

**Funktionelle Untersuchung der
Orexin-Rezeptoren 1 und 2
auf humanen hämatopoetischen
CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Simone Bork
aus Bocholt

Juli 2007

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Rainer Haas

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

Referent: PD. Dr. med. Ralf Kronenwett
Koreferent: Prof. Dr. rer.nat. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2007

**Geniale Menschen beginnen große Werke,
fleißige Menschen beenden sie.**

Leonardo da Vinci (1452 – 1519)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Hämatopoetische Stammzellen	1
1.1.1 Stammzellen	1
1.1.2 CD34 ⁺ Stamm- und Vorläuferzellen.....	2
1.1.3 Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34 ⁺ Zellen	4
1.1.4 Stammzellmigration	6
1.1.5 Stammzellplastizität	7
1.1.6 Neuronale Marker auf CD34 ⁺ Zellen.....	9
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR).....	11
1.2.1 Aufbau und Funktion von GPCR	11
1.2.2 G-Proteine	13
1.2.3 Zelluläre Effektoren der GPCR	14
1.2.3.1 Adenylatzyklase und cAMP	14
1.2.3.2 Phospholipase-C-β und Calcium	16
1.3 Orexin-System	18
1.3.1 Liganden und Rezeptoren	18
1.3.2 Systemische Effekte	19
1.3.3 Zelluläre Effekte	20
1.4 Ziel der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Geräte	23
2.2 Materialien.....	24
2.3 Puffer, Medien und Zusätze	24
2.4 Chemikalien	25
2.5 Kit-Systeme	26
2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie	26
2.7 Orexin-Rezeptor-Liganden.....	27
2.8 Primer und Sonden für die quantitative TaqMan-PCR.....	28
2.9 Methoden	29
2.9.1 Gewinnung von hämatopoetischen CD34 ⁺ Zellen	29
2.9.1.1 Leukapherese	29
2.9.1.2 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von MNCs.....	29
2.9.1.3 Immunmagnetische Isolierung	30
2.9.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer.....	32
2.9.3 Durchflusszytometrie	33

2.9.3.1	Bestimmung der CD34 ⁺ Reinheit.....	34
2.9.3.2	Bestimmung der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34 ⁺ Zellen	35
2.9.3.3	Zweifarbennimmunfluoreszenz	36
2.9.4	CD34 ⁺ Suspensionszellkultur.....	36
2.9.5	Apoptose-Test durch Annexin V- und 7-AAD-Färbung.....	37
2.9.6	cAMP-Enzymimmunoassay	38
2.9.7	Intrazelluläre Calcium-Messung mittels Durchflusszytometrie.....	40
2.9.8	Migrationsassay	42
2.9.9	Klonogener Wachstumstest.....	44
2.9.10	Genexpressionsanalysen	45
2.9.10.1	RNA-Isolation.....	46
2.9.10.2	cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	47
2.9.10.3	In vitro Transkription (IVT-Reaktion)	48
2.9.10.4	Fragmentierung der cRNA.....	49
2.9.10.5	Human-Genome-Focus-Microarrays.....	49
2.9.10.6	Affymetrix-System	49
2.9.10.7	Hybridisierung der Microarrays	50
2.9.10.8	Waschen und Färben der Microarrays	51
2.9.10.9	Scannen der Microarrays	52
2.9.10.10	Normalisierung	52
2.9.10.11	Identifikation signifikanter Gene	52
2.9.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	53
2.9.12	Bestimmung der RNA-Qualität mittels LabChip®	54
2.9.13	Quantitative „Real-Time“- PCR mittels TaqMan-Technologie.....	55
2.9.13.1	cDNA-Synthese.....	57
2.9.13.2	„Real-Time“-TaqMan-PCR	58
2.9.13.3	Quantifizierung der TaqMan-PCR	59
2.9.14	Vergleich der Microarray-Technologie mit der TaqMan-PCR.....	61
2.9.15	Agarose-Gelelektrophorese	61
2.9.16	Statistische Auswertungen	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Proteinexpression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34 ⁺ Zellen.....	63
3.2	Differenzierungsabhängige Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2.....	65
3.3	Orexin A und Orexin B reduzieren die intrazelluläre cAMP-Konzentration	67
3.4	Orexin A und Orexin B reduzieren die intrazelluläre Calciumkonzentration.....	70
3.5	Hemmung der Migration durch Orexin A und Orexin B.....	76
3.6	Orexin A und Orexin B hemmen das klonogene Wachstum.....	78

3.7	Orexine zeigen keinen Effekt auf die Proliferation	81
3.8	Orexine zeigen keinen Effekt auf die Apoptose	82
3.9	Transkriptionelle Veränderungen nach Orexin-Rezeptor-Stimulation	83
3.9.1	Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34 ⁺ Zellen	84
3.9.2	Cytoskelett, Adhäsion und Migration	86
3.9.3	Calciumtransport.....	87
3.9.4	Glucose- und Lipidmetabolismus.....	90
3.9.5	Oxidativer Stress (Hypoxie)	92
3.9.6	Gene aus Orexin-exprimierenden Geweben	93
3.9.7	Proliferation und Apoptose	95
3.9.8	RAS/MAPK-Signalweg	97
3.9.9	Weitere differentiell exprimierte Gene	100
3.10	Bestätigung der signifikanten Gene mittels quantitativer „Real-Time“- PCR.....	100
4	Diskussion	104
4.1	Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34 ⁺ Zellen.....	104
4.2	Funktionelle Aspekte.....	105
4.2.1	Reduktion der „second messenger“ Moleküle cAMP und Ca ²⁺	105
4.2.2	Hemmung des klonogenen Wachstums von CD34 ⁺ Zellen.....	110
4.2.3	Reduktion der Migration von CD34 ⁺ Zellen.....	112
4.2.4	RAS/p38-MAPK/HIF1A-induzierter Signalweg	113
4.2.5	Apoptose und Proliferation	115
4.2.6	Orexin-induzierte Effekte in nicht-hämatopoetischen Geweben	116
4.3	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	117
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	118
5	Zusammenfassung	121
5.1	Summary.....	123
6	Anhang	125
6.1	Differentiell exprimierte Gene in alphabetischer Reihenfolge	125
7	Literaturverzeichnis	130
8	Abkürzungsverzeichnis	150
9	Eidesstattliche Erklärung	153
10	Danksagung	154

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzellen

1.1.1 Stammzellen

Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und gleichzeitig organspezifische Tochterzellen zu erzeugen. Dieses Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung wird durch die Art ihrer Zellteilung bestimmt. Bilden sich bei der Teilung von Stammzellen zwei Tochterzellen, die die Eigenschaften einer Stammzelle bewahren, so bezeichnet man das als symmetrische Teilung. Im Gegensatz dazu entstehen bei einer asymmetrischen Teilung eine Tochterzelle mit Stammzellcharakter und eine bereits liniendeterminierte Vorläuferzelle. Dabei entscheidet vor allem das die Stammzelle umgebende biologische Milieu über Selbsterneuerung oder Differenzierung. Abhängig vom ontogenetischen Alter und ihrem Differenzierungspotenzial unterscheidet man embryonale von adulten Stammzellen. Nach der Befruchtung der Eizelle bildet sich durch erste Zellteilungen die Blastozyste, die die ontogenetisch frühesten Stammzellen enthält, die Embryonalstammzellen. Da diese das Potenzial besitzen, in alle Gewebetypen und Organe eines kompletten Organismus auszureifen, bezeichnet man sie als totipotent (Tarnowski and Sieron, 2006). Diese Fähigkeit geht nach heutigem Wissen mit Ablauf des 8-Zellstadiums verloren (Pan et al., 2002; Pesce et al., 1999), wenn die Embryonalzellen beginnen, sich weiter zu differenzieren. Doch auch im ausgewachsenen menschlichen Körper findet man eine Vielzahl verschiedener Stammzelltypen, die adulten Stammzellen. Da sie im Gegensatz zu den Embryonalstammzellen ein geringeres Selbsterneuerungsvermögen und ein eingeschränktes Entwicklungspotenzial besitzen, sich aber noch in verschiedene Zelltypen eines Gewebes ausdifferenzieren können, bezeichnet man sie als multipotent. Ihre physiologische Funktion besteht darin, die Homöostase der Zellzahl des sie enthaltenen Gewebes aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund findet man sie vor allem in Geweben mit hoher Zellproliferation, wie zum Beispiel dem Plattenepithel der Haut (Blanpain et al., 2004; Christiano, 2004; Alonso and Fuchs, 2003), dem Dünndarm (Brittan and Wright, 2004; Marshman et al., 2002) und dem Knochenmark (Steidl et al., 2004; Nakauchi, 2004; Steidl et al., 2002; Kronenwett et al., 2000). Doch auch in anderen Geweben des erwachsenen Organismus wurden adulte Stammzellen entdeckt. Dazu zählen die Leber (Nakauchi, 2004; Song et al., 2004), die Lunge (Neuringer and Randell, 2004; Otto, 2002), das Gehirn (Schanzer et al., 2004; Bazan et al., 2004; Ader et al., 2004; Winkler, 2003; Bjornson et al., 1999), Kornea und Retina (Boulton and Albon, 2004; Sun and Lavker, 2004; Chacko et al., 2003), das Endothel (Hilbe et al., 2004; Asahara and Kawamoto, 2004; Lin et al., 2000), der

Pankreas (Yao et al., 2004; Chaudhari et al., 2001), die Skelettmuskulatur (Machida et al., 2004; Cao et al., 2004) und die Herzmuskulatur (Penn et al., 2004; Messina et al., 2004; Oh et al., 2004).

