hervorgerufen. Dieses Zytokin wird physiologischerweise von Osteoblasten, endothelialen Progenitorzellen und MSC im Knochenmark gebildet und führt über die Bindung an seinen korrespondierenden Rezeptor CXCR4 zur Retention der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark. Darüber hinaus existieren zahlreiche weitere Rezeptor-Liganden-Interaktionen zwischen dem Mikromilieu und den HSC, die es beiden Kompartimenten ermöglichen, auf vielfältige Weise in Kontakt zu treten und sich wechselseitig zu beeinflussen. Eine detailliertere Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten zwischen der HSC und Elementen der Stammzellnische zeigt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: *Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Elementen der Stammzellnischen*

Zell-Zell-Interaktion	Involvierte Moleküle	Nischenart	Referenzen
HSC/Osteoblasten	c-Kit - SCF Jagged1 – Notch1 Angiopoietin – Tie2 CXCL12 – CXCR4 Osteopontin N-Cadherin β-Cathenin TPO - MPL	osteoblastär	(Miyazawa <i>et al.</i> 1995, Calvi <i>et al.</i> 2003, Zhang <i>et al.</i> 2003, Arai <i>et al.</i> 2004, Semerad <i>et al.</i> 2005, Mitsiadis <i>et al.</i> 2007, Can 2008, Nakamura-Ishizu und Suda 2013)
Osteoblast/Osteoclast	RANKL	osteoblastär	(Mitsiadis <i>et al.</i> 2007)
Endothelzellen (BMEC)/ Megakaryozyten	CXCL12 – CXCR4 FGF4 VE-Cadherin	vaskulär	(Avecilla <i>et al.</i> 2004)

Zell-Zell-Interaktion	Involvierte Moleküle	Nischenart	Referenzen
BMEC/HSC	SCF – c-Kit Jagged1 – Notch1 VCAM-1 ICAM-1 E-Selektin P-Selektin VLA4 LFA1 CD44	vaskulär	(Kopp <i>et al.</i> 2005, Nakamura-Ishizu und Suda 2013)
Neutrophile/BMEC;HSC	Elastase Cathepsin G MMP-2 MMP-9	vaskulär	(Kopp <i>et al.</i> 2005)
MSC/HSC	CXCL12 – CXCR4 SCF – c-Kit Angiopoetin1 VCAM-1	vaskulär / osteoblastär	(Nakamura-Ishizu und Suda 2013)
Megakaryozyten/HSC	Angiopoetin1 TGF β Thrombopoetin	vaskulär / osteoblastär	(Nakamura-Ishizu und Suda 2013)

Darüber hinaus kann das Wechselspiel zwischen den HSC und den verschiedenen Komponenten des Knochenmarkmikromilieus auch extrinsisch durch das vegetative Nervensystem moduliert werden. Erste Hinweise hierauf ergaben sich aus dem Nachweis von Nervenfasern im Knochenmark (Katayama *et al.* 2006). Diese stellen das morphologische Korrelat zu der funktionellen Beobachtung dar, dass unter homöostatischen Bedingungen Signale aus dem sympathischen Nervensystem (SNS) zur Mobilisierung von Stammzellen erforderlich sind. Diese Signale werden z. B. über den beta3-adrenergen Rezeptor der mesenchymalen Stromazellen vermittelt und führen zu einer rhythmischen Schwankung des SDF-1 Spiegels in der Nische (Mendez-Ferrer *et al.* 2008, Mendez-Ferrer *et al.* 2010b). Auch die Expression des HSC-regulierenden Angiopoetin-1 oder VCAM-1 in den MSC der Stammzellnische scheint durch neuronale Signale moduliert zu werden (Mendez-Ferrer *et al.* 2010a). Ferner konnte gezeigt werden, dass der catecholaminerge Neurotransmitter Dopamin die Migration und die Repopulationsrate von Stammzellen beeinflussen kann (Spiegel *et al.* 2007, Lucas *et al.* 2012). Nicht zuletzt der Nachweis von zahlreichen Rezeptoren für Neuromediatoren auf der Oberfläche hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen und deren funktionelle Aktivität belegt die enge funktionelle Verknüpfung zwischen neuronalem und hämatopoietischen System innerhalb des Knochenmarkmikromilieus (Steidl *et al.* 2004). Zu diesen Rezeptoren gehören neben anderen

die Orexin Rezeptoren 1 und 2, deren funktioneller Einfluss auf die Hämatopoiese im Mittelpunkt dieser Dissertation stand.

1.2 Das orexinerge System

Das orexinerge System besteht aus den Orexinrezeptoren 1 und 2 (OxR), sowie deren Liganden Orexin A (OxA) und Orexin B (OxB). Die Rezeptoren und die Liganden wurden 1998 zeitgleich von den Gruppen um Sakurai und de Lecea aus dem Hypothalamus der Ratte isoliert und erstmals charakterisiert. Die Arbeitsgruppe um Sakurai benannte die Neuropeptide nach dem griechischen Wort für Hunger (grch. *orexis* = Hunger), da sie zeigen konnte, dass bei Ratten die Nahrungsaufnahme stimuliert wurde, wenn ihnen Orexin (Ox) verabreicht wird (Sakurai *et al.* 1998). Unabhängig von der Gruppe um Sakurai klonierte die Arbeitsgruppe von de Lecea ein mit Prepro-Orexin (PPOx) identisches Neuropeptid aus Hypothalamus spezifischer mRNA und nannte das Peptid aufgrund seiner Herkunft und seiner Sequenzhomologie zu Secretin als Präpro-Hypocretin (de Lecea *et al.* 1998). Bis heute werden die Begriffe Orexin und Hypocretin gleichermaßen verwendet.

Die beiden Orexinrezeptoren sind heptahelikale Transmembranproteine (7-TM-Rezeptoren) und bilden eine eigene Untergruppe der Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Wie alle 7-TM-Rezeptoren bestehen sie aus sieben (griechisch „*hepta*“) α -helikalen Untereinheiten, welche die Zellmembran durchspannen und die sowohl extra-, als auch intrazellulär durch jeweils drei Schleifen miteinander verbunden sind (Abbildung 1.3). Auf der extrazellulären Seite besitzen sie eine Bindungsdomäne für einen Liganden, während auf der intrazellulären Seite die G-Proteine binden.

Die Orexinrezeptoren 1 und 2 weisen untereinander in ihrer Aminosäuresequenz eine 64%ige Sequenzhomologie auf. Abgesehen davon besteht die größte Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu zwei Neuropeptid FF Rezeptoren, jedoch liegt die Homologie in deren Sequenz zu den humanen Orexinrezeptoren nur bei 31-35%. Zu anderen Peptidrezeptoren, wie z. B. dem Neuropeptid Y_2 Rezeptor, dem Thyrotropin (TSH)-releasing Hormone Rezeptor oder dem Chemokinrezeptor CXCR4 sind ebenfalls lediglich Sequenzhomologien zwischen 28-31% vorhanden (Kukkonen *et al.* 2002).

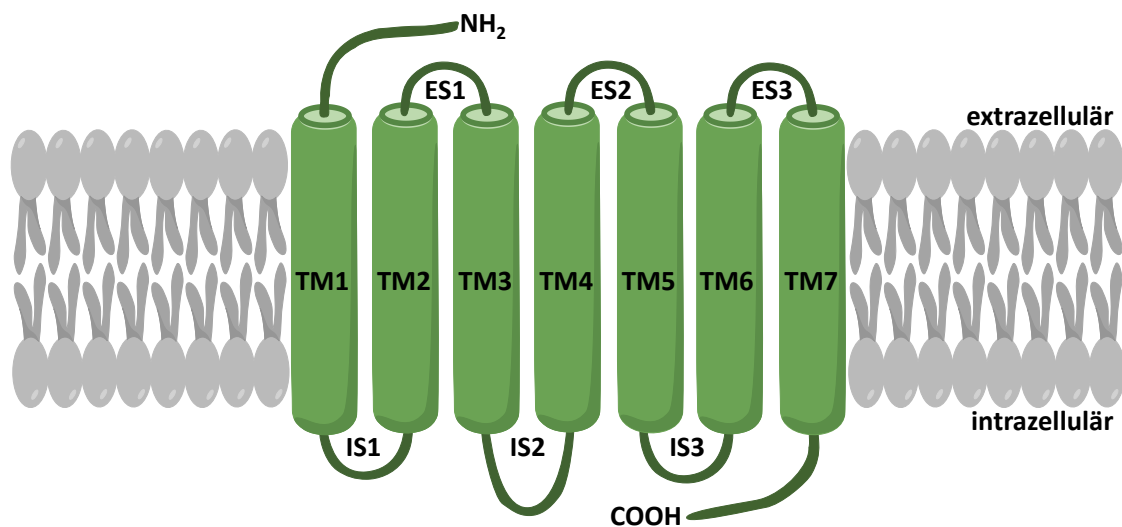


Abbildung 1.3: Schematische Abbildung eines 7-TM-Rezeptors

Sieben die Membran durchspannende α -Helices (TM1-TM7) verbinden den extrazellulären N-Terminus (NH₂) mit dem intrazellulären C-Terminus (COOH) des Rezeptors. Die α -Helices sind durch jeweils drei intrazelluläre (IS1-IS3) und drei extrazelluläre Schleifen (ES1-ES3) miteinander verbunden

Die Aminosäuresequenzen der Orexinrezeptoren sind zwischen den verschiedenen Säugetierarten, wie Mensch, Schwein, Hund, Ratte und Maus hoch konserviert. So beträgt zum Beispiel die Sequenzhomologie der jeweiligen Rezeptoren zwischen Mensch und Ratte 95%. Der Orexinrezeptor 1 besitzt zwei Glykosylierungsstellen und ist etwa 48 kDa groß, der Orexinrezeptor 2 ist ca. 50 kDa groß und kann an drei Stellen glykosyliert werden. Beide OxR reagieren auf keine weiteren Neuropeptide und sind daher hoch spezifisch für die Neuropeptide OxA und OxB (Sakurai *et al.* 1998, Holmqvist *et al.* 2001).

Die beiden Liganden OxA und OxB werden durch proteolytische Spaltung und posttranslationale Modifikation des Vorläuferproteins PPOX, welches 131 Aminosäuren lang und etwa 16 kDa groß ist, gebildet. Orexin A ist 33 Aminosäuren lang und weist eine 46%ige Sequenzhomologie zu dem 28 Aminosäuren langen Orexin B auf (Abbildung 1.4). Beide Peptide werden während ihrer Prozessierung posttranslational am C-Terminus amidiert. Des Weiteren wird OxA n-terminal mit einem Pyroglutamat-Rest und zwei intramolekularen Disulfidbrücken modifiziert, wodurch OxA zyklisch vorliegt, während OxB eine lineare Struktur beibehält (Sakurai *et al.* 1998, Sakurai *et al.* 1999, Holmqvist *et al.* 2001). Diesbezüglich konnten Kastin und Akerstrom 1999 zeigen, dass OxA die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann, während OxB dies nicht kann (Kastin und Akerstrom 1999).

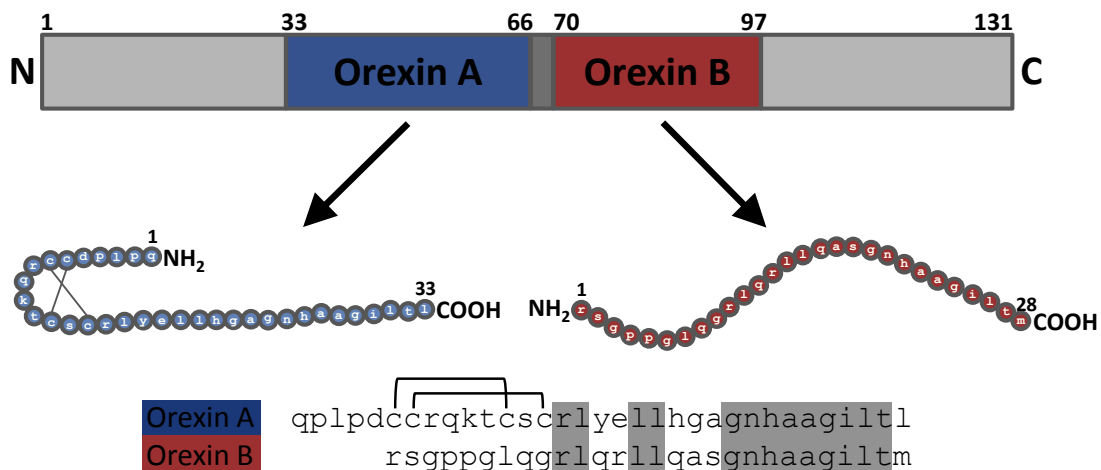


Abbildung 1.4: Vom Prepro-Orexin zu Orexin A und Orexin B

Die beiden Liganden Orexin A (33AS) und Orexin B (28AS) werden posttranslational durch proteolytische Spaltung des 131 Aminosäuren langen Prepro-Orexin gebildet. Die homologen Sequenzen zwischen Orexin A und Orexin B sind grau unterlegt, Orexin A liegt durch die beiden Disulfidbrücken zyklisch vor.

Wie in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt ist kann sowohl Orexin A als auch Orexin B beide Rezeptoren aktivieren, wobei Orexin A mit gleicher Affinität an die Orexinrezeptoren 1 und 2 bindet, Orexin B jedoch eine 10fach stärkere Affinität zum Orexinrezeptor 2 gegenüber dem Orexinrezeptor 1 besitzt (Sakurai *et al.* 1998, Kukkonen *et al.* 2002).

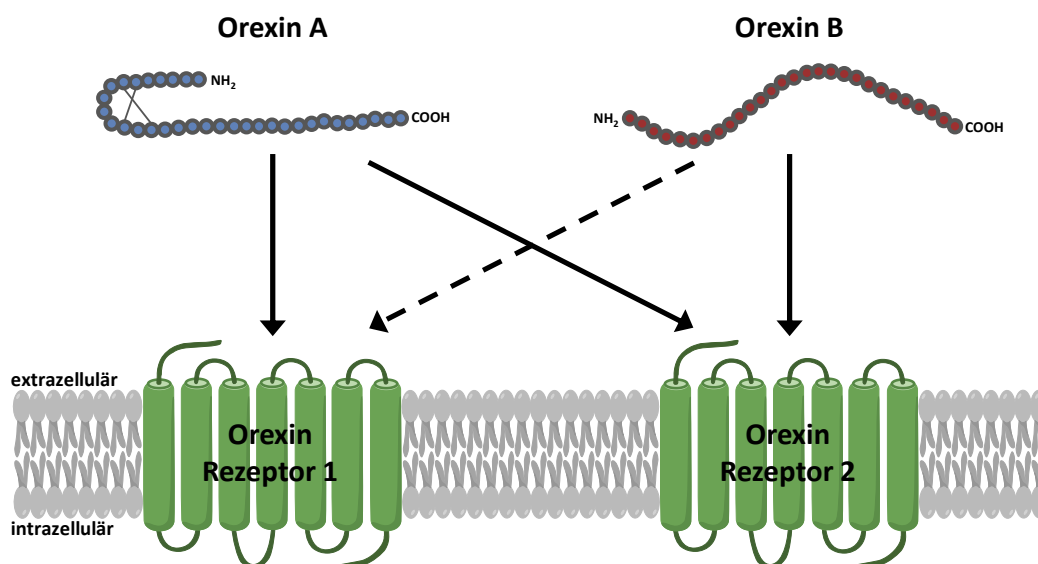


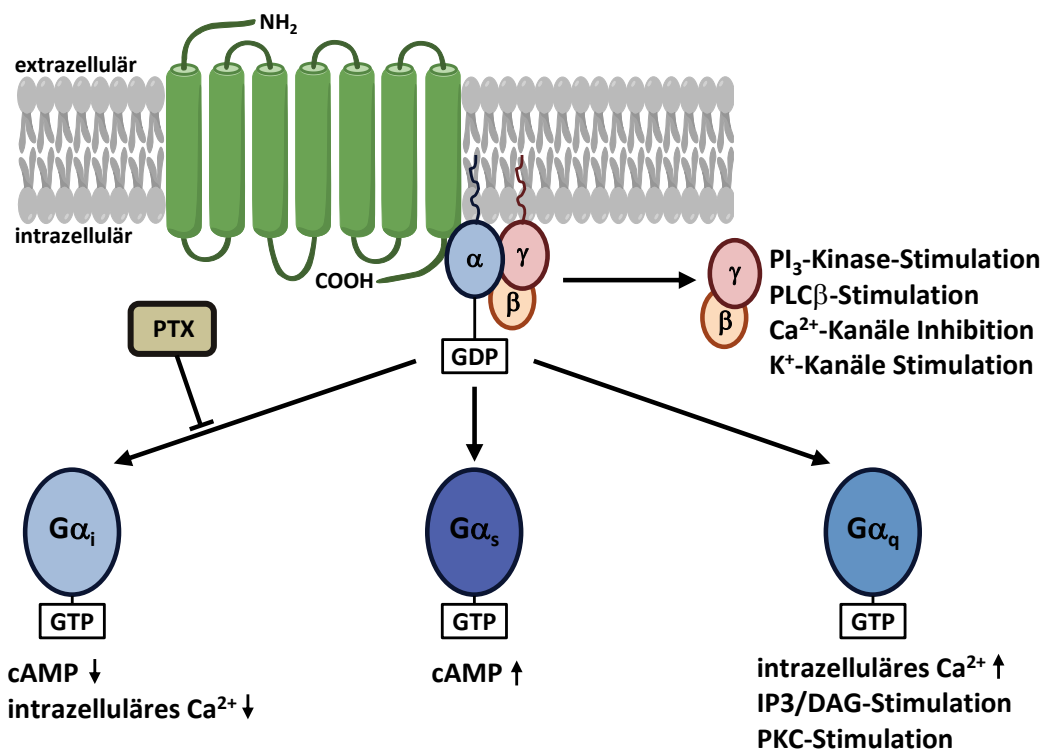
Abbildung 1.5: Bindungsaffinitäten von Orexin A und Orexin B

Orexin A bindet mit gleicher Affinität an beide Orexinrezeptoren (OxR), Orexin B besitzt zum Orexinrezeptor 2 eine 10fach höhere Affinität als zum Orexinrezeptor 1

1.2.1 Physiologische und zelluläre Effekte von Orexin

Das orexinerge System greift in zahlreiche physiologische Funktionen ein. So wurde zuerst ein Appetit anregender Effekt der Orexine beschrieben (Sakurai *et al.* 1998). Außer der Kontrolle der Nahrungsaufnahme reguliert das orexinerge System auch den Schlaf-Wach-Rhythmus. Gerade in der Hirnregion, die maßgeblich an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt ist, konnte eine starke Orexin- und Orexinrezeptor-Expression nachgewiesen werden (Peyron *et al.* 1998). Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung am Schlaf-Wach-Rhythmus konnte die Gruppe um Hara erbringen, in dem sie zeigten, dass ein genetisches Ausschalten, also ein Knockdown, der orexinerger Neuronen bei Mäusen zu Narkolepsie führt (Hara *et al.* 2001).

Außerdem erhöht die Aktivität des orexinerger Systems die Produktion und Freisetzung der Hormone Corticosteron und Aldosteron aus der Nebennierenrinde (Malendowicz *et al.* 1999), und stimuliert in humanen Nebennierengeweben und adrenocortikalen Zellen die Sekretion von weiteren Nebennierenhormonen (Karteris und Randeva 2003, Ziolkowska *et al.* 2005, Wenzel *et al.* 2009, Kagerer und Jöhren 2010). Durch die Ausschüttung von Corticosteroiden und Aldosteron vermittelt Orexin bei Stressreaktionen eine Erhöhung des Blutdrucks, der Herz- und der Atemfrequenz (Samson *et al.* 1999, Shirasaka *et al.* 1999). Weiter nimmt Orexin Einfluss auf die Regulation der gastrointestinalen Motilität (Kirchgessner und Liu 1999), auf die Adipozytenproliferation, sowie auf die Spermatogenese (Heinonen *et al.* 2008). Die Regulation des metabolischen Status wird ebenfalls durch Orexin beeinflusst. Hier wechselwirkt es mit Insulin und Glukagon, wobei durch Orexin A die Sekretion von Glukagon gesteigert wird, während die Insulinsekretion vermindert wird (Ouedraogo *et al.* 2003, Ehrström *et al.* 2005b). Bisher konnten sowohl die Rezeptoren, als auch die Liganden in vielen, verschiedenen peripheren Organen gezeigt werden. So wurden die Orexinrezeptoren unter anderem in der Niere, der Nebennierenrinde, dem Nebennierenmark, in den Hoden, dem Penis und den Nebenhoden, in Fettgewebe, im Magen, im Dünndarm und im Nervus vagus nachgewiesen (Kirchgessner und Liu 1999, Randeva *et al.* 2001, Blanco *et al.* 2002, Burdyga *et al.* 2003, Karteris *et al.* 2004, Ehrström *et al.* 2005a, Spinazzi *et al.* 2005, Digby *et al.* 2006, Takahashi *et al.* 2006). Die Expression der Liganden Orexin A und B, sowie deren Vorläuferprotein Prepro-Orexin konnte bisher unter anderem in der Niere, den Nebennieren, dem Magen, Dün- und Dickdarm, dem Pankreas, dem Penis und den Nebenhoden und in der Plazenta gezeigt werden (Kirchgessner und Liu 1999, Nakabayashi *et al.* 2003, Karteris *et al.* 2004, Ehrström *et al.* 2005a, Takahashi *et al.* 2006).



DAG: Diacylglycerin; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; PI₃: Phosphoinositid-3; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; G α_n /G α_c : stimulatorische G-Proteine

Außer an diesen eher neurophysiologischen Effekten scheinen Orexine z. B. bei Karzinomzellen auch an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt zu sein (Kukkonen 2013). Dies zeigt sich in der Aktivierung von mitogenaktivierten Protein Kinasen (MAPK)-Signalwegen. So führt z. B. eine Stimulierung des Orexinrezeptor 1 bei CHO-Zellen, die aus dem Eierstock des chinesischen Hamsters gewonnen werden, zu einer Phosphorylierung von MAPK42/44 (Ammoun *et al.* 2006), welche Einfluss auf Apoptose und Zellzyklus nimmt.

2 ZIELSETZUNG

Seitdem unsere Arbeitsgruppe im Jahre 2004 über Genexpressionsanalysen und durchflusszytometrische Analysen zeigen konnte, dass CD34⁺ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut die hauptsächlich aus dem neurologischen System bekannten Orexinrezeptoren 1 und 2 exprimieren, stellt sich die Frage, inwieweit diese beiden Rezeptoren ebenfalls auf den CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark vorhanden sind und, ob sie das Verhalten von CD34⁺ Zellen beeinflussen.

Daher soll in dieser Arbeit zum einen nochmals die Expression, aber auch die Verteilung der Orexinrezeptoren auf den CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark und auch deren verschiedenen Subsets genauer untersucht werden. Insbesondere soll aber die Bedeutung der Orexinrezeptoren auf die Funktionen der hämatopoietischen Stammzellen aus dem Knochenmark analysiert werden. Hierzu wird mit Hilfe verschiedener funktioneller Zellkulturexperimente die Auswirkung der Orexin-Rezeptor-Stimulation auf grundlegende Funktionen der CD34⁺ Zellen, wie z.B. Polarität, Adhäsion oder Migration, untersucht. Des Weiteren soll anhand von klonogenen Wachstumstests der Einfluss von Orexinen auf die Differenzierungsfähigkeit von CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen dargestellt werden.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Expression der Orexinrezeptoren auf den CD34⁺ Zellen und den Auswirkungen der Stimulation der Orexinrezeptoren auf die Funktionen dieser Zellen sollen in dieser Arbeit auch Hinweise darauf gesucht werden, wie die beiden Neuropeptide Orexin A und Orexin B zu den CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen gelangen, um ihren Einfluss auf diese ausüben zu können. Es sollen also Hinweise auf die Quelle der Orexine im Knochenmark gefunden werden.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Verwendete Materialien

Im folgenden Kapitel sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Antikörper, Geräte und Materialien aufgelistet.

3.1.1 Chemikalien, Kits und Substanzen

In der folgenden Tabelle 3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Substanzen und Kits mit den jeweils dazugehörigen Herstellern aufgelistet.

Tabelle 3.1: *verwendete Chemikalien und Kits*

Chemikalien und Kits	Hersteller (Firmensitz)
A. dest. (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi AG (Homburg, Deutschland)
Acrylamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences (San José, CA, USA)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology Inc (Rockford, IL, USA)
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Direct cAMP Enzyme Immunoassay Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Flow-Count™ Fluorospheres	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Fluo4-AM	Invitrogen / Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
<i>fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i> (FLT3L)	Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA)
Formaldehyd (Methanol Free, 10 % UltraPure)	Polysciences Inc. (Warrington, PA, USA)
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FBS) für LTC-IC	StemCell Technologies (Vancouver, BC, Kanada)

Glucose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
HBSS (Hank 's Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
HEPES Pufferlösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Horse Serum (HS; Pferdeserum)	StemCell Technologies (Vancouver, BC, Kanada)
HPGM™	Lonza (Köln, Deutschland)
Humanes Serumalbumin (HSA)	CSL Behring GmbH (Marburg, Deutschland)
IMDM (Iscove 's Modified Dulbecco 's Medium)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Interleukin-3 (IL-3)	Peptrotech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin-6 (IL-6)	Peptrotech (Rocky Hill, NJ, USA)
Lysepuffer	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methylzellulose MethoCult SF4436 und MethoCult H4434 Classic	StemCell Technologies (Vancouver, BC, Kanada)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NBT/BCIP-Detektionssystem	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
N,N'-Methylenbisacrylamid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Orexin A	Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA)
Orexin B	Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA)
Ortho-Phosphorsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS mit Ca ²⁺ Mg ²⁺	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Pertussis Toxin (PTX)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SB334867 (OxR1-Antagonist)	Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA)
SDS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Serva-Blau G	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>stem cell factor</i> (SCF)	Peptrotech (Rocky Hill, NJ, USA)
<i>stromal derived factor 1 alpha</i> (SDF-1α)	Peptrotech (Rocky Hill, NJ, USA)
TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Thapsigargin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3.1.2 Antikörper

In der Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet. Bis auf einige wenige entstammen alle Antikörper der Maus und sind gegen humane Epitope gerichtet. Die Antikörper gegen die aktivierte Caspase-3 (Anti-cleaved Caspase-3) und gegen Prepro-Orexin stammen aus dem Kaninchen, die Antikörper gegen Orexin A, Orexin B und gegen die beiden Orexinrezeptoren 1 und 2 stammen aus der Ziege.

Tabelle 3.2: *verwendete Antikörper*

Antikörper	Klon	Konjugation	Hersteller (Firmensitz)
Anti-CD2	S5.2	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD3	SK7	PE, APC	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD4	SK3	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD7	M-T701	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD8	SK1	FITC, PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD10	HI10a	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD11b	D12	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD14	MΦP9	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD19	SJ25C1	PE, PerCP-Cy5.5	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD20	L27	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD34	8G12	FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD38	HB-7	FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD45	HI30	FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD45RA	2H4LDH11 LDB9	ECD	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Anti-CD56	MY31	PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD123	7G3	PE-Cy7	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Anti-CD235a	11E4B-7-6	PE	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

Anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175)	n.a.	AlexaFluor488	Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)
Anti-Orexinrezeptor 1	n.a.	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Orexinrezeptor 2	n.a.	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Orexin A	n.a.	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Orexin B	n.a.	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Prepro-Orexin	n.a.	unkonjugiert	LifeSpan Biosciences (Seattle, WA, USA)
IgG ₁ /IgG ₁ Isotyp	X40/X40	FITC/PE	BD Biosciences (San José, CA, USA)
IgG ₁ , κ Isotyp	MOPC-21	PerCP-Cy5.5, APC	BD Biosciences (San José, CA, USA)
Ziege anti-Kaninchen IgG	n.a.	Alkalische Phosphatase	Abcam, Cambridge, UK
Ziege anti-Kaninchen IgG	n.a.	AlexaFluor488, AlexaFluor568	Invitrogen / Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Kaninchen anti-Ziege IgG	n.a.	AlexaFluor488, AlexaFluor568	Invitrogen / Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

3.1.3 Geräte

In der folgenden Tabelle 3.3 sind die im Labor verwendeten Geräte mit den entsprechenden Herstellern aufgelistet.

Tabelle 3.3: *verwendete Geräte*

Gerät	Hersteller (Firmensitz)
Autoklav Systec 2540EL und Systec V-75	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg, Deutschland)
Brutschränke/Inkubatoren: Heraeus HERA cell Binder CB210	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer: FACSCalibur MoFlowXDP	BD Biosciences (San José, CA, USA) Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)

Kühl-/Gefrierschränke (-20 °C, 4 °C)	Bosch (Gerlingen, Deutschland) Liebherr-International AG (Bulle, Schweiz)
Mikroskope:	
ZEISS Axiovert 25	ZEISS (Oberkochen, Deutschland)
ZEISS Axioplan 2 imaging	ZEISS (Oberkochen, Deutschland)
MidiMACS Magnetischer Zellseparator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Pipettierhilfen:	
Eppendorf Research® (0,1 – 2,5 µl),	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® (0,5 – 10 µl),	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® (2 – 20 µl),	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® (10 – 100 µl),	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® (20 – 200 µl),	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® (100 – 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Finnpipette Novus 12-Kanal (30 – 300 µl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Rainin 12-Kanal (20 – 200 µl)	Rainin Instrument LLC (Oakland, CA, USA)
Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Spülmaschine Miele G7735, G7748 & G7749	Miele Professional (Gütersloh, Deutschland)
Sterilwerkbänke:	
Gelaire® BSB 3A,	Gelaire (Sydney, Australien)
Schulz Z100	Schulz Lufttechnik GmbH (Sprockhövel, Deutschland)
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad GFL-1083	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Zellzählgerät: CASY® Cell Counter and Analyser System Model TT	Innovatis (Zürich, Schweiz)
Zentrifugen:	
Megafuge® 1.0R,	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Biofuge® stratos,	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Biofuge® fresco	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

3.1.4 Verbrauchsmaterial

In der folgenden Tabelle 3.4 sind die im Labor verwendeten Geräte mit den entsprechenden Herstellern aufgelistet.

Tabelle 3.4: *verwendete Verbrauchsmaterialien*

Material	Hersteller (Sitz)
beschichtete 24-Well Platten: Biocoat Fibronectin coated Plates Biocoat Collagen I coated Plates	Corning (Corning, NY, USA)
Bottle-Top-Filter (150 ml, 500 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
CASY Cups	Innovatis (Zürich, Schweiz)
Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts (6,5 mm, 5 µm), 24-Well Platte	Corning (Corning, NY, USA)
MACS® Separation Columns (25 LS Columns)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym (Hamburg, Deutschland),
Pre-Separation-Filter 0,2 µm	Partec (Münster, Deutschland)
Reagenzreservoirs (100 ml)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Reaktionsgefäße (5 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Zellkulturflaschen (T25 cm ² , T75 cm ²)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturplatten (12-well, 24-well, 96-Well)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

3.2 Methoden in der Zellkultur

3.2.1 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien werden unter sterilen Bedingungen hergestellt. Die einzelnen Komponenten werden unter einer Sterilbank gemischt und mit einer Vakuumpumpe durch einen Flaschenaufsatz-Filter in autoklavierte Schott-Flaschen steril filtriert. Medienreste werden bei erneutem Gebrauch nach spätestens einer Woche erneut steril filtriert und mit

den entsprechenden Mengen an L-Glutamin 100 U/ml und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetzt. Der pH-abhängige Farbindikator Phenolrot im Medium zeigt an, ob für die Zellen im Medium optimale Bedingungen vorliegen (rote Farbe), oder der CO₂-Gehalt nicht stimmt (pinke Farbe). Ist das Medium gelb, ist das ein Indiz für einen erhöhten Stoffwechsel, dem starkes Zellwachstum oder auch Kontaminationen durch Bakterien oder Pilzen zugrunde liegen können.

AFT - Medium:

Zur Herstellung von AFT - Medium zur Kultivierung der Zelllinie AFT024 wird benötigt:

Tabelle 3.5: *Zusammensetzung von AFT-Medium*

AFT - Medium (100 ml)	
80 ml	DMEM (low Glucose)
20 ml	FCS
100 U/ml	Pen/Strep/L-Glutamin
60 µl	β-Mercaptoethanol (50 MM)

LTBMC Medium:

Zur Herstellung von LTBMC - Medium zur Kultivierung von CD34⁺ Zellen während des LTC-IC-Ansatz wird benötigt:

Tabelle 3.6: *Zusammensetzung von LTBMC-Medium*

LTBMC Medium (100 ml)	
75 ml	IMDM
12,5 ml	HS for human long term culture
12,5 ml	HS for human long term culture
100 U/ml	Pen/Strep/L-Glutamin

Iscoves 20 (I20):

Zur Herstellung von I20 - Medium wird benötigt:

Tabelle 3.7: *Zusammensetzung von I20-Medium*

I20 - Medium (100 ml)	
80 ml	IMDM
20 ml	FCS
100 U/ml	Pen/Strep/L-Glutamin

Iscoves 20⁺⁺⁺⁺ (I20⁺⁺⁺⁺):

Zur Herstellung von zytokinhaltigem I20⁺⁺⁺⁺ - Medium zur Kultivierung primärer CD34⁺ Zellen in serumhaltiger Suspensionskultur wird benötigt:

Tabelle 3.8: *Zusammensetzung von I20⁺⁺⁺⁺-Medium*

I20⁺⁺⁺⁺ - Medium (100 ml)	
80 ml	IMDM
20 ml	FCS
100 U/ml	Pen/Strep/L-Glutamin
10 ng/ml	IL-3
10 ng/ml	IL-6
10 ng/ml	SCF
10 ng/ml	FLT-3L

Hematopoietic Progenitor Growth Medium⁺⁺⁺⁺ (HPGM⁺⁺⁺⁺):

Zur Herstellung von zytokinhaltigem HPGM⁺⁺⁺⁺ - Medium zur Kultivierung primärer CD34⁺ Zellen in serumfreier Suspensionskultur wird benötigt:

Tabelle 3.9: *Zusammensetzung von HPGM⁺⁺⁺⁺-Medium*

HPGM⁺⁺⁺⁺ - Medium (100 ml)	
100 ml	HPGM
100 U/ml	Pen/Strep/L-Glutamin
10 ng/ml	IL-3
10 ng/ml	IL-6
10 ng/ml	SCF
10 ng/ml	FLT-3L

3.2.2 Zelllinie AFT024

Die AFT024 ist eine Stromazelllinie aus der fetalen Leber von Mäusen, die von Moore 1997 isoliert wurde (Moore *et al.* 1997a). Mit der Kokultivierung von konfluentem AFT024-Stroma können HSZ und Vorläuferzellen in vitro mehr als sieben Wochen erhalten werden (Moore *et al.* 1997b, Punzel *et al.* 1999a). Somit eignen sich die Kulturbedingungen zur Identifizierung von Stammzellen mit Hilfe von LTC-IC-, ML-IC- oder NK-IC-Versuchen. Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinie erfolgt in Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von

80-90%. Die Zellen werden, wie in 3.2.4 beschrieben, trypsinisiert und im Verhältnis von 1:5 - 1:6 gesplittet. Nach ca. 8 Wochen sollte eine neue Charge der Zellen in Kultur genommen werden, da unter anderem das Proliferationspotential der Zellen nachlässt.

3.2.3 Isolierung von CD34⁺ Zellen

Die Aufreinigung von CD34⁺ Zellen erfolgt über zwei verschiedene Techniken. Im ersten Schritt der Aufreinigung werden die mononukleären Zellen (MNC) vom Restblut über eine Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt, um aus diesen im zweiten Schritt mittels eines spezifischen CD34-Antikörpers und einer säulenbasierten Zellseparation die CD34⁺ Zellen anzureichern.

Zur Separation der MNC wird 15 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1.077, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) in 50 ml-Röhrchen, jeweils mit gleichen Mengen Blut bzw. Knochenmark (mit PBS verdünnt) überschichtet und in einer Heraeus Megafuge 1.0R mit 400 x g 20 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Als Ergebnis sieht man mehrere sauber getrennte Schichten. In der untersten Phase befinden sich die pelletierten Erythrozyten, gefolgt von einer Interphase aus Ficoll-Lösung und einer dünnen Schicht Leukozyten/MNC und der obersten Schicht aus Serum und Ficoll-Lösung. Die Schicht aus mononukleären Zellen wird mit einer Pipette vorsichtig abgehoben und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt, mit PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf 50 ml aufgefüllt und bei 600 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Waschschrift wird wiederholt, und aus den 50 ml der Zellsuspension werden 500 µl für weitere Analysen abgenommen. Die Zellen werden wie oben pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet für die Lyse der Erythrozyten in 10 ml kaltem 0,83%-igem Ammoniumchlorid resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Danach erfolgt ein weiterer Waschschrift. Das Pellet wird in 1 ml MACS-Puffer (PBS + 2 mM EDTA und 0,1% HSA) resuspendiert und kaltgestellt. Die MNC werden danach entweder in der Neubauer-Kammer oder am CASY-Zellzählgerät (Innovatis/Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gezählt.

Die Fraktion der CD34⁺ Zellen wird nun mit einem speziellen Separationsverfahren, das auf dem Prinzip der spezifischen immunmagnetischen Zellseparation beruht, aus den MNC angereichert. Dazu werden die MNC mit anti-CD34-magneto-bead markierten Antikörpern (CD34 MicroBead Kit; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) inkubiert und gewaschen. Anschließend werden die markierten Zellen mit Hilfe eines starken Magnetfeldes (Midimacs Separation unit; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) von den übrigen

Zellen getrennt. Die markierten Zellen verbleiben aufgrund der magnetischen Wechselwirkungen in der MACS-Säule („magnetic antibody cell separation“ columns; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) während die nicht markierten Zellen durch die Säule fließen.

Die MNC werden hierfür in 300 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert und mit je 100 µl *blocking*-Reagenz und *magneto-bead* konjugierten Antikörper gegen das Oberflächenepitop CD34 versetzt. Nun werden die Zellen bei 4°C für 30 min inkubiert und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2-3 ml MACS-Puffer resuspendiert und über einen Zellfilter (Pre-Separationfilter; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) auf die Separationssäule im Magneten gegeben, die vorher mit einem Säulenvolumen MACS-Puffer äquilibriert wurde. Das Röhrchen wird mit 3-4 ml MACS-Puffer gespült und die Flüssigkeit auf die Säule gegeben. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen ist, wird diese mit drei Säulenvolumina MACS-Puffer gespült, um in der Säule verbliebene, unmarkierte Zellen aus der Säule heraus zu waschen. Der gesamte Durchfluss der Säule im Magnetfeld wird als CD34⁻ Zellen in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt. Zur Elution der in der Säule verbliebenen CD34⁺ Zellen wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit 2 Säulenvolumen Macs-Puffer gespült. Die CD34⁺ Zellen werden in einem 15 ml-Röhrchen aufgefangen. Für die Bestimmung der Zellzahl und des CD34-Gehaltes werden 350 µl abgenommen.

3.2.4 Präparation der AFT024 Platten

Die Zelllinie AFT024 wird in AFT-Medium bei 33°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Bei 80-90%iger Konfluenz werden die Zellen trypsiniert und auf den mit 0,1% Gelatine (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) vorbeschichteten 96-Well-Platten ausplattiert. Dabei wird das wie folgt beschriebene Protokoll verwendet.

Das Medium wird vom Rand aus der Zellkulturflasche mit einer sterilen Pipette abgenommen und der Zellrasen wird mit 10 ml PBS gespült. Dann werden 5 ml 37°C-warmes 1xTrypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in die Flasche gegeben, und die Flasche wird geschwenkt und geklopft, um die Zellen zu lösen. Zum Stoppen der Trypsinierungsreaktion werden 20 ml von 4°C kaltem I20 oder AFT-Medium zugegeben. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Tube gegeben und der Füllstand mit PBS oder Medium auf 40-45ml erhöht. Die Zellen werden pelletiert (600 x g), der Überstand abgegossen und das Pellet durch Ratschen aufgeschüttelt. Dann werden 5 ml AFT-Medium zugegeben, resuspendiert und 10 µl der

Zellsuspension abgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen. Die Zelldichte wird auf 100.000 Zellen/ml eingestellt, und zum Ausplattieren der Zellen in die 96-Well-Platten wird die Zellsuspension in ein Reagent-Reservoir gegeben und je 150 µl pro Vertiefung pipettiert (11 Wells pro Reihe). Für die Weiterkultivierung der AFT024 werden in 75 ml Zellkulturflaschen 20 ml AFT-Medium vorgelegt und ca. $1-2 \cdot 10^6$ Zellen hinzugegeben. Die Zellkulturplatten und Flaschen werden erneut bei 33°C und 5% CO₂ inkubiert. Sobald der Zellrasen in den 96-Well-Platten konfluent ist, wird er mit einem Cobalt-Irradiator mit 30 Gray bestrahlt, um weiteres Wachstum zu verhindern. 24 Stunden nach Bestrahlung muss das Medium in den Platten gegen frisches AFT-Medium ausgetauscht werden. Die Zellen können nach der Bestrahlung auf 37°C gehalten werden.

3.2.5 Funktionelle Analysen in der Zellkultur

Für die Identifizierung humaner Stammzellen stehen prinzipiell verschiedene Auswertungssysteme in der Zellkultur zu Verfügung. Um bereits determinierte Vorläuferzellen auf ihre Koloniebildungsfähigkeit zu testen, wird in dieser Arbeit der Colony-Forming Cell (CFC)-Assay benutzt. Für die Untersuchung von funktionellen Eigenschaften von primitiven HSZ wurde in veränderter Form der von Punzel entwickelte ML-IC-Versuchsansatz (Myeloid-Lymphoid-Initiating-Cell) als Stammzellassay übernommen (Punzel *et al.* 1999b). Dieser beruht auf dem Nachweis der Entwicklungsfähigkeit von Zellen in myeloische (LTC-IC) und lymphatische Effektorzellen (NK-IC). In diesem Auswertesystem ist die Kokultivierung der HSZ mit einer stammzellerhaltenden Zelllinie (AFT024) notwendig. Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz misst über Verdünnungsreihen die Frequenz zur Koloniebildung oder Generierung lymphatischer Zellen nach einer Langzeitkultur von 5-7 Wochen. Des Weiteren lassen sich über verschiedene Ansätze funktionelle Aussagen z. B. zur Polarität, Adhäsions- und Migrationsfähigkeit treffen. Die verschiedenen Auswertesysteme werden im Folgenden detaillierter dargestellt.

3.2.5.1 Colony-Forming Cell (CFC)-Ansatz

Ogawa und Mitarbeiter entwickelten Anfang der achtziger Jahre den ersten *in-vitro*-Assay für humane hämatopoietische Stammzellen, der 5-Fluorouracil (5-FU)-resistente Vorläuferzellen mit sekundärem, wiederherstellendem Potenzial beschreibt (Nakahata und Ogawa 1982, Leary *et al.* 1984). Die Kolonien dieser so genannten Colony-Forming-Cells (CFC) produzierten zwischen 50 und 500 unreife hämatopoietische Zellen. Bradley *et al.* haben diesen Assay weiterentwickelt und sogenannte „High proliferative potential-CFC“ (HPP-CFC)

beschrieben. Mit 5×10^4 Zellen/Kolonie kann der HPP-CFC-Assay das Proliferationspotenzial bestimmter Vorläuferzellen bewerten (Bradley und Hodgson 1979).

Zur Bestimmung der Differenzierung von determinierten Vorläuferzellen wird der CFC-Ansatz (Colony-Forming-Cell-Ansatz) mit dem klonogenem Methylzellulosemedium MethoCult SF4436 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) verwendet. Dazu werden in der Regel 2500 Zellen zu 2,5 ml möglichst luftblasenfreiem Methylzellulosemedium gegeben und zu gleichen Teilen auf vier Wells einer 24-Well-Platte aufgeteilt. Die Kulturen werden für maximal 14 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Tag 14 wird die Anzahl der Kolonien in fünf verschiedenen Kategorien bestimmt. Es werden CFU-E- (Colony-Forming-Unit-Erythroid), BFU-E- (Burst-Forming-Unit-Erythroid), CFU-G- (Colony-Forming-Unit-Granulocyte), CFU-M- (Colony-Forming-Unit-Macrophage), CFU-GM- (Colony-Forming-Unit-Granulocyte, Macrophage) und CFU-GEMM- (Colony-Forming-Unit-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte)-Kolonien unterschieden. Die frühesten Progenitoren sind die CFU-GM und CFU-GEMM Kolonie bildenden Zellen, wobei die CFU-GEMM-Zellen in der Lage sind, Zellen sämtlicher myeloischer Linien hervorzubringen und hingegen bei den CFU-GM-Zellen nur Zellen der weißen Linie entstehen können. CFU-E- und BFU-E-kolonie-bildenden Zellen sind späte Progenitoren der roten Linie, und die CFU-G- und CFU-M-kolonie-bildenden Zellen kennzeichnen spät determinierte Vorläuferzellen der weißen Linie. Außerdem lässt sich mit diesem Ausleseverfahren die Gesamtzahl und die CFC-Frequenz, also die Frequenz der kolonie-bildenden Zellen bestimmen.

3.2.5.2 Myeloischer Differenzierungsansatz (LTC-IC-Ansatz)

Die Arbeitsgruppe um Sutherland entwickelte Ende der achtziger Jahre den so genannten Long-Term-Culture-Initiating-Cell (LTC-IC)-Ansatz, der wesentlich unreifere und den Stammzellen enger verwandte Progenitoren beschreibt als der CFC-Ansatz. Diese Vorläuferzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach mehr als fünf Wochen *in-vitro*-Kultur noch in der Lage sind, sekundäre Kolonien aus den primär gebildeten Kolonien zu generieren (Sutherland *et al.* 1990). Ähnlich wie die LTC-IC-Ansätze beschreiben sogenannte CAFC-Ansätze (Cobblestone-Area-Forming-Cells) den gleichen Progenitortyp (Cohen *et al.* 1980, Gordon *et al.* 1985). Crooks und Hao haben den LTC-IC Assay auf mehr als 60 Tage Langzeitkultur erweitert und nennen diese Zellen E („Extended“)-LTC-IC (Hao *et al.* 1995, Hao *et al.* 1996). Das folgende Protokoll beschreibt den Ablauf des LTC-IC-Ansatzes, wie er in dieser Arbeit durchgeführt wird.

Initial werden 6000 Zellen der CD34⁺-Zellen direkt in 5 ml LTBMCMedium sortiert und bis zum Ausplattieren auf Eis gestellt. Die Zellen werden dann über eine Verdünnungsreihe auf die 96-Well-Platten gegeben. Dazu gibt man die 5 ml Zellsuspension in ein Reagent-Reservoir und mischt diese nochmals. Für das Ausplattieren wird für exaktes Pipettieren eine RAININ-Multipipette mit einem Satz Spitzen benutzt. Für die ersten beiden Reihen werden pro Reihe 11 Wells mit je 150 µl/Well befüllt. Die restliche Zellsuspension wird mit 3,3 ml LTBMCMedium verdünnt und gut gemischt. Die nächsten beiden Reihen werden befüllt und die nächsten Verdünnungen erfolgen mit 3 ml (Reihe 5+6) und 2,7 ml (Reihe 7+8) LTBMCMedium. Der Rest der Zellsuspension wird auf die letzten beiden Reihen verteilt. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ für 35 Tage kultiviert. Das Medium wird bei Bedarf, spätestens jedoch alle sieben Tage, erneuert. Nach fünf Wochen Kultur wird das Medium nahezu komplett abgenommen, die Zellen mit MethoCult H4434 Classic überschichtet und weitere 14 Tage kultiviert. Anschließend werden die Platten mikroskopisch ausgewertet. Hierbei werden die Wells als positiv für LTC-IC gewertet, in denen Zellen in der Lage sind, sekundäre CFC-Kolonien zu generieren. Die Frequenzen werden mit dem Programm L-Calc (StemSoft Inc.) statistisch ausgewertet.

3.2.5.3 Analysen zur Polarität

CD34⁺ Zellen sind direkt nach der Anreicherung klein und rund. Werden sie in Medium kultiviert bilden sie eine sogenannte „Leading Edge“ und einen „Uropod“ aus, wobei die „Leading Edge“ die Richtung anzeigt, in welche die Zelle sich bewegt. Man könnte sie also auch als Wanderungsfront bezeichnen. Die Zelle nimmt hierbei eine „Tröpfchenform“ an, einen Phänotyp, der dem Migrationsphänotyp wandernder Leukozyten sehr ähnlich ist. Zur Ermittlung dieser morphologischen Polarität werden 25000 CD34⁺ Zellen in 0,5 ml HPGM⁺⁺⁺⁺ Medium aufgenommen und in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Die Zellen werden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Nach 72 Stunden werden Übersichtsaufnahmen des Wells am Lichtmikroskop gemacht und sowohl die morphologisch polaren (also die Zellen, die eine „Tröpfchenform“ angenommen hatten) als auch die runden, also morphologisch nicht-polaren Zellen gezählt. Aus diesen Daten kann dann der Prozentsatz polarer Zellen, die Polaritätsrate, errechnet werden.

3.2.5.4 Analysen zur Adhäsion

Die Analysen zur Adhäsion wurden auf Fibronektin und auf Kollagen beschichteten 24-Well-Platten von BD Biosciences (San José, CA, USA) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst

25000 frisch isolierte CD34⁺ Zellen für 16 Stunden in HPGM⁺⁺⁺⁺ Medium mit den zu untersuchenden Zusätzen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 16 Stunden Kultivierung wurden 5000 CD34⁺ Zellen in 0,5 ml HPGM⁺⁺⁺⁺ Medium in ein Well der beschichteten Platten ausplattiert. Die ausplattierten Zellen wurden 3 Stunden im Brutschrank kultiviert, um den Zellen Zeit zu geben adhärent zu werden. Nach der 3 stündigen Inkubation wurde das Medium inklusive der nicht adhärenen Zellen mit einer Pipette abgenommen. Das Well wurde dreimal vorsichtig mit je 0,5 ml PBS gespült, um evtl. noch vorhandene nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Die adhärenen Zellen wurden dann mit 0,5 ml 0,1%igem Formaldehyd fixiert und am Lichtmikroskop ausgezählt.

3.2.5.5 Analysen zur Migration

Zur Ermittlung der Migrationsrate von CD34⁺ Zellen wurde der sogenannten Transwell-Migrationsassay verwendet, wobei 24-Well Transwellplatten mit einer Porengröße von 5 µm benutzt wurden. Für den Versuch wurden zunächst 150000 frisch isolierte CD34⁺ Zellen für 16 Stunden in HPGM⁺⁺⁺⁺ Medium mit den zu untersuchenden Zusätzen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird der Einsatz eines Transwells mit 100000 der kultivierten Zellen in 150µl des Kultivierungsmediums befüllt. In die untere Kammer werden 600 µl HPGM⁺⁺⁺⁺ mit 100 ng SDF1α als Stimulus gegeben. Nach einer weiteren dreistündigen Inkubation werden die Zellen aus der unteren Kammer gezählt. Hierzu wird der Einsatz aus der Kammer entnommen und die Zellsuspension aus der unteren Kammer wird in FACS-Tubes überführt. Nach zweimaligem Waschen der Kammer mit PBS wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100µl PBS aufgenommen und an einem FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der gewanderten Zellen wird eine festgelegte Anzahl FlowCount Beads (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) zu den Proben gegeben und mitgemessen. So kann in Relation zu den eingesetzten Beads mit der unten stehenden Formel die genaue Anzahl vorhandener Zellen im Ansatz bestimmt werden.

$$\text{Gesamtzellzahl (migrierte Zellen)} = \frac{\text{eingesetzte Beads}}{\text{gemessene Beads}} * \text{gemessene Zellen}$$

3.3 Immunohistochemische Analysen

3.3.1 Extrazelluläre Markierung mit Antikörpern

Die Markierung mit primären fluorochemkonjugierten Antikörpern wird in Suspension durchgeführt. Hierfür werden die zu färbenden Zellen zunächst in 5 ml FACS-Tubes (Corning Inc., Corning, NY, USA) überführt und mit 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 100 µl PBS oder MACS-Puffer resuspendiert. Nach Hinzugabe der Antikörper wird die Zellsuspension für ca. 30 min bei 4°C inkubiert. Vor den FACS-Analysen wird der überschüssige Antikörper durch Waschen mit PBS aus dem Färbeansatz entfernt. Hierbei werden die Zellen in einer adäquaten Menge PBS oder MACS-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei ca. 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS aufgenommen.

Die Markierung mit nativen, also unkonjugierten Antikörpern erfolgte zunächst wie die mit konjugierten, jedoch wurden die Zellen nach der ersten Färbung zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen (5 Minuten; 400 x g) und dann mit einem fluorochemkonjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 für 30 Minuten bei 4°C nachgefärbt. Der Sekundärantikörper ist hierbei gegen den Isotyp des Wirtes des Erstantikörpers gerichtet. Nach dieser zweiten Färbung wurden die Zellen noch zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen (5 Minuten; 400 x g) und dann in 200 µl PBS aufgenommen. Es wurden nur AlexaFluor gekoppelte H+L Sekundärantikörper (Invitrogen / Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet. Diese sind gegen andere Wirtstypen abgesättigt, wodurch Kreuzreaktionen der Antikörper ausgeschlossen werden können, und das AlexaFluor bietet eine relativ hohe Fotostabilität.

3.3.2 Intrazelluläre Markierung mit Antikörpern

Intrazelluläre Färbungen mit fluorochemkonjugierten Antikörpern wurden in Suspension durchgeführt. Sollten intrazelluläre mit extrazellulären Färbungen kombiniert werden, so wurde, sofern nicht anders angegeben, zuerst extrazellulär gefärbt (Abschnitt 3.3.1) und erst im Anschluss daran mit der intrazellulären Färbung begonnen. Hierfür werden die Zellen zunächst in 2 %igem Formaldehyd in PBS (Formaldehyd [*Methanol free*] 10 % *Ultra Pure*, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) für 10 min bei 37 °C fixiert. Anschließend werden die Zellen für 30 min bei RT auf einem Wankler bei 120 Upm in 0,1 % TritonX100 in PBS im Dunkeln permeabilisiert. In den folgenden zwei Waschungen mit Triton-Waschpuffer

(0,01% Triton-X100 in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) werden die Zellen bei $400 \times g$ für jeweils 5 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Überstände werden die Zellen in einem adäquatem Volumen Triton-Waschpuffer resuspendiert und mit den zu verwendenden Antikörpern laut Herstellerangaben ad 100 μ l versetzt. Anschließend werden die Proben für 30 min bei 4 °C dunkel im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss folgt eine erneute Waschung und sofern kein sekundärer Antikörper nötig ist, werden die Zellen in 0,1 %igem Formaldehyd refixiert und entweder in den jeweiligen Versuchen weiterverwendet oder bis zu 24 h bei 4 °C dunkel gelagert. Bei Verwendung eines unkonjugierten Antikörpers wurden die Zellen wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit einem AlexaFluor-konjugierten Antikörper nachgefärbt.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wird für das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom verwendet. Die Methode der Durchflusszytometrie benutzt die physikalische Brechungseigenschaft einer Zelle, auftreffendes Licht zu streuen. Die gemessenen Intensitäten in der Brechung des Lichtes geben Informationen über die Größe und Granularität der entsprechenden Zelle. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren vorhanden sind, desto größer ist das entstehende Streulicht einer durch einen Laserstrahl kreuzenden Zelle. Die Zelle streut das Licht also in verschiedene Richtungen, und wird meist an 2 Stellen gemessen. In der Richtung des ursprünglichen Strahls wird das Vorwärtstreulicht (Forward-Scatter; FS) detektiert und gibt Informationen über die Größe der Zelle. Etwa im rechten Winkel zum Laserstrahl wird das Seitwärtstreulicht (Side-Scatter; SS) detektiert, dessen Signalintensität von der Größe der Zellen, aber auch sehr stark von der Granularität der Zellen abhängt. Die Zellen können nach den Intensitäten in ihrem Vorwärtstreulicht und ihrem Seitwärtstreulicht in einem Diagramm (Plot) dargestellt werden. Dabei werden die Zellen, die ähnliche Streulichteigenschaften haben, in wolkenähnlichen Projektionen dargestellt. In diesen Darstellungen entspricht jeder Punkt einem gemessenen Ereignis.

Eine weitere Form der durchflusszytometrischen Anwendung besteht darin, die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf oder innerhalb von Zellen quantitativ zu bestimmen. Die Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und an einem

Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbei geleitet. Ein Photodetektor registriert die entsprechende Menge an Fluoreszenzsignal, welches sich proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers pro Zelle verhält und somit eine Aussage z.B. über das Vorhandensein oder die Stärke einer Expression von Oberflächenmolekülen erlaubt. Zusätzlich werden weiterhin durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zelle (Größe, Granularität) gewonnen. Unterscheiden sich die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe in ihren Emissionsspektren ist eine gleichzeitige FACS-Messung mit mehreren, verschiedenen Farbstoffen möglich.

3.3.3.1 Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten

Die Darstellungs- und Auswertungssoftware für FACS-Analysen ermöglicht die graphische Darstellung der physikalischen Ereignisse in FACS-Diagrammen (FACS-Plots). Zur Auswertung der FACS-Analysen wird in der Regel nur ein Teil der Messereignisse herangezogen. Um eine Auswahl bestimmter Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenz- (Antigen-) Eigenschaften zu untersuchen, wird ein Software-Fenster (Gate) um bestimmte „Zellwolken“/Zellpopulationen gelegt, welches als Gating bezeichnet wird. Diese selektierten Zellen lassen sich nun auch bezüglich anderer Parameter in neuen Diagrammen darstellen. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden entweder mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer unter Verwendung der CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) oder mit einem MoFlowXDP Durchflusszytometer unter Verwendung der Summit Software (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt.

Die erhobenen Daten werden mit den Programmen FCS Express Reader 3 (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) und Summit 5.1 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland GmbH, Krefeld, Germany) analysiert und aufbereitet, bevor sie in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) exportiert und ausgewertet werden. Für statistische Auswertungen wurde, soweit nicht anders angegeben, der Student's t-Test verwendet.

3.3.3.2 Färbung der Orexinrezeptoren auf CD34⁺ HSPC-Subsets

Um die CD34⁺ Stamm- und Progenitor-Subpopulationen näher zu charakterisieren, wurden eine Vielzahl verschiedener Oberflächenmarker verwendet. Zunächst werden durch einen sogenannten *Lineage Marker* die nicht zu den HSC, CMP, GMP oder MEP gehörigen Zellen ausgeschlossen. Der *Lineage Marker* besteht aus einem Mix von 12 Antikörpern gegen Oberflächenepitope auf reifen T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen

Zellen und B-Zellen, im Einzelnen CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 und CD235a. Hierbei sind alle Antikörper des *Lineage Markers* mit demselben Fluorochrom, Phycoerythrin (PE), gekoppelt, um alle markierten Zellen gleichzeitig in nur einem Fluoreszenzkanal ausschließen zu können. Die Lineage negativen (Lin^{neg}) Zellen werden mit Hilfe von Markern gegen weitere Oberflächenepitope in die verschiedenen Subsets unterteilt. Hierbei wurden Antikörper gegen CD34, CD38, CD45RA und CD123 eingesetzt, welche mit folgenden Fluorochromen gekoppelt waren: CD34 mit APC (Allophycocyanin), CD38 mit PerCP-Cy5.5 (Peridinin-Chlorophyll-Cyanin Konjugat 5.5), CD45RA mit ECD (Electron-coupled dye) und CD123 mit PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanin Konjugat 7).

Die mit diesen Antikörpern markierten, unterschiedlichen Vorläuferpopulationen innerhalb der CD34^+ Zellen konnten dann wie folgt definiert werden (Manz *et al.* 2002):

$$\text{HSC} = \text{Lin}^{\text{neg}}/\text{CD34}^+/\text{CD38}^{\text{low}}$$

$$\text{CMP} = \text{Lin}^{\text{neg}}/\text{CD34}^+/\text{CD38}^+/\text{CD45RA}^{\text{neg}}/\text{CD123}^+$$

$$\text{GMP} = \text{Lin}^{\text{neg}}/\text{CD34}^+/\text{CD38}^+/\text{CD45RA}^+/\text{CD123}^+$$

$$\text{MEP} = \text{Lin}^{\text{neg}}/\text{CD34}^+/\text{CD38}^+/\text{CD45RA}^{\text{neg}}/\text{CD123}^{\text{neg}}$$

Das Kürzel „ $^{\text{low}}$ “ beinhaltet hierbei sowohl negative als auch schwach positive Signale.

Die Färbungen zur Markierung der Orexinrezeptoren 1 und 2 erfolgt an $2-5 \times 10^5$ frisch angereicherten CD34^+ Zellen. Da die Antikörper gegen die Orexinrezeptoren nicht Fluorochrom-gekoppelt vorliegen, werden die Zellen in zwei Schritten gefärbt. Im ersten Schritt werden die Zellen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben gefärbt. Für die Färbung werden 20 μl des *Lineage Marker* in PE, 10 μl CD34 APC, 10 μl CD38 PerCP-Cy5.5, 10 μl CD45RA ECD, 3 μl CD123 PE-Cy7 und 10 μl eines ungekoppelten Antikörpers gegen den Orexinrezeptor 1 oder Orexinrezeptor 2 verwendet. Nach Abschluss dieser ersten Färbung wird die Zellsuspension dreimal in je 1 ml PBS gewaschen und wieder in 100 μl PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen ein zweites Mal gefärbt, wobei Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet werden, die an den Antikörpern gegen die Orexinrezeptoren 1 und 2 binden. Diese Sekundärantikörper sind zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen oder Kreuzreaktionen „highly cross-absorbed“ und wurden 1:1000 eingesetzt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal je

1 ml PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden direkt im Anschluss an die Färbung an einem MoFlowXDP Durchflusszytometer gemessen.

3.3.3.3 Bestimmung apoptotischer CD34⁺ HSPC mittels Antikörperfärbung gegen Annexin V und *aktivierte-Caspase 3*

Zur Bestimmung von apoptotischen CD34⁺ Zellen wurde zum einen das Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) nach Herstellerangaben verwendet und zum anderen wurden intrazelluläre Färbungen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) angefertigt, die wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt worden sind.

Mit Annexin V lassen sich Zellen, die sich im frühen Prozess der Apoptose befinden, detektieren. In der frühen Apoptose verlieren die Zellen die Asymmetrie ihrer Plasmamembran, wodurch das normalerweise intrazellulär lokalisierte Phospholipid Phosphatidylserin (PS) auf die Oberflächenmembran der Zellen gelangt. Annexin V wiederum ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS, wodurch apoptotische Zellen mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppeltem Annexin V durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können. Caspase 3 ist ein Protein, welches in der frühen Apoptose sowohl durch extrinsische (z.B. death ligand), als auch durch intrinsische (z.B. mitochondrial) Signalwege aktiviert wird (Salvesen 2002, Ghavami *et al.* 2009). Es kann als eines der Schlüsselproteine in der Apoptose bezeichnet werden, da es für die proteolytische Spaltung vieler an der Apoptose beteiligten Proteine, wie z. B. der poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1), verantwortlich gemacht wird (Fernandes-Alnemri *et al.* 1994).

3.3.3.4 Messung von intrazellulärem Kalzium im Durchflusszytometer

Um die intrazelluläre, zytosolische Kalziumkonzentration in der CD34⁺ Zellen durchflusszytometrisch zu messen wurde der fluoreszierenden Kalziumindikator Fluo4-Acetoxymethylester (Fluo4-AM) benutzt. Fluo4-AM ist in seiner Form als Acetoxymethylester lipophil und somit membrangängig, und kann daher bei einer Inkubation mit CD34⁺ Zellen durch die Zellmembran in das Zytosol diffundieren. Im Zytosol spalten unspezifische Esterasen den Farbstoff, wodurch er hydrophil wird. In seiner hydrophilen Form kann der Farbstoff die Zellmembran nicht mehr passieren und reichert sich im Zytosol an.

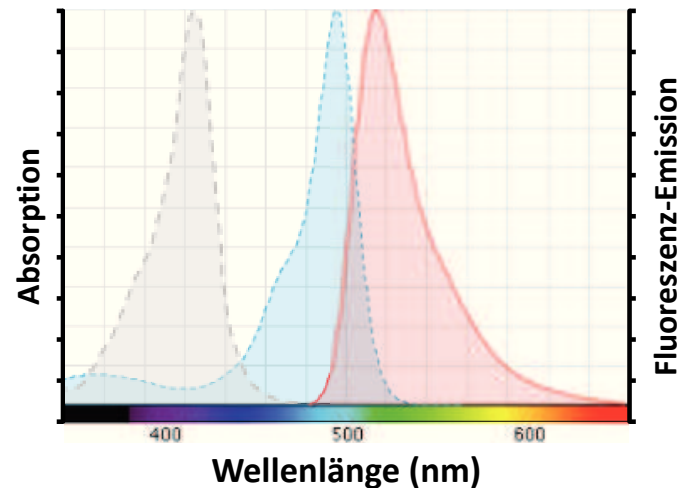


Abbildung 3.1: Absorptionsspektrum von Fluo4

Durch die Anwesenheit von Kalziumionen (Ca^{2+} -Ionen) verschiebt sich das Absorptionsspektrum von Fluo4 von 416 nm (grau) auf 494 nm (blau), das Emissionsmaximum liegt in beiden Fällen bei 516 nm (rot).

Um die zytosolische Kalziumkonzentration durchflusszytometrisch zu bestimmen nutzt man den Effekt, dass sich das Absorptionsspektrum von Fluo4 in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Kalziumionen (Ca^{2+} -Ionen) wie in Abbildung 3.1 dargestellt verschiebt. So hat kalziumfreies Fluo4 ein Absorptionsmaximum von 416 nm, welches sich in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen auf 494 nm verschiebt. Das Emissionsmaximum liegt sowohl kalziumfrei, als auch in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen bei 516 nm, wodurch die Intensität der Fluoreszenzemission ein Maß für die intrazelluläre, zytosolische Kalziumkonzentration darstellt.