1.1.2 CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen

Die Hämatopoese gewährleistet einen lebenslangen Nachschub an verschiedenen Zelltypen des Blutes. Ausgangspunkt dieses blutbildenden Prozesses im Knochenmark ist eine kleine Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen. Diese Zellen besitzen neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung auch das Potenzial, durch Proliferation und terminale Differenzierung in zunächst liniendeterminierte Vorläuferzellen und dann in alle Blutzellen auszureifen (TILL, 1961). Dabei entstehen aus der myeloischen Differenzierungsreihe Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten, während sich aus der lymphatischen Differenzierungsreihe die T- und B-Lymphozyten entwickeln.

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen sind charakterisiert durch die Expression bestimmter Oberflächenantigene (Abb.1.1). Das am frühesten erwähnte ist das CD34-Antigen (CD = „cluster of differentiation“). Dieses hoch glykolisierte Transmembranprotein von 110 kD wurde schon 1984 als hämatopoetisch stammzellassoziertes Oberflächenmolekül beschrieben (Civin et al., 1984). Obwohl es neben hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen auch von Endothelzellen (Fina et al., 1990) und einigen Stromazellen exprimiert wird, ist über die funktionelle Rolle und die Regulation des Expressionsmusters noch nichts bekannt. Ein dem CD34 ähnliches Expressionsmuster auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zeigt das CD133-Antigen (Kobari et al., 2001). Neben dem CD34- und CD133-Antigen exprimieren hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen weitere differenzierungsabhängige Oberflächenmoleküle. Dazu gehören unter anderem das CD38- und das HLA-DR-Antigen. Diese Marker werden von sehr frühen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nur schwach oder überhaupt nicht exprimiert, während sich ihre Expression mit zunehmender Liniendifferenzierung erhöht (Petzer et al., 1996; Terstappen et al., 1991; Weilbaecher et al., 1991; Sutherland et al., 1989). Umgekehrt proportional dazu verhält sich die Expressionsstärke des Thy-1-Oberflächenantigens. Je undifferenzierter die Stammzellen sind, desto höher ist die Thy-1 Expression (Craig et al., 1993). Während mit zunehmender Reifung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen das CD34-Antigen verloren geht, zeichnen sich die reiferen, liniendeterminierten Vorläuferzellen der einzelnen Blutzelllinien durch die Koexpression von spezifischen, linienabhängigen Oberflächenmolekülen wie zum Beispiel CD3, CD20, CD33, CD71, CD41, CD61, CD90, oder CD117 aus (Huang and Terstappen, 1994; Civin and Gore, 1993) (Abb.1.1).

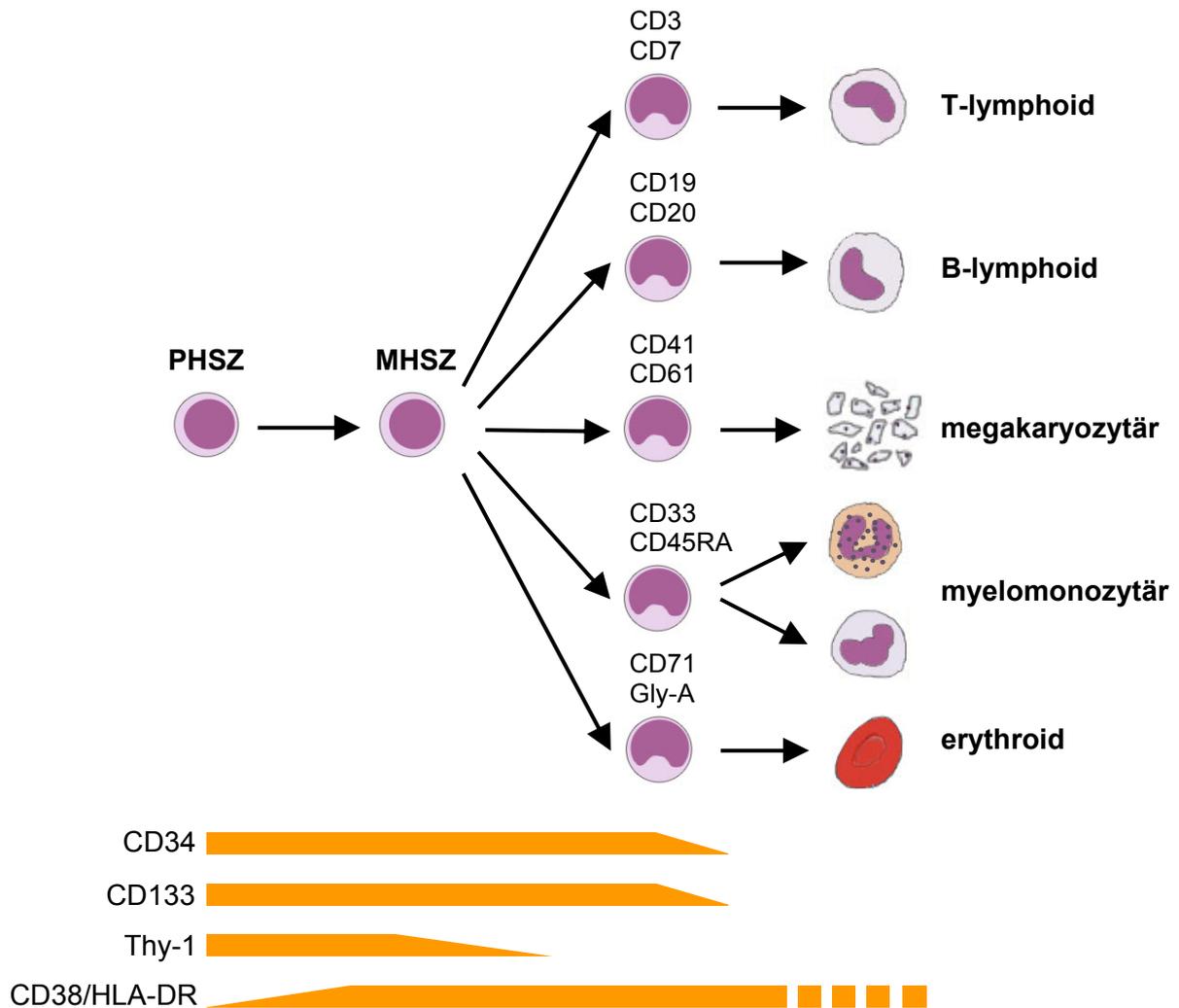


Abbildung 1.1: Expression von differenzierungsspezifischen Oberflächenantigenen auf hämatopoetischen Stamm- und liniendeterminierten Vorläuferzellen. PHSZ: pluripotente hämatopoetische Stammzelle; MHSZ: multipotente hämatopoetische Stammzelle

So weist eine Koexpression von CD33 auf eine myelomonozytäre Differenzierung und die Koexpression von CD41 und CD61 auf eine megakaryozytäre Differenzierung hin, während die Koexpression des Transferrinrezeptors CD71 und Gly-A für eine erythropoetische Differenzierung spricht. Die Differenzierung in die lymphatische Reihe ist durch die Koexpression von CD19 und CD20 (B-Lymphozyten) oder CD7 und CD3 (T-Lymphozyten) gekennzeichnet. Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die genannten Antigene lassen sich deshalb hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks und Blutes anhand der Expressionsstärke der Oberflächenmarker als frühe oder liniendeterminierte, reifere Zellen charakterisieren.

1.1.3 Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34⁺ Zellen

Im Knochenmark eines gesunden Erwachsenen werden im Zuge der Hämatopoese täglich 5×10^{11} neue Blutzellen gebildet (Kern, 2002). Dabei muss stets das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen erhalten bleiben. Dieser Prozess wird durch spezifische Signale aus dem die Stammzelle umgebenden Mikromilieu („Microenvironment“) präzise reguliert (Fuchs et al., 2004). Eingebettet in die so genannte „hämatopoetische Nische“ des Knochenmarks haben Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsmoleküle sowie die Interaktion der CD34⁺ Zellen mit zellulären Faktoren und Matrixkomponenten des Knochenmarkstromas einen entscheidenden Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der blutbildenden Zellen. So wird durch den Einfluss der Transkriptionsfaktoren Notch-1 (Stein et al., 2004; Calvi et al., 2003; Ohishi et al., 2002), Gata-2 (Stein et al., 2004; Zhu and Emerson, 2002) und HoxB4 (Klump et al., 2005; Stein et al., 2004; Zhu and Emerson, 2002; Antonchuk et al., 2001) eine gesteigerte Erhaltung bzw. Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzelle beschrieben (Abb.1.2.). Andere Transkriptionsfaktoren hingegen regulieren die Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen. So ist Gata-1 an der erythropoetischen und megakaryozytären Differenzierung beteiligt (Zhu and Emerson, 2002; Mueller et al., 2002; Terui et al., 2000), während Pu.1 eine Rolle bei der myelomonozytären und B-lymphatischen Differenzierung spielt (Zhu and Emerson, 2002; Mueller et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor CEBP α fördert die Ausbildung von Granulozyten (Zhu and Emerson, 2002) und HoxA10 ist ein Regulator der myeloiden Differenzierung (Zhu and Emerson, 2002; Bjornsson et al., 2001).

Neben den Transkriptionsfaktoren sind hauptsächlich Zytokine an der linienspezifischen Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen beteiligt (Abb.1.2). Dazu gehören neben den so genannten „Kolonien-stimulierenden Faktoren“ (-CSF) auch Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO). Während EPO eine entscheidende Rolle bei der Ausreifung der myeloiden Zellen zu Erythrozyten spielt, wird durch TPO die thrombozytäre Differenzierung induziert. Neben dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) ist auch der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) an der Bildung der Granulozyten beteiligt. Zudem induziert GM-CSF auch die Monozyten- und Makrophagendifferenzierung (Zhu and Emerson, 2002).