Für den Versuch wurden frisch angereicherte CD34^+ Zellen im Brutschrank über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 in HPGM⁺⁺⁺⁺ mit oder ohne 0,1 μM Orexin kultiviert. Am nächsten Tag wurden pro Versuchsansatz wurden 5×10^5 angereicherte CD34^+ Zellen zuerst für 30 Minuten bei 4°C mit einem Antikörper gegen CD34 extrazellulär gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 50 μl HBSS-Puffer mit 10 μM Fluo4-AM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgenommen und bei 37°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden die Zellen mit dem 4-fachen Volumen HBSS-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 0,1% HSA aufgefüllt und für weitere 40 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 μl HEPES-Waschpuffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gewaschen, bei 500g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurde das Pellet in 300 μl HEPES-Waschpuffer resuspendiert und nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunkeln konnten die Proben durchflusszytometrisch gemessen werden. Bei den

Versuchen zum SDF1-vermittelten Kalziumsignal mit kurzer Stimulationsdauer von Orexin A und Orexin B (Kapitel 4.4.1.2, Abbildung 4.19b) wurde für die letzten 30 Minuten der 40 minütigen Inkubation das Orexin in einer Endkonzentration von $0,1\ \mu\text{M}$ zu dem Versuchsansatz gegeben.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung von HEPES-Waschpuffer

HEPES-Waschpuffer	
0,1%	BSA
10 mM	HEPES
5 mM	Glucose
in PBS mit $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	

Die Messung der gefärbten Zellen am Durchflusszytometer wurde über einen Zeitraum von 104 Sekunden durchgeführt. Dieser Zeitraum wurde dabei, wie in Abbildung 3.2 gezeigt, in 13 Zeitintervalle mit je 8 Sekunden aufgeteilt, wobei während der ersten beiden Intervallen (16 Sekunden) die mittlere Fluoreszenzemission als Basisfluoreszenz (BF) der Probe gemessen wurde. Im dritten Intervall (16-24 Sekunden) wurde die Probe stimuliert und über die Dauer der restlichen Intervalle wurde die Veränderung der Intensität Fluoreszenzsignals aufgezeichnet. Zur Auswertung der Messung wurde die Basisfluoreszenz der Probe auf 100% gesetzt und alle anderen Werte wurden in Relation dazu berechnet und grafisch dargestellt.

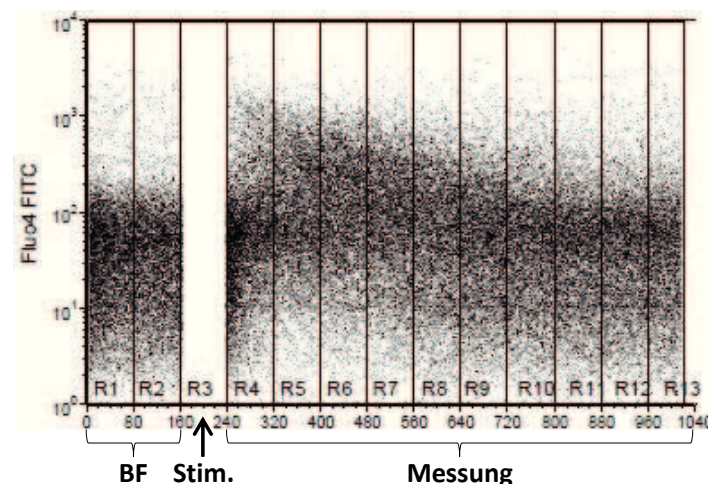


Abbildung 3.2: Kalziummessung am Durchflusszytometer

Einteilung der 104 Messsekunden in 13 Intervalle (R1-R13). Nach Ermittlung der Basisfluoreszenz (BF) wurde die Probe stimuliert (Stim.) und Veränderungen der Intensität des Fluoreszenzsignals über 80 Sekunden beobachtet (Messung).

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Proteinisolation mittels Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform

Extraktion

Die Extraktion mittels Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform ermöglicht sowohl die Isolation von Gesamt-RNA, -DNA als auch von -Protein aus Zellen oder Geweben. Für die Isolation von Gesamt-RNA und -Protein aus CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark wurden bis zu 3×10^6 Zellen anschließend an die in Abschnitt 3.2.4 beschriebene immunomagnetische Anreicherung in jeweils 200 µl PBS aufgenommen und im Anschluss mit 200 µl TriFast-Reagenz (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), in Chloroform-resistenten Gefäßen vermischt. Für adhärenzte Zellen in der Zellkultur wurden jeweils 1 ml TriFast-Reagenz pro 10 cm² Fläche (Zellkulturschale) bzw. 100 mg Gewebe verwendet und schnell homogenisiert. Nach erfolgter Homogenisation wurden die Proben für 5 min zur Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurde den Homogenisaten 0,2 ml Chloroform/ml Reagenz hinzugeben und für 15 sec kräftig geschüttelt. Anschließend an eine 3 minütige Inkubation bei RT wurden die Homogenisate bei $5000 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation entstehende Auftrennung enthält die Gesamt-RNA in der oberen, wässrigen Phase, DNA und Protein befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der Inter- und organischen-Phase. Die wässrige, die RNA beinhaltende Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.

Durch die Zugabe von 0,3 ml 98 %igem EtOH/ml Reagenz zu Inter- und organischer-Phase, wurde die DNA nach mehrfachem Invertieren in einer 3 minütigen Inkubation bei RT präzipitiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei $1500 \times g$ bei 4 °C für 5 min konnte der Phenol-EtOH-Überstand, der ausschließlich das Gesamt-Protein enthält, abgenommen werden. Der die Proteine beinhaltende Überstand wurde im nächsten Schritt mit jeweils 1,5 ml Isopropanol/ml Reagenz durch Invertieren vermischt. Nach anschließender, 10 minütiger Inkubation bei RT erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei $12000 \times g$ und 4 °C. Das die Proteine enthaltene Pellet wurde dann mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 %igem EtOH jeweils $3 \times$ gewaschen. Hierfür wurden die Proben 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min bei $12000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Nach der vollständigen Abnahme des Überstandes wurde das Protein-Pellet mit 98 %igem EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Protein-Pellets in 1 %iger

SDS-Lösung resuspendiert und auf 50 °C erhitzt. Die Messung der Konzentration erfolgte mittels Bradford-Analyse (Abschnitt 3.1.15). Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80 °C.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

(Bradford 1976)

Tabelle 3.11: *Bradford-Reagenz und Referenzlösung*

Bradford-Reagenz (1000 ml)	
100 mg	Serva-Blau G
In 85%	Ortho-Phosphorsäure (v/v)
460 ml	Ethanol
ad 1000 ml	A. dest.
Referenzlösung (1 ml)	
100 µl	A. dest.
900 µl	Bradford-Reagenz

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurden 100 µl der Probe mit 900 µl Bradford-Reagenz vermischt, 5 min bei RT inkubiert und die O.D._{595nm} spektralphotometrisch gegen die Referenzlösung ermittelt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit BSA-Standard-Lösungen (25, 50, 100, 150 µg/ml) vor jeder Messreihe neu erstellt wurde. Alternativ wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine zunächst in einer SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.3.1) aufgetrennt, anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Immunoblot-Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) transferiert (Abschnitt 3.4.3.2), somit immobilisiert und dann über einen indirekten Enzym-Immunversuch (Abschnitt 3.4.3.3) nachgewiesen.

3.4.3.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (nach Laemmli 1970)

Tabelle 3.12: *Zusammensetzung der Acrylamid-Stammlösung*

Acrylamid-Stammlösung (100 ml)

29,2 g	Acrylamid (37:1)
0,8 g	N,N'-Methylenbisacrylamid
ad 100 ml	A. dest.

Tabelle 3.13: *Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers*

SDS-Probenpuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10%	Glycerol (v/v)
4%	SDS (v/v)
2%	β -Mercaptoethanol (v/v)
0,03%	Bromphenolblau (w/v)

Tabelle 3.14: *Zusammensetzung des Elektrophorese-Laufpuffers*

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8)

25 mM	Tris-HCl
192 mM	Glycin
0,1%	SDS (w/v)

Tabelle 3.15: *Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamidgelen (PA-Gel)*
(die Mengenangaben gelten für zwei Gele mit den Maßen 7 cm [Länge] x 8 cm [Breite])

Lösungen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid-Stammlösung	0,83 ml	4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	---	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	---
A. dest.	2,77 ml	3,35 ml
10 % SDS (w/v)	50 μ l	100 μ l
10 % APS (w/v)	50 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Molekulargewichtsstandard:

Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit den Gewichtsgrößen 10; 15; 25; 35; 40; 50; 70; 100; 140; 260 kDa.

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt und die Proteine während der Elektrophorese aufgrund ihres ähnlichen Masse/Ladungsverhältnisses nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden für 5-10 min bei 95 °C denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur *Mini-PROTEAN Gelkammer II* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurde, während sich die Proben im Sammelgel befanden, eine Spannung von 100 V angelegt, welche nach dem Übertritt der Proben ins Trenngel auf 200 V erhöht wurde.

3.4.3.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

(nach Yuen *et al.* 1989)

Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Transferpuffers

Transferpuffer
48 mM Tris-HCl
39 mM Glycin (pH9,2)
20% Methanol (v/v)
0,0375% SDS (v/v)

Die mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.3.1) aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des „semi dry“-blot Moduls der Firma Labor-Brand/Micro-Bio-Tec (Gießen, Deutschland) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P; Millipore, Billerica, MA, USA) übertragen. Hierfür wurde das Modul an den *Elektrophoresis Power Supply EPS301* (Amersham Biosciences/GE-Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) angeschlossen. Vor dem Transfer wurde die Membran für 1 min in Methanol (absolut), dann für 5 min in A. dest. aktiviert. Anschließend wurde die Membran für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Auch das Gel wurde für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in einem „semi dry“-blot Modul unter Verwendung des oben aufgeführten Transferpuffers, der Apparaturaufbau ist der

Abbildung 3.3 zu entnehmen. Der Transfer wurde für 30 min bei 15 V bzw. 400 mA durchgeführt.

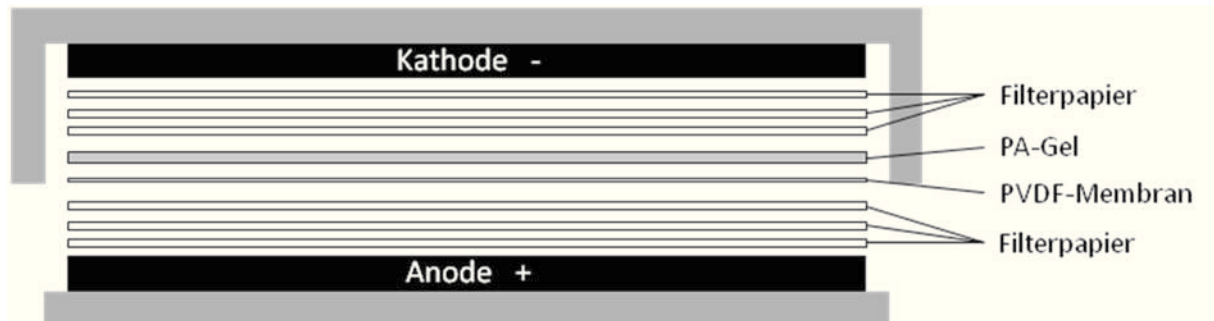


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des „semi dry“-Blotmoduls für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-PA-Gel auf eine PVDF-Membran

3.4.3.3 Immunodetektion mit dem NBT/BCIP-Detektionssystem

Tabelle 3.17: Zusammensetzung des Substratpuffers für das NBT/BCIP-System

Substratpuffer (NBT/BCIP)	
0,1 M	Tris
0,1 M	NaCl (pH9,5)
50 mM	MgCl ₂

PBST-Puffer: 0,2% Tween20 (v/v) in PBS-Puffer

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen wurden diese entweder für 1 Stunde bei 30 °C oder ÜN bei 4 °C in PBST-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurden die PVDF-Membranen zunächst für 10 min mit 25 ml PBST-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Erstantikörper, anti-PreproOrexin-AK der Firma Lifespan Biosciences (Seattle, WA, USA), 1:1000 verdünnt in PBST-Puffer inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Membranen anschließend dreimal 15 min in PBST-Puffer gewaschen. Nach der Waschung wurden die Membranen mit einem Alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Abcam, Cambridge, UK) in einer 1:5000 Verdünnung in PBST-Puffer für 1 h inkubiert und danach erneut dreimal 15 min mit

PBST-Puffer gewaschen. Das auf die Membranen gebundene Protein wurde dann über das NBT/BCIP-Detektionssystem (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nachgewiesen. Das NBT/BCIP-Detektionssystem besteht aus den beiden Komponenten NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluinsalz). BCIP stellt das Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase dar und reagiert während der Umsetzung in einer Redoxreaktion mit dem NBT. Während der Reaktion fallen beide Salze als unlösliche, blaue Farbstoffe aus. Zur Detektion des nachzuweisenden Proteins werden nach Herstellerangaben 200 µl der NBT/BCIP-Stammlösung in 10 ml Substratpuffer verdünnt und die Membran bis zur gewünschten Farbtintensität darin inkubiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Orexinrezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark

Damit die Neuropeptide Orexin A und Orexin B überhaupt einen Einfluss auf humane CD34⁺ hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ausüben können, müssen die Orexinrezeptoren auf diesen Zellen exprimiert sein. Die Expression der Orexinrezeptoren auf CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits im Jahr 2004 (Steidl *et al.* 2004) gezeigt werden. Da dies jedoch eine eher allgemeine Arbeit zu Neuromediatoren auf hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen war, sollte nun nochmals eine genauere Betrachtung mit Blick auf das Knochenmark und auf die funktionellen Auswirkungen einer Aktivierung der Orexinrezeptoren auf die CD34⁺ Zellen erfolgen. Hierzu wurden von 35 gesunden Probanden CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark, wie in Material und Methoden beschrieben, erst mittels Dichtezentrifugation angereichert und dann über eine immunmagnetische Aufreinigung isoliert. Die so isolierten CD34⁺ Zellen wurden danach mit Hilfe von Fluoreszenzchrom gekoppelten Antikörpern bezüglich der Oberflächenexpression der Orexinrezeptoren 1 und 2 im Durchflusszytometer analysiert.

4.1.1 Die Expression der Rezeptoren auf frühen und späten Progenitoren

Zunächst wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen die Expression der Orexinrezeptoren auf den frühen und späten Progenitoren betrachtet. Hierbei sind nach Punzel *et al.* die CD34⁺/CD38^{low} Zellen (HSC) als frühe Progenitoren und die CD34⁺/CD38⁺ Zellen als späte Progenitoren (Punzel *et al.* 2002) definiert worden. In Abbildung 4.1 ist die Gating-Strategie anhand einer repräsentativen Probe dargestellt.

Auf frühen CD34⁺/CD38^{low} Progenitoren konnte hierbei eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von $4598,62 \pm 706,36$ für den Orexinrezeptor 1 und $4399,48 \pm 913,68$ für den Orexinrezeptor 2 detektiert werden. Auf späten CD34⁺/CD38⁺ Progenitoren wurde eine MFI von $2792,33 \pm 359,45$ für den Orexinrezeptor 1 und $2682,37 \pm 434,62$ für den Orexinrezeptor 2 gemessen. Beide Orexinrezeptoren sind auf den frühen Progenitorzellen signifikant stärker exprimiert, als auf den späteren CD34⁺/CD38⁺ Zellen (OxR1 $p=0,012$; OxR2 $p=0,026$). Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die Stärke der Expression der

Orexinrezeptoren auf hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen eventuell differenzierungsabhängig sein könnte und mit fortschreitender Differenzierung der Zellen schwächer werden würde. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde weiterhin die Expressionsstärke der Orexinrezeptoren auf den verschiedenen Subsets innerhalb der CD34⁺ Zellpopulation untersucht.

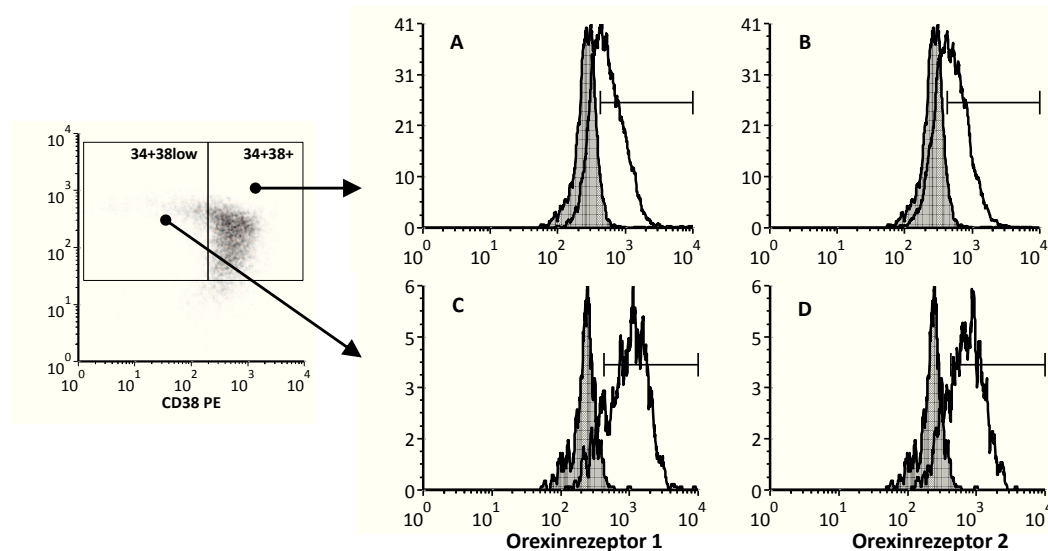


Abbildung 4.1: Expression der Orexin Rezeptoren 1 und 2 auf frühen und späten Progenitoren

Repräsentative Darstellung der Expression der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf späten (A und B) und auf frühen Progenitorzellen (C und D).

4.1.2 Die Expression der Rezeptoren auf Subsets

Um die Expression der Rezeptoren auf den Subsets der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen zu messen, wurden die CD34⁺ Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen diverse Linienmarker (Lineage), CD45RA und CD123 inkubiert. Hierdurch war es möglich die CD34⁺ Zellen anhand der vorhandenen Markerkonstellation pro Zelle in die, in der Einleitung bereits erwähnten, folgenden Subpopulationen zu unterteilen:

HSC (lin⁻/CD34⁺/CD38^{low})

CMP (lin⁻/CD34⁺/CD38⁺/CD45RA^{low}/CD123⁺)

GMP (lin⁻/CD34⁺/CD38⁺/CD45RA⁺/CD123⁺)

MEP (lin⁻/CD34⁺/CD38⁺/CD45RA^{low}/CD123^{low})

Die Gating-Strategie zur Messung der Rezeptorexpression auf den verschiedenen Subpopulationen bzw. Subsets der CD34⁺ Zellen ist in Abbildung 4.2 an einem repräsentativem Beispiel veranschaulicht.

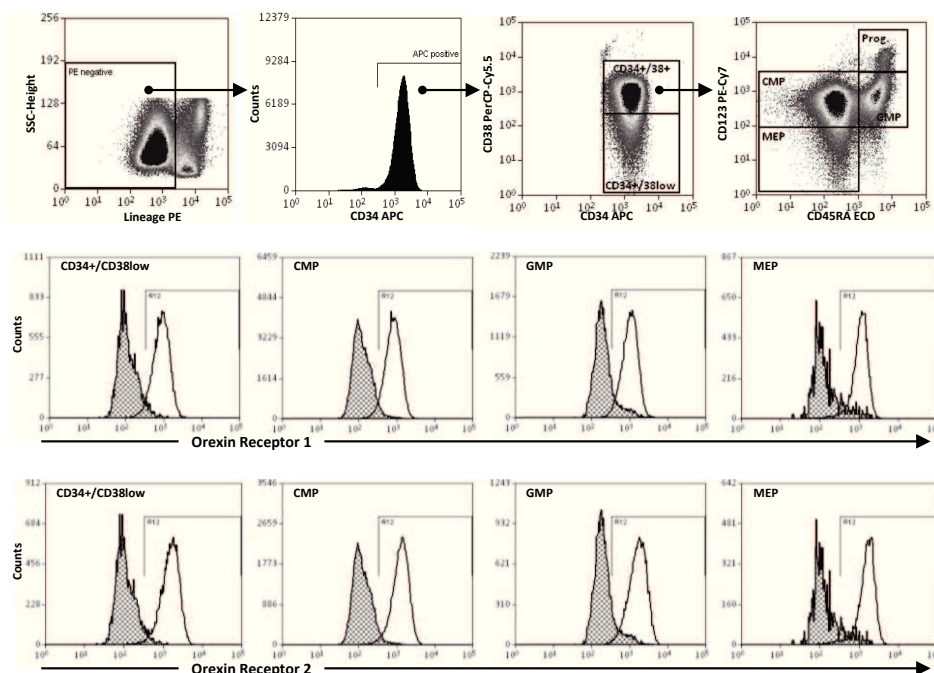


Abbildung 4.2: Expression der Orexin Rezeptoren 1 und 2 auf Subsets hämatopoietischer CD34⁺ HSPC
Repräsentative Darstellung der Expression der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf Subsets der CD34⁺ Zellpopulation

Die Subsetanalysen zeigten, dass die Orexinrezeptoren tatsächlich in allen Subsets unterschiedlich stark exprimiert sind. So ergaben die Messungen für den Orexinrezeptor 1 mittlere Fluoreszenzintensitäten von $4598,62 \pm 706,36$ auf der HSC-Population, $2572,82 \pm 222,30$ auf CMPs, $3271,41 \pm 394,70$ auf GMPs und $1231,16 \pm 84,69$ auf den MEPs (Abbildung 4.3).

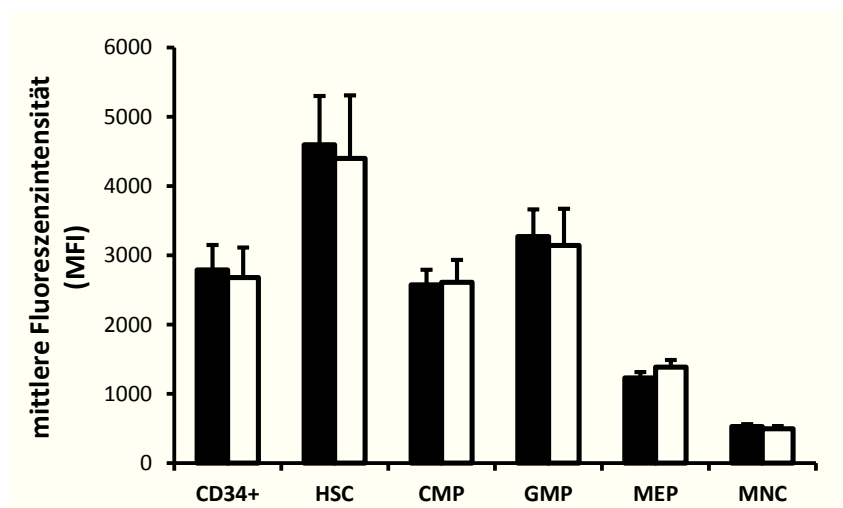


Abbildung 4.3: Expressionsstärke der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ HSPC-Subsets und MNC
Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Orexinrezeptoren 1 (schwarz) und 2 (weiß) auf den Subsets von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen. Es sind Mittelwerte und SEM von $n=5$ bzw. $n=3$ (MNC) Experimenten angegeben. Die Signifikanzen sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Die durchschnittlichen MFIs für den Orexinrezeptor 2 betrugen auf HSCs $4399,48 \pm 913,68$, auf CMPs $2612,43 \pm 324,74$, auf GMPs $3142,68 \pm 533,98$ und auf MEPs $1385,96 \pm 105,43$. Auf der Gesamtpopulation der mononukleären Zellen (MNC) betrug die MFI noch $526,59 \pm 40,99$ für den Orexinrezeptor 1 und $496,51 \pm 43,01$ für den Orexinrezeptor 2 (Abbildung 4.3).

Vergleicht man die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Rezeptoren innerhalb der verschiedenen CD34⁺ HSPC-Subsets, stellt man in fast allen Subsets eine signifikant unterschiedlich starke Expression beider Rezeptoren fest. Nicht-signifikante Änderungen zeigten sich lediglich beim Vergleich der Expressionsstärken zwischen der CD34⁺ Gesamtzellpopulation und den CMPs bei beiden Rezeptoren und beim Vergleich der Expressionsstärke des Orexinrezeptor 2 auf den CMPs mit den GMPs.

Tabelle 4.1: Signifikanzen der Expressionsstärken der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ HSPC-Subsets

Orexin Rezeptor 1						
Subset	CD34 ⁺	HSC	CMP	GMP	MEP	MNC
CD34 ⁺		0,012	0,26	0,0047	0,0054	0,036
HSC	0,012		0,024	0,04	0,0067	0,0092
CMP	0,26	0,024		0,025	0,00064	0,022
GMP	0,0047	0,04	0,025		0,003	0,032
MEP	0,0054	0,0067	0,00064	0,003		0,015
MNC	0,036	0,0092	0,022	0,032	0,015	
Orexin Rezeptor 2						
Subset	CD34 ⁺	HSC	CMP	GMP	MEP	MNC
CD34 ⁺		0,026	0,62	0,022	0,019	0,015
HSC	0,026		0,041	0,039	0,022	0,043
CMP	0,62	0,041		0,089	0,0071	0,023
GMP	0,022	0,039	0,089		0,017	0,019
MEP	0,019	0,022	0,0071	0,017		0,0021
MNC	0,015	0,043	0,023	0,019	0,0021	

In dieser Tabelle sind die Signifikanzen der Unterschiede in den Expressionsstärken der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf den verschiedenen Subsets der CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen als p-Werte aufgelistet. Die dunkelgrau dargestellten p-Werte sind nicht signifikant. Die p-Werte wurden mit einem zweiseitigen, gepaarten T-Test über eine Stichprobenanzahl von n=5 bzw. n=3 (MNC) ermittelt.

Zur besseren Übersicht sind die Signifikanzen der Unterschiede in der Expressionsstärke beider Orexinrezeptoren innerhalb der verschiedene CD34⁺ HSPC-Subsets als p-Werte in Tabelle 4.1 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hypothese der differenzierungsabhängigen Expression der Orexinrezeptoren durch diese Ergebnisse weiter untermauert wird, da in den frühen Progenitoren (HSC) die Expression beider Orexinrezeptoren am höchsten ist, während im weiteren Verlauf der Differenzierung der Zellen bis hin zu MEP's und MNCs die Expression der Rezeptoren immer weiter abnimmt.

4.2 Funktionelle Untersuchungen von CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark nach Stimulation mit Orexin A und Orexin B

Nachdem die Expression beider Orexinrezeptoren auf CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarkes, sowie auf deren Subsets gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die beiden Rezeptoren auf den CD34⁺ Zellen auch funktionell aktiv sind und welche Auswirkungen eine Aktivierung der Rezeptoren auf die CD34⁺ Zellen haben könnte. Daher sind Analysen zu einer Reihe von wichtigen funktionellen Eigenschaften hämatopoietischer Stammzellen durchgeführt worden. Für die funktionellen Analysen wurden die CD34⁺ Zellen jeweils mit den Agonisten Orexin A oder Orexin B alleine, oder mit Orexin A zusammen mit dem Orexinrezeptor 1 Antagonisten SB334867 stimuliert. Durch den Antagonisten SB334867 lässt sich die Signalweiterleitung am Orexinrezeptor 1 unterbinden. Wie in der Einleitung bereits beschrieben wirkt Orexin A gleichermaßen auf den Orexinrezeptor 1 und den Orexinrezeptor 2. Die gemeinsame Stimulation mit Orexin A und SB334867 und somit der Blockade des Orexinrezeptor 1 sollte genauere Hinweise auf den Einfluss der einzelnen Rezeptoren erbringen. Zusätzlich wurden bei den funktionellen Analysen noch Versuche mit CD34⁺ HSPC durchgeführt, welche mit Pertussis Toxin vorinkubiert waren. Pertussis Toxin ist ein Exotoxin des Bakteriums *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens, und unterbindet durch ADP-Ribosylierung von inhibitorischen G-Proteinen (G_i) spezifisch die Signalweiterleitung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, welche an ein G_i-Protein gebunden sind. Durch die zusätzliche Inkubation mit Pertussis Toxin in einigen der durchgeführten funktionellen Assays sollten Erkenntnisse über die G-Protein Kopplung der Orexinrezeptoren bei CD34⁺ HSPC erlangt werden.

4.2.1 Analysen zur Adhäsionsfähigkeit

Die Fähigkeit zur Adhäsion ist für hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von größter Bedeutung, da diese sie befähigt in der Stammzellnische zu adhären und mit dieser zu interagieren. Außerdem spielt die Fähigkeit zur Adhäsion als Grundlage der Migration eine

entscheidende Rolle. Zur Überprüfung, ob die Stimulation von $CD34^+$ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen mit Orexin A oder Orexin B Auswirkungen auf die Adhäsionsfähigkeit dieser Zellen hat, wurden Adhäsionsversuche auf Fibronektin und Kollagen beschichteten 24-Well Platten durchgeführt. Hierzu wurden je Ansatz 5000 angereicherte $CD34^+$ HSPC aus Knochenmark wie in Material und Methoden beschrieben in beschichtete 24-Well Platten ausplattiert und drei Stunden mit und ohne Liganden kultiviert. Die adhären gewordenen Zellen wurden anschließend im Phasenkontrastmikroskop gezählt.

Im Mittel sind von 5000 eingesetzten unstimulierten $CD34^+$ Zellen aus dem Knochenmark $21,15\% \pm 1,7\%$ auf Fibronektin adhären geworden. Auf Kollagen waren es mit $16,22\% \pm 1,04\%$ signifikant weniger adhären Zellen ($p=0,033$). Mit Pertussis Toxin sind auf Fibronektin $21,25\% \pm 1,71\%$ und auf Kollagen $16,66\% \pm 1,1\%$ der eingesetzten Zellen adhären geworden. Auch hier sind es signifikant weniger Zellen, die auf Kollagen haften bleiben ($p=0,048$). Dieser Effekt scheint allerdings auf den unterschiedlichen Beschichtungen der Platten zu beruhen, denn innerhalb der gleich beschichteten Platten gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl adhären Zellen mit oder ohne Pertussis Toxin Behandlung (Abbildung 4.4). Die Adhäsionsfähigkeit der $CD34^+$ Zellen wird hier also durch Pertussis Toxin nicht beeinträchtigt.

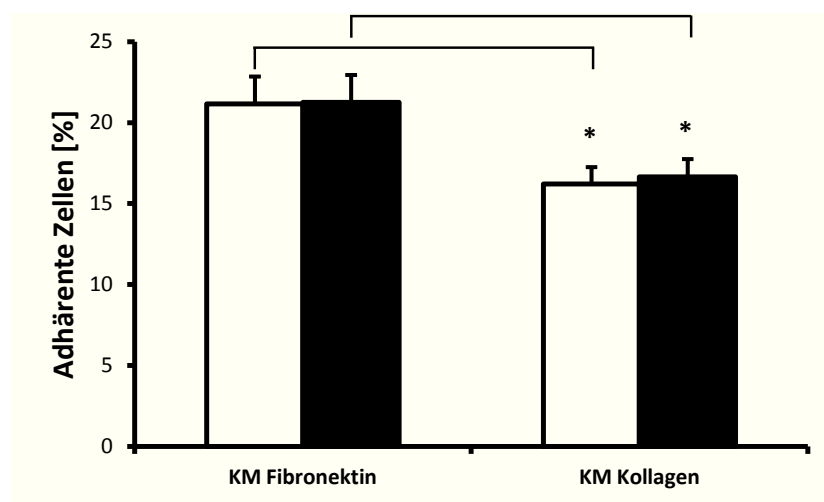


Abbildung 4.4: Prozentuale Adhäsionsrate von unstimulierten $CD34^+$ HSPC.

Dargestellt ist die prozentuale Adhäsionsfähigkeit in Bezug auf die eingesetzte Gesamtzellzahl unstimulierter $CD34^+$ Zellen aus Knochenmark (KM) auf Fibronektin und Kollagen beschichteten Platten mit (schwarz) und ohne Pertussis Toxin (weiß). Es sind Mittelwerte und SEM für $n=6$ Experimente angegeben (* $p<0,05$).

Durch die Stimulation mit Orexin A reduzierte sich die Adhärenz von $CD34^+$ HSPC aus dem Knochenmark auf Fibronektin in Relation zur Kontrolle hoch signifikant um $47,31\% \pm 4,73\%$ ($p=0,00017$) und bei Stimulation mit Orexin B um $27,11\% \pm 3,11\%$ ($p=0,00033$). Die gemeinsame Stimulation von Orexin A und SB334867 zeigte in Relation zur Kontrolle eine

nicht signifikante Verminderung der adhärenenten Zellen um $2,82\% \pm 0,78\%$ und somit eine hoch signifikante Aufhebung des Effektes von alleiniger Orexin A Stimulation ($p=0,00089$). Wurden die $CD34^+$ Zellen vor der eigentlichen Stimulation mit Pertussis Toxin inkubiert ergaben sich bei keinem der Versuchsansätze signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten der $CD34^+$ Zellen (Abbildung 4.5).

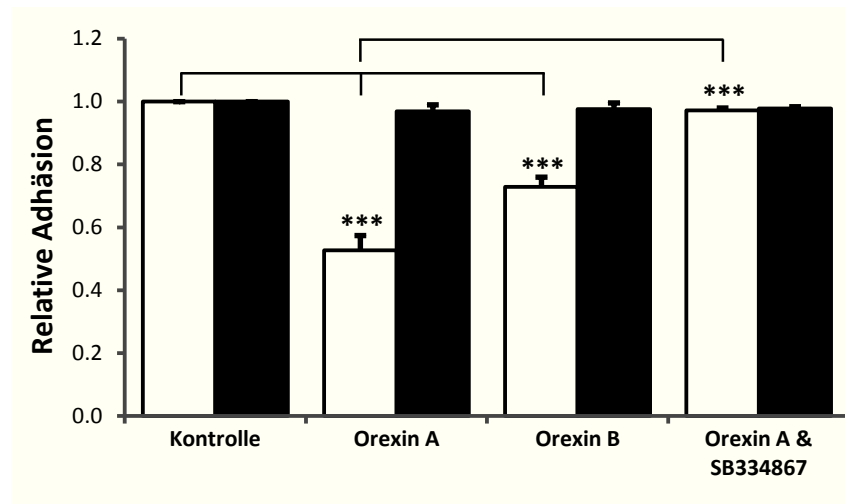


Abbildung 4.5: Relative Adhäsion von HSPC auf Fibronektin beschichteten Platten

Dargestellt ist die Adhäsionsfähigkeit von stimulierten $CD34^+$ Zellen in Relation zur Kontrolle. Es wurden Versuche mit (schwarz) und ohne Pertussis Toxin (weiß) durchgeführt. Die Signifikanzen von OxA und OxB sind in Bezug zur Kontrolle, die Signifikanz bei OxA+SB334867 bezieht sich auf OxA (***) $p>0,001$). Für die Kontrolle, Orexin A und Orexin B sind Mittelwert und SEM aus $n=6$, für Orexin A + SB334867 aus $n=4$ Experimenten angegeben.

Auch auf Kollagen beschichteten Platten reduzierte sich die Adhäsionsfähigkeit von $CD34^+$ HSPC aus dem Knochenmark bei Stimulation mit Orexin A und Orexin B hoch signifikant. Nach der Stimulation mit Orexin A adhärten $41,43\% \pm 5,69\%$ ($p=0,00077$) weniger Zellen in Relation zur Kontrolle, bei Orexin B waren es $22,44\% \pm 3,34\%$ ($p=0,0011$) weniger.

Wie auch bei den Versuchen mit den Fibronektin beschichteten Platten hebt sich der Effekt, den Orexin A auf die Zellen aus dem Knochenmark hat, bei vorheriger Zugabe des Antagonisten SB334867 vollständig auf ($p=0,0026$). Wird vor Orexin A Stimulation mit dem Antagonisten inkubiert werden lediglich $0,34\% \pm 1,27\%$ weniger Zellen adhärenent als in der Kontrolle. Wie bei den Versuchen mit Fibronektin beschichteten Platten wurden auch auf den Kollagen beschichteten Platten alle Effekte, die mit Orexin A und Orexin B beobachtet werden konnten, durch die vorherige Inkubation mit Pertussis Toxin aufgehoben (Abbildung 4.6).

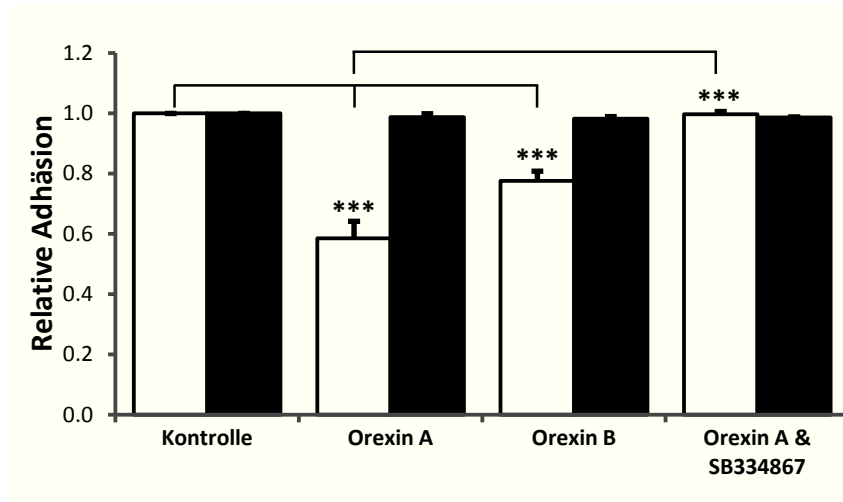


Abbildung 4.6: Relative Adhäsion von HSPC auf Kollagen beschichteten Platten

Dargestellt ist die Adhäsionsfähigkeit von stimulierten $CD34^+$ Zellen in Relation zur Kontrolle. Es wurden Versuche mit (schwarz) und ohne Pertussis Toxin (weiß) durchgeführt. Die Signifikanzen von OxA und OxB sind in Bezug zur Kontrolle, die Signifikanz bei OxA+SB334867 bezieht sich auf OxA (***) ($p < 0,001$). Für die Kontrolle, Orexin A und Orexin B sind Mittelwert und SEM aus $n=6$, für Orexin A + SB334867 aus $n=5$ Experimenten angegeben.

Diese, durch den Einsatz von Pertussis Toxin bedingte, nahezu vollständige Aufhebung des Effektes von Orexin A und Orexin B, sowohl auf Fibronektin beschichteten als auch auf Kollagen beschichteten Platten lässt auf eine Bindung beider Rezeptoren mit einem inhibitorischen G-Protein schließen.

4.2.2 Analysen zur Migrationsfähigkeit

Da die Adhäsionsfähigkeit der $CD34^+$ Zellen durch die Stimulierung mit Orexin A und Orexin B stark vermindert war, lag die Vermutung nahe, dass auch deren Migrationsfähigkeit eingeschränkt ist. Um dies zu überprüfen wurden Migrationsversuche mit $CD34^+$ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen durchgeführt. Hierzu wurden 150.000 angereicherte $CD34^+$ Zellen aus dem Knochenmark analog zu den oben beschriebenen Adhäsionsversuchen über Nacht stimuliert. Am Folgetag wurden 1×10^5 $CD34^+$ Zellen 3 Stunden in eine 24-Well Transwellplatte überführt worden, um gegen das chemotaktisch wirkende Cytokin SDF1 zu migrieren. Auch diese Versuche wurden, wie auch die Adhäsionsversuche, zusätzlich mit Pertussis Toxin durchgeführt, um Hinweise auf die G-Protein Kopplung der Orexinrezeptoren in $CD34^+$ HSPC zu erhalten.

Die mittlere Migrationsrate der unbehandelten Kontrollzellen betrug $7,6\% \pm 1,47\%$. Eine Behandlung der $CD34^+$ Zellen mit Pertussis Toxin führte zu einer signifikanten Verminderung ($p=0,008$) des Anteils migrierender Zellen auf $1,83\% \pm 0,25\%$ (Abbildung 4.7). Dass der

Anteil wandernder Zellen bei der Behandlung mit Pertussis-Toxin stark fällt ist nicht weiter verwunderlich, da die SDF1-vermittelte Migration über den Chemokinrezeptor CXCR4 gesteuert wird. Dieser vermittelt im Normalfall sein Signal über ein inhibitorisches G-Protein, welches jedoch durch das Pertussis-Toxin unterbunden wird.

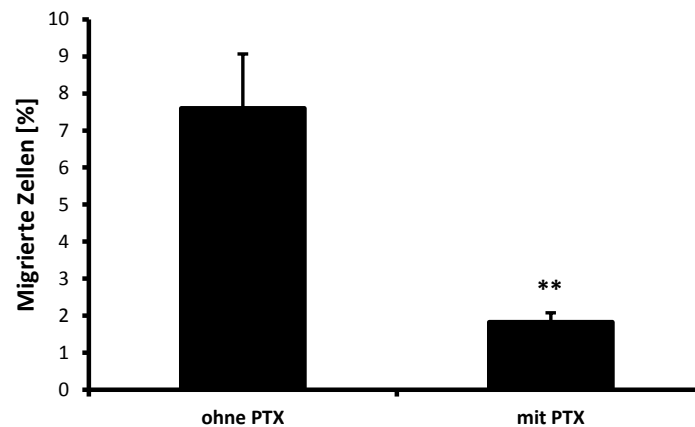


Abbildung 4.7: Prozentuale Migrationsrate unstimulierten CD34⁺ HSPC.

Dargestellt ist die Migrationsrate von unstimulierten CD34⁺ Zellen aus Knochenmark (KM) mit und ohne Pertussis Toxin. Es sind Mittelwert und SEM für n=7 Experimente angegeben (** p<0,01).

Durch die Stimulation mit Orexin A, wie auch durch die Stimulation mit Orexin B reduzierte sich die Migrationsrate der CD34⁺ Zellen hoch signifikant. Bei Stimulation mit Orexin A und Orexin B wanderten im Mittel 51,06% ± 7,56% und 47,39% ± 7,58% weniger Zellen als in der unstimulierten Kontrolle (p=0,00034 und p=0,00051). Die gemeinsame Stimulation mit dem Antagonisten und Orexin A reduzierte den Effekt von alleiniger Orexin A Gabe zwar nicht signifikant (p=0,16), aber es zeigte sich ein deutlicher Trend zur Aufhebung des durch Orexin A vermittelten Effektes. Es wanderten hierbei im Mittel 15,91% ± 25,54% weniger CD34⁺ Zellen als in der Kontrolle (Abbildung 4.8).

Wurden die CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark vor dem Versuch mit Pertussis Toxin stimuliert fiel die Reduktion der Migrationsrate bei Stimulation mit Orexin A und Orexin B nicht mehr ganz so hoch aus, wie ohne Pertussis Toxin, aber sie ist noch immer signifikant. Orexin A bewirkt hier bei Pertussis Toxin stimulierten CD34⁺ Zellen eine Reduktion der Migrationsrate um 25,94% ± 7,32% (p=0,0087), Orexin B bewirkt ein Reduktion um 13,74% ± 5,68% (p=0,04). Der von Orexin A vermittelte Effekt konnte durch die Gabe des Orexin Rezeptor 1 Antagonisten aufgehoben werden, wodurch die Migrationsrate bei gemeinsamer Gabe steigt nicht signifikant um 2,66% auf 102,66% ± 10,58% in Relation zur Kontrolle (Abbildung 4.8).

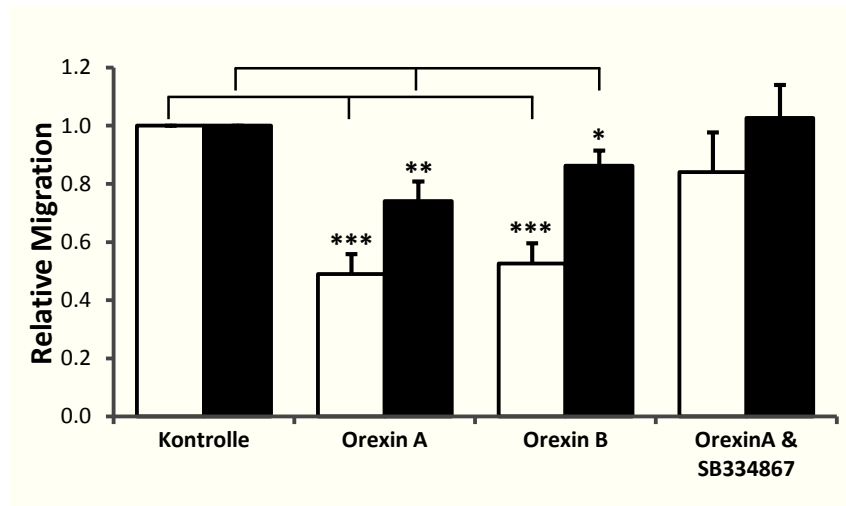


Abbildung 4.8: Relative Migration von HSPC aus Knochenmark.

Dargestellt ist die Migrationsfähigkeit von stimulierten $CD34^+$ Zellen in Relation zur Kontrolle. Es wurden Versuche mit (schwarz) und ohne Pertussis Toxin (weiß) durchgeführt. Die Signifikanzen von OxA und OxB beziehen sich auf die Kontrolle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p > 0,001$). Für die Kontrolle, Orexin A und Orexin B sind Mittelwert und SEM aus $n=7$, für Orexin A + SB334867 aus $n=6$ Experimenten angegeben.

Auch bei den Migrationsversuchen könnte die Verminderung des Orexin vermittelten Effektes durch Pertussis Toxin einen Hinweis darauf geben, dass zumindest einer Orexinrezeptoren in $CD34^+$ HSPC an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist, wobei zu beachten bleibt, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 selbst auch schon an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist und wie in Abbildung 4.7 gezeigt durch PTX größtenteils inhibiert wird.

4.2.3 Analysen zur morphologischen Polarität

Da sowohl die Adhäsion, als auch die Migration bei Orexin stimulierten $CD34^+$ Zellen stark eingeschränkt war, stellte sich die Frage, ob auch schon die Polarität der $CD34^+$ Zellen, welche als eine Grundvoraussetzung für die Adhäsion und auch der Migration gilt, durch die Stimulation mit Orexin herabgesetzt wird. Daher wurden Versuche zur morphologischen Zellpolarität durchgeführt. Hierbei wurden 25000 aus Knochenmark angereicherte $CD34^+$ Zellen in 0,5 ml HPGM⁺⁺⁺⁺ mit den entsprechenden Zusätzen bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert und an Tag 3 ausgezählt. Aus den gezählten Zellen konnte dann der Prozentsatz polarer Zellen errechnet werden. Pro Ansatz wurden drei Übersichtsaufnahmen aus verschiedenen Bereichen des Wells gemacht und deren Werte gemittelt.

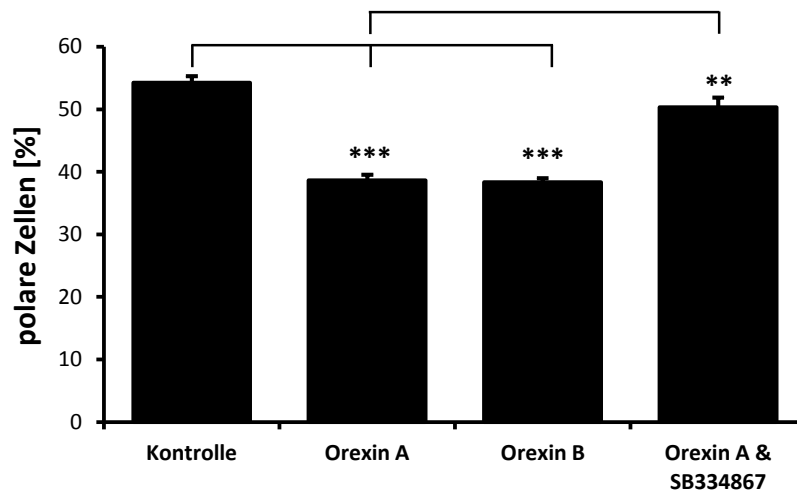


Abbildung 4.9: Prozentuale Polaritätsrate von unstimulierten CD34⁺ HSPC aus KM

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von polaren Zellen nach drei Tagen Kultur in HPGM^{****} mit und ohne die angegebenen Zusätze. Die Signifikanzen von OxA und OxB sind in Bezug zur Kontrolle, die Signifikanz bei OxA+SB334867 bezieht sich auf OxA (** p<0,01; *** p>0,001). Es sind Mittelwerte und SEM für n=6 Experimente angegeben.

In der Kontrolle wiesen im Mittel 54,27% ± 1,02% der eingesetzten CD34⁺ Zellen eine polare Struktur auf. Bei den mit Orexin stimulierten Ansätzen reduzierte sich der prozentuale Anteil polarer CD34⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant auf 38,64% ± 0,92% bei Orexin A (p=0,000053) und auf 38,37% ± 0,64% bei Orexin B (p=0,000041) stimulierten CD34⁺ Zellen. In dem Ansatz mit Orexin A und dem Orexin Rezeptor 1 Inhibitor SB 334867 nahm der Anteil polarer Zellen zwar auch noch bis auf 48,69% ± 1,72% ab, jedoch ist diese Abnahme mit einem p-Wert von 0,09 nicht mehr signifikant zur Kontrolle. Der Vergleich zwischen den mit Orexin A und Orexin A & SB334867 stimulierten Ansätzen zeigt allerdings, dass durch die Zugabe von SB334867 der Effekt von Orexin A signifikant unterdrückt wird (p=0,0036) (Abbildung 4.9).

4.2.4 Analysen zum programmierten Zelltod (Apoptose)

Um die Auswirkungen von Orexin A und Orexin B auf die Apoptose von hämatopoietischen Stamm und Progenitorzellen zu analysieren wurden CD34⁺ Zellen mit und ohne Zugabe von Thapsigargin, sowie mit und ohne Orexin A und Orexin B kultiviert. Thapsigargin wurde hierbei als Positivkontrolle genutzt, da es ATPase abhängige Kalziumtransporter im endoplasmatischen Retikulum inhibiert, wodurch letztlich Apoptose ausgelöst wird. Außerdem wurde Thapsigargin mit Orexin A bzw. Orexin B zusammen eingesetzt, um festzustellen, ob Orexin die Induktion der Apoptose durch Thapsigargin fördert oder dieser entgegenwirkt. Um die Apoptose der CD34⁺ Zellen zu messen, wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre oberflächliche Annexin V und intrazelluläre Caspase-3

Expression untersucht. Die Färbungen wurden an mit Orexin A und Orexin B stimulierten, sowie an unstimulierten CD34⁺ Zellen ohne und nach 24 bzw. 48 stündiger Inkubation mit Thapsigargin durchgeführt.

Bei den unstimulierten CD34⁺ Zellen konnten $9,4\% \pm 1,24\%$ Annexin V positive Zellen gemessen werden. Mit Orexin A und Orexin B waren es $9,75\% \pm 1,03\%$ bzw. $11,79\% \pm 1,19\%$. Nach 24 stündiger Thapsigargin Inkubation stieg der Anteil der Annexin V positiven Zellen in der unstimulierten Kontrolle signifikant auf $58,20\% \pm 11,54\%$ ($p=0,035$) und nach 48 stündiger Inkubation ebenfalls signifikant auf $72,43\% \pm 14,42\%$ ($p=0,022$).

Bei Orexin A und Orexin B stimulierten CD34⁺ Zellen lag der Anteil Annexin V positiver Zellen nach 24 stündiger gleichzeitiger Inkubation mit Thapsigargin bei $58,17\% \pm 9,17\%$ bzw. $65,25 \pm 12,39\%$. Wurden die CD34⁺ Zellen für 48 Stunden mit Thapsigargin inkubiert lag der Anteil Annexin V positiver Zellen in der Kontrolle bei $72,43\% \pm 14,42\%$, mit Orexin A bei $75,41\% \pm 12,48\%$ und mit Orexin B bei $74,15\% \pm 13,58\%$. Es konnte somit kein Einfluss von Orexin A oder Orexin B auf die Apoptose der CD34⁺ Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.10a).

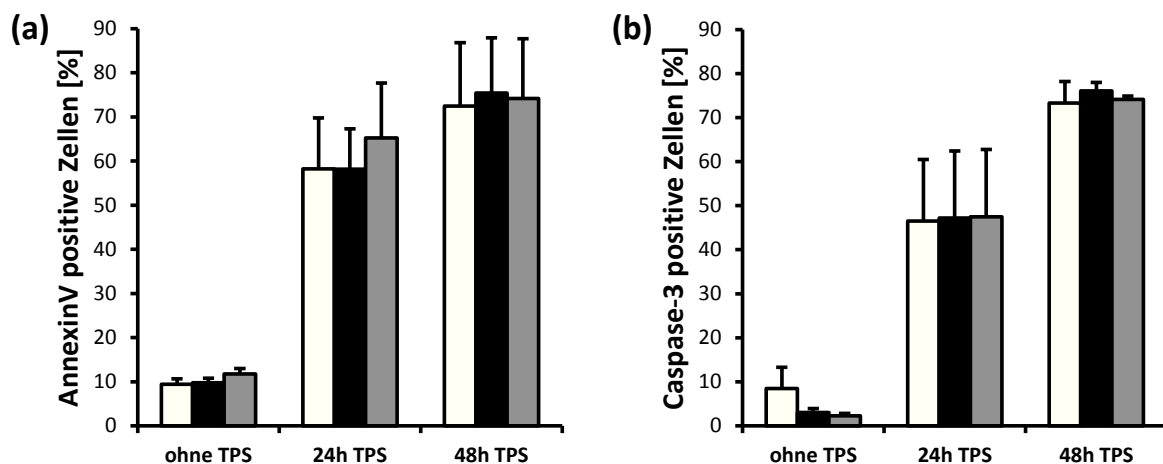


Abbildung 4.10: Anteile Annexin V und Caspase-3 positiver Zellen unter Einfluss von Orexin

Dargestellt sind die prozentualen Anteile Annexin V (a) und Caspase-3 positiver Zellen (b) unter Orexin Einfluss bei Thapsigargin (TPS) Stimulation. Die unstimulierten Kontrollzellen sind weiß, die Orexin A stimulierten Zellen schwarz und die Orexin B stimulierten Zellen grau dargestellt. Es sind Mittelwert und SEM aus $n=4$ (ohne TPS und 24h TPS) sowie $n=3$ (48h TPS) Experimenten angegeben.

Bei den Caspase-3 Messungen wurden vergleichbare Ergebnisse wie bei den Messungen zu Annexin V erzielt. Der Anteil Caspase-3 positiver CD34⁺ Zellen betrug in der unstimulierten Kontrolle $8,51\% \pm 4,78\%$, bei Stimulation mit Orexin A und Orexin B sank der Anteil auf $3,01\% \pm 0,91\%$ bzw. $2,25\% \pm 0,59\%$ positiver Zellen. Mit Thapsigargin Inkubation für 24

Stunden stieg der Anteil apoptotischer Zellen in den unstimulierten Kontrollzellen auf $46,5\% \pm 14,01\%$, mit Orexin A und Orexin B Stimulation lag er bei $47,18\% \pm 15,25\%$ und $47,5\% \pm 15,27\%$. Nach 48 stündiger Thapsigargin Gabe stieg der Anteil Caspase-3 positiver Zellen signifikant auf $73,33\% \pm 4,89\%$ in der Kontrolle ($p=0,025$) und auf $76,09\% \pm 1,88\%$ bzw. $74,12\% \pm 0,76\%$ bei Stimulation mit Orexin A bzw. Orexin B. Trotz der um über 50% geringeren Expression von Caspase-3 in den Orexin stimulierten Zellen ohne Thapsigargin Inkubation gibt es keinen signifikanten, Orexin bedingten Effekt auf die Apoptose von $CD34^+$ Zellen (Abbildung 4.10b).

4.2.5 Analysen zur Proliferation

Um die Auswirkungen der Neuropeptide Orexin A und B auf die Proliferationsrate von $CD34^+$ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen wurden frisch isolierte $CD34^+$ Zellen mit Orexin A und Orexin B stimuliert und über sieben Tage in HPGM⁺⁺⁺⁺ Medium im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden unstimulierte $CD34^+$ Zellen genutzt. Während der sieben täglichen Kulturdauer wurde alle 24 Stunden die Zellzahl mit einem Casy-Zellzählgerät bestimmt. Um die relative Proliferationsrate der Zellen darzustellen wurde der Quotient aus der Zellzahl des jeweiligen Tages und der von Tag 0 gebildet.

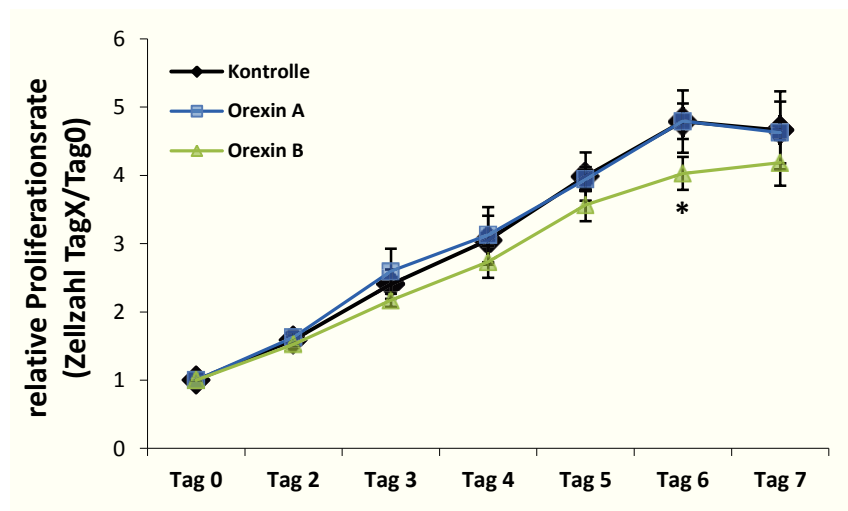


Abbildung 4.11: Relative Proliferationsraten von $CD34^+$ HSPC während 7-tägiger Kultur

Frisch isolierte $CD34^+$ Zellen wurden für 7 Tage in Kultur genommen und mit Orexin A (blau) oder Orexin B (grün) stimuliert. Als Kontrollzellen dienen unstimulierte $CD34^+$ Zellen (schwarz). Die relative Proliferationsrate wurde aus dem Quotienten der Zellzahl des jeweiligen Tages und der Zellzahl von Tag 0 bestimmt. Es sind Mittelwerte und SEM von $n=6$ (Tag 0, 2, 3 und 7), $n=5$ (Tag 4 und 6) und $n=4$ (Tag 5) Experimenten angegeben (* $p<0,05$).

Bei den Analysen zeigte sich, dass bei den unstimulierten CD34⁺ Zellen die Zellzahl bis Tag 6 stetig bis auf den Faktor $4,79 \pm 0,46$ ansteigt und dann an Tag 7 auf den Faktor $4,66 \pm 0,57$ wieder etwas abfällt (Abbildung 4.11).

Die mit Orexin A stimulierten CD34⁺ Zellen zeigten ein zu den unstimulierten Zellen sehr ähnliches Proliferationsverhalten. Hier stieg die Zellzahl bis zum Tag 6 ebenfalls um den Faktor $4,79 \pm 0,26$ an, und sank dann an Tag 7 auf den Faktor $4,63 \pm 0,45$. Die mit Orexin B stimulierten CD34⁺ Zellen zeigten von Tag 2 an eine etwas langsamere Steigerung der Zellzahl, wenngleich auch hier ein stetiger Anstieg zu verzeichnen war. Bis an Tag 6 stieg die Zellzahl um den Faktor $4,03 \pm 0,24$ an, was im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant geringerer Anstieg ist ($p=0,03$). Im Gegensatz zu den unstimulierten und den Orexin A stimulierten Zellen fiel die Proliferationsrate allerdings nach Tag 6 nicht ab, sondern stieg bis Tag 7 weiter auf den Faktor $4,18 \pm 0,34$ an, wodurch sich der Unterschied an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle wieder als nicht signifikant darstellt (Abbildung 4.11).

Insgesamt kann also festgestellt werden, dass die Stimulation mit Orexin A oder Orexin B keinen nennenswerten Einfluss auf die Proliferation von CD34⁺ Zellen ausübt.

4.3 Untersuchungen zur Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark nach Stimulation mit Orexin A und Orexin B

Da, wie in der Einleitung schon erwähnt, die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung bei hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des blutbildenden Systems spielt, sollte auch der Einfluss von Orexin auf diese Entscheidung untersucht werden. Hierfür wurden zwei verschiedene, auf klonogener Methylzellulose basierende Versuche durchgeführt, um das Potenzial von späten sowie frühen myeloischen Progenitorzellen zu analysieren und um eventuelle Änderungen in der CFU-Frequenz (Colony-Forming Unit) und LTC-IC-Frequenz (Long Term Culture-Initiating Cell) bei Stimulation mit Orexin A bzw. Orexin B zu detektieren. Die Methoden, die hierfür genutzt wurden, sind zum einen der CFC-Ansatz (Colony Forming Cell-Ansatz) zur Analyse der CFU-Frequenz und Differenzierungskapazität von späten myeloischen Progenitoren und zum anderen der LTC-IC-Ansatz zur Analyse der Selbsterneuerungskapazität bzw. der sogenannten LTC-IC-Frequenz der frühen myeloischen Progenitoren.

4.3.1 Analysen zur Differenzierungskapazität von CD34⁺ HSPC mittels des CFC-Ansatzes

Wie oben bereits erwähnt lässt sich mit dem CFC-Ansatz, oder auch CFU-GEMM-Ansatz das Zellschicksal später myeloischer Progenitoren retrospektiv beurteilen, sowie deren Frequenz bestimmen. Die aus den Progenitoren hervorgehenden Kolonietypen werden in drei Hauptklassen (rote, weiße und gemischte Kolonien) gegliedert, welche weiter in sechs spezifische Kategorien unterteilt werden können (Abbildung 4.12).

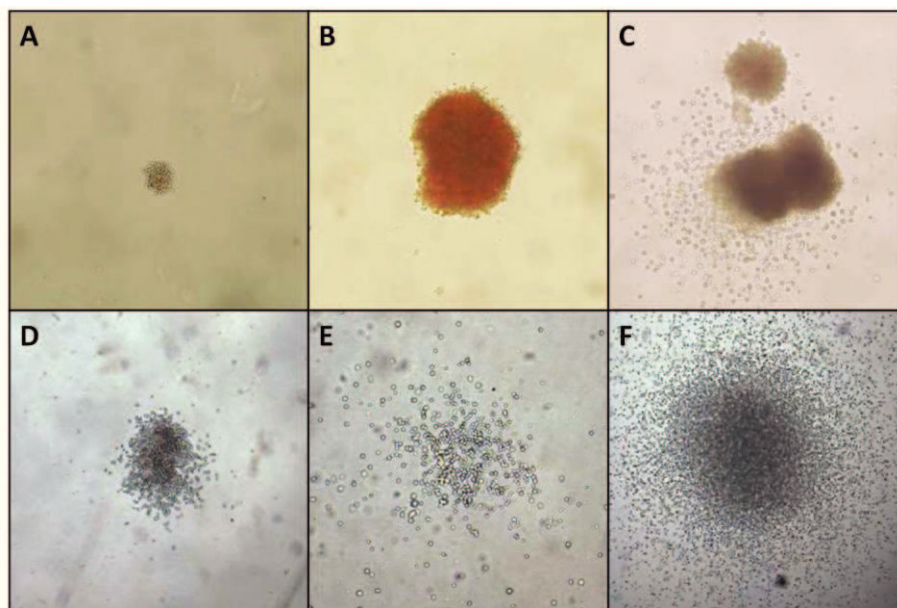


Abbildung 4.12: verschiedene Kolonietypen im CFU-GEMM

In der Abbildung ist eine Übersicht der verschiedenen Kolonietypen im CFU-GEMM-Ansatz dargestellt. A: CFU-E; B: BFU-E; C: CFU-GEMM; D: CFU-G; E: CFU-M; F: CFU-GM; Quelle: Stem Cell Technologies (2014)

Bei der Auswertung wird die Gesamtanzahl koloniebildender Zellen bestimmt und als CFU-Frequenz in Bezug auf die Zellzahl der eingesetzten Zellen berechnet. Außerdem wird die Koloniefrequenz bestimmt, indem die Koloniezahlen der einzelnen Kolonietypen bestimmt und deren Frequenz auf die Gesamtzahl der Kolonien errechnet wird. Für eine bessere Übersicht werden hierbei die drei weißen Kolonietypen zusammengefasst.

Die CFU-Frequenz der unstimulierten Kontrollzellen betrug im Mittel $7,66\% \pm 0,79\%$. Bei Stimulation mit Orexin A fiel die CFU-Frequenz auf $6,39\% \pm 1\%$. Wurden die Zellen vor der Orexin A Gabe mit dem Orexin Rezeptor 1 Antagonist SB334867 behandelt betrug die CFU-Frequenz $6,92\% \pm 1,52\%$. Weder die Änderungen der CFU-Frequenz durch Orexin A in Bezug zur Kontrolle noch die vorherige Behandlung mit dem Antagonisten SB334867 in Bezug zu Orexin A stimulierten Zellen waren signifikant. Wurden die Zellen mit Orexin B

zusammen kultiviert so sank die CFU-Frequenz signifikant auf $5,88 \pm 1,29\%$ ($p=0,03$) (Abbildung 4.13).