Zusätzlich zu den bisher genannten löslichen Faktoren spielt auch die Wechselwirkung mit dem Knochenmarkstroma eine Rolle bei der Bestimmung des Zellschicksals von hämatopoetischen Stammzellen. Dabei beeinflussen Adhäsionsmoleküle und ihre zugehörigen Rezeptoren durch die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen oder durch die Modulation der Reaktion auf Wachstumsfaktoren die Regulation des Zellverhaltens. Doch

trotz der bisherigen Erkenntnisse sind die genauen Mechanismen zur Steuerung von Differenzierung und Selbsterneuerung weiterhin ungeklärt.

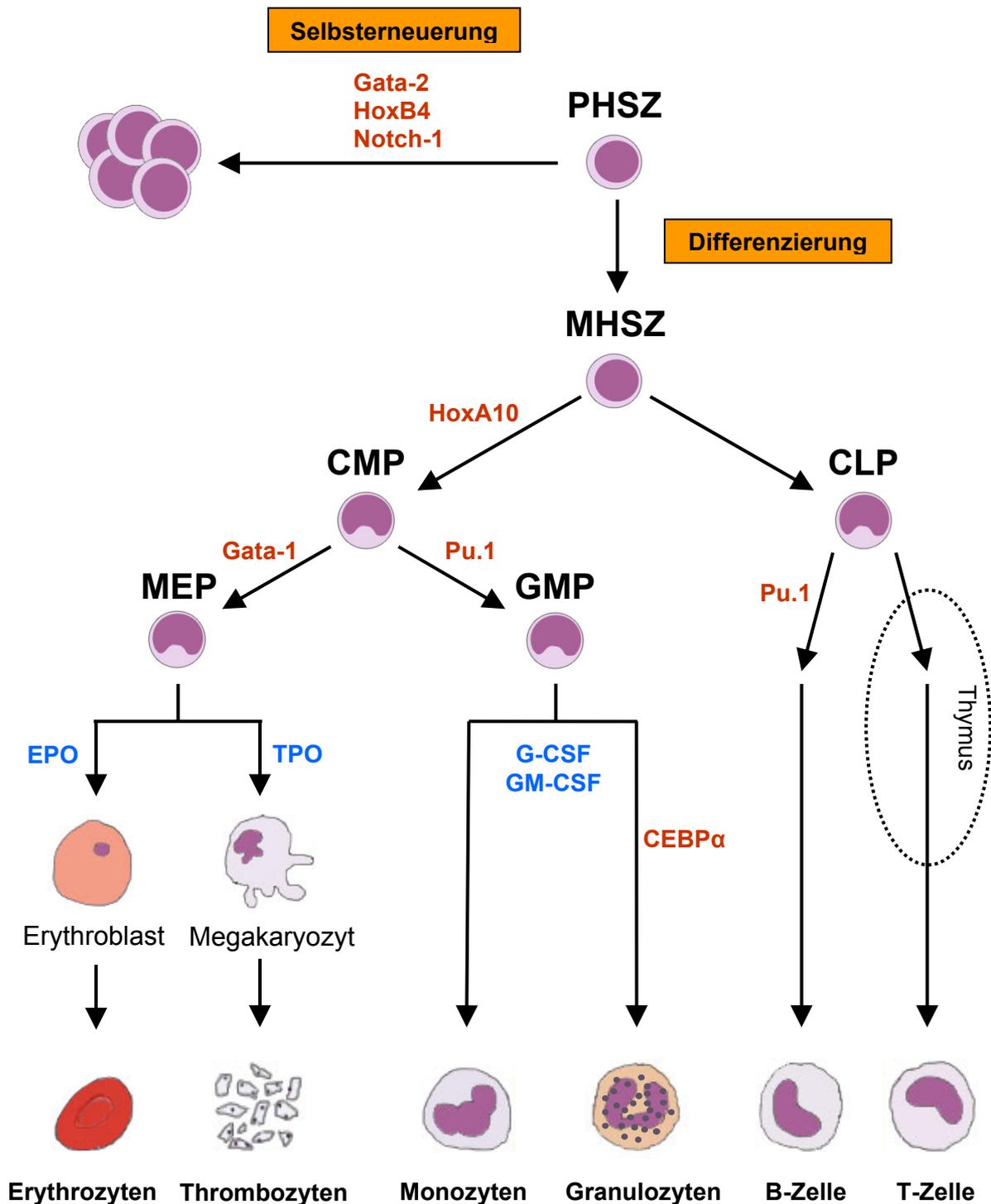


Abbildung 1.2: Einfluss von Transkriptionsfaktoren (rot) und Zytokinen (blau) auf die Selbsterneuerung bzw. linienspezifische Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. PHSZ: pluripotente hämatopoetische Stammzelle; MHSZ: multipotente hämatopoetische Stammzelle; CMP: myeloide Vorläuferzelle; CLP: lymphoide Vorläuferzelle; GMP: Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle; MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle; G-CSF: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor; GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor TPO: Thrombopoetin; EPO: Erythropoetin

1.1.4 Stammzellmigration

Neben der Fähigkeit zur Rekonstitution der Hämatopoese bewahrt sich die hämatopoetische Stammzelle ein Leben lang das Potenzial, aus dem Knochenmark heraus ins periphere Blut zu wandern. Dies geschieht zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen, bei schwerer körperlicher Arbeit oder bei einem nekrotischen Gewebeschaden wie zum Beispiel einem Herzinfarkt. So wurde kürzlich gezeigt, dass bei Patienten nach einem Herzinfarkt die Zahl der im Blut zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen ansteigt (Massa et al., 2005). Diese Migrationsfähigkeit macht man sich klinisch bei einer Stammzelltransplantation zu nutze. Grundlage dieser Anwendung ist dabei die Mobilisierbarkeit der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut durch Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel G-CSF und die Einwanderung der transplantierten Stammzellen in das Knochenmarkstroma des Empfängers, das so genannte „Homing“. Beide Prozesse erfolgen durch eine transendotheliale Migration der Stammzellen durch das Endothel des Knochenmarks.

Auch wenn die genauen biologischen Mechanismen von Stammzellmobilisierung und „Homing“ noch nicht geklärt sind, so ist doch bekannt, dass neben einer Reihe von Adhäsionsmolekülen (z.B. VLA-4, ICAM-1, VCAM-1), parakrinen Zytokinen und chemotaktischen Faktoren auch die Extrazellulärmatrix und zudem Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an diesen Prozessen beteiligt sind (Mohle et al., 2003; Mohle et al., 2001; Kronenwett et al., 2000). So führt eine verminderte Bindung des Chemokins SDF-1 (Stromal-Cell-Derived-Factor-1) mit seinem auf Stammzellen exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4 zu einer Reduktion des Stammzellhomings (Peled et al., 1999). Zudem fördert der Einsatz des CXCR4-Antagonisten AMD3100 die Mobilisierung von Stammzellen in die Peripherie (Broxmeyer et al., 2005; Flomenberg et al., 2005). Des Weiteren wurde für den auf Stammzellen exprimierten G-Protein-gekoppelten Leukotrienrezeptor CysLT1 eine Beteiligung an der verstärkten Migration von Stammzellen gezeigt (Bautz et al., 2001). Ein anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor S1P1, ist in der Lage die durch CXCR4-vermittelte Chemotaxis der Stammzellen zu steigern (Seitz et al., 2005; Kimura et al., 2004). Da bis heute jedoch kein Faktor oder Rezeptor identifiziert werden konnte, der spezifisch und unabdingbar das „Homing“ oder die Mobilisierung von Stammzellen bestimmt, wird vermutet, dass mehrere Mechanismen an der Regulation der Stammzellmigration beteiligt sind. Dies wurde auch schon für bestimmte Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine beschrieben, die beim „Homing“ den ersten Kontakt der Stammzellen mit dem Knochenmarkendothel vermitteln (Mazo et al., 1998).

1.1.5 Stammzellplastizität

In Verbindung mit dem klinischen Einsatz von hämatopoetischen Stammzellen in der Transplantations- und regenerativen Medizin wird immer wieder der Aspekt der Stammzellplastizität angesprochen. Dabei stellt sich die Frage, ob die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen in der Lage sind, unter bestimmten physiologischen Bedingungen in nicht-hämatopoetische Zelltypen zu differenzieren. In diesem Zusammenhang konnte in einer Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt werden, dass sich hämatopoetische Stammzellen über ihr blutbildendes Potenzial hinaus auch in Hepatozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen oder Zellen des Nervensystems differenzieren können (Abb.1.3).

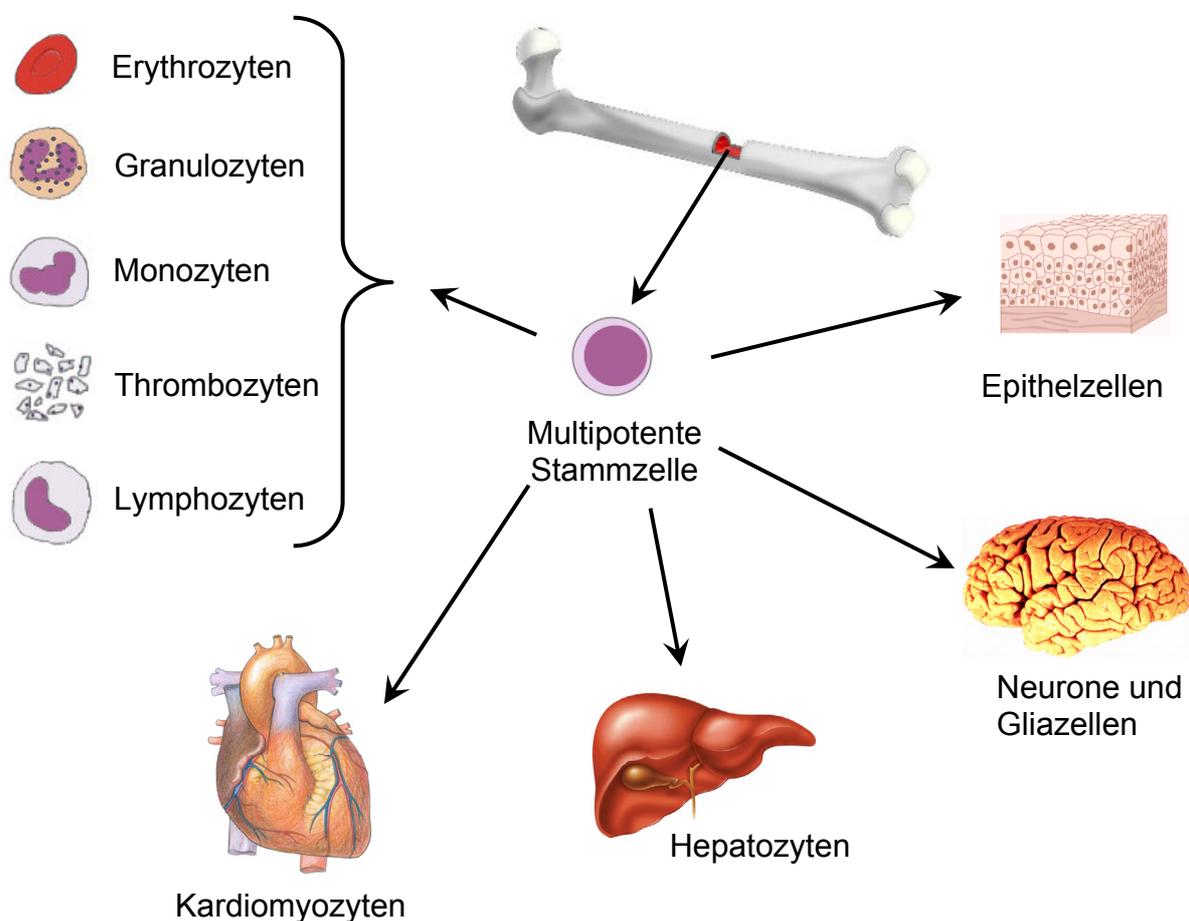


Abbildung 1.3: Differenzierungspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen.

Nachdem zunächst durch „Sex-mismatched“-Transplantationen in Ratten (Petersen et al., 1999) und Mausmodellen (Theise et al., 2000) beobachtet wurde, dass sich hämatopoetische Stammzellen in vivo zu Hepatozyten differenzieren können, wurde dies im Jahr 2000 auch zum ersten Mal für humane Stammzellen gezeigt (Alison et al., 2000). Zwei

Jahre später konnte die Arbeitsgruppe um Körbling nach einer Knochenmarktransplantation in der Leber des Empfängers spenderspezifische Zellen nachweisen, die das Hepatozyten-spezifische Antigen Zytokeratin 8 exprimierten (Körbling et al., 2002). Auch im Gehirn von Mäusen wurden nach einer Knochenmarktransplantation Spenderzellen entdeckt, die nervenspezifische Antigene exprimierten (Goolsby et al., 2003; Mezey et al., 2003; Brazelton et al., 2000). 2004 zeigte dann Cogle, dass sich humane Stammzellen nach einer Knochenmarktransplantation beim Empfänger in Neurone, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia differenzierten (Cogle et al., 2004). Im Jahre 2001 injizierte Orlic Knochenmarkszellen aus männlichen Mäusen in ein experimentell induziertes Myokardinfarktgebiet von weiblichen Mäusen und beobachtete, dass die Spenderzellen sich im Infarktgebiet ansiedelten und kardial-, endothelial- und glattmuskulär-spezifische Antigene exprimierten (Orlic et al., 2001a). Zudem zeigte Orlic, dass bei einer durch SCF- oder GCSF-vermittelten in vivo Mobilisierung muriner hämatopoetischer Stammzellen eine Verbesserung der kardialen Funktion durch Bildung von Kardiomyozyten auftrat (Orlic et al., 2001b). Auch im Menschen konnten nach einer Knochenmarktransplantation spenderspezifische Kardiomyozyten im Empfänger entdeckt werden (Quaini et al., 2002). Bei ersten klinischen Studien zur Regeneration des Herzmuskelgewebes nach einem Herzinfarkt wurden dem Patienten autolog mononukleäre Knochenmarkszellen transplantiert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Verkleinerung des Infarktareals und eine Verbesserung der kardialen Funktion (Tse et al., 2003; Stamm et al., 2003; Strauer et al., 2002). Weitere wissenschaftliche Arbeiten geben Hinweise darauf, dass sich hämatopoetische Stammzellen noch in eine Reihe anderer nicht-hämatopoetischer Zelltypen differenzieren können. Dazu gehören Skelettmuskelzellen (LaBarge and Blau, 2002; Ferrari et al., 1998), Nierenepithelzellen (Gupta et al., 2002; Poulsom et al., 2001) und Mesangiumzellen (Ito et al., 2001), pankreatische Inselzellen (Ianus et al., 2003; Hess et al., 2003) sowie Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes (Okamoto et al., 2002; Krause et al., 2001), der Haut (Hematti et al., 2002; Krause et al., 2001), der Leber und der Lunge (Krause et al., 2001).

Neben diesen Ergebnissen gibt es Studien, die dem Transdifferenzierungspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen widersprechen. So konnten Balsam und Murray nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt im Mausmodell keine transdifferenzierten Myokardzellen der injizierten Stammzellen im Infarktareal nachweisen (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004). Und auch die Arbeitsgruppe von Wagers konnte nach Transplantation von adulten hämatopoetischen Stammzellen keine Differenzierung in nicht-hämatopoetische Gewebetypen beobachten (Wagers et al., 2002). Statt einer Transdifferenzierung vermuten die Autoren einen Vorgang der Zellfusion, bei dem der Zellkern der Stammzellen mit dem einer reifen liniendeterminierten Zelle verschmilzt. Das genomische Repertoire des

fusionierten Zellkerns wird so neu programmiert und steht für die Differenzierung in andere Gewebetypen zur Verfügung. Unterstützt wird diese Vermutung durch Studien von Terada und Ying, die zeigen konnten, dass Knochenmarkstammzellen und neuronale Stammzellen in vitro mit embryonalen Stammzellen fusionieren und dadurch das Potenzial der embryonalen Stammzellen annehmen (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

Somit bleibt die Frage nach dem Differenzierungspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen noch immer offen und muss durch weitere wissenschaftliche Untersuchungen geklärt werden.

1.1.6 Neuronale Marker auf CD34⁺ Zellen

Neben dem Transdifferenzierungspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen wird auch die Möglichkeit einer neuronalen Regulation der Hämatopoese kontrovers diskutiert.

Schon 1968 wurde anhand von Tiermodellen das Vorkommen von sensorischen und autonomen Nerven im Knochenmark beschrieben (Calvo, 1968). Seitdem bestreiten zwar einige Stimmen eine direkte Beeinflussung hämatopoetischer Stammzellen durch Neuromediatoren (Benestad et al., 1998), aber dennoch gibt es immer wieder Hinweise auf eine neuronale Beeinflussung der Blutbildung (Miyano et al., 1998), zum Beispiel durch Katecholamine (Maestroni, 1998) oder Neurohormone (Maestroni, 2000). Auch eine aktuelle Arbeit unterstützt die Hypothese einer neuronalen Steuerung von hämatopoetischen Funktionen (Larsson and Scadden, 2006; Katayama et al., 2006). Dabei konnten die Autoren zeigen, dass das sympathische Nervensystem über Aktivierung von Osteoblasten die G-CSF-induzierte Stammzellmobilisierung reguliert. Anhand von Genexpressionsanalysen wurde zudem gezeigt, dass hämatopoetische und neuropoetische Zellen bei Mäusen überlappende genetische Programme besitzen (Terskikh et al., 2001) und hämatopoetische Progenitorzellen neuronale Gene exprimieren (Goolsby et al., 2003). Eine weitere Studie in diese Richtung wurde von unserer eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei untersuchten wir hochangereicherte CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut mittels cDNA-Array-Technologie (Clontech Atlas Human 1.2 I Array). Die gefundenen Ergebnisse lieferten erstmals Genexpressionsprofile von humanen hämatopoetischen CD34⁺ Zellen und konnten die funktionellen Unterschiede zwischen zirkulierenden CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut und ortsständigen CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark auf molekularer Ebene erklären (Steidl et al., 2003a). Zudem konnten wir erstmalig zeigen, dass die hämatopoetischen CD34⁺ Zellen auch Gene exprimieren, die an neurobiologischen Funktionen beteiligt sind. Diese interessanten Befunde veranlassten uns, spezialisierte cDNA-Arrays, „Real-Time“-PCR und FACS-Analysen zu verwenden, um gezielt die Expression dieser neurobiologisch relevanten Gene zu untersuchen. Auf diesem Wege fanden wir die Expression von Rezeptor-Tyrosin/Serin-Kinasen, liganden- und

spannungsabhängigen Ionenkanälen, sowie von verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Neuromediatoren, wie zum Beispiel für die hypothalamischen Peptide Orexin A, Orexin B und „Corticotropin-releasing hormone“ (CRH), oder Rezeptoren für Neurotransmitter, wie zum Beispiel GABA B (Abb.1.4) (Steidl et al., 2004).