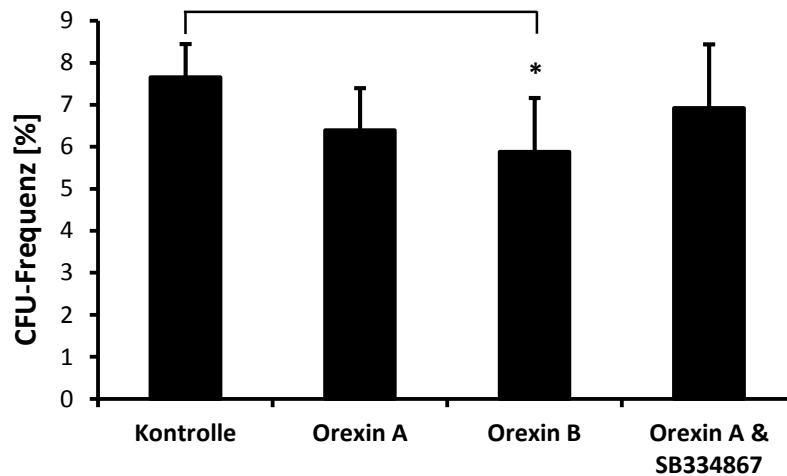


Abbildung 4.13: Einfluss von Orexin auf die CFU-Frequenz von CD34⁺ Zellen

Die Abbildung zeigt die CFU-Frequenz [%] von unstimulierten CD34⁺ Zellen (Kontrolle) im Vergleich zu Orexin A, Orexin B und Orexin A & SB334867 stimulierten CD34⁺ Zellen. Die CFU-Frequenz wurde retrospektiv über die Gesamtkolonieanzahl in Relation zur eingesetzten Gesamtzellzahl bestimmt. Die Signifikanz bezieht sich auf die Kontrolle (* $p<0,05$). Es sind Mittelwerte und SEM aus $n=8$ (Kontrolle, Orexin A und Orexin B) sowie $n=5$ (Orexin A & SB334867) Experimenten angegeben.

Der Einfluss von Orexin A und auch Orexin B auf die spezifischen Koloniefrequenzen der roten, weißen und gemischten Kolonien zeigt sich zum einen in einer signifikanten Verminderung der roten Kolonietypen, wobei sowohl CFU-E als auch BFU-E betroffen sind, und zum anderen in einer signifikanten Erhöhung der gemischten Kolonien (Abbildung 4.14). In der Kontrolle teilen sich die Kolonien auf in $10,12\% \pm 0,85\%$ CFU-E, $20,48\% \pm 3,36\%$ BFU-E, $40,07\% \pm 3,75\%$ CFU-G/-M/-GM und $29,34\% \pm 5,9\%$ CFU-GEMM.

Bei Stimulation mit Orexin A fiel der prozentuale Anteil der CFU-E auf $5,02\% \pm 0,54\%$ ($p=0,0007$) und der der BFU-E auf $11,58\% \pm 2,55\%$ ($p=0,002$). Der prozentuale Anteil der CFU-GEMM stieg auf $42,48\% \pm 3,43\%$ ($p=0,007$). Wurden die CD34⁺ Zellen mit Orexin B stimuliert fielen die Anteile der roten Kolonien auf $7,34\% \pm 0,79\%$ ($p=0,014$) bei den CFU-E und auf $12,44\% \pm 2,99\%$ ($p=0,009$) bei den BFU-E. Der Anteil an gemischten Kolonien stieg auf $43,11\% \pm 4,26\%$ ($p=0,017$). Die Inkubation mit dem Antagonisten SB334867 vor Orexin A Gabe hob alle signifikanten Effekte der alleinigen Orexin A Stimulation wieder auf, wobei jedoch im Vergleich zu Orexin A stimulierten CD34⁺ Zellen nur die Reduktion des Anteils der CFU-GEMM auf $21,91\% \pm 3,33\%$ signifikant ausfiel ($p=0,002$). Die Anteile der roten Kolonien erhöhten sich wieder auf $6,39\% \pm 1,7\%$ bei den CFU-E und $21,3\% \pm 7,61\%$ bei den BFU-E.

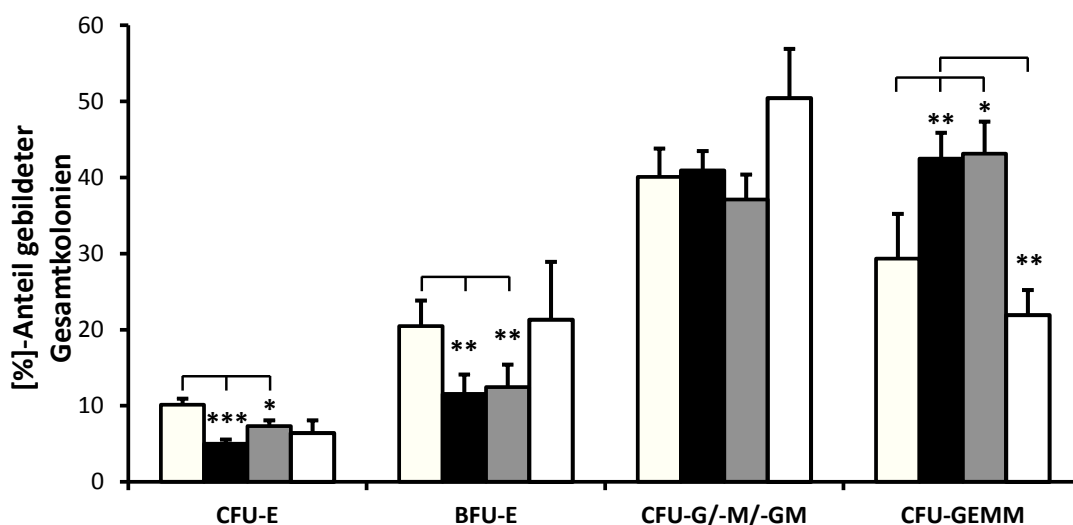


Abbildung 4.14: Einfluss von Orexin auf das Entwicklungspotenzial von CD34⁺ HSPC

Die Abbildung zeigt die spezifischen Koloniefrequenzen der roten (CFU-E, BFU-E), weißen (CFU-G/-M/-GM) und gemischten (CFU-GEMM) Kolonien von unstimulierten CD34⁺ Zellen (Kontrolle [weiße Balken]) im Vergleich zu Orexin A (schwarze Balken), Orexin B (graue Balken) und Orexin A & SB334867 (schraffierte Balken) stimulierten CD34⁺ Zellen. Die Signifikanzen sind in Tabelle 4.2 näher erläutert (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Es sind Mittelwerte und SEM aus n=8 (Kontrolle, Orexin A und Orexin B) sowie n=5 (Orexin A & SB334867) Experimenten angegeben.

Bei Betrachtung der weißen Kolonien konnte festgestellt werden, dass weder Orexin A noch Orexin B Stimulation zu signifikanten Änderungen in der Koloniefrequenz führten. Der Anteil von CFU-G/-M/-GM stieg bei Orexin A Stimulation leicht von 40,07% ± 3,75% in der Kontrolle auf 40,91% ± 2,57%, bei Orexin B Stimulation fiel der Anteil auf 37,11% ± 3,28%. Wurde mit SB334867 vorinkubiert stieg der Anteil weißer Kolonien in Bezug auf die Gesamtkoloniezahl ebenfalls nicht signifikant auf 50,4% ± 6,51%. Für eine bessere Übersicht sind die prozentualen Anteile von CFU-E, BFU-E, CFU-G/-M/-GM und CFU-GEMM an den gebildeten Gesamtkolonien nochmals in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Prozentuale Anteile gebildeter Kolonien im CFC-Ansatz

Stimulation Kolonietyyp	Kontrolle	Orexin A	Orexin B	Orexin A & SB334867
CFU-E	10,12 ± 0,85%	5,02 ± 0,54% p=0,0007	7,34 ± 0,79% p=0,014	6,39 ± 1,7% n.s. / n.s.
BFU-E	20,48 ± 3,36%	11,58 ± 2,55% p=0,002	12,44 ± 2,99% p=0,009	21,3 ± 7,61% n.s. / n.s.
CFU-G/-M/-GM	40,07 ± 3,75%	40,91 ± 2,57% n.s.	37,11 ± 3,28% n.s.	50,4 ± 6,51% n.s. / n.s.
CFU-GEMM	29,34 ± 5,9%	42,48 ± 3,43% p=0,007	43,11 ± 4,26% p=0,017	21,91 ± 3,33% n.s. / p=0,002 (zu OxA)

Die Signifikanzen (p-Werte) bei Orexin A und Orexin B beziehen sich auf die Kontrolle, die Signifikanzangaben bei Orexin A & SB334867 stehen in Bezug zur Kontrolle / Orexin A; n.s. = nicht signifikant

Insgesamt konnten also festgestellt werden, dass sich durch die Stimulation mit Orexin A und auch mit Orexin B das Verhältnis der roten Kolonien zu den gemischten Kolonien zugunsten der gemischten Kolonien verschob. Das wiederum könnte bedeuten, dass Orexin in den Entscheidungsprozess zur Selbsterneuerung oder Differenzierung zugunsten der Selbsterneuerung eingreift.

4.3.2 Analysen zur Selbsterneuerungsfähigkeit von CD34⁺ HSPC mittels des LTC-IC-Ansatzes

Zur Bestimmung der Frequenz früher myeloischer Progenitorzellen in der CD34⁺ Zellfraktion wurde der LTC-IC-Ansatz verwendet. Hierbei werden die CD34⁺ Zellen, wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben auf der adhären wachsenden, murinen Zelllinie AFT024 ausplattiert. Die AFT024 dient hierbei als Zellstroma und soll eine Umgebung zur Erhaltung des primitiven Zellschicksals der CD34⁺ Zellen schaffen. Innerhalb der folgenden 5-wöchigen Kultur differenzieren die späten Vorläuferzellen in Makrophagen oder Megakaryozyten aus, während die frühen Vorläuferzellen sogenannte CAFC-Kolonien (Cobblestone-Area-Forming-Cells-Kolonie) bilden, in denen die Zellen pflastersteinartig angeordnet scheinen (Abbildung 4.15).

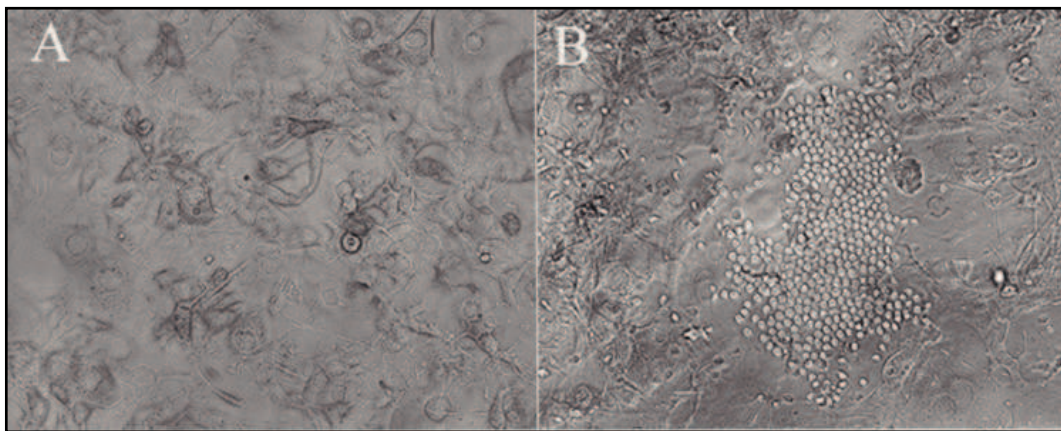


Abbildung 4.15: Kultivierung von CD34⁺ Zellen auf AFT024-Stromazellen:

A: Konfluent gewachsene AFT024-Stromazellen; **B:** CAFC-Kolonien, welche sich nach drei Wochen Kultur aus einer initialen Zelle entwickelt haben. Quelle: Diplomarbeit Ron-Patrick Cadeddu

Um zu ermitteln, ob sich in der Kultur noch primitive Zellen befinden, die in der Lage sind Kolonien zu bilden, werden die Zellen nach der 5-wöchigen Kultur mit klonogenem Methylzellulosemedium überlagert, in dem die Differenzierung der frühen Progenitoren induziert wird. Durch die zähe Konsistenz der Methylzellulose wird zusätzlich ein Auseinanderwandern der Zellen der sekundär entstehenden Kolonien verhindert. Entsprechend dem Ausleseverfahren werden die Zellen, welche über die Dauer der

5-wöchigen Kultur ihr Koloniebildungspotential behalten haben als LTC-IC (Long-Term-Culture-Initiating-Cell) bezeichnet (Abbildung 4.16).

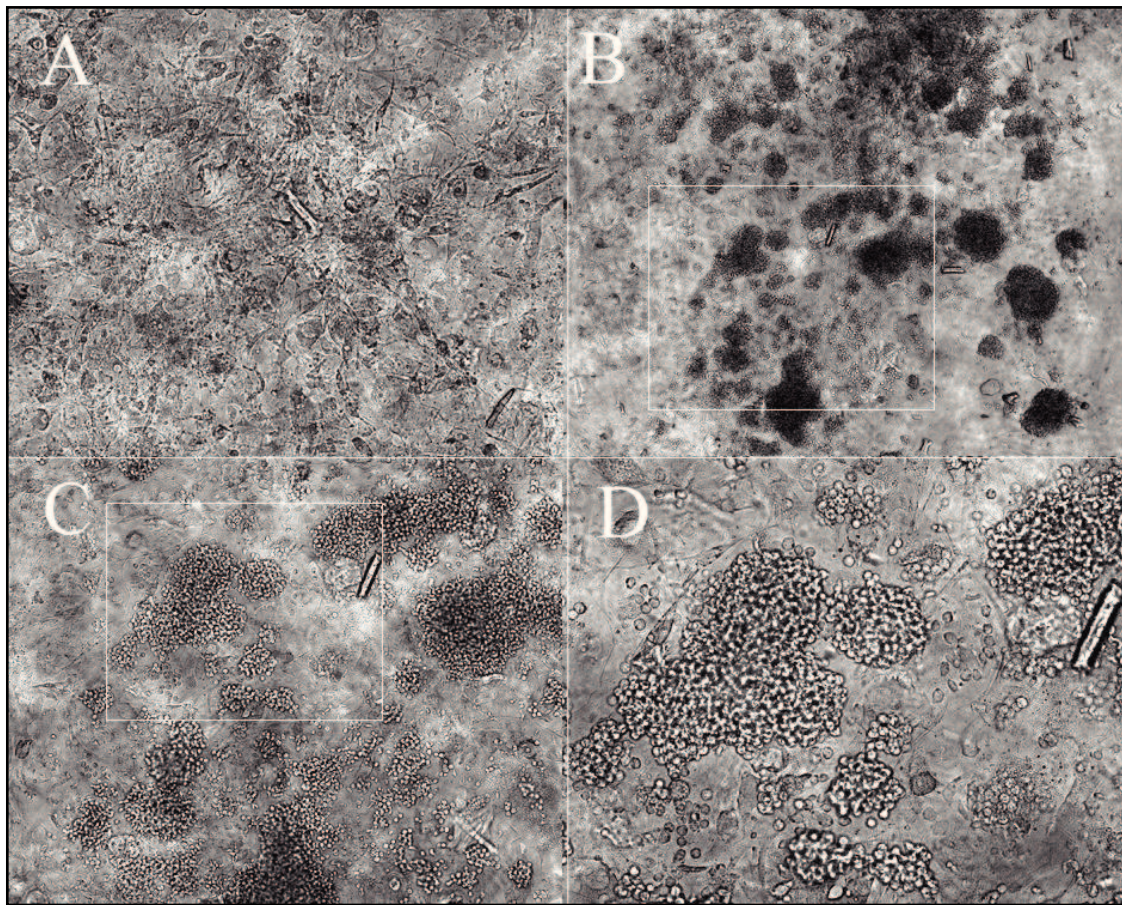


Abbildung 4.16: Myeloische Kolonien im LTC-IC-Ansatz nach Überschichtung mit klonogener Methylzellulose
Die Abbildung zeigt sekundäre Kolonien, welche sich nach Überschichtung mit klonogenem Methylzellulosemedium aus den CAFC-Kolonien (Abbildung 4.15) gebildet haben. **A:** AFT024-Stromazellen nach sieben Wochen Kultur ohne Kolonien (50x); **B:** Myeloische Kolonien an Tag 10 nach Überschichtung (50x); **C:** Ausschnittvergrößerung von B (100x); **D:** Ausschnittvergrößerung von C (200x). Quelle: Diplomarbeit Ron-Patrick Cadeddu

Um die LTC-IC-Frequenz der ausgesäten Zellfraktion zu ermitteln werden zunächst die mit Kolonien besiedelten Ansätze lichtmikroskopisch ausgezählt und mit Hilfe des Statistikprogramms L-Calc (StemSoft Inc., Version 1.1) ausgewertet. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung werden jeweils die Wells der 96-Well-Platte pro Verdünnung ausgezählt, in denen sich sekundäre Kolonien gebildet haben.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass die LTC-IC-Frequenz von CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark bei 0,92% ± 0,06% lag (Abbildung 4.17). Unter Einfluss von Orexin A stieg die LTC-IC-Frequenz signifikant auf 1,94% ± 0,21% (p=0,015) an. Auch wenn die CD34⁺ HSPC

während des Versuches mit Orexin B stimuliert wurden, konnte ein signifikanter Anstieg der LTC-IC-Frequenz auf $1,36\% \pm 0,03\%$ ($p=0,002$) festgestellt werden.

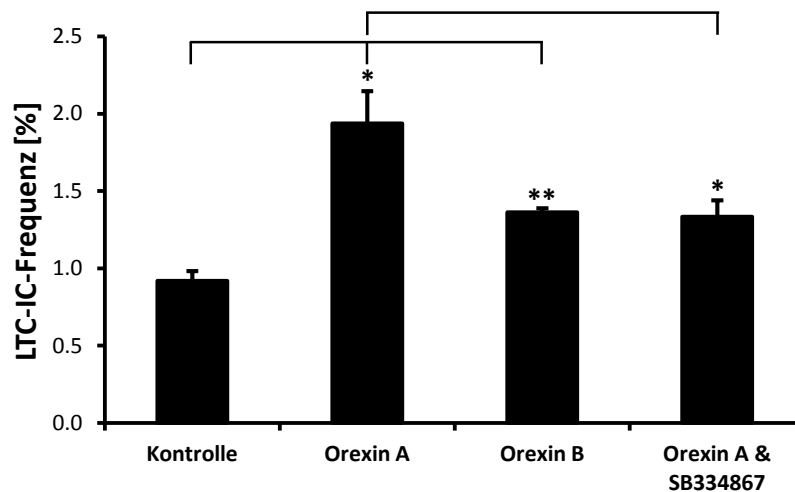


Abbildung 4.17: Einfluss von Orexin auf die LTC-IC-Frequenz von CD34⁺ HSPC

Die Abbildung zeigt die LTC-IC-Frequenzen von unstimulierten CD34⁺ Zellen (Kontrolle) aus dem Knochenmark im Vergleich zu Orexin A, Orexin B und Orexin A & SB334867 stimulierten CD34⁺ Zellen. Die Signifikanzen von OxA und OxB sind gegen die Kontrolle, die Signifikanz von OxA&SB334867 ist gegen OxA gerechnet (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). Es sind Mittelwerte und SEM aus $n=4$ (Kontrolle, OxA, OxB) sowie $n=3$ (OxA & SB334867) Experimenten angegeben.

Wurden die Zellen vor der Orexin A Stimulation mit dem Antagonisten SB334867 inkubiert fiel die LTC-IC-Frequenz im Vergleich zu den mit Orexin A stimulierten Zellen signifikant auf $1,33\% \pm 0,11\%$ ($p=0,048$; Abbildung 4.17). Der Anstieg der LTC-IC-Frequenz im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle ist hierbei zwar immer noch gegeben, jedoch nicht signifikant. Es konnte hier also gezeigt werden, dass CD34⁺ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen unter Einfluss von Orexin A oder Orexin B eine signifikant höhere LTC-IC-Frequenz aufweisen. Wie auch die Ergebnisse aus den CFC-Ansätzen könnte die Erhöhung der LTC-IC-Frequenz durch Orexin-Stimulation darauf hinweisen, dass Orexin zugunsten der Selbsterneuerung in die Mechanismen der CD34⁺ Zellen zur Entscheidung Selbsterneuerung oder Differenzierung eingreift.

4.4 Untersuchungen zur Signalübermittlung in CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark nach Stimulation mit Orexin A und Orexin B

Nachdem sich in den vorangegangenen Analysen bei der Stimulierung von CD34⁺ HSPC mit den Neuropeptiden Orexin A und Orexin B einige essentielle funktionelle Effekte und Änderungen in der Differenzierungsfähigkeit der CD34⁺ HSPC gezeigt haben, interessierten

uns die Mechanismen, über die diese Effekte vermittelt werden könnten. Da als Haupteffekte der Orexinrezeptor-Stimulation in der Literatur neben Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration auch Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration beschrieben (Mazzocchi *et al.* 2001, Holmqvist *et al.* 2005) werden, wurden diese beiden Wege untersucht. Hierzu wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen die Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels von CD34⁺ Zellen und mittels eines kompetitiven cAMP-Enzymimmunoassays die Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration von CD34⁺ Zellen bestimmt.

4.4.1 Analysen zum intrazelluläres Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$)

Um die Auswirkungen von Orexin auf den intrazellulären Kalziumspiegel von CD34⁺ Zellen zu messen, wurden die frisch isolierten CD34⁺ Zellen wie in Kapitel 3.3.3.4 beschrieben mit dem Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4-Acetoxymethylester (Fluo4-AM) beladen. Danach wurde am Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 80 Sekunden nach der Stimulation die Fluo4-Fluoreszenzemission gemessen. Hierbei wurden sowohl die direkten Auswirkungen einer Orexin-Stimulation auf den intrazellulären Kalziumspiegel der CD34⁺ Zellen untersucht, als auch die Auswirkungen der Orexin-Stimulation auf die SDF1-vermittelte Kalziumerhöhung in die CD34⁺ Zellen.

4.4.1.1 Auswirkungen von Orexin-Stimulation auf den intrazellulären Kalziumspiegel von CD34⁺ HSPC

Zur Detektion einer durch Orexin vermittelten Änderung des Kalziumspiegels sind die CD34⁺ Zellen nach 16 Sekunden Messzeit dem Durchflusszytometer entnommen worden und innerhalb von 8 Sekunden stimuliert, gemischt und wieder der Messung zugeführt worden. Stimuliert wurde mit Wasser als Kontrolle, Orexin A, Orexin B und mit SDF-1 als in der Literatur belegte Positivkontrolle (Aiuti 1997).

Wie in Abbildung 4.18 zu sehen veränderte sich bei den mit Wasser stimulierten Kontrollzellen die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) über den Verlauf der Messung kaum. Sie erreichte mit dem $1,08 \pm 0,04$ fachen des Anfangswertes ihren höchsten Wert nach 56 Sekunden und lag nach 80 Sekunden bei dem $1,03 \pm 0,04$ fachen der Anfangsfluoreszenz. Insgesamt schwankte die Fluoreszenz hier zwischen dem $0,99 \pm 0,01$ und $1,08 \pm 0,04$ fachen der Fluoreszenz bei Beginn der Messung. Die Stimulation mit SDF1 hingegen bewirkte eine immense Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ in den CD34⁺ Zellen. Diese erreichte nach 16 Sekunden mit dem $3,00 \pm 0,18$ fachen der Anfangsfluoreszenzintensität ein Maximum und flachte dann im

Verlauf der nächsten 64 Sekunden wieder auf das $1,14 \pm 0,04$ fache der Anfangsfluoreszenzintensität ab. Alle Messwerte zwischen 8 und 40 Sekunden sind signifikant höher als in der Kontrolle.

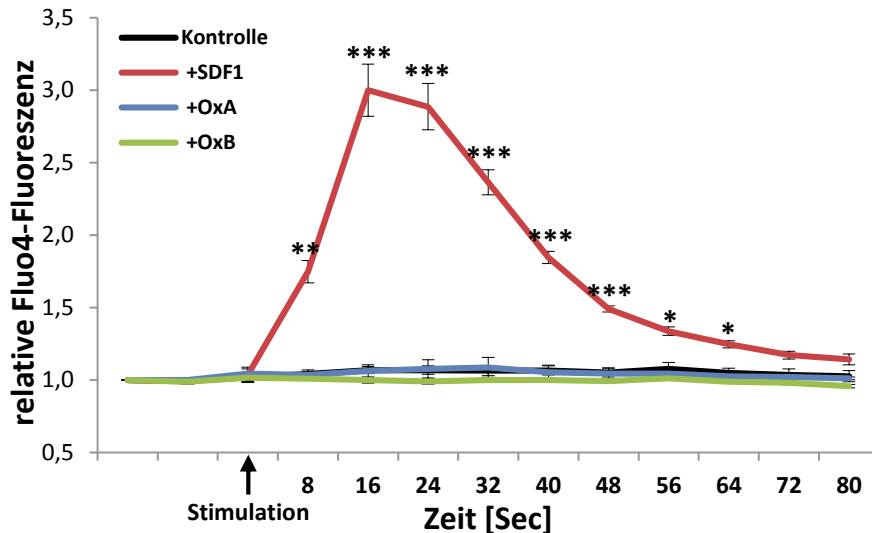


Abbildung 4.18: Einfluss von Orexin auf den intrazellulären Kalziumspiegel ($[Ca^{2+}]_i$)

Die $CD34^+$ Zellen wurden mit Fluo4-AM inkubiert und nach 16 sec mit 100ng/ml SDF1 (+SDF1) oder 0,1 μ M Orexin A (+OxA) oder 0,1 μ M Orexin B (OxB) stimuliert. Als Kontrolle diente eine Stimulation mit Wasser. Nach der Stimulation wurde die Fluo4-Fluoreszenzemission als Maß für die $[Ca^{2+}]_i$ über 80 sec gemessen, um den Verlauf der Veränderungen derselben zu dokumentieren. Es sind Mittelwerte und SEM für jeweils n=5 Experimente angegeben. Die statistische Signifikanz ist in Bezug zur Kontrolle angegeben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Bei den mit Orexin A und Orexin B stimulierten $CD34^+$ Zellen blieb die $[Ca^{2+}]_i$ nach der Stimulation stabil. Der Kalziumspiegel stieg im Verlauf der Messung bei Orexin A nach 32 Sekunden auf das $1,09 \pm 0,07$ fache des Anfangswertes an, bei Orexin B schwankte die $[Ca^{2+}]_i$ über die gesamte Messdauer nur zwischen dem $0,96 \pm 0,01$ fachen und $1,02 \pm 0,03$ fachen der Ausgangskonzentration. Nach der gesamten Messdauer lag die $[Ca^{2+}]_i$ bei Orexin A und Orexin B stimulierten Zellen bei dem $1,01 \pm 0,01$ bzw. $0,96 \pm 0,01$ fachen der Ausgangskonzentration. Somit konnten hier keine direkten Auswirkungen auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration von $CD34^+$ Zellen durch die Stimulierung mit Orexin A oder Orexin B festgestellt werden.

4.4.1.2 Auswirkungen von Orexin-Stimulation auf das SDF1-vermittelte Kalziumsignal in $CD34^+$ HSPC

Um die Auswirkungen von Orexin A und Orexin B auf die SDF1-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in $CD34^+$ Zellen zu untersuchen wurden die $CD34^+$ Zellen entweder über Nacht (16 Stunden) oder 30 Minuten vor der SDF1 Stimulation (Abbildung 4.19a & Abbildung

4.19b) mit Orexin A oder Orexin B inkubiert. Wie auch bei den Versuchen zur direkten Auswirkung der Orexin-Stimulation auf die $[Ca^{2+}]_i$ in CD34⁺ Zellen wurden die Zellen nach 16 Sekunden Messzeit dem Durchflusszytometer entnommen und innerhalb von 8 Sekunden stimuliert, gemischt und wieder der Messung zugeführt.

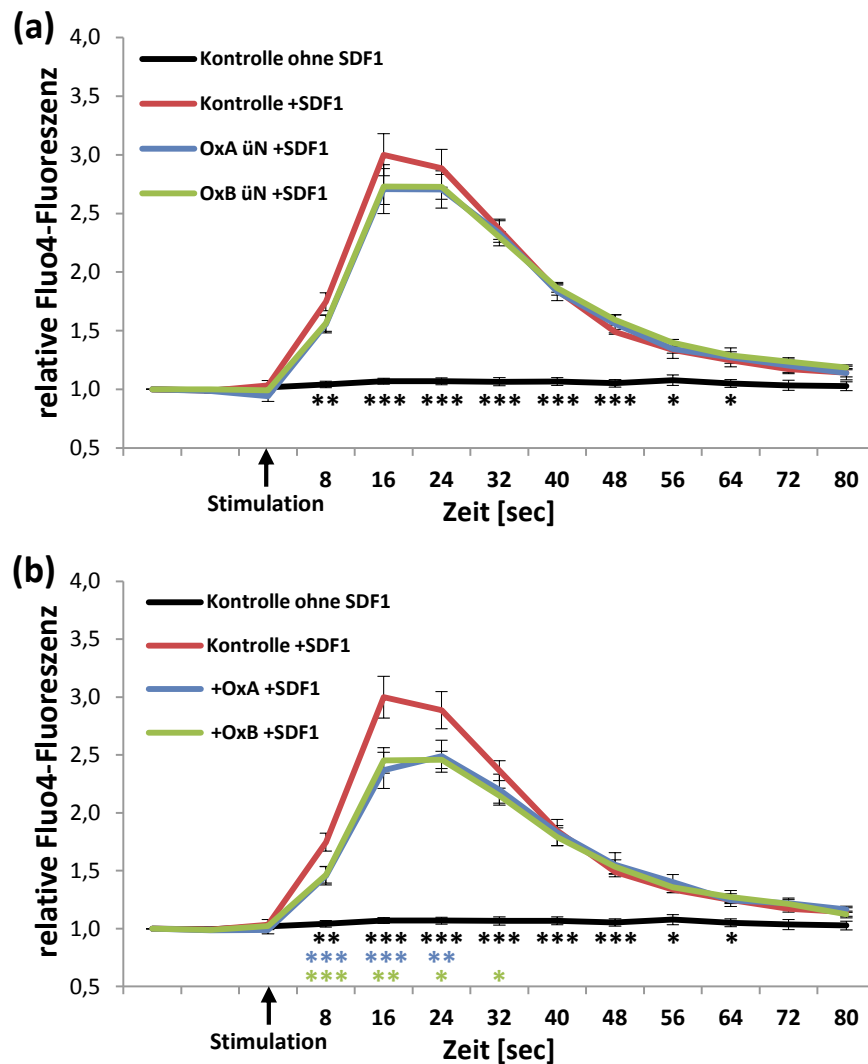


Abbildung 4.19: Einfluss von Orexin auf die SDF1-vermittelte Erhöhung des Kalziumspiegels

Die CD34⁺ Zellen wurden entweder (a) über Nacht (16 Stunden) mit OxA und OxB inkubiert oder (b) 30 Minuten vor der SDF1 Stimulation mit OxA und OxB inkubiert. Als Kontrolle ohne SDF diente eine Stimulation mit Wasser. Nach der Stimulation wurde die Fluo4-Fluoreszenzemission als Maß für die $[Ca^{2+}]_i$ über 80 sec gemessen, um den Verlauf der Veränderungen derselben zu dokumentieren. Es sind Mittelwerte und SEM für jeweils n=5 Experimente angegeben. Die statistische Signifikanz ist in Bezug zur SDF1 stimulierten Kontrolle angegeben (* p<0,05; ** p<0,01; *** p>0,001).

In Abbildung 4.19a ist zu sehen, dass die 16 stündige Inkubation mit Orexin A oder Orexin B das SDF1-vermittelte Kalziumsignal in CD34⁺ Zellen kaum beeinträchtigte. Beide Messkurven zeigten, wie auch die SDF1 stimulierte Kontrolle, einen sofortigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach der SDF1-Stimulation, der nach 16 Sekunden sein Maximum erreichte und dann innerhalb

der nächsten 64 Sekunden wieder auf das Niveau der mit Wasser stimulierten Kontrollzellen abfiel. Bei der SDF1-stimulierten Kontrolle lag das Maximum beim $3,00 \pm 0,18$ fachen des Ausgangswertes, bei den mit Orexin über Nacht behandelten Proben lagen die Maxima beim $2,71 \pm 0,21$ fachen (Orexin A) und beim $2,73 \pm 0,15$ fachen (Orexin B) des Ausgangswertes. Es ist hier zwar eine Erniedrigung des SDF1-vermittelten Kalziumsignals durch Orexin A und Orexin B zu verzeichnen, jedoch ist diese mit p-Werten von 0,1 bei OxA und 0,18 bei OxB nicht signifikant.