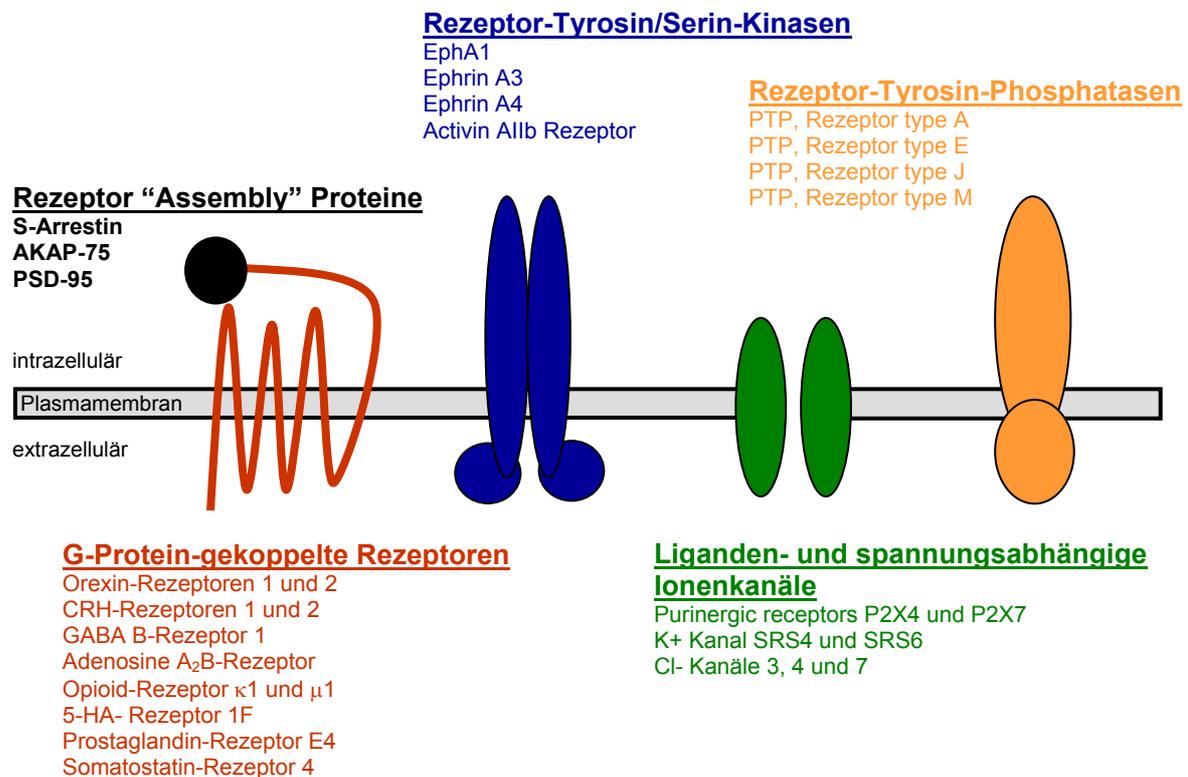


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Expression neurobiologisch relevanter Gene in hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen (nach Steidl et al., 2004).

Diese Ergebnisse könnten einerseits ein Hinweis auf die vieldiskutierte Transdifferenzierungskapazität adulter Blutstammzellen sein. Eine andere Erklärung ist, dass hämatopotische Funktionen nicht nur über Zytokine und das sympathische Nervensystems, sondern auch beispielsweise über GABAerge Neuronen oder das Orexin-System gesteuert werden. Um diese Frage zu klären, muss die Bedeutung der neurobiologisch relevanten Gene in hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen in weiteren funktionellen Experimenten untersucht werden.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

1.2.1 Aufbau und Funktion von GPCR

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht aus Transmembranrezeptoren, die die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls in die Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen umsetzen. Von dieser Wechselwirkung mit den G-Proteinen lässt sich auch der Name der Rezeptorfamilie ableiten. Das Grundgerüst der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht aus einem extrazellulären Aminoende, das durch sieben, die Membran durchspannende α -Helices mit dem intrazellulären Carboxyende verbunden ist (Abb.1.5).

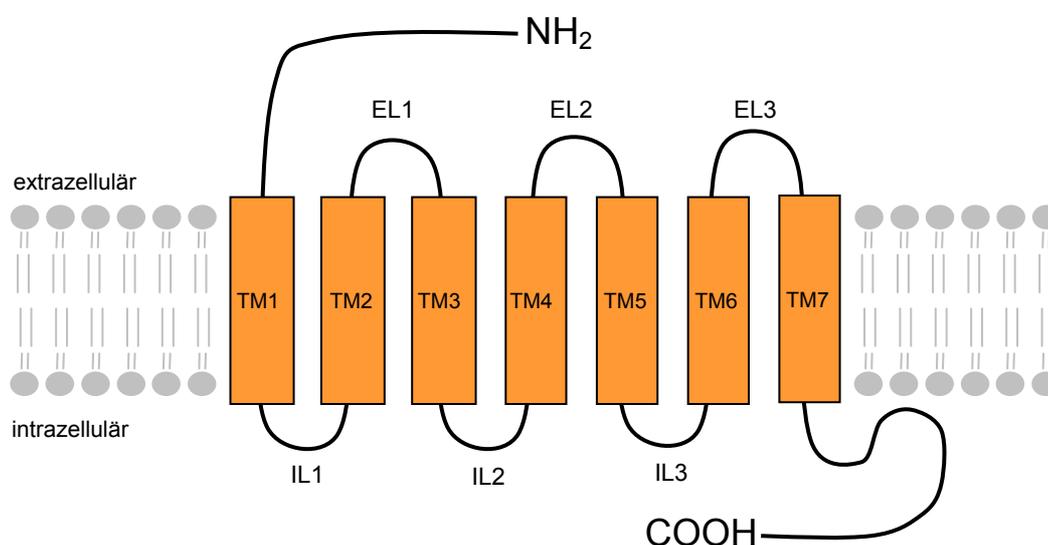


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau eines 7-Transmembranrezeptors. Das extrazelluläre Aminoende (NH₂) und das intrazelluläre Carboxyende (COOH) werden durch sieben, die Membran durchspannende α -Helices (TM) über drei extrazelluläre Schleifen (EL) und drei intrazelluläre Schleifen (IL) miteinander verbunden.

Aufgrund dieser von der Hefe bis zum Homo sapiens unverändert konservierten Struktur bezeichnet man die Mitglieder dieser Proteinfamilie auch als heptahelikale oder 7-Helix-Transmembranrezeptoren (Pierce et al., 2002). Extra- und intrazellulär werden die Transmembranregionen durch jeweils drei Schleifen verknüpft. Die Schleifen auf der Zellaußenseite wirken als Ligandenbindungsstelle, während auf der cytoplasmatischen Seite zwei der Schleifen die Bindungsstelle für Signalproteine bilden und die dritte Schleife als Bindungsstelle für die gekoppelten G-Proteine dient. Da diese aus der Familie der GTPasen stammenden G-Proteine aus den drei verschiedenen Monopeptid-Untereinheiten α , β und γ bestehen, bezeichnet man sie als heterotrimere G-Proteine.

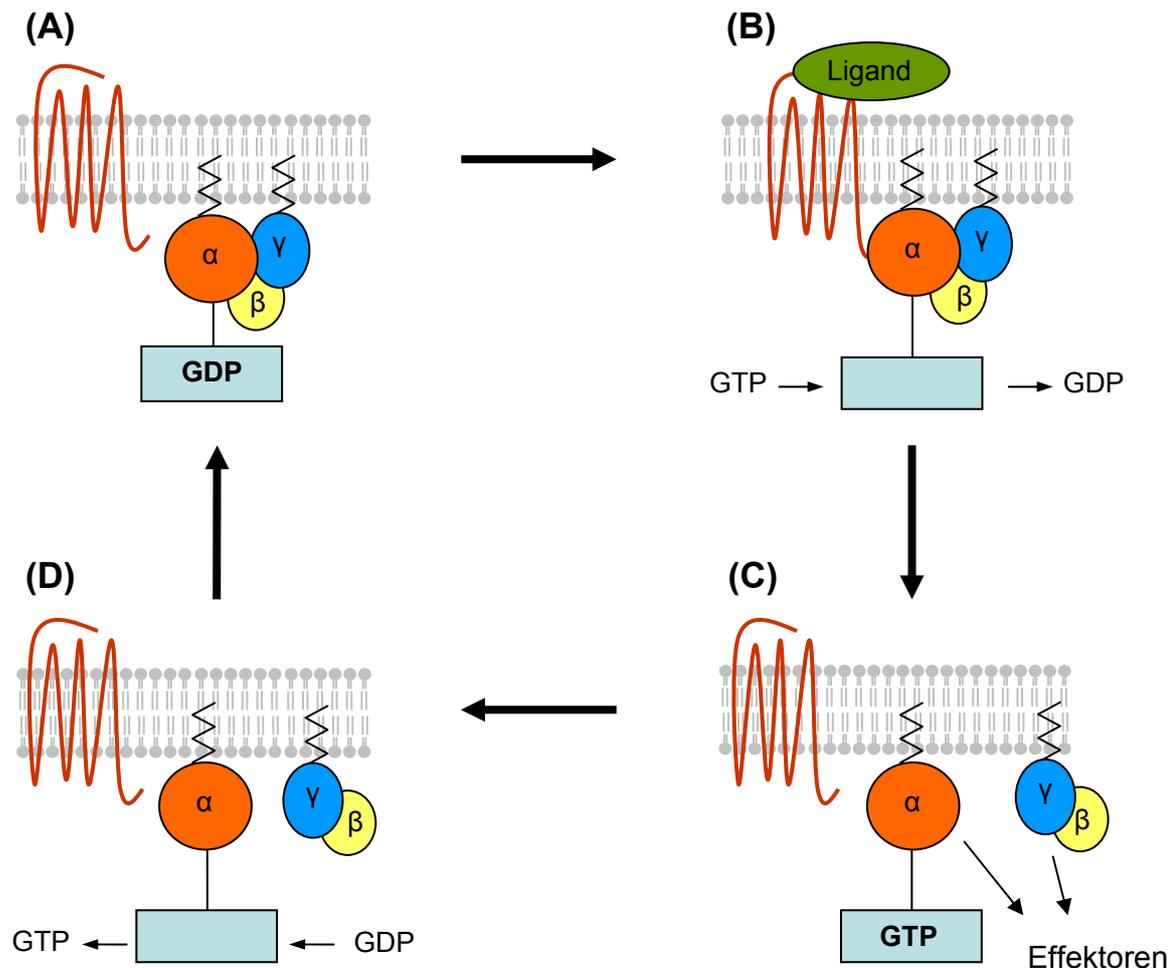


Abbildung 1.6: Mechanismus der intrazellulären Signalvermittlung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Die Signalvermittlung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt nach einem grundlegenden Schema. Im unstimulierten Zustand des Rezeptors ist die α -Untereinheit des heterotrimeren Proteins mit dem $\beta\gamma$ -Komplex assoziiert und bindet GDP (Abb.1.6 (A)). Wird der Rezeptor durch Bindung eines Liganden stimuliert, kommt es zu einer Bindung des Rezeptors an das inaktive G-Protein. Aufgrund dieser Bindung durchläuft die α -Untereinheit einer Konformationsänderung, die zu einer verminderten Affinität der GDP-Bindung führt. Dadurch kann GDP durch GTP ersetzt werden (Abb.1.6 (B)) und es kommt zu einer Dissoziation der α -Untereinheit von dem $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl die α - als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit können dann weitere Effektormoleküle binden und aktivieren und so das Signal des Rezeptors intrazellulär fortsetzen (Abb.1.6 (C)). Das Ende der Reaktion wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit vermittelt, wobei das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird (Abb.1.6 (D)). Daraufhin folgt die Reassoziierung der α -Untereinheit mit dem $\beta\gamma$ -Komplex zu einem inaktiven G-Protein. Die Kinetik der Reaktion wird unter anderem auch durch so genannte „Regulators of G Protein Signaling“ (RGS) reguliert. Diese Moleküle

gehören zu einer Proteinfamilie, die durch die Verstärkung der GTP-Hydrolyse zur Beschleunigung des G-Protein-Zyklus beiträgt (Hollinger and Hepler, 2002).

1.2.2 G-Proteine

Die Proteinfamilie der heterotrimeren G-Proteine kann in Abhängigkeit von der Aktivität und Sequenzähnlichkeit der α -Untereinheit in vier große Untergruppen eingeteilt werden (Offermanns, 2003; Cabrera-Vera et al., 2003). Diese bezeichnet man als G_s -, G_i -, G_q - und G_{12} -Proteine (Abb.1.7), wobei jede Gruppe aus unterschiedlichen α -Untereinheiten besteht.

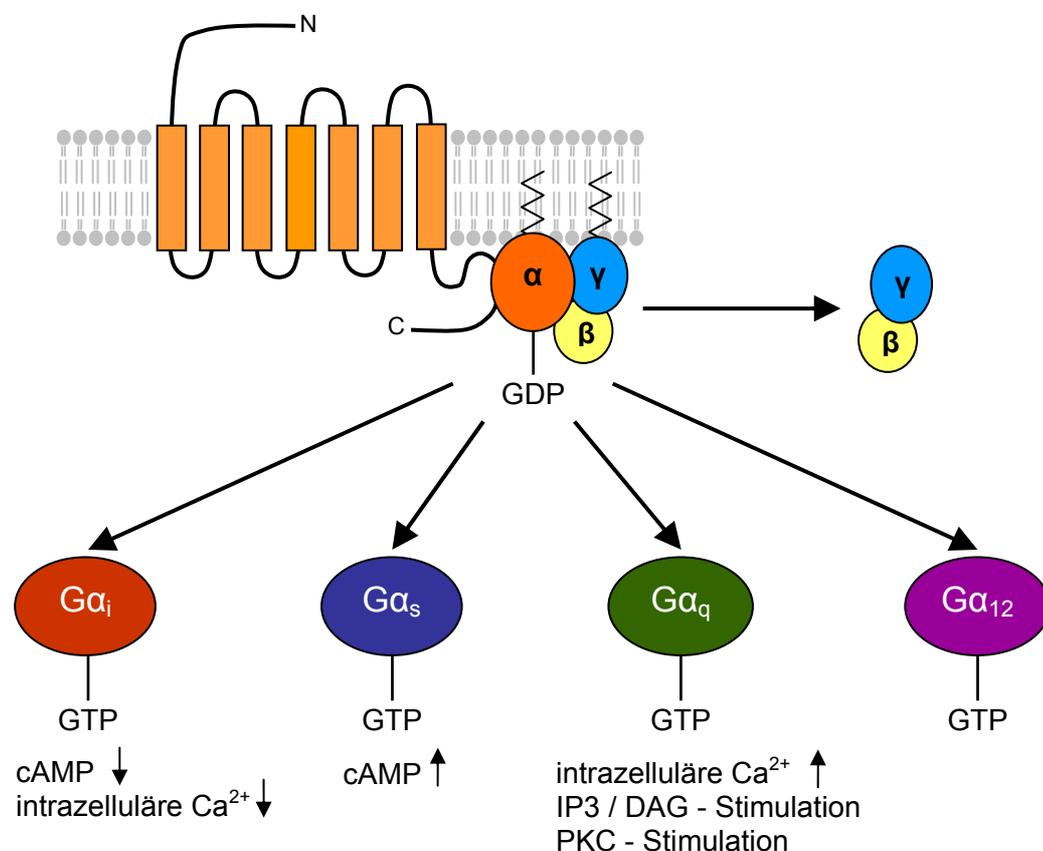


Abbildung 1.7: Übersicht über vier Untergruppen der $G\alpha$ -Untereinheiten und ihre zellulären Effekte. IP3: Inositol-1,4,5-triphosphat; DAG: Diacylglycerin; PKC: Proteinkinase C

Zur Gruppe der G_s -Proteine gehören zum einen die vier Spleißvarianten der klassischen α_s -Untereinheit (Bray et al., 1986) und zudem die für die ZNS- und olfaktorischen-Neuronen spezifische α_{olf} -Untereinheit. Alle diese fünf $G\alpha_s$ -Untereinheiten haben einen stimulatorischen Effekt auf die Adenylatzyklase und somit auf die cAMP-Konzentration in der Zelle. Die G_i -Proteinfamilie setzt sich aus insgesamt neun α -Untereinheiten zusammen, die alle einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylatzyklase zeigen. Unabhängig von der Adenylatzyklase bewirken die vier α Untereinheiten der G_q -Familie durch die Aktivierung der Phospholipase-

C- β eine Pertussis-Toxin unabhängige Erhöhung der Calciumkonzentration in der Zelle (Rhee, 2001). Zur G_{12} -Proteinfamilie gehören die $G\alpha_{12}$ - und $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten, die bisher nur in Verbindung mit der Fähigkeit von Zellen zur Transformation beschrieben wurden (Xu et al., 1993), für die aber in aktuelleren Untersuchungen auch direkte Interaktionspartner entdeckt werden konnten (Suzuki et al., 2003; Kozasa et al., 1998).

Neben den verschiedenen α -Untereinheiten existieren für die heterotrimeren G-Proteine fünf β -Untereinheiten und zwölf γ -Untereinheiten, die in allen möglichen Kombinationen miteinander vorkommen und auf eine Reihe von Effektoren wirken können, wie zum Beispiel Kaliumkanäle (Logothetis et al., 1987), Adenylatzyklen (Tang and Gilman, 1991), die Phospholipase-C- β (Katz et al., 1992) und die Phosphoinositol-3-Kinase (Stephens et al., 1994).

1.2.3 Zelluläre Effektoren der GPCR

Durch die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können eine Reihe von Effektorproteinen aktiviert werden, die das extrazelluläre Signal intrazellulär fortsetzen. Die wichtigsten Effektoren dabei sind die Adenylatzyklase, die Phospholipase-C- β (PLC β), Kalium- und Calciumkanäle und cGMP-spezifische Phosphodiesterasen. Dabei wird, je nach Kombination der aktivierten α -, β - und γ -Untereinheiten, eine Vielzahl von verschiedenen Signalmolekülen beeinflusst, die in der Gesamtheit in einem Netzwerk von Signalwegen zusammenwirken.

1.2.3.1 Adenylatzyklase und cAMP

Obwohl der Einfluss der Adenylatzyklase auf die Konzentration des „second messengers“ cAMP einer der am besten untersuchten intrazellulären Signalwege ist, sind noch immer einige Fragen zur genauen Funktion ungeklärt.