Wurden die CD34⁺ Zellen 30 Minuten vor der SDF1 Stimulierung mit Orexin A oder Orexin B vorinkubiert (Abbildung 4.19b) war bereits der Anstieg des SDF1-vermittelten Kalziumsignals hoch signifikant reduziert. Die $[Ca^{2+}]_i$ erreichte in ihrem Maximum bei mit Orexin A inkubierten Zellen nur noch das $2,49 \pm 0,14$ fache ($p=0,006$) ihres Ausgangswertes und war über den Messzeitraum von 8 bis 24 Sekunden nach der Stimulierung mit SDF1 ist die $[Ca^{2+}]_i$ signifikant erniedrigt. Genau wie bei den mit Orexin A vorinkubierten Zellen stieg die $[Ca^{2+}]_i$ auch bei mit Orexin B vorinkubierten Zellen nur noch auf das $2,46 \pm 0,08$ fache ($p=0,012$) der Ausgangskonzentration an und war über den Zeitraum von 8 bis 32 Sekunden nach SDF1 Gabe signifikant erniedrigt. Erst nach 40 Sekunden waren die intrazellulären Kalziumkonzentrationen der kurzzeitig mit Orexin A und Orexin B vorinkubierten CD34⁺ Zellen wieder auf dem Level der SDF1-stimulierten Kontrolle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Stimulation mit Orexin zwar keine direkte Auswirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ von CD34⁺ Zellen zeigt, dass jedoch eine kurzzeitige Orexin Stimulierung eine deutliche, signifikante Reduktion des SDF1-vermittelten Kalziumsignals in CD34⁺ Zellen bewirkt.

4.4.2 Untersuchungen zum intrazellulären cAMP ($[cAMP]_i$)

Wie am Anfang des Kapitels bereits erwähnt gehört die Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einem der Haupteffekte, die durch die Stimulierung der Orexinrezeptoren vermittelt werden. Daher sollte überprüft werden, ob auch in den CD34⁺ HSPC mit der Stimulierung der Orexinrezeptoren Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration einhergehen. Hierzu wurden die isolierten CD34⁺ HSPC für 30 Minuten mit Orexin A und Orexin B stimuliert und im Anschluss wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration mit einem kompetitiven cAMP-Enzymimmunoassay wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt.

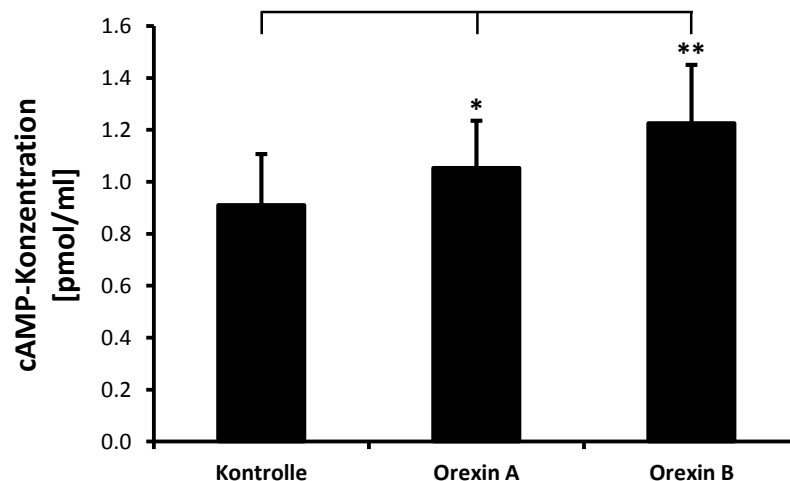


Abbildung 4.20: Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Orexin A und Orexin B

Dargestellt ist die signifikante Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in CD34⁺ HSPC durch die 30 minütige Stimulierung mit Orexin A und Orexin B. Es sind Mittelwerte und SEM von n=5 Experimenten angegeben (*p<0,05; **p<0,01).

Als Kontrolle dienten hierbei unstimulierte CD34⁺ HSPC, bei denen im Mittel eine intrazelluläre cAMP-Konzentration von $0,911 \pm 0,197$ pmol/ml gemessen werden konnte. Sowohl die Stimulation mit Orexin A, als auch die Stimulation mit Orexin B verursachte eine signifikante Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen in den CD34⁺ HSPC. Bei Orexin A Stimulation stieg die cAMP-Konzentration um 15,7% auf $1,054 \pm 0,182$ pmol/ml an ($p=0,014$) und bei Orexin B Zugabe erhöhte sich das intrazelluläre cAMP auf $1,226 \pm 0,225$ pmol/ml ($p=0,0059$), ein Anstieg um 34,58% (Abbildung 4.20). Die durch Orexin vermittelte Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration ist ein weiterer Beleg für die funktionelle Aktivität der Orexinrezeptoren auf den hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen. Die durch die Orexin Stimulation erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration könnte einen Erklärungsansatz für die erniedrigten Adhäsions- und Migrationsraten bieten. Hierzu konnte bereits gezeigt werden, dass bei MDA-MB-231 Brustkrebszellen eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in direktem Zusammenhang mit der Herunterregulierung der Adhäsion und Migration steht (Spina *et al.* 2012).

4.5 Prepro-Orexin in CD34⁺ HSPC und in der Nische

Nachdem die Expression und vor allem auch die Funktionalität der Orexinrezeptoren auf den CD34⁺ Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte der Frage nachgegangen werden, wie die Liganden Orexin A und Orexin B das Knochenmark erreichen um ihre Wirkung auf die CD34⁺ Zellen zu entfalten. Dadurch, dass im neuronalen System sogenannte orexinerge Nerven die Liganden in die Umgebung ausschütten (Sakurai 2007, Sakurai und Mieda 2011),

wurde die Frage aufgeworfen, ob auch im Knochenmark durch die vorhandenen Nervenfasern des vegetativen Nervensystems Orexin A und Orexin B ausgeschüttet wird und so an seine Wirkstätte gelangt, oder ob die Orexine z. B. über die Blutbahn in das Knochenmark gelangen. Es sollte also herausgefunden werden, ob Bestandteile der Nische oder das Blut selbst als Quelle für Orexin im Knochenmark dienen.

4.5.1 Prepro-Orexin in KM-Stanzen

Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst immunfluoreszente Färbungen an Knochenmarkstanzen (KM-Stanzen) von gesunden Knochenmarkspendern durchgeführt. Hiermit sollte zunächst festgestellt werden, ob sich überhaupt Orexin A, Orexin B oder vielleicht der Vorläufer Prepro-Orexin im Knochenmark nachweisen lässt. In anschließenden Versuchen sollte dann die Quelle des Orexins identifiziert werden.

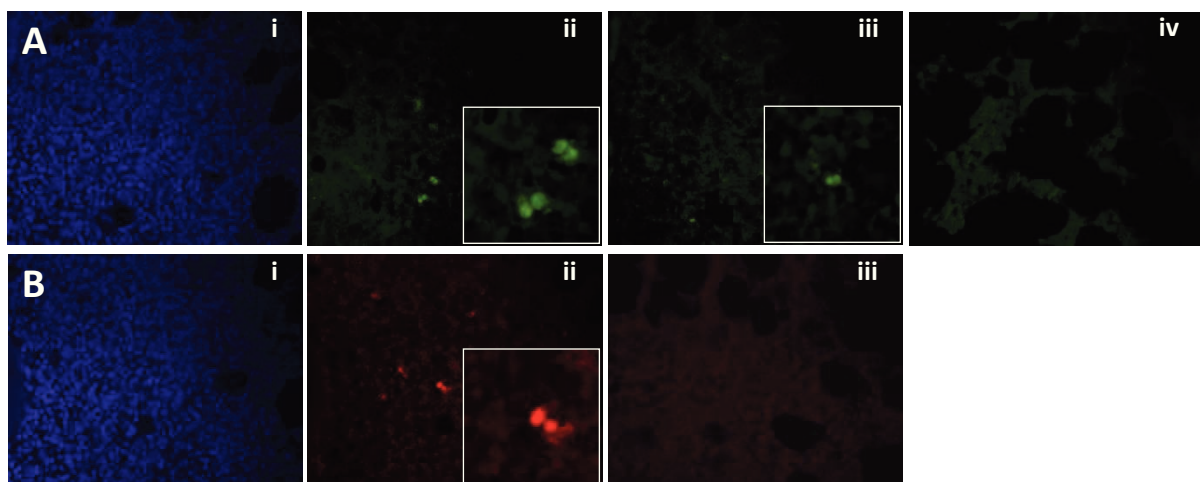


Abbildung 4.21: Immunfluoreszente Färbung von Prepro-Orexin, Orexin A und Orexin B an KM-Stanzen

Dargestellt sind repräsentative, immunfluoreszente Färbungen von Orexin A (A_{ii}), Orexin B (A_{iii}) und Prepro-Orexin (B_{ii}) in KM-Stanzen von gesunden Knochenmarkspendern. Die Zellkerne wurden mit DAPI (A_i+B_i) gefärbt. Als Negativkontrolle diente eine alleinige Sekundärantikörperfärbung ohne Primärantikörper ($A_{iv}+B_{iii}$).

Wie in Abbildung 4.21 zu erkennen ist, wurden in den KM-Stanzen Zellen gefunden, in denen Orexin A, Orexin B oder Prepro-Orexin immunofluoreszent markiert werden konnte. Einen Hinweis auf Nervenzellen bzw. Neurone, welche Orexin in das Milieu des Knochenmarks abgeben, konnten die Färbungen nicht geben. Daher liegt es nahe, dass es Zellen aus der Nische sind, über die das Orexin ins Knochenmark abgegeben wird.

Da es sich bei den Versuchen mit den KM-Stanzen als äußerst schwierig darstellte, Doppelfärbungen mit zellspezifischen Markern anzufertigen, ließ sich mit dieser Methode nicht herausfinden, in welchem Zelltyp im Knochenmark die Neuropeptide markiert wurden.

Allerdings legen die Anzahl positiver Zellen von ca. 0,2-0,4% sowie deren Verteilungsmuster nahe, dass es sich um die CD34⁺ Zellen selbst handeln könnte, in welchen Orexin A, Orexin B und Prepro-Orexin immunofluoreszent markiert worden sind.

4.5.2 Prepro-Orexin in CD34⁺ HSPC

4.5.2.1 Mikroskopische Analysen zu Prepro-Orexin in CD34⁺ HSPC

Da in den Färbungen an Knochenmarkstanzen sowohl Orexin A und Orexin B positive Zellen, als auch Prepro-Orexin positive Zellen zu sehen waren, und da diese positiv gefärbten Zellen von der Anzahl und dem Verteilungsmuster her am ehesten CD34⁺ Zellen entsprachen, lag die Vermutung nahe, dass die CD34⁺ Zellen vielleicht selbst die Neuropeptide Orexin A und Orexin B exprimieren und daraufhin entweder parakrin die Zellen in ihrer Umgebung bzw. autokrin sich selbst stimulieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, immunofluoreszente, intrazelluläre Färbungen von frisch isolierten CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark angefertigt.

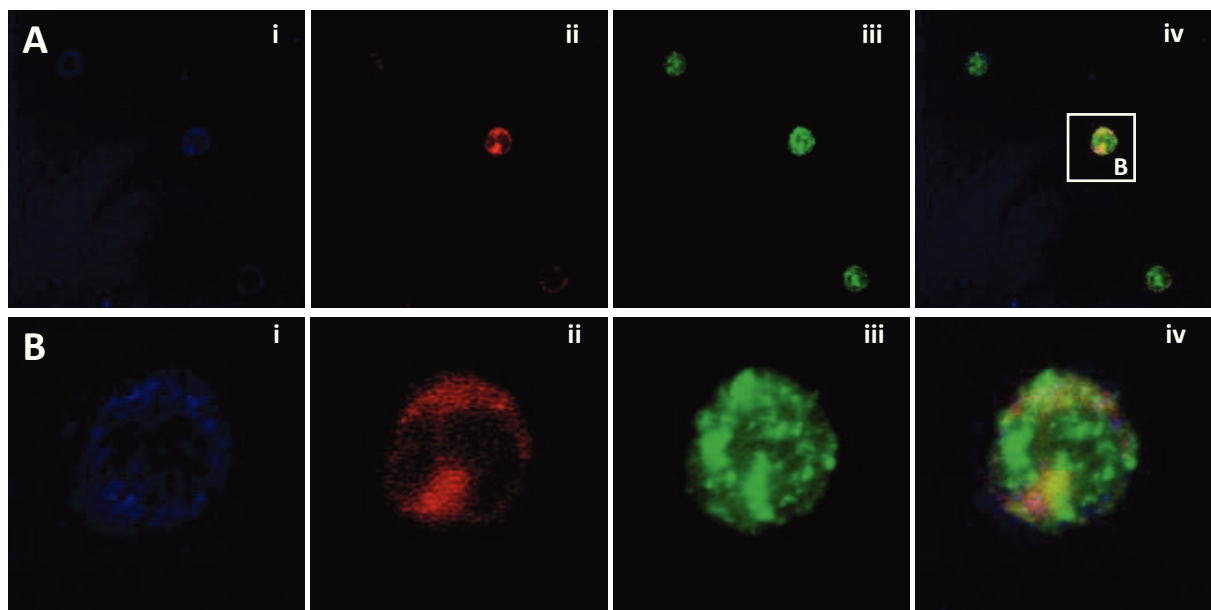


Abbildung 4.22: Immunfluoreszente Färbung von Prepro-Orexin an CD34⁺ HSPC

Dargestellt ist eine repräsentative von fünf Färbungen von Prepro-Orexin in CD34⁺ HSPC. In Reihe A ist eine Übersichtsaufnahme dargestellt, Reihe B ist ein Detailausschnitt von A. CD34 ist hier in blau dargestellt (i), CD38 in rot (ii) und Prepro-Orexin in grün (iii). In der vierten Spalte (iv) sind die Bilder i bis iii übereinandergelegt.

Für die intrazelluläre Färbung wurde lediglich Antikörper gegen Prepro-Orexin und nicht, wie bei den Färbungen der KM-Stanzen, auch noch Antikörper gegen Orexin A und Orexin B verwendet, da Prepro-Orexin ja wie in der Einleitung schon erwähnt, posttranslational in

Orexin A und Orexin B prozessiert wird. Hierdurch konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass evtl. detektiertes Orexin A oder Orexin B aus der Umgebung stammt und lediglich von den CD34⁺ Zellen aufgenommen wurde. Zusätzlich wurden die CD34⁺ Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD34 und CD38 gefärbt.

Anhand der immunofluoreszenten Färbungen konnte gezeigt werden, dass CD34⁺ HSPC intrazelluläres Prepro-Orexin enthalten (Abbildung 4.22). Die Expression von Prepro-Orexin durch CD34⁺ HSPC warf wiederum die Frage auf, ob Prepro-Orexin, wie die Orexinrezeptoren auch, in unterschiedlich reifen CD34⁺ Zellen unterschiedlich stark vorhanden sein könnte.

4.5.2.2 Durchflusszytometrische Analysen zu Prepro-Orexin in CD34⁺ HSPC

Um diese Frage zu beantworten wurden zusätzlich durchflusszytometrische Analysen zur Expression von Prepro-Orexin in CD34⁺ Zellen durchgeführt. Hierfür wurden frisch isolierte CD34⁺ HSPC, wie auch schon zuvor bei den immunofluoreszenten Färbungen, auf intrazelluläres Prepro-Orexin und auf die extrazellulären Marker CD34 und CD38 gefärbt. Zur Auswertung wurden, wie in Abbildung 4.23 dargestellt, die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Prepro-Orexin gefärbten Zellpopulationen (MNC, CD34⁺, CD34⁺/CD38⁺ und CD34⁺/CD38^{low}) miteinander verglichen.

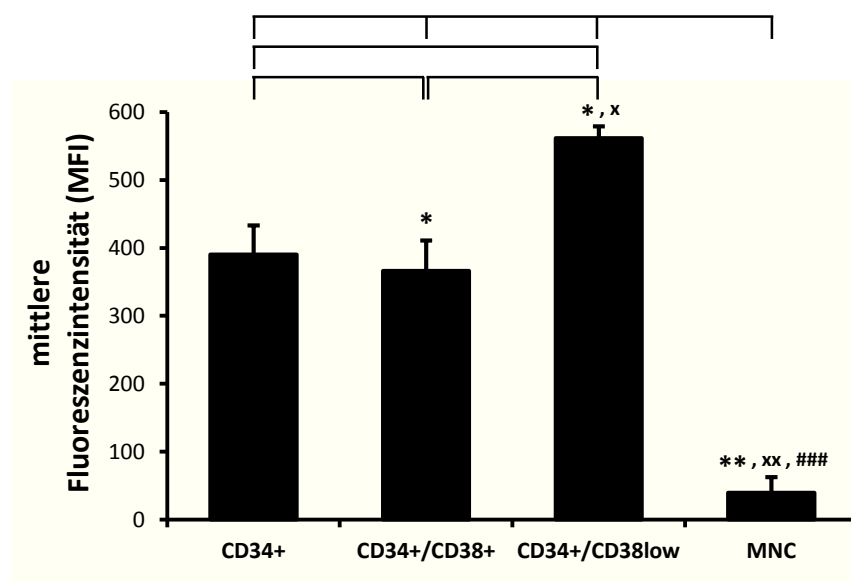


Abbildung 4.23: Durchflusszytometrische Analysen zu Prepro-Orexin an CD34⁺ HSPC

Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von durchflusszytometrisch analysierten Prepro-Orexin gefärbten CD34⁺ Zellen und MNC aus dem Knochenmark. Die CD34⁺ Zellen wurden weiter in CD34⁺/CD38⁺ Zellen, sowie in CD34⁺/CD38^{low} Zellen unterteilt. Es sind Mittelwerte und SEM von n=3 Experimenten angegeben. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt * (vgl. zu CD34⁺); x (vgl. zu CD34⁺/CD38⁺); # (vgl. zu CD34⁺/CD38^{low}) und beschreiben die folgenden p-Werte */x: p<0,05; **/xx: p<0,01; ###: p<0,001.

Hierbei wurde deutlich, dass die $CD34^+/CD38^{low}$ Zellen mehr Prepro-Orexin enthielten, als alle anderen gemessenen Zellpopulationen. Sie wiesen bei den Messungen sowohl gegenüber den $CD34^+$ Zellen ($p=0,021$), als auch gegenüber den $CD34^+/CD38^+$ Zellen ($p=0,015$) eine signifikant höhere MFI auf. Die $CD34^+/CD38^+$ Zellen enthielten wiederum signifikant weniger Prepro-Orexin als die $CD34^+$ Zellen allein ($p=0,013$) und die MNC enthielten signifikant weniger Prepro-Orexin gegenüber allen anderen Zellpopulationen ($p=0,0014$ [$CD34^+$]; $p=0,0022$ [$CD34^+/CD38^+$]; $p=0,000018$ [$CD34^+/CD38^{low}$]).

Aus diesen Messungen geht hervor, dass die hämatopoietischen Zellen umso mehr Prepro-Orexin enthalten, je unreifer sie sind, wodurch sich die Vermutung, dass neben den Orexinrezeptoren auch Prepro-Orexin differenzierungsabhängig in den hämatopoietischen Zellen exprimiert wird, zu bestätigen scheint.

4.5.2.3 Western Blot Nachweis von Prepro-Orexin in $CD34^+$ HSPC

Zusätzlich zu den immunofluoreszenten Färbungen an aufgereinigten $CD34^+$ Zellen wurde mittels Western Blot an einer weiteren Methode den Nachweis von Prepro-Orexin in $CD34^+$ Zellen erbracht. Die Versuche hierzu wurden wie in 3.4.3 beschrieben durchgeführt, wobei 30 μ g des Proteinlysats aus jeweils 5×10^6 $CD34^+$ Zellen bzw. $CD34$ -negative Zellen eingesetzt wurde. Zur Detektierung von Prepro-Orexin wurde derselbe Antikörper eingesetzt, der auch schon bei den mikroskopischen und durchflusszytometrischen Analysen zum Einsatz kam.

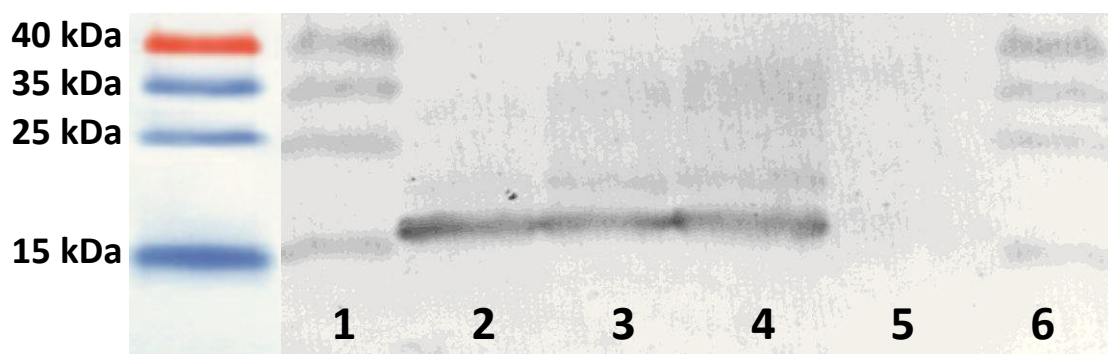


Abbildung 4.24: Immunologischer Nachweis von Prepro-Orexin in $CD34^+$ HSPC

Dargestellt ist ein Western Blot zum immunologischen Nachweis von Prepro-Orexin. In den Spuren 2,3 und 4 sind jeweils 30 μ g Proteinlysate aus $CD34^+$ Zellen von drei verschiedenen KM aufgetragen. In Spur 5 ist 30 μ g Proteinlysate aus $CD34^{neg}$ Zellen aufgetragen. Die Spuren 1 und 6 zeigen den Größenstandard Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

Wie Abbildung 4.24 zu entnehmen ist, sind in den Spuren 2 bis 4, wo das Proteinlysate aus $CD34^+$ Zellen aufgetragen wurde deutliche Banden mit einer Größe von etwa 16 kDa, also in

der für Prepro-Orexin erwarteten Größe, zu sehen. In Spur 5, wo das Proteinlysate aus CD34-negativen Zellen aufgetragen wurde, sind keinerlei Banden erkennbar. Die CD34⁺ Zellen scheinen, wie auch die vorangegangenen Versuche vermuten lassen, während ihrer Differenzierung die Produktion von Orexin einzustellen, was mit der Expression der Orexinrezeptoren korreliert, welche auch im Laufe der Differenzierung der CD34⁺ Zellen weniger wird. Vielleicht besteht hier ein Hinweis darauf, dass sich frühe CD34⁺ HSPC selbst, also autokrin mit Orexin versorgen.

5 DISKUSSION

Vor ca. 10 bis 15 Jahren erschienen zahlreiche Arbeiten, welche die Transdifferenzierbarkeit von hämatopoietischen Progenitorzellen in verschiedene nicht-hämatopoietische Zelltypen wie z. B. Endothel-, Nerven- und auch Herzmuskelzellen beschrieben. Dies nährte zum damaligen Zeitpunkt die Hoffnung, hämatopoietische Progenitoren als adulte Stammzellen an Stelle von embryonalen Stammzellen für die regenerative Medizin nutzen zu können (Haas *et al.* 1995, Kronenwett *et al.* 2000, Orlic *et al.* 2001, Kobbe *et al.* 2002, Wagers *et al.* 2002). Mit dem Ziel hämatopoietische Progenitoren hinsichtlich dieser Transdifferenzierbarkeit näher zu charakterisieren, führte die damalige Arbeitsgruppe von Ulrich Steidl Genexpressionsanalysen von CD34⁺ HSPC durch. Hierbei konnten sie eine Vielzahl von bisher nur auf neuronalen Zellen beschriebenen Molekülen erstmals auf CD34⁺ HSPC nachweisen. Dazu gehörten Moleküle, welche für die Vesikelbildung oder Zellmotilität von Bedeutung sind, ebenso wie zahlreiche Rezeptorkinasen und -phosphatasen. Von besonderem Interesse war jedoch bereits zum damaligen Zeitpunkt die Entdeckung von verschiedenen G-Protein gekoppelten Neurorezeptoren wie dem CRH1- und CRH2-Rezeptor, dem GABA-B-Rezeptor, Adenosin-, Opioid-, 5-HT-, sowie den Orexin 1- und Orexin 2-Rezeptoren (Steidl *et al.* 2004). Erste Beobachtungen, dass die Rezeptoren in Abhängigkeit von Entwicklungsstadien auf den HSPC exprimiert werden und eine Stimulierung der Rezeptoren mit einer Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels einhergehen, legten bereits zum damaligen Zeitpunkt nahe, dass die Rezeptoren funktionell aktiv sind und daher eine Rolle für die Steuerung von HSPC spielen könnten. Zeitgleich erschienen erste Arbeiten, welche einen zirkadianen Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die HSPC-Proliferation und Migration beschrieben (Katayama *et al.* 2006, Mendez-Ferrer *et al.* 2008, Mendez-Ferrer *et al.* 2009). Orexinrezeptoren wurden bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Hämatopoiese beschrieben. Im Wissen um ihre physiologische Bedeutung, welche vergleichbar mit dem vegetativen Nervensystem eine Rolle für die Regulation des Schlaf-Wach-Verhaltens sowie der Nahrungsaufnahme spielen, wurde in dieser Arbeit die Rolle der Orexinrezeptoren auf HSPC adressiert. Hierbei konnte nicht nur zum ersten Mal eine differenzierungsabhängige Expression von Orexinrezeptoren auf den verschiedenen HSPC-Subsets gezeigt werden, sondern es konnten auch funktionelle Effekte auf das HSPC-Verhalten nachgewiesen werden. Ferner erlauben erste Hinweise auf die Herkunft des Orexins im Knochenmark Rückschlüsse auf den möglichen Steuerungsmechanismus der HSPC durch das orexinerge System.

5.1 Orexinrezeptoren werden in den verschiedenen CD34⁺ HSPC-Subsets unterschiedlich stark exprimiert

Da erste präliminäre Ergebnisse von Steidl *et al.* 2004, gezeigt hatten, dass Orexinrezeptoren auf den unreiferen CD34⁺/CD38^{low} Zellen höher exprimiert sind als auf den reiferen CD34⁺/CD38⁺ Zellen, wurde die Expression der Orexine auf den verschiedenen CD34⁺ HSPC-Subsets gemäß der Einteilung nach Weissmann untersucht (Manz *et al.* 2002, Steidl *et al.* 2004). In dieser Arbeit konnte in durchflusszytometrischen Subsetanalysen gezeigt werden, dass beide Orexinrezeptoren differenzierungsabhängig über die gesamten Subsets der CD34⁺ HSPC unterschiedlich stark exprimiert sind (Kapitel 4.1.2). Die höchste Expression konnte bei den HSC (Lin⁻/CD34⁺/CD38^{low}) festgestellt werden, gefolgt von den CMP (Lin⁻/CD34⁺/CD38⁺/CD45RA^{low}/CD123⁺) und den GMP (Lin⁻/CD34⁺/CD38⁺/CD45RA⁺/CD123⁺). Die niedrigste Expression wiederum wiesen die MEP (Lin⁻/CD34⁺/CD38⁺/CD45RA^{low}/CD123^{low}) auf. Diese differenzierungsabhängige Verteilung der Rezeptorexpression legt nahe, dass gerade die unreifen, frühen blutbildenden Zellen, die noch das volle Potenzial besitzen in jeden der verschiedenen Zelltypen des hämatopoietischen Systems differenzieren zu können durch die höchste Rezeptordichte am empfänglichsten für die orexinergen Signale sind. Dies korreliert mit Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, in denen gezeigt wurde, dass das sympathische Nervensystem eine Rolle in der Hämatopoiese spielt, indem Neurotransmitter, wie die Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin Einfluss auf die Aufrechterhaltung, Mobilisierung, Proliferation und Entwicklung von HSPC nehmen. So konnten Spiegel *et al.* 2007 zeigen, dass CD34⁺ Zellen verstärkt migrieren, wenn Dopamin und Norepinephrin als chemotaktische Lockstoffe eingesetzt werden (Spiegel *et al.* 2007). Analog zu den Orexinrezeptoren fanden auch sie eine differenzierungsabhängige Expression der Dopaminrezeptoren 3 und 5, welche auf den primitiveren CD34⁺/CD38^{low} Zellen signifikant höher exprimiert waren als auf den CD34⁺/CD38⁺ Zellen.

Angesichts dieses vergleichbaren Verteilungsmusters der Orexinrezeptoren auf den HSPC-Subsets wurden als nächstes die funktionellen Effekte untersucht, welche durch die Stimulation mit Orexin A und Orexin B in den CD34⁺ HSPC hervorgerufen wurden.

5.2 Orexine haben funktionelle Auswirkungen auf CD34⁺ HSPC

5.2.1 Orexine vermindern die Polarität, Adhäsions- und Migrationsrate

In den Versuchen zur morphologischen Polarität und zur Adhäsions- und Migrationsrate der CD34⁺ HSPC zeigte sich der größte Einfluss von Orexin A und Orexin B auf die Funktionalität der CD34⁺ Zellen. So reduzierte sich der Anteil morphologisch polarer CD34⁺ Zellen unter dem Einfluss von sowohl Orexin A, als auch Orexin B um jeweils etwa ein Drittel (Kapitel 4.2.3). Auch die Adhäsion an Kollagen-beschichteten wie auch Fibronektin beschichteten Platten nahm signifikant nach Stimulation mit Orexin A und B ab, wobei der Effekt auf den Fibronektin-beschichteten Platten stärker ausgeprägt war als auf den Kollagen-beschichteten Platten. Ebenso war die Reduktion der adhärenenten Zellen nach der Stimulation mit Orexin A stärker ausgeprägt als nach der Stimulation mit Orexin B (Kapitel 4.2.1). Bei der Migrationsrate waren die Effekte noch erheblicher, so wanderten unter dem Einfluss von Orexin A und Orexin B jeweils ca. 50% weniger CD34⁺ Zellen, als in der Kontrolle (Kapitel 4.2.2). Um differenzieren zu können, auf welchen der beiden Orexinrezeptoren die beobachteten Effekte zurückzuführen sind, wurde bei allen drei Versuchsreihen zusätzlich zum Orexin A auch den Orexinrezeptor 1-Antagonist SB334867 eingesetzt. Hierbei zeigte sich bei den Versuchen zur Polarität und zur Migrationsrate nur eine teilweise Aufhebung des durch Orexin A vermittelten Effektes. Hieraus lässt sich folgern, dass die Effekte auf die Polarität und die Migrationsrate über beide Rezeptoren gesteuert werden, da der Antagonist SB334867 lediglich den Orexinrezeptor 1 blockiert und bei gleichzeitiger Gabe mit Orexin A, welches an beide Rezeptoren gleichermaßen bindet immer noch ein "Resteffekt" über den Orexinrezeptor 2 vorhanden ist. Bei den Versuchen zur Adhäsion konnte sowohl auf Kollagen als auch auf Fibronektin beschichteten Platten durch die zusätzliche Gabe des Antagonisten eine vollständige Aufhebung der Reduktion der Adhäsionsrate erreicht werden. Diese vollständige Aufhebung des Orexin A vermittelten Effektes durch den Antagonisten lässt darauf schließen, dass die Verminderung der Adhäsion ausschließlich über den Orexinrezeptor 1 vermittelt wird.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erstmals, dass die beiden Neuropeptide Orexin A und Orexin B einen hemmenden Einfluss auf wesentliche Funktionen der HSPC, nämlich Polarität, Adhäsion und Migration haben. Diese Beobachtungen decken sich, wie oben bereits erwähnt, mit Arbeiten zu anderen G-Protein gekoppelten Neurorezeptoren, welche ebenfalls eine Wirkung auf das hämatopoietische System zeigen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass catecholaminerge Neurotransmitter, welche über Dopamin- und Adrenorezeptoren wirken,

unter anderem über den Wnt-Signalweg Einfluss auf unreife CD34⁺ Zellen nehmen. Demnach sollen Dopamin und andere Agonisten des Dopaminrezeptors die Migration von CD34⁺ Zellen induzieren und deren klonogene Kapazität und Repopulationsrate erhöhen, während adrenerge Neurotransmitter wie z.B. Adrenalin und Noradrenalin je nach Höhe der Dosis eine sowohl hoch, als auch herunter regulierende Wirkung auf Motilität, Proliferation und Mobilisierung von CD34⁺ Zellen zeigen kann (Spiegel *et al.* 2007). Weiterhin konnte in aktuellen Arbeiten zu anderen Zelltypen gezeigt werden, dass Noradrenalin die Migration von Makrophagen und Tumorzellen der Pankreastumorzelllinien PANC1, CFPAC1 und IMIM-PC2 signifikant inhibiert (Stock *et al.* 2013, Xiu *et al.* 2013). Im Gegensatz dazu reagierten Tumorzellen aus der Brust, dem Dickdarm und der Prostata auf Noradrenalin genau umgekehrt mit einer erhöhten Migrationsrate (Masur *et al.* 2001, Drell *et al.* 2003, Lang *et al.* 2004). Während Dopamin durch dopaminerge Nervenzellen im Zentralnervensystem gebildet und freigesetzt wird, werden Adrenalin und Noradrenalin vom Nebennierenmark produziert und von dort aus ins Blut ausgeschüttet. Sowohl das Zentralnervensystem, als auch das Nebennierengewebe wird, wie in der Einleitung erwähnt, ebenfalls durch Orexine beeinflusst. Aufgrund des Vorkommens und der ähnlichen Wirkung scheint es naheliegend, dass es ein enges Wechselspiel zwischen Adrenalin, Orexin und Dopamin gibt, bei dem Orexin eine regulierende Wirkung auf die Ausschüttung von Catecholaminen haben könnte. Hierzu wurde 2013 von der Gruppe um Nemoto gezeigt, dass die Stimulation mit Orexin in Zellen des Nebennierenmarks von Rindern eine Änderung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und eine Ausschüttung von Adrenalin bewirkt. Gleichzeitig bewirkte die Gabe von Orexin eine Herunterregulierung von Prepro-Orexin, OxR1 und OxR2, was auf eine Art Autoregulation des Orexinspiegels in der Nebenniere hinweist (Nemoto *et al.* 2013).