Die Familie der membrangebunden Adenylatzyklen (AC) besteht aus neun Isoformen (AC1 bis AC9), die alle die Bildung von cAMP aus ATP katalysieren. Zwar variiert die Expression der AC-Isoformen von Zelle zu Zelle und von Gewebe zu Gewebe, aber dennoch exprimieren fast alle Zellen wenigstens ein bis zwei Isoformen (Defer et al., 2000). Die allgemeine Struktur der Adenylatzyklase besteht aus einem integralen Membranprotein mit zwei hydrophoben Domänen, die jeweils sechs die Membran durchspannende Helices enthalten. Zwei weitere cytoplasmatische Domänen bilden das aktive Zentrum des Moleküls. Einmal aktiviert, katalysiert die Adenylatzyklase unter Abspaltung von Pyrophosphat die Bildung von cAMP aus ATP (Abb.1.8). Die gebildeten cAMP-Moleküle diffundieren ins Cytoplasma und regulieren ihrerseits eine Reihe von physiologischen Prozessen, zum Beispiel den Glycogen-Metabolismus, die Hormonsynthese, die Aktivierung von

Ionenkanälen und die Gentranskription. Die meisten der Effekte werden durch die Bindung von cAMP an die Proteinkinase A (PKA) und die damit verbundenen Aktivierung der PKA vermittelt (Abb.1.8), aber auch andere Zielmoleküle wurden identifiziert. Ein Ende der cAMP vermittelten Signalkaskade erfolgt durch den Abbau von cAMP durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE).

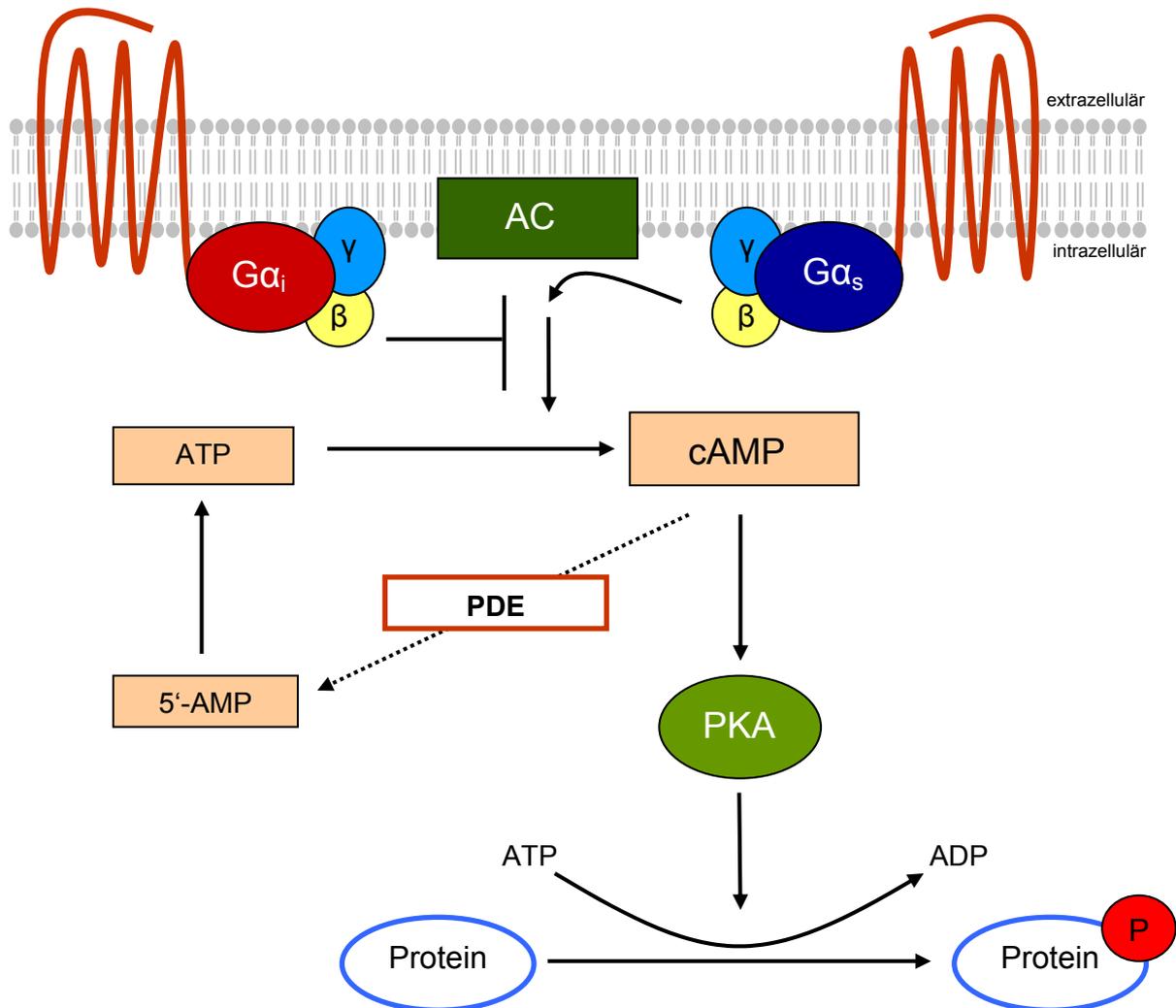


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der cAMP-vermittelten Signalkaskade. Abhängig davon, ob ein Rezeptor ein stimulatorisches oder inhibitorisches G-Protein aktiviert, wird die cAMP-Konzentration in der Zelle durch die Adenylatzyklase (AC) beeinflusst. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die wiederum die Phosphorylierung (P) und somit die Aktivierung von Effektorproteinen auslöst. Durch die Phosphodiesterase (PDE) werden die cAMP-Moleküle wieder degradiert.

Aufgrund der Vielfalt der Isoformen und der unterschiedlichen α -, β - und γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine werden die Adenylatzyklasen durch eine Reihe von Faktoren auf unterschiedliche Weise reguliert. Während alle $G\alpha_s$ -Untereinheiten auch alle Isoformen der Adenylatzyklasen mit unterschiedlicher Affinität stimulieren (Harry et al., 1997), inhibieren die

G α_i -Untereinheiten nur einige der Adenylatzyklasen (Taussig et al., 1994). Neben diesen Effekten kann auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine sowohl inhibitorisch als auch stimulatorisch auf die Adenylatzyklasen wirken (Tang and Gilman, 1991). Zudem wurde für die zellulären Effektormoleküle Calmodulin (CaM) und die PLC β -aktivierte Proteinkinase C (PKC) gezeigt, dass beide abhängig von der Isoform der Adenylatzyklase einen stimulatorischen oder inhibitorischen Effekt haben können (Mons et al., 1998).

1.2.3.2 Phospholipase-C- β und Calcium

Ein weiteres durch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviertes Effektormolekül ist die Phospholipase-C (PLC). Alle Mitglieder dieser Enzymgruppe sind in der Lage, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) zu hydrolysieren. Von den elf verschiedenen PLC Isoformen ist die membranverankerte (Harlan et al., 1994) Phospholipase-C- β (PLC β) das Zielmolekül in der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkaskade. Die vier beschriebenen Isoformen der PLC β werden in einer Reihe von Geweben exprimiert (Watanabe et al., 1998) und können, ähnlich der Adenylatzyklase, über die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine unterschiedlich reguliert werden.

Unabhängig von der Aktivierungskaskade wird durch die Lipaseaktivität der PLC β das membranverankerte PIP $_2$ zu DAG und IP3 hydrolysiert (Abb.1.9). Beide Effektormoleküle können dann weitere Signalprozesse stimulieren. So aktiviert DAG als membrangebundenes Molekül die Proteinkinase C (PKC), die dann frei in der Zelle diffundiert und eine Reihe von Effektormolekülen phosphorylieren kann. Abgesehen von der PKC kann DAG auch an die C1 Domäne von anderen Proteinen binden und diese aktivieren, zum Beispiel die Isoformen der Proteinkinase D oder Ras und Rap1 „Exchange“ Faktoren.

Der bekannteste durch IP3 vermittelte Signalweg ist die Calciumfreigabe aus intrazellulären Calciumspeichern. Da Calciumionen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von zellulären Aktivitäten spielen, wie zum Beispiel bei der Muskelkontraktion, der Zellteilung, der Befruchtung oder der synaptischen Signalübertragung, wird die Konzentration der Calciumionen in der Zelle präzise reguliert. Im Ruhezustand beträgt die Calciumkonzentration im Cytoplasma um die 100 nM und wird durch verschiedene Ionenpumpen und Ionenkanäle aufrechterhalten. Als Antwort auf einen Stimulus kann dann die Abgabe von Calciumionen aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder der Einstrom aus dem Extrazellulärraum erfolgen, wodurch es zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration kommt. Die Erhöhung der Calciumkonzentration resultiert dann in der Bindung von Calciumionen an weitere Effektormoleküle, wie zum Beispiel Calmodulin, die dann in der Lage sind ihre aktive Funktion auszuüben. Endet der Stimulus, so werden die Calciumionen durch Pumpen und

Kanäle wieder in die intrazellulären Speicher oder aus der Zelle heraustransportiert, um die ursprüngliche Konzentration wieder herzustellen. Der Einstrom von Calciumionen aus den intrazellulären Speichern erfolgt einerseits durch die Bindung der gebildeten IP₃-Moleküle an die IP₃-Rezeptoren (IP₃R) in der Membran des ER (Abb.1.9). Diese Rezeptoren sind tetramere Calciumkanäle (Taylor et al., 1999), die sich durch die IP₃-Bindung öffnen und so die durch die Calcium-ATPase im ER angesammelten Calciumionen ins Cytosol abgeben.

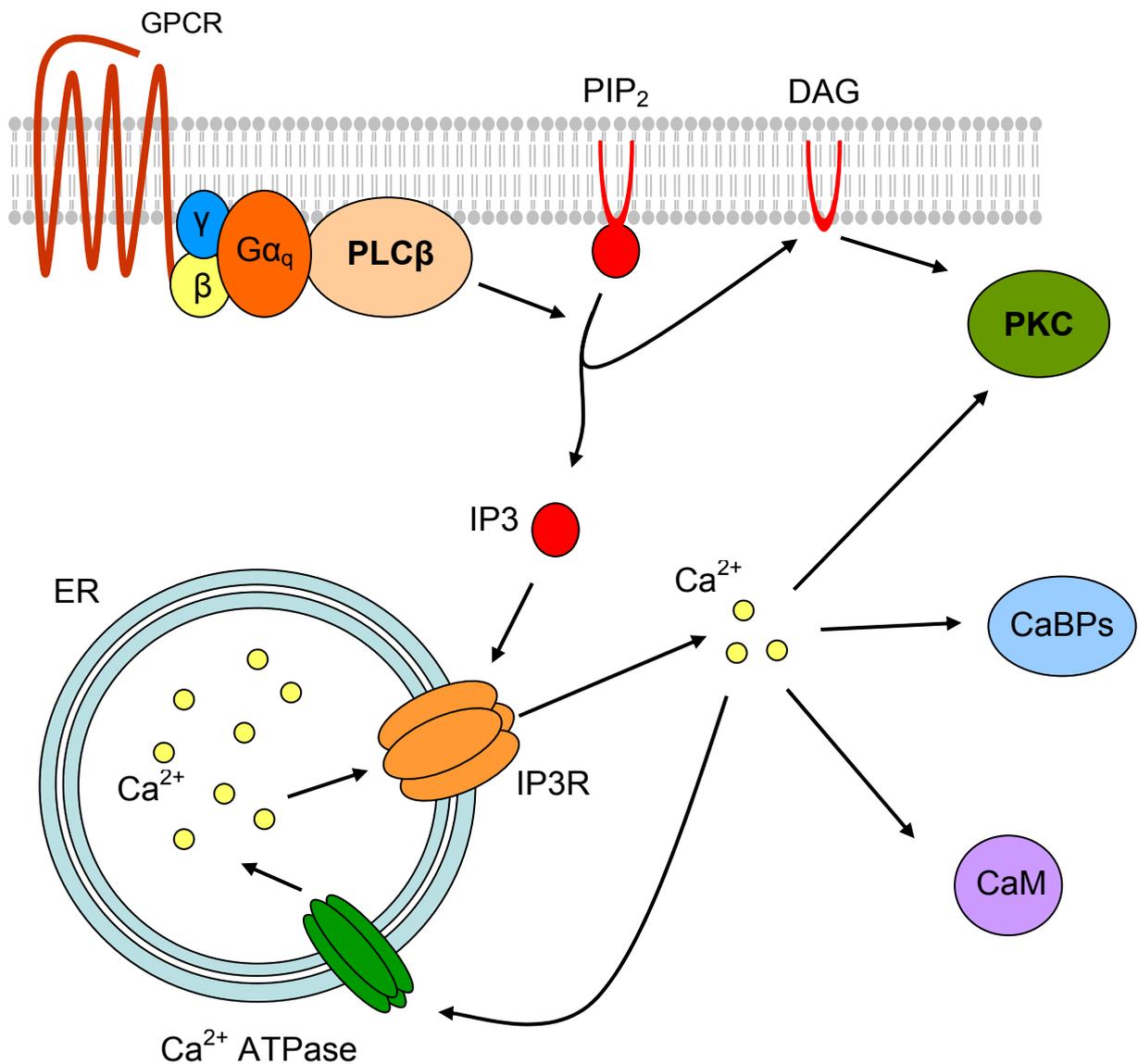


Abbildung 1.9: Intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung durch PLCβ und IP₃. Aktiviert durch ein G_q-Protein katalysiert die Phospholipase-C-β (PLCβ) die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Durch Bindung von IP₃ an den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP₃R) kommt es zum Ausstrom von Calciumionen (Ca²⁺) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Calciumionen können dann Effektormoleküle wie die Proteinkinase C (PKC), Calmodulin (CaM) oder calciumbindende Proteine (CaBPs) aktivieren. Über die Ca²⁺-ATPase-Pumpe werden die Calciumionen aktiv zurück ins ER transportiert.

Eine andere Möglichkeit zur Freigabe von Calciumionen aus intrazellulären Speichern ist die Bindung von Calcium selber, zum Beispiel an die Ryanodin-Rezeptoren in Herzzellen (Clapham, 1995). Weitere Mediatoren für diesen Effekt sind zum Beispiel die cyclische ADP-Ribose oder der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Ligand Sphingosine-1-Phosphat.

1.3 Orexin-System

1.3.1 Liganden und Rezeptoren

Die beiden Neuropeptide Orexin A und Orexin B, auch unter den Namen Hypocretin 1 und Hypocretin 2 bekannt, sowie ihre Rezeptoren Orexin-Rezeptor 1 (OXR1) und Orexin-Rezeptor 2 (OXR2) wurden 1998 zum ersten Mal in hypothalamischen Neuronen beschrieben (Sakurai et al., 1998; de Lecea et al., 1998). Beide Peptide werden durch ein gemeinsames Gen auf dem Chromosom 17q21 kodiert und entstehen bei der proteolytischen Spaltung eines Prepro-Orexin-Peptids (Sakurai et al., 1999). Dabei umfasst Orexin A insgesamt 33 Aminosäuren und besitzt zwei Disulfidbrücken, während Orexin B ein 28 Aminosäuren langes, lineares Peptid darstellt (Abb.1.10).

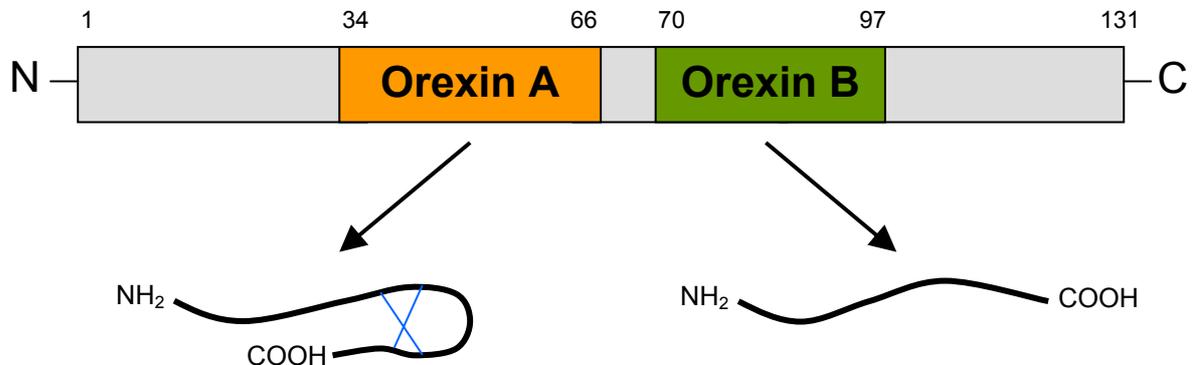


Abbildung 1.10: Proteinstruktur des Prepro-Orexin-Peptids. Durch proteolytische Spaltung entstehen aus dem 131 Aminosäuren langen Prepro-Orexin die beiden Peptide Orexin A (33 AS) und Orexin B (28 AS). Die zwei Disulfidbrücken im Orexin A sind blau dargestellt.

Die beiden Orexin-Rezeptoren 1 und 2 gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten 7-Helix-Transmembranrezeptoren und zeigen in ihrer Sequenz eine signifikante Homologie von 64%. Interessanterweise konnte bisher keine weitere Homologie mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beobachtet werden (Kukkonen et al., 2002). Beide Rezeptoren können von beiden Orexin Peptiden aktiviert werden, wobei Orexin A an beide Rezeptoren mit gleicher Affinität bindet, während Orexin B eine 10fach höhere Affinität für den OXR2

besitzt als für den OXR1 (Rouet-Benzineb et al., 2004; Kukkonen et al., 2002). Neben den Liganden Orexin A und Orexin B werden in funktionellen Untersuchungen auch selektive Orexin-Rezeptor-Antagonisten eingesetzt, die durch Bindung des Rezeptors die Aktivierung durch die Orexin-Liganden hemmen. Schon 2001 wurde der erste selektive Orexin-Rezeptor-1-Antagonist SB-334687 beschrieben (Smart et al., 2001) und drei Jahre später erstmalig auch ein Orexin-Rezeptor-2-Antagonist (McAtee et al., 2004).

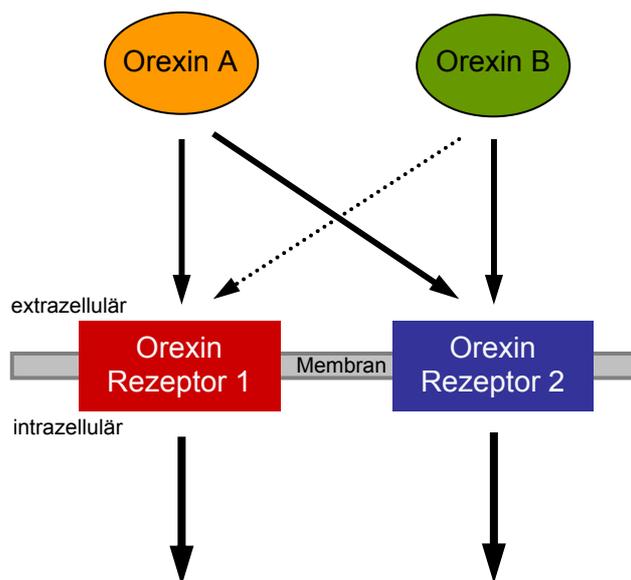


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Bindungsaffinität von Orexin A und Orexin B an die Orexin-Rezeptoren 1 und 2. Orexin A bindet mit der gleichen