5.2.2 Orexine reduzieren das SDF1-abhängige Ca²⁺-Signal und erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel

Mit Blick auf die orexinerge Beeinflussung von Migration und Adhäsion konnten im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen zur Signalweiterleitung (Kapitel 4.4) innerhalb der CD34⁺ Zellen zusätzliche Hinweise darauf gefunden werden, wie die Adhäsion und Migration durch die Orexinstimulation in den CD34⁺ Zellen beeinträchtigt werden könnte. Hier konnte gezeigt werden, dass die Orexine zwar kein direktes Ca²⁺-Signal in den CD34⁺ Zellen auslösen (Kapitel 4.4.1.1), aber dass sowohl Orexin A als auch Orexin B das SDF1-abhängige Ca²⁺-Signal nach halbstündiger Stimulierung signifikant reduzieren (Kapitel 4.4.1.2). Da bei den Versuchen zur Migration der chemotaktische Lockstoff SDF1 verwendet wurde, stellt

genau diese signifikante Abnahme des SDF1-abhängigen Ca^{2+} -Signals eine mögliche mechanistische Erklärung der verringerten Migrationsrate der CD34^+ Zellen unter dem Einfluss von Orexin dar.

Weiterhin konnte in den Versuchen zum intrazellulären cAMP-Spiegel gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von Orexin der intrazelluläre cAMP-Spiegel in CD34^+ Zellen ansteigt (Kapitel 4.4.2). Dieser Effekt ist in beiden Fällen signifikant, wenn auch bei der Gabe von Orexin B stärker ausgeprägt als bei der Gabe von Orexin A. Auch diese Ergebnisse liefern Hinweise auf die Mechanismen, welche zu der verminderten Adhäsion und Migration der CD34^+ Zellen nach Orexin-Exposition führen könnten. So konnte die Gruppe um Spina zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in MDS-MB-231 Brustkrebszellen zu einer Herunterregulierung der fokalen Adhäsion und der Migration führt (Spina *et al.* 2012). Es ist also denkbar, dass bei CD34^+ Zellen die Stimulation mit Orexin neben der Reduktion des SDF1-abhängigen Ca^{2+} -Signals eine Herunterregulierung der Adhäsion über den cAMP-Spiegel induziert. Dies würde wiederum synergistisch zu einer verminderten Adhäsion und Migration führen.

5.2.3 Orexine verschieben das Gleichgewicht von Selbsterneuerung und Differenzierung

Neben Migration und Adhäsion stellen auch die Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit wesentliche Eigenschaften von CD34^+ HSPC dar. Interessanterweise zeigten sich auch hierbei relevante funktionelle Effekte von Orexin A und Orexin B. Zunächst induzierte die Stimulation mit Orexin A und B eine leichte Reduktion der CFC-Frequenz, welche jedoch nur bei Orexin B Stimulation signifikant war. Zusätzlich beeinflusste die Stimulation mit Orexin A und Orexin B deutlich die Differenzierungsfähigkeit von CD34^+ Zellen. Im CFC-Assay sanken sowohl bei Stimulation mit Orexin A als auch mit Orexin B die Anteile der roten Kolonietypen signifikant in Bezug zur Kontrolle, während der Anteil an CFU-GEMM signifikant anstieg (Kapitel 4.3.1). Es zeigte sich also eine deutliche Verschiebung der Kolonieanteile zu Gunsten der gemischten Kolonien, welche aus den primitiveren, wenig determinierten CD34^+ Zellen entstehen, auf Kosten der roten Kolonien, welche aus den am weitesten determinierten CD34^+ Zellen entstehen. Dies könnte auch bedingt sein, durch die bereits oben erwähnte Verteilung der Orexinrezeptoren auf den unterschiedlichen HSPC-Subsets.

Die Inkubation mit dem OxR1-Antagonisten SB334867 konnte die von Orexin A vermittelten Effekte dementsprechend umso besser unterdrücken, je undifferenzierter und undeterminierter die Zellen waren. So wurde der Effekt von Orexin A auf die CFU-E durch SB334867 nur etwas gemildert, während er bei den BFU-E vollständig aufgehoben wurde. Der Effekt auf die CFU-GEMM wurde sogar mehr als aufgehoben, hier sinkt der Anteil an Kolonien bei zusätzlicher Gabe von SB334867 sogar unter den Anteil bei der unstimulierten Kontrolle (Kapitel 4.3.1). Es scheint, als wäre eine Aktivierung des Orexinrezeptor 1 notwendig, um die volle Selbsterhaltungskapazität der CD34⁺ Zellen zu gewährleisten. Zumindest zeigt die Wirkung von SB334867, dass der Rezeptor 1 eine tragende Rolle in der Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung spielt.

In Korrelation zu der Erhöhung der primitiveren, weniger determinierten CD34⁺ Zellen im CFC-Ansatz konnte in den Versuchen zur Selbsterneuerungsfähigkeit eine signifikant gesteigerte LTC-IC-Frequenz in der klonogenen Langzeitzellkultur festgestellt werden. Der Anteil an LTC-IC erhöhte sich durch Stimulation mit Orexin A signifikant um mehr als 100% und bei Stimulation mit Orexin B ebenfalls signifikant um fast 50%. Die zusätzliche Inkubation mit SB334867 bewirkte eine Aufhebung des Orexin A vermittelten Effektes bis auf den Level der Stimulation mit Orexin B, so dass hier spekuliert werden kann, ob der Effekt von Orexin auf die LTC-IC hauptsächlich, oder eventuell sogar alleine über den Orexinrezeptor 2 ausgeübt wird. Aufgrund der Verschiebung der Kolonieanteile im CFC-Assay und der Erhöhung der LTC-IC-Frequenzen lässt sich folgern, dass die Stimulation mit Orexin A und Orexin B der Determinierung der CD34⁺ Zellen entgegenwirkt, und somit das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung bei CD34⁺ Zellen in Richtung Selbsterneuerung verschiebt. Da die hier durchgeführten Untersuchungen die ersten Versuche zur Selbsterneuerungsfähigkeit und zum Differenzierungspotential von CD34⁺ Zellen unter dem Einfluss von Orexin überhaupt sind, gibt es noch keine Daten von anderen Gruppen zu dieser Thematik. Für andere Neurotransmitter ist jedoch schon ein Einfluss auf die Hämatopoiese bekannt. So erhöht Dopamin wie weiter oben schon beschrieben die klonogene Kapazität von CD34⁺ Zellen (Spiegel *et al.* 2007) und die Gruppe um Penn *et al.* konnte zeigen, dass Noradrenalin die Erythropoiese in Ratten effektiv inhibiert. In diesem Zusammenhang zeigten sich in den untersuchten Ratten eine dosisabhängige Inhibierung des BFU-E und CFU-E Koloniewachstums von mehr als 50% durch Noradrenalin (Penn *et al.* 2010).

5.2.4 Orexine haben keinen Einfluss auf die Proliferation oder Apoptose

In zahlreichen Publikationen wird beschrieben, dass die Stimulation des Orexinrezeptor 1 in Neuroblastomzellen und auch in CHO-Zellen zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt (Rouet-Benzineb *et al.* 2004, Ammoun *et al.* 2006, Voisin *et al.* 2006, Kukkonen 2013). Daher wurden als nächstes Untersuchungen zum Einfluss der Orexin-Stimulation auf die Apoptose- und Proliferationsrate von CD34⁺ Zellen durchgeführt, in dem unbehandelte und mit Thapsigargin (TPS) stimulierte CD34⁺ Zellen mit Orexin A und B inkubiert wurden. Mittels der durchflusszytometrischen Bestimmung von Annexin V und intrazellulärer, aktivierter Caspase3 konnten jedoch kein wesentlicher Einfluss von Orexin A und B auf das Apoptoseverhalten von CD34⁺ HSPC erfasst werden. Auch mit Blick auf das Proliferationsverhalten wurde kein Hinweis auf eine relevante Beeinflussung durch Orexin A und Orexin B gefunden (Kapitel 4.2.4 & 4.2.5).

Sowohl der fehlende Einfluss auf das Apoptoseverhalten als auch auf die Zellproliferation legen daher nahe, dass die Veränderungen im CFC- und LTC-IC-Assay nicht durch Veränderungen in der Apoptose oder der Proliferation hervorgerufen werden, sondern dass Orexin tatsächlich durch die Veränderung von intrinsischen Programmen Einfluss auf die Entscheidungsfindung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung nimmt.

5.2.5 Orexinrezeptoren sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt

Wie in der Einleitung bereits erwähnt können Orexinrezeptoren, je nach Zell- oder Gewebetyp, an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sein (Holmqvist *et al.* 2005). Um einen Einblick in die G-Protein-Kopplung der Orexinrezeptoren in CD34⁺ Zellen zu erlangen, ist in bestimmten Versuchen zusätzlich PTX als Inhibitor von G α_i -Proteinen eingesetzt worden. Hierbei gab es durch die Adhäsionsversuche deutliche Hinweise, dass der Orexinrezeptor 1 in CD34⁺ Zellen an ein inhibitorisches G-Protein (G α_i -Protein) gekoppelt ist. Zum einen wurde der inhibitorische Effekt von Orexin A auf die Adhäsion durch die gleichzeitige Gabe des OxR1 Antagonisten SB334867 nahezu komplett aufgehoben, was aufzeigt, dass dieser Effekt auf die Adhäsion ausschließlich durch den Orexinrezeptor 1 vermittelt wird (Kapitel 4.2.1). Zum anderen wurde durch die Inkubation mit PTX sowohl die von Orexin A als auch die von Orexin B vermittelte Reduzierung der Adhäsion vollständig aufgehoben, was bedeutet, dass der Effekt auf die Adhäsion durch ein G α_i -Protein vermittelt wird (siehe Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6). In Kombination deuten diese beiden Erkenntnisse darauf hin, dass in den CD34⁺ Zellen der Orexinrezeptor 1 an ein G α_i -Protein gekoppelt sein muss. Die Kopplung des

Orexinrezeptor 1 und der Einfluss von Orexin auf die Adhäsionsfähigkeit von CD34⁺ Zellen kann anhand dieser Daten also wie in folgendem Schema dargestellt werden:

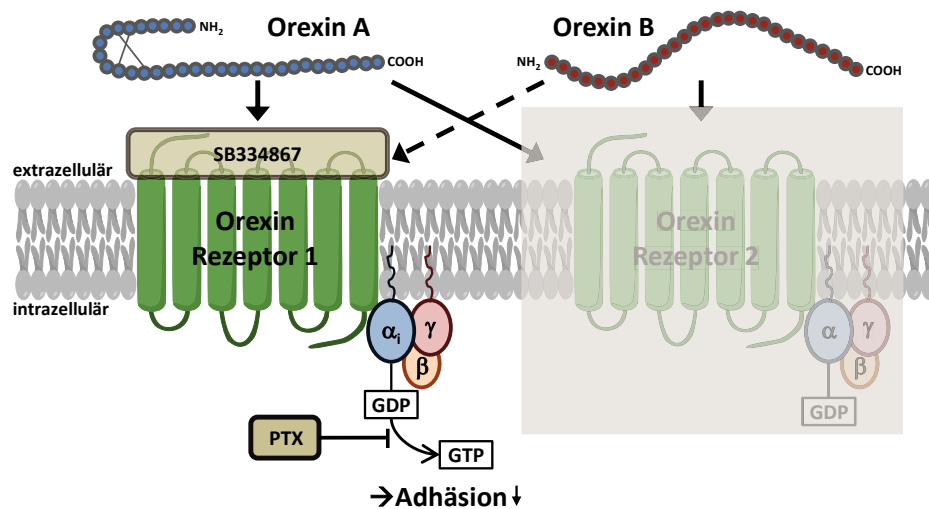


Abbildung 5.1: Schematische Abbildung des Einflusses von Orexin auf die Adhäsion

Nach den vorliegenden Daten nimmt der Orexinrezeptor 2 keinen Einfluss auf die Adhäsion der CD34⁺ Zellen. Sowohl Orexin A, als auch Orexin B wirken hierbei ausschließlich über den Orexinrezeptor 1, was durch die vollständige Aufhebung des Effektes beider Orexine durch Einsatz des OxR1 Antagonisten SB334867 deutlich wird. Die Kopplung des Orexinrezeptor 1 an ein G_{αi}-Protein wird unter diesen Umständen dann durch die vollständige Aufhebung des Orexin vermittelten Effektes durch PTX verdeutlicht.

Weitere Rückschlüsse auf die G-Protein-Kopplung der Orexinrezeptoren in CD34⁺ Zellen wurden über die Migrationsversuche deutlich (Kapitel 4.2.2). Hierbei war es nicht möglich den Orexin A vermittelten Effekt auf die Migrationsrate der CD34⁺ Zellen durch die zusätzliche Gabe von SB334867 vollständig aufzuheben (siehe Abbildung 4.8), was darauf hindeutet, dass der negative Effekt auf die Migrationsrate sowohl über den OxR1, als auch über den OxR2 vermittelt wird. Weiterhin zeigte sich, dass die Migrationsrate bei Inkubation mit PTX durch die G_{αi}-Kopplung des CXCR4-Rezeptors zwar per se schon signifikant verringert ist (siehe Abbildung 4.7), jedoch konnte die Migrationsrate der CD34⁺ Zellen, wie in Abbildung 4.8 dargestellt, durch die gleichzeitige Gabe von Orexin A oder Orexin B noch weiter herabgesetzt werden. Allerdings erreichte in beiden Fällen die Reduktion der Migrationsrate nicht das Niveau der Reduktion bei alleiniger Stimulation mit Orexin A oder Orexin B im Vergleich zur Kontrolle. Die Beobachtungen, dass der Effekt auf die Migration über beide Orexinrezeptoren gesteuert wird, und dass durch die Gabe von PTX der inhibitorische Effekt der Orexine nicht wie bei den Versuchen zur Adhäsion komplett aufgehoben wird, lassen zusammen mit der im letzten Abschnitt beschriebenen Prämisse, dass der Orexinrezeptor 1 an ein G_{αi}-Protein gekoppelt ist, darauf schließen, dass der Orexinrezeptor 2 an ein stimulatorisches G_{αs}/G_{αq}-Protein gekoppelt ist, dessen

Signalweiterleitung nicht durch PTX beeinflusst wird. Zusammengefasst mit den Daten aus den Versuchen zur Adhäsion ergibt sich folgendes Schema zur G-Protein-Kopplung der Orexinrezeptoren in CD34⁺ Zellen:

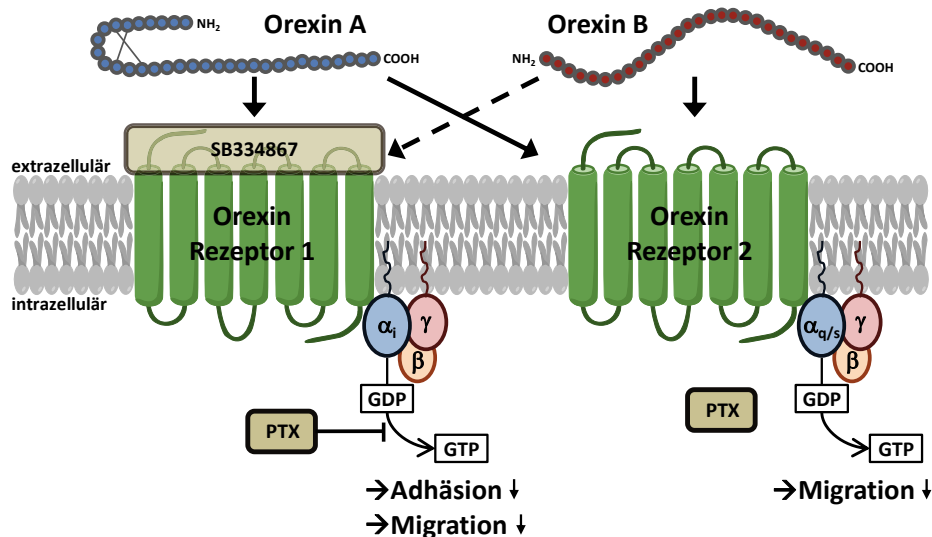


Abbildung 5.2: Schema zur Wirkung von Orexin auf die Adhäsion und Migration von CD34⁺ HSPC

Sowohl der Orexinrezeptor 1, als auch der Orexinrezeptor 2 nehmen Einfluss auf die Migration der CD34⁺ HSPC. Die Kopplung des Orexinrezeptor 1 an ein Gα_i-Protein und des Orexinrezeptor 2 an ein Gα_s- oder Gα_q-Protein wird unter diesen Umständen durch die unvollständige Aufhebung des Orexin vermittelten Effektes auf die Migration sowohl durch PTX, als auch durch den OxR1 Antagonisten SB334867, verdeutlicht.

Zusätzlich haben auch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur intrazellulären cAMP und Ca²⁺-Konzentration weitere Hinweise auf die G-Protein-Kopplung der Orexinrezeptoren in CD34⁺ Zellen gegeben (Kapitel 4.4). Für die cAMP Produktion ist hauptsächlich die Adenylatzyklase (AC) verantwortlich. Bisher sind neun verschiedene Isoformen der Adenylatzyklase (AC1 - AC9) in Säugetieren bekannt. Die wichtigsten Faktoren zur Regulation der AC sind hierbei G-Protein α-Untereinheiten (Gα_i; Gα_s), G-Protein βγ-Untereinheiten (Gβγ), Ca²⁺/Calmodulin und Proteinkinase C (PKC) (Sunahara *et al.* 1996, Hanoune und Defer 2001). Charakteristische Eigenschaften der verschiedenen AC-Isoformen sind, dass die einzelnen Isoformen nicht auf alle Faktoren ansprechen, und dass ein einzelner Faktor für die eine Isoform inhibierend, aber für eine andere Isoform stimulierend wirken kann. So inhibiert Gβγ beispielsweise AC1, während es stimulierend auf AC2, AC4 und AC7 wirkt. Allerdings wirkt Gβγ auch nur dann stimulierend auf AC2, AC4 und AC7 wenn diese ACs gleichzeitig durch einen anderen Faktor, wie z. B. Gα_s oder PKC stimuliert werden (Tang und Gilman 1991, Nasman *et al.* 2002). Die Konsequenz dieses Isoform-abhängigen Signalweges ist die ungleiche Änderung des intrazellulären cAMP-Spiegels von Zelltyp zu Zelltyp abhängig vom Expressionsmuster der AC-Isoformen und weiterer an der

AC-Regulation beteiligten Proteine. Zu der Gruppe der G_{α_s} -Proteine gehören die vier Spleißvarianten der klassischen α_s -Untereinheit und die für ZNS- und olfaktorische Nerven spezifische α_{olf} -Untereinheit (Bray *et al.* 1986). Diese fünf Untereinheiten wirken stimulatorisch auf die ACs und erhöhen so die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Die Gruppe der G_{α_i} -Proteine verfügt über insgesamt neun unterschiedliche α -Untereinheiten, welche alle einen inhibitorischen Effekt auf die ACs zeigen, und somit für eine Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration sorgen. Die vier α -Untereinheiten der Gruppe der G_{α_q} -Proteine vermitteln ihre Effekte primär über Ca^{2+} und bewirken beispielsweise durch die Aktivierung der Phospholipase-C- β eine PTX unabhängige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Rhee 2001, Milde *et al.* 2014).

In den hier durchgeführten Arbeiten zum intrazellulären Ca^{2+} in den $CD34^+$ Zellen war keine direkte Beeinflussung des intrazellulären Kalziumspiegels durch Orexin A oder Orexin B zu beobachten (Abbildung 4.18). Mit den Rückschlüssen aus den Adhäsions- und Migrationsversuchen, liegt es daher nahe, dass der Orexinrezeptor 2 in $CD34^+$ Zellen an ein G_{α_s} -Protein gebunden ist. Dafür sprechen auch die Ergebnisse aus den Versuchen zum intrazellulären cAMP-Spiegel in $CD34^+$ Zellen. Hierbei würde das an den Orexinrezeptor 1 gebundene G_{α_i} -Protein für eine Absenkung des intrazellulären cAMP-Spiegels sorgen, während das G_{α_s} -Protein am Orexinrezeptor 2 für eine Anhebung verantwortlich wäre. Da die Adenylatzyklaseaktivität jedoch ebenfalls durch die freiwerdenden G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten ($G\beta\gamma$) der beiden Rezeptoren stimuliert werden kann, ergibt sich insgesamt eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Abbildung 4.20) sowohl durch die Gabe von Orexin A, als auch von Orexin B. Durch die bei Orexin B vorhandene 10fach höhere Affinität zum Orexinrezeptor 2 fällt bei der Gabe von Orexin B die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration wesentlich größer aus, als bei der Gabe von Orexin A, welches, wie in der Einleitung schon beschrieben, die gleiche Affinität zu beiden Rezeptoren aufweist. Aufgrund dieser Ergebnisse kann nun ein finales, wenn auch immer noch hypothetisches Modell der G-Proteinkopplung der Orexinrezeptoren in den $CD34^+$ Zellen inklusive der von den Rezeptoren vermittelten Effekte auf die Funktionalität dieser Zellen aufgezeichnet werden, welches in Abbildung 5.3 dargestellt ist. In diesem Modell vermittelt der über ein inhibitorisches, Pertussis Toxin sensibles G_{α_i} -Protein gekoppelte Orexinrezeptor 1 reduktive Effekte auf sowohl die Polarität, Adhäsion und Migration, als auch auf die Differenzierungsfähigkeit von $CD34^+$ HSPC. Gleichzeitig wird durch die Stimulation des Orexinrezeptor 1 die Selbsterneuerungsfähigkeit der $CD34^+$ HSPC erhöht. Dies alles geht einher mit einer Reduktion des SDF1-abhängigen Kalziumsignals. In den intrazellulären

cAMP-Haushalt scheint der Orexinrezeptor 1 sowohl negativ über das $G\alpha_i$ -Protein, als auch positiv über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins einzugreifen.

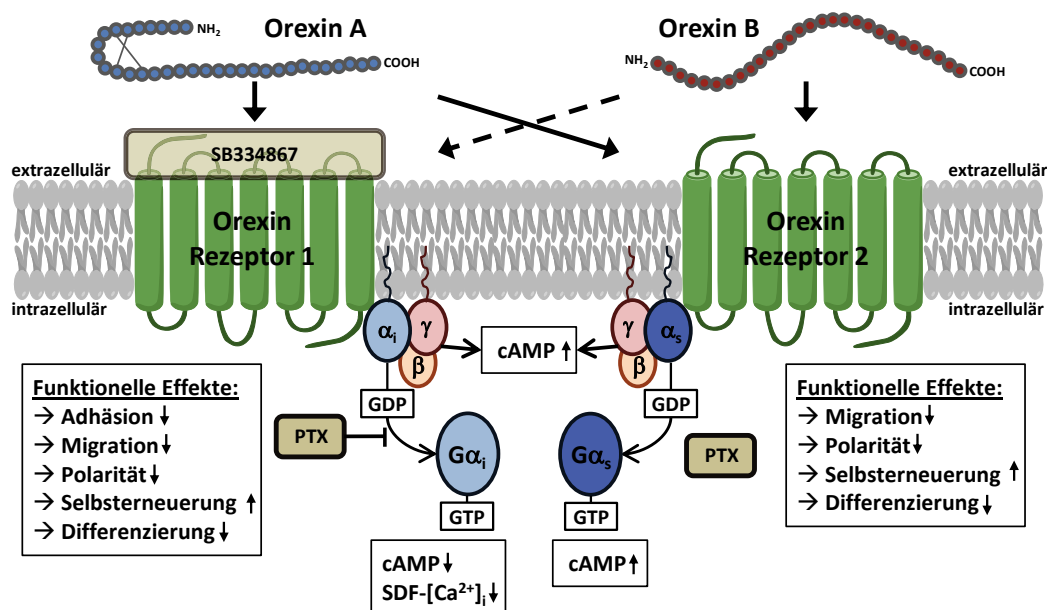


Abbildung 5.3: Hypothetische Kopplung der G-Proteine und Effekte in $CD34^+$ HSPC

Diese Abbildung stellt die auf den vorliegenden Daten basierende Hypothese zur G-Protein-Kopplung der Orexinrezeptoren und deren Effekte in bzw. auf $CD34^+$ Zellen dar.

Der Orexinrezeptor 2 verhält sich in diesem Modell ähnlich zum Orexinrezeptor 1, auch er vermittelt reduktive Effekte auf die Polarität, die Migration und die Differenzierungsfähigkeit und auch er erhöht die Selbsterneuerungsfähigkeit von $CD34^+$ HSPC. Allerdings scheint der Orexinrezeptor 2 an ein $G\alpha_s$ -Protein gekoppelt zu sein, wodurch er keinen Einfluss auf das SDF-abhängige Ca^{2+} -Signal nimmt. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel würde dann allerdings sowohl durch das $G\alpha_s$ -Protein, als auch durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit erhöht werden.

5.3 $CD34^+$ HSPC exprimieren Prepro-Orexin

Die vorangegangenen Versuche zeigten zum einen eine ausgeprägte, differenzierungsabhängige Expression der Orexinrezeptoren auf $CD34^+$ HSPC sowie zum anderen eine weitreichende Einflussnahme von Orexin auf grundlegende funktionelle Eigenschaften von $CD34^+$ HSPC.

Die Orexine A und B werden normalerweise nur von einer kleinen Anzahl orexinergischer Neurone exprimiert, welche sich hauptsächlich im lateralen und posterioren Hypothalamus befinden. Von hier aus erstrecken sich die Axone dieser Neurone, mit Ausnahme des Kleinhirns, in nahezu alle Regionen des zentralen Nervensystems, um das Schlaf- und

Wachverhalten, Appetit und Nahrungsaufnahme sowie endokrine und autonome Prozesse zu steuern (Holmqvist *et al.* 2005, Sakurai 2007, Sakurai und Mieda 2011). Hieraus resultierte die Frage, ob und auf welchem Weg die Orexine in das Knochenmark gelangen könnten, um ihre Wirkung auf CD34⁺ Zellen zu entfalten. Um diese Frage zu beantworten, wurden zunächst immunfluoreszente Färbungen von Knochenmarkstanzen angefertigt, wobei es gelang Orexin A-, Orexin B-, und Prepro-Orexin (PPOx) enthaltende Zellen im Knochenmark nachzuweisen. Die Menge und das Verteilungsmuster der Orexin-positiven Zellen in den Knochenmarkstanzen ließ sich am ehesten mit dem von CD34⁺ Zellen vergleichen. Daraufhin wurde untersucht, ob CD34⁺ Zellen tatsächlich Orexine exprimieren. Hierfür wurde sich auf PPOx beschränkt, dem Vorläuferprotein der beiden Liganden Orexin A und Orexin B (de Lecea *et al.* 1998, Sakurai *et al.* 1998). Zunächst wurden an CD34⁺ Zellen intrazelluläre, immunfluoreszente 4fach Färbungen mit DAPI und mit Antikörpern gegen die Epitope CD34, CD38 und PPOx durchgeführt. Hierdurch konnte PPOx sowohl in CD34⁺/CD38⁺ als auch in CD34⁺/CD38^{low} Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 4.5.2.1). Da die Fluoreszenzintensität in den beiden Zellpopulationen unterschiedlich erschien und die Expression der Orexinrezeptoren ebenfalls differenzierungsabhängig war, lag es nahe, dass sich auch die Expression von PPOx mit der fortschreitenden Determinierung der CD34⁺ Zellen verändert. In der Tat zeigten die anschließenden durchflusszytometrischen Analysen, dass in den primitiveren, weniger determinierten CD34⁺/CD38^{low} Zellen signifikant mehr PPOx exprimiert wird als in allen anderen untersuchten Zellpopulation (MNC, CD34⁺, CD34⁺/CD38⁺). Die Population der CD34⁺ Zellen (welche sowohl CD38⁺, als auch CD38^{low} Zellen beinhaltet) exprimiert wiederum signifikant mehr Prepro-Orexin als die CD34⁺/CD38⁺ Zellen, und diese exprimieren signifikant mehr PPOx als die MNC, in denen PPOx kaum noch zu detektieren war (Kapitel 4.5.2.2). Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu den immunfluoreszenten Färbungen von PPOx in CD34⁺ Zellen darauf hin, dass die Expression von PPOx mit fortschreitender Differenzierung der Zellen herunter reguliert wird.

Da PPOx das Vorläuferprotein von OxA und OxB ist und posttranslational zu eben diesen gespalten wird, detektieren die handelsüblichen Antikörper entweder OxA oder OxB zusätzlich zum PPOx. Um sicherzustellen, dass in den durchflusszytometrischen Analysen tatsächlich der Orexin Vorläufer PPOx (16 kDa) detektiert wurde und nicht die kleineren posttranslationalen Spaltprodukte wurden zusätzlich Western Blot Analysen mit dem bisher verwendeten Antikörper durchgeführt (Kapitel 4.5.2.3). Hierbei wurde nur PPOx in den CD34⁺ Zellen nachgewiesen. Zudem stellte sich heraus, dass in CD34^{neg} Zellen weder PPOx

noch OxA detektiert werden konnte, was die Hypothese der differenzierungsabhängigen PPOx-Expression nochmals unterstützt.

Es kann hier also festgehalten werden, dass die PPOx-Expression in CD34⁺ HSPC ebenso wie die Rezeptorexpression mit zunehmender Determinierung immer geringer wird. Vor der Fragestellung, wie die Orexine in vivo die CD34⁺ Zellen erreichen, um sie zu beeinflussen legen diese Daten nahe, dass ein autokriner Stimulationsmechanismus der CD34⁺ Zellen mit Orexin A und Orexin B, vorliegen könnte.

Dennoch sollte bedacht werden, dass auch eine parakrine Stimulation der CD34⁺ Zellen über z. B. Nervenzellen/-fasern oder mesenchymale Stromazellen möglich wäre, auch wenn die Ergebnisse hier eher auf eine autokrine Stimulation hinweisen. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass in Zellen aus den Tibiae (Schienbeinen) von Mäusen die mRNA für den Orexinrezeptor 1 exprimiert ist. Dies weist auf eine lokale Regulation durch Orexin hin. Die zusätzlich gefundene tibiale Orexin-Expression konnte den dort vorkommenden MSC, den Osteoblasten und den Adipozyten zugeordnet werden (Wei *et al.* 2014). Dieselbe Gruppe konnte weiter zeigen, dass je nach Aktivierung der Orexinrezeptoren, die Differenzierung von MSC in Osteoblasten vermindert und eine Differenzierung in Adipozyten gesteigert wird, und somit der Knochenaufbau bzw. die Knochendichte verringert wird. Dieses Zusammenspiel wird zum einen vom sympathischen Nervensystem durch Anpassung des Levels von zirkulierendem Leptin über den OxR2 gesteuert und zum anderen lokal in der Tibia, wo eine Aktivierung des OxR1 die lokale Expression von Ghrelin vermindert. Die Verminderung der Expression von Ghrelin beeinflusst wiederum die Knochendichte negativ, während eine Verminderung von zirkulierendem Leptin die Knochendichte eher steigert (Wei *et al.* 2014). Insgesamt ist dies ein gutes Beispiel dafür, dass Orexin sowohl autokrin/parakrin an lokaler Stelle, aber auch über das sympathische Nervensystem global im Organismus seine Wirkung entfalten kann.

Ähnliches könnte auch in der humanen Knochenmarknische vorliegen, wo zwischen den Nischenbestandteilen ein enger räumlicher Kontakt herrscht, so dass Signale des sympathischen Nervensystems über die MSC an die HSC weitergegeben werden können (siehe Kapitel 1.1.2). Zum einen könnte diese Einflussnahme autokrin/parakrin über mesenchymale Stromazellen, Osteoblasten und Osteoclasten realisiert werden, so wie beispielsweise die G-CSF-induzierte Mobilisierung durch adrenerge Signale an den β 2-adrenergen Rezeptor von Osteoblasten gesteuert wird (Kondo *et al.* 2005, Katayama *et al.* 2006). Zum anderen kann das vegetative Nervensystem über Neurotransmitter auch durch

direkte Signale an die HSC Einfluss auf die Hämatopoiese nehmen. Passend zu letzterem konnte die Gruppe um Spiegel *et al.* eine direkte noradrenerge Regulation von HSC zeigen, indem sie in Migrationsversuchen Dopamin und Norepinephrin als chemotaktischen Lockstoff einsetzten und dabei eine höhere Migrationsrate der CD34⁺ Zellen feststellen konnten (Spiegel *et al.* 2007). Ursächlich hierfür scheint die signifikant höhere Expression der Dopaminrezeptoren 3 und 5 auf den primitiveren CD34⁺/CD38^{low} Zellen gegenüber der CD34⁺/CD38⁺ Zellen zu sein. Da auch die Orexinrezeptoren auf den primitiveren CD34⁺/CD38^{low} Zellen höher exprimiert sind, ebenfalls direkte Effekte zum Beispiel auf die Migration von HSC beobachten werden konnten und darüber hinaus in MSC weder die Expression der Orexinrezeptoren, noch von Prepro-Orexin nachgewiesen werden konnte, ist eher anzunehmen, dass das vegetative Nervensystem mit den HSC direkt über die Orexinrezeptoren interagiert, als dass eine indirekte Interaktion z.B. über die MSC stattfindet. Auch die Expression andere HSC-regulierender Gene, wie Angiopoetin-1 oder VCAM-1 scheint durch neuronale Signale beeinflusst zu werden (Mendez-Ferrer *et al.* 2008, Mendez-Ferrer *et al.* 2010b). Daher ist es leicht vorstellbar, dass auf gleichem oder ähnlichem Wege diverse funktionelle Eigenschaften der HSC bereits in der Nische durch Orexine moduliert werden.

Final lässt sich festhalten, dass die Expression sowohl von Prepro-Orexin, als auch der Orexinrezeptoren 1 und 2 in CD34⁺ HSPC differenzierungsabhängig ist und dabei mit fortschreitender Differenzierung immer geringer wird. Weiterhin zeigten sich durch die Stimulation mit Orexin A und Orexin B diverse Effekte auf essentielle Funktionen und Eigenschaften der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen. So konnte gezeigt werden, dass Orexine Einfluss auf die Polarität, Adhäsion und Migration von CD34⁺ HSPC nehmen und sowohl die Differenzierungskapazität, als auch die Selbsterneuerungsfähigkeit dieser Zellen erhöhen. Zusätzlich konnte in CD34⁺ HSPC ein Abschwächen des intrazellulären SDF1-abhängigen Kalziumsignals und ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Orexin-Stimulation beobachtet werden.

Darüber hinaus lässt sich zur Expression von Orexin im Knochenmark sagen, dass einige der in dieser Arbeit erhobenen Daten, wie die differenzierungsabhängige Expression von Prepro-Orexin in den CD34⁺ Zellen und auch das Verteilungsmuster Orexin-positiver Zellen in den Knochenmarkstanzen auf eine autokrine Versorgung der CD34⁺ Zellen mit Orexin nahe legen. Auch das bereits in Kapitel 5.2.1 beschriebene "Feedback-System", bei dem die Expression von Prepro-Orexin, sowie die der Orexinrezeptoren 1 und 2 bei Zellen des Nebennierenmarks durch die Gabe von Orexin A um mehr als 50% herunter reguliert wird

(Nemoto *et al.* 2013) lässt eine autokrine Regulation der Orexine im Knochenmark sehr wahrscheinlich erscheinen, verbleibt jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt spekulativ. Um den genauen Weg der Orexine in das Knochenmark bzw. bis zu den CD34⁺ Zellen nachvollziehen zu können, bedarf es noch weiterführender Experimente z. B. zur Sekretion und Aufnahme von Orexin.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Neuropeptide Orexin A und Orexin B sind hauptsächlich aus dem neuronalen System und für die Regulation des Schlaf- und Wachrhythmus, sowie des Essverhaltens bekannt. Sie sind die Agonisten für die Orexinrezeptoren 1 und 2, welche auf keine anderen Neuropeptide reagieren und somit hochspezifisch für Orexin A und Orexin B sind.

Unsere Arbeitsgruppe beschrieb bereits im Jahr 2004 die Expression der G-Proteingekoppelten Orexinrezeptoren auf CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (CD34⁺ HSPC) aus peripherem Blut und konnte in ersten Versuchen auch die Funktionalität der Orexinrezeptoren in diesen Zellen belegen.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen war es Ziel dieser Arbeit die Expression und Funktionalität der Orexinrezeptoren, sowie die funktionellen Effekte der Neuropeptide Orexin A und Orexin B auf CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark genauer zu untersuchen. Dabei konnte in durchflusszytometrischen Subsetanalysen erstmalig gezeigt werden, dass auf den CD34⁺ HSPC beide Orexinrezeptoren differenzierungsabhängig exprimiert sind, wobei die Expression der Orexinrezeptoren mit fortschreitender Differenzierung der Zellen abnimmt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass essentielle Funktionen der CD34⁺ HSPC sowohl von Orexin A, als auch von Orexin B beeinflusst werden. So werden zum Beispiel die morphologische Polarität, die Adhäsions- und die Migrationsfähigkeit, sowie die SDF1-abhängige intrazelluläre Kalziumantwort von CD34⁺ HSPC durch die Orexine herabgesetzt, während die Differenzierungskapazität, die Selbsterneuerungsfähigkeit und die intrazelluläre cAMP-Konzentration der Zellen gesteigert wird. Teilweise wurden die oben erwähnten Versuche mit dem Orexinrezeptor 1 Antagonisten SB334867 und mit dem inhibitorischen G-Protein-Inhibitor Pertussis Toxin durchgeführt, so dass erste Erkenntnisse zur G-Proteinkopplung der Orexinrezeptoren in den CD34⁺ HSPC aus dem Knochenmark gewonnen werden konnten. In der dadurch hergeleiteten Hypothese ist der Orexinrezeptor 1 an ein inhibitorisches G-Protein ($G\alpha_i$ -Protein) gekoppelt, während der Orexinrezeptor 2 an ein stimulatorisches $G\alpha_s$ -Protein gebunden ist.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse stellte sich die Frage, wie die Orexine zu den CD34⁺ HSPC gelangen, ob Orexine im Knochenmark vorhanden sind, und wenn ja, was die Orexin-Quelle im Knochenmark darstellt. Hierzu wurden Färbungen an Knochenmarkschnitten angefertigt, in denen Orexin exprimierende Zellen darstellbar waren. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass nicht nur die

Orexinrezeptoren, sondern auch die Orexine selbst von den CD34⁺ HSPC differenzierungsabhängig, also mit abnehmender Expressionsstärke bei fortschreitender Differenzierung, exprimiert werden. Dieser Umstand lässt eine autokrine Regulation der Orexine durch CD34⁺ HSPC im Knochenmark zwar sehr wahrscheinlich erscheinen, jedoch kann auch eine parakrine Regulation über das vegetative Nervensystem und der im Knochenmark ansässigen Nervenfasern nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt zeigen die hier vorliegenden Daten, dass die Neuropeptide Orexin A und Orexin B vermittelt über die funktionell aktiven Orexinrezeptoren auf den CD34⁺ HSPC die Funktionen und Eigenschaften eben jener CD34⁺ HSPC beeinflussen können. Es bedarf jedoch weiterer Klärung, auf welchem Weg die Orexine in das Knochenmark gelangen und wie sie dort reguliert werden. Hier kommen sowohl autokrine, lokale Wege (über die CD34⁺ HSPC oder andere Nischenbestandteile), als auch parakrine Wege in Frage, z. B. wie oben erwähnt über das vegetative Nervensystem.

6.1 Summary

The neuropeptides orexin A (OxA) and orexin B (OxB) are well described in the neuronal system involved in the regulation of sleep and wakefulness as well as in the control of feeding behavior. They are agonists for the orexinreceptors (OxR) 1 and 2, which do not react with other neuropeptides; consequently they are highly specific for OxA and OxB.

In 2004, our lab group already described the expression of the G-protein-coupled OxR on CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells (CD34⁺ HSPC) from peripheral blood and demonstrated preliminary evidence for their functionality.

Based on that background the present work aimed to specify the expression and functionality of OxR as well as the functional impact of OxA and OxB on CD34⁺ HSPC derived from bone marrow samples. Thereby, using flow cytometric-based subset analysis differentiation-dependent expression of both OxR was pointed out for the first time. Furthermore this work demonstrates that essential functions of CD34⁺ HSPC are affected by both agonists, OxA and OxB. Morphological polarity, adhesion, migration and the SDF1-dependent intracellular calcium response is decreased by orexin stimulation, whereas differentiation capacity, self-renewal and intracellular cAMP concentration is increased. Employing the OxR1 antagonist SB334867 and Pertussis Toxin, an inhibitor of inhibitory G-proteins facilitated a first insight in G-protein coupling of OxR in CD34⁺ HSPC. In detail, these data suggested, that the OxR1 may be coupled to an inhibitory G-protein (G α_i), while the OxR2 is bound to a stimulatory G α_s -protein.

Nextly, the source of orexin within the bone marrow (BM) niche was experimentally addressed. By immunohistochemical staining orexin expressing cells (Ox⁺) were identified within the BM. Distribution pattern as well as frequency of the Ox⁺ cells suggested that not only OxRs but also orexin itself is expressed in CD34⁺ HSPC and correlates with their differentiation state. Although this is a strong hint for an autocrine regulation of orexin in BM-derived CD34⁺ HSPC, a paracrine regulation through the vegetative nervous system is also conceivable.

In summary, based on these data neuropeptides OxA and OxB significantly impact essential functional properties of CD34⁺ HSPC by interaction with their functionally active OxRs. However there is still need for clarification how the orexins are regulated in the BM. Within this context, both autocrine but also paracrine stimulation by other niche components or the vegetative nervous system are considerable.

7 ANHANG

7.1 Literaturverzeichnis

- Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, S. Kale, M. W. Long, und J. Chen.** 2003. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 102: 1249-53.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, und I. L. Weissman.** 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404: 193-7.
- Ammoun, S., L. Johansson, M. E. Ekholm, T. Holmqvist, A. S. Danis, L. Korhonen, O. A. Sergeeva, H. L. Haas, *et al.*** 2006. OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling. *Mol Endocrinol*. 20: 80-99.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh, und T. Suda.** 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 118: 149-61.
- Avecilla, S. T., K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D. K. Jin, S. Dias, *et al.*** 2004. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 10: 64-71.
- Blanco, M., T. Garcia-Caballero, M. Fraga, R. Gallego, J. Cuevas, J. Forteza, A. Beiras, und C. Dieguez.** 2002. Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept*. 104: 161-5.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-54.
- Bradley, T. R., und G. S. Hodgson.** 1979. Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow. *Blood*. 54: 1446-50.
- Bray, P., A. Carter, C. Simons, V. Guo, C. Puckett, J. Kamholz, A. Spiegel, und M. Nirenberg.** 1986. Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 8893-7.
- Burdyga, G., S. Lal, D. Spiller, W. Jiang, D. Thompson, S. Attwood, S. Saeed, D. Grundy, *et al.*** 2003. Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans. *Gastroenterology*. 124: 129-39.

- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, *et al.*** 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 425: 841-6.
- Can, A.** 2008. Haematopoietic stem cells niches: interrelations between structure and function. *Transfus Apher Sci*. 38: 261-8.
- Cohen, G., G. Canellos, und J. Greenberger.** 1980. In vitro quantitation of engraftment between purified population of bone marrow hematopoietic stem cell and stromal cell, pp. 491-506. *In* R. Gale und C. Fox [eds.], *Biology of Bone Marrow Transplantation : proceedings of the 1980 ICN-UCLA Symposia on Biology of Bone Marrow Transplantation held in Keystone, Colorado*. Academic Press, New York.
- de Lecea, L., T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, E. L. Battenberg, *et al.*** 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 322-7.
- Digby, J. E., J. Chen, J. Y. Tang, H. Lehnert, R. N. Matthews, und H. S. Randeva.** 2006. Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol*. 191: 129-36.
- Drell, T. L. t., J. Joseph, K. Lang, B. Niggemann, K. S. Zaenker, und F. Entschladen.** 2003. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat*. 80: 63-70.
- Ehninger, A., und A. Trumpp.** 2011. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*. 208: 421-8.
- Ehrström, M., T. Gustafsson, A. Finn, A. Kirchgessner, P. Gryback, H. Jacobsson, P. M. Hellstrom, und E. Naslund.** 2005a. Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 90: 2370-7.
- Ehrström, M., F. Levin, A. L. Kirchgessner, P. T. Schmidt, L. M. Hilsted, P. Gryback, H. Jacobsson, P. M. Hellstrom, und E. Naslund.** 2005b. Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regul Pept*. 132: 9-16.
- Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, und E. S. Alnemri.** 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*. 269: 30761-4.
- Ghavami, S., M. Hashemi, S. R. Ande, B. Yeganeh, W. Xiao, M. Eshraghi, C. J. Bus, K. Kadkhoda, *et al.*** 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*. 46: 497-510.

- Gordon, M. Y., J. A. Hibbin, L. U. Kearney, E. C. Gordon-Smith, und J. M. Goldman.** 1985. Colony formation by primitive haemopoietic progenitors in cocultures of bone marrow cells and stromal cells. *Br J Haematol.* 60: 129-36.
- Haas, R., B. Witt, R. Mohle, H. Goldschmidt, S. Hohaus, S. Fruehauf, M. Wannenmacher, und W. Hunstein.** 1995. Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood.* 85: 3754-61.
- Hahn, H., S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz, und S. Suerbaum.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, 6., 2008.
- Hanoune, J., und N. Defer.** 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 145-74.
- Hao, Q. L., A. J. Shah, F. T. Thiemann, E. M. Smogorzewska, und G. M. Crooks.** 1995. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood.* 86: 3745-53.
- Hao, Q. L., F. T. Thiemann, D. Petersen, E. M. Smogorzewska, und G. M. Crooks.** 1996. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood.* 88: 3306-13.
- Hara, J., C. T. Beuckmann, T. Nambu, J. T. Willie, R. M. Chemelli, C. M. Sinton, F. Sugiyama, K. Yagami, *et al.*** 2001. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron.* 30: 345-54.
- Heinonen, M. V., A. K. Purhonen, K. A. Makela, und K. H. Herzig.** 2008. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf).* 192: 471-85.
- Holmqvist, T., K. E. Akerman, und J. P. Kukkonen.** 2001. High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci Lett.* 305: 177-80.
- Holmqvist, T., L. Johansson, M. Ostman, S. Ammoun, K. E. Akerman, und J. P. Kukkonen.** 2005. OX1 orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 280: 6570-9.
- Holtzer, H., M. Okayama, J. Biehl, und S. Holtzer.** 1978. Chondrogenesis in chick limb buds and somites. *Experientia.* 34: 281-4.
- Iscoe, N. N., und K. Nawa.** 1997. Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol.* 7: 805-8.
- Kagerer, S. M., und O. Jöhren.** 2010. Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions. *Acta Physiol (Oxf).* 198: 361-71.

- Karteris, E., und H. S. Randeva.** 2003. Orexin receptors and G-protein coupling: evidence for another "promiscuous" seven transmembrane domain receptor. *J Pharmacol Sci.* 93: 126-8.
- Karteris, E., J. Chen, und H. S. Randeva.** 2004. Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 1957-62.
- Kastin, A. J., und V. Akerstrom.** 1999. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 289: 219-23.
- Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas, und P. S. Frenette.** 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 124: 407-21.
- Kirchgessner, A. L., und M. Liu.** 1999. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron.* 24: 941-51.
- Kobbe, G., P. Schneider, M. Aivado, F. Zohren, D. Schubert, R. Fenk, F. Neumann, R. Kronenwett, *et al.*** 2002. Reliable engraftment, low toxicity, and durable remissions following allogeneic blood stem cell transplantation with minimal conditioning. *Exp Hematol.* 30: 1346-53.
- Kondo, H., A. Nifuji, S. Takeda, Y. Ezura, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, K. Nakashima, G. Karsenty, und M. Noda.** 2005. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem.* 280: 30192-200.
- Kondo, M., I. L. Weissman, und K. Akashi.** 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 91: 661-72.
- Kopp, H. G., S. T. Avecilla, A. T. Hooper, und S. Rafii.** 2005. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda).* 20: 349-56.
- Kronenwett, R., S. Martin, und R. Haas.** 2000. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells.* 18: 320-30.
- Kukkonen, J. P.** 2013. Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304: C2-32.
- Kukkonen, J. P., T. Holmqvist, S. Ammoun, und K. E. Akerman.** 2002. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C1567-91.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-5.
-

Lam, B. S., und G. B. Adams. 2010. Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int J Lab Hematol.* 32: 551-8.

Lang, K., T. L. t. Drell, A. Lindecke, B. Niggemann, C. Kaltschmidt, K. S. Zaenker, und F. Entschladen. 2004. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer.* 112: 231-8.

Leary, A. G., M. Ogawa, L. C. Strauss, und C. I. Civin. 1984. Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J Clin Invest.* 74: 2193-7.

Leblond, C. P. 1964. Classification of Cell Populations on the Basis of Their Proliferative Behavior. *Natl Cancer Inst Monogr.* 14: 119-50.

Lodish, H. F. Molecular cell biology. W.H. Freeman and Company, New York, 5. Auflage, 2003.

Lucas, D., I. Bruns, M. Battista, S. Mendez-Ferrer, C. Magnon, Y. Kunisaki, und P. S. Frenette. 2012. Norepinephrine reuptake inhibition promotes mobilization in mice: potential impact to rescue low stem cell yields. *Blood.* 119: 3962-5.

Lund, P. E., R. Shariatmadari, A. Uustare, M. Detheux, M. Parmentier, J. P. Kukkonen, und K. E. Akerman. 2000. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem.* 275: 30806-12.

Malendowicz, L. K., C. Tortorella, und G. G. Nussdorfer. 1999. Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 70: 185-8.

Manz, M. G., T. Miyamoto, K. Akashi, und I. L. Weissman. 2002. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 11872-7.

Masur, K., B. Niggemann, K. S. Zanker, und F. Entschladen. 2001. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res.* 61: 2866-9.

Mazzocchi, G., L. K. Malendowicz, L. Gottardo, F. Aragona, und G. G. Nussdorfer. 2001. Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 778-82.

Mendez-Ferrer, S., M. Battista, und P. S. Frenette. 2010a. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci.* 1192: 139-44.

- Mendez-Ferrer, S., D. Lucas, M. Battista, und P. S. Frenette.** 2008. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 452: 442-7.
- Mendez-Ferrer, S., A. Chow, M. Merad, und P. S. Frenette.** 2009. Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*. 16: 235-42.
- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, *et al.*** 2010b. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 466: 829-34.
- Metcalf, D.** 1998. Pre-progenitor cells: a proposed new category of hematopoietic precursor cells. *Leukemia*. 12: 1-3.
- Milde, M., R. C. Werthmann, K. von Hayn, und M. Bunemann.** 2014. Dynamics of adenylate cyclase regulation via heterotrimeric G-proteins. *Biochem Soc Trans*. 42: 239-43.
- Mitsiadis, T. A., O. Barrandon, A. Rochat, Y. Barrandon, und C. De Bari.** 2007. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res*. 313: 3377-85.
- Miyazawa, K., D. A. Williams, A. Gotoh, J. Nishimaki, H. E. Broxmeyer, und K. Toyama.** 1995. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood*. 85: 641-9.
- Moore, K. A., H. Ema, und I. R. Lemischka.** 1997a. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*. 89: 4337-47.
- Moore, K. A., B. Pytowski, L. Witte, D. Hicklin, und I. R. Lemischka.** 1997b. Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 4011-6.
- Nakabayashi, M., T. Suzuki, K. Takahashi, K. Totsune, Y. Muramatsu, C. Kaneko, F. Date, J. Takeyama, *et al.*** 2003. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol*. 205: 43-50.
- Nakahata, T., und M. Ogawa.** 1982. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest*. 70: 1324-8.
- Nakamura-Ishizu, A., und T. Suda.** 2013. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim Biophys Acta*. 1830: 2404-9.
- Nasman, J., J. P. Kukkonen, T. Holmqvist, und K. E. Akerman.** 2002. Different roles for Gi and Go proteins in modulation of adenylyl cyclase type-2 activity. *J Neurochem*. 83: 1252-61.
-

- Nemoto, T., F. Toyoshima-Aoyama, Y. Ueda, T. Ohba, T. Yanagita, H. Watanabe, T. Shirasaka, I. Tsuneyoshi, *et al.*** 2013. Involvement of the orexin system in adrenal sympathetic regulation. *Pharmacology*. 91: 250-8.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, *et al.*** 2001. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 10344-9.
- Ouedraogo, R., E. Naslund, und A. L. Kirchgessner.** 2003. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes*. 52: 111-7.
- Penn, A., A. M. Mohr, S. G. Shah, Z. C. Sifri, V. L. Kaiser, P. Rameshwar, und D. H. Livingston.** 2010. Dose-response relationship between norepinephrine and erythropoiesis: evidence for a critical threshold. *J Surg Res*. 163: e85-90.
- Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. van den Pol, L. de Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe, und T. S. Kilduff.** 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 18: 9996-10015.
- Punzel, M., K. A. Moore, I. R. Lemischka, und C. M. Verfaillie.** 1999a. The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells. *Leukemia*. 13: 92-7.
- Punzel, M., T. Zhang, D. Liu, V. Eckstein, und A. D. Ho.** 2002. Functional analysis of initial cell divisions defines the subsequent fate of individual human CD34(+)CD38(-) cells. *Exp Hematol*. 30: 464-72.
- Punzel, M., S. D. Wissink, J. S. Miller, K. A. Moore, I. R. Lemischka, und C. M. Verfaillie.** 1999b. The Myeloid-Lymphoid Initiating Cell (ML-IC) Assay Assesses the Fate of Multipotent Human Progenitors In Vitro. *Blood*. 93: 3750-3756.
- Randeva, H. S., E. Karteris, D. Grammatopoulos, und E. W. Hillhouse.** 2001. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*. 86: 4808-13.
- Rhee, S. G.** 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*. 70: 281-312.
- Robey, P. G.** 2000. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest*. 105: 1489-91.
- Rouet-Benzineb, P., C. Rouyer-Fessard, A. Jarry, V. Avondo, C. Pouzet, M. Yanagisawa, C. Laboisie, M. Laburthe, und T. Voisin.** 2004. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem*. 279: 45875-86.

- Sakurai, T.** 2007. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci.* 8: 171-81.
- Sakurai, T., und M. Mieda.** 2011. Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci.* 32: 451-62.
- Sakurai, T., T. Moriguchi, K. Furuya, N. Kajiwara, T. Nakamura, M. Yanagisawa, und K. Goto.** 1999. Structure and function of human prepro-orexin gene. *J Biol Chem.* 274: 17771-6.
- Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, *et al.*** 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 92: 573-85.
- Salvesen, G. S.** 2002. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.* 9: 3-5.
- Samson, W. K., B. Gosnell, J. K. Chang, Z. T. Resch, und T. C. Murphy.** 1999. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res.* 831: 248-53.
- Seita, J., und I. L. Weissman.** 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2: 640-53.
- Semerad, C. L., M. J. Christopher, F. Liu, B. Short, P. J. Simmons, I. Winkler, J. P. Levesque, J. Chappel, *et al.*** 2005. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood.* 106: 3020-7.
- Shirasaka, T., M. Nakazato, S. Matsukura, M. Takasaki, und H. Kannan.** 1999. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol.* 277: R1780-5.
- Spiegel, A., S. Shvitiel, A. Kalinkovich, A. Ludin, N. Netzer, P. Goichberg, Y. Azaria, I. Resnick, *et al.*** 2007. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol.* 8: 1123-31.
- Spina, A., F. Di Maiolo, A. Esposito, L. Sapio, E. Chiosi, L. Sorvillo, und S. Naviglio.** 2012. cAMP Elevation Down-Regulates beta3 Integrin and Focal Adhesion Kinase and Inhibits Leptin-Induced Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Biores Open Access.* 1: 324-32.
- Spinazzi, R., A. Ziolkowska, G. Neri, M. Nowak, P. Rebuffat, G. G. Nussdorfer, P. G. Andreis, und L. K. Malendowicz.** 2005. Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med.* 15: 847-52.

- Steidl, U., S. Bork, S. Schaub, O. Selbach, J. Seres, M. Aivado, T. Schroeder, U. P. Rohr, et al.** 2004. Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood*. 104: 81-8.
- Stem Cell Technologies.** 2014.
<http://www.stemcell.com/tutorials/bone%20marrow/ptemail01.html>
- Stock, A. M., D. G. Powe, S. A. Hahn, G. Troost, B. Niggemann, K. S. Zanker, und F. Entschladen.** 2013. Norepinephrine inhibits the migratory activity of pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res*. 319: 1744-58.
- Sunahara, R. K., C. W. Dessauer, und A. G. Gilman.** 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 36: 461-80.
- Sutherland, H. J., P. M. Lansdorp, D. H. Henkelman, A. C. Eaves, und C. J. Eaves.** 1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 3584-8.
- Takahashi, K., Z. Arihara, T. Suzuki, M. Sone, K. Kikuchi, H. Sasano, O. Murakami, und K. Totsune.** 2006. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides*. 27: 871-7.
- Tang, W. J., und A. G. Gilman.** 1991. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*. 254: 1500-3.
- University Medical Center Groningen (UMCG), D. o. E. H.** 2012.
<http://www.rug.nl/umcg/faculteit/disciplinegroepen/interneGeneeskunde/Hematologie/researchlines/res1>
- Voisin, T., A. E. Firar, V. Avondo, und M. Laburthe.** 2006. Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology*. 147: 4977-84.
- Wagers, A. J., R. I. Sherwood, J. L. Christensen, und I. L. Weissman.** 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 297: 2256-9.
- Wei, W., T. Motoike, J. Y. Krzeszinski, Z. Jin, X. J. Xie, P. C. Dechow, M. Yanagisawa, und Y. Wan.** 2014. Orexin regulates bone remodeling via a dominant positive central action and a subordinate negative peripheral action. *Cell Metab*. 19: 927-40.
- Weissman, I. L.** 2000. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 287: 1442-6.
-

- Wenzel, J., N. Grabinski, C. A. Knopp, A. Dendorfer, M. Ramanjaneya, H. S. Randeva, M. Ehrhart-Bornstein, P. Dominiak, und O. Jöhren.** 2009. Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297: R1601-9.
- Xiu, F., M. Stanojcic, und M. G. Jeschke.** 2013. Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. *PLoS One.* 8: e69167.
- Yuen, S. W., A. H. Chui, K. J. Wilson, und P. M. Yuan.** 1989. Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins. *Biotechniques.* 7: 74-83.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, *et al.*** 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 425: 836-41.
- Ziolkowska, A., R. Spinazzi, G. Albertin, M. Nowak, L. K. Malendowicz, C. Tortorella, und G. G. Nussdorfer.** 2005. Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 96: 423-9.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese (adaptiert nach University Medical Center Groningen (UMCG) 2012).....	2
Abbildung 1.2: Schematische Gegenüberstellung der osteoblastären und vaskulären Nische (adaptiert nach Ehninger und Trumpp 2011).....	4
Abbildung 1.3: Schematische Abbildung eines 7-TM-Rezeptors.....	8
Abbildung 1.4: Vom Prepro-Orexin zu Orexin A und Orexin B	9
Abbildung 1.5: Bindungsaffinitäten von Orexin A und Orexin B.....	9
Abbildung 1.6 Übersicht über die zellulären Effekte der G-Protein-Untereinheiten und PTX .	11
Abbildung 3.1: Absorptionsspektrum von Fluo4.....	33
Abbildung 3.2: Kalziummessung am Durchflusszytometer	34
Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des „semi dry“-Blotmoduls	39
Abbildung 4.1: Expression der Orexin Rezeptoren 1 und 2 auf frühen und späten Progenitoren	42
Abbildung 4.2: Expression der Orexin Rezeptoren 1 und 2 auf Subsets hämatopoietischer CD34 ⁺ HSPC.....	43
Abbildung 4.3: Expressionsstärke der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf CD34 ⁺ HSPC-Subsets und MNC.....	43
Abbildung 4.4: Prozentuale Adhäsionsrate von unstimulierten CD34 ⁺ HSPC.	46
Abbildung 4.5: Relative Adhäsion von HSPC auf Fibronektin beschichteten Platten	47
Abbildung 4.6: Relative Adhäsion von HSPC auf Kollagen beschichteten Platten.....	48
Abbildung 4.7: Prozentuale Migrationsrate unstimulierten CD34 ⁺ HSPC.	49
Abbildung 4.8: Relative Migration von HSPC aus Knochenmark.....	50
Abbildung 4.9: Prozentuale Polaritätsrate von unstimulierten CD34 ⁺ HSPC aus KM.....	51

Abbildung 4.10: Anteile Annexin V und Caspase-3 positiver Zellen unter Einfluss von Orexin	52
Abbildung 4.11: Relative Proliferationsraten von CD34 ⁺ HSPC während 7-tägiger Kultur	53
Abbildung 4.12: verschiedene Kolonietypen im CFU-GEMM	55
Abbildung 4.13: Einfluss von Orexin auf die CFU-Frequenz von CD34 ⁺ Zellen	56
Abbildung 4.14: Einfluss von Orexin auf das Entwicklungspotenzial von CD34 ⁺ HSPC	57
Abbildung 4.15: Kultivierung von CD34 ⁺ Zellen auf AFT024-Stromazellen:	58
Abbildung 4.16: Myeloische Kolonien im LTC-IC-Ansatz nach Übersichtung mit klonogener Methylzellulose	59
Abbildung 4.17: Einfluss von Orexin auf die LTC-IC-Frequenz von CD34 ⁺ HSPC	60
Abbildung 4.18: Einfluss von Orexin auf den intrazellulären Kalziumspiegel ($[Ca^{2+}]_i$)	62
Abbildung 4.19: Einfluss von Orexin auf die SDF1-vermittelte Erhöhung des Kalziumspiegels	63
Abbildung 4.20: Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Orexin A und Orexin B.....	65
Abbildung 4.21: Immunfluoreszente Färbung von Prepro-Orexin, Orexin A und Orexin B an KM-Stanzen.....	66
Abbildung 4.22: Immunfluoreszente Färbung von Prepro-Orexin an CD34 ⁺ HSPC.....	67
Abbildung 4.23: Durchflusszytometrische Analysen zu Prepro-Orexin an CD34 ⁺ HSPC	68
Abbildung 4.24: Immunologischer Nachweis von Prepro-Orexin in CD34 ⁺ HSPC.....	69
Abbildung 5.1: Schematische Abbildung des Einflusses von Orexin auf die Adhäsion	78
Abbildung 5.2: Schema zur Wirkung von Orexin auf die Adhäsion und Migration von CD34 ⁺ HSPC.....	79
Abbildung 5.3: Hypothetische Kopplung der G-Proteine und Effekte in CD34 ⁺ HSPC.....	81

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Elementen der Stammzellnischen	5
Tabelle 3.1: verwendete Chemikalien und Kits	14
Tabelle 3.2: verwendete Antikörper	16
Tabelle 3.3: verwendete Geräte.....	17
Tabelle 3.4: verwendete Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3.5: Zusammensetzung von AFT-Medium.....	20
Tabelle 3.6: Zusammensetzung von LTBMCMedium	20
Tabelle 3.7: Zusammensetzung von I20-Medium.....	20
Tabelle 3.8: Zusammensetzung von I20 ⁺⁺⁺⁺ -Medium	21
Tabelle 3.9: Zusammensetzung von HPGM ⁺⁺⁺⁺ -Medium.....	21
Tabelle 3.10: Zusammensetzung von HEPES-Waschpuffer	34
Tabelle 3.11: Bradford-Reagenz und Referenzlösung	36
Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Acrylamid-Stammlösung.....	37
Tabelle 3.13: Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers	37
Tabelle 3.14: Zusammensetzung des Elektrophorese-Laufpuffers	37
Tabelle 3.15: Zusammensetzung von 12 % SDS-Polyacrylamidgelen (PA-Gel).....	37
Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Transferpuffers	38
Tabelle 3.17: Zusammensetzung des Substratpuffers für das NBT/BCIP-System	39
Tabelle 4.1: Signifikanzen der Expressionsstärken der Orexinrezeptoren 1 und 2 auf CD34 ⁺ HSPC-Subsets	44
Tabelle 4.2: Prozentuale Anteile gebildeter Kolonien im CFC-Ansatz.....	57

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. R. Haas für die Anregung, dieses interessante Thema zu bearbeiten und die Möglichkeit dies im Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie zu tun sowie seine fortwährende Unterstützung bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. W. Martin als Vertreter der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für die freundliche Unterstützung als Mentor und die Übernahme des Korreferats.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. T. Schröder für die Betreuung, die zahlreichen Gespräche und für die Unterstützung bei allen Aspekten dieser Arbeit bedanken. Derselbe Dank gilt Herrn Dr. med. I. Bruns und Herrn Dr. med. A. Czibere für Hilfestellungen und anregende Diskussionen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, insbesondere den Kolleginnen und Kollegen des Routinelabors, für das freundschaftliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Großer Dank gilt natürlich auch meinen Mitstreitern im Labor, also Steffi, Julia, Sebastian, Anne, Caro, Jamina und Paul für den häufigen wissenschaftlichen Austausch, die vielen persönlichen Gespräche, die ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima im Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Monika und Alessandro Cadeddu, sowie meiner Verlobten, Dr. rer. nat. Melanie Schwarz, die während meiner gesamten Studienzzeit und darüber hinaus an mich geglaubt und mich immer unterstützt haben.

Vielen Dank!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde von mir bisher in dieser oder ähnlicher Form keiner anderen Fakultät vorgelegt und ich habe bisher weder erfolgreiche, noch erfolglose Promotionsversuche unternommen.

Ron Patrick Cadeddu, Januar 2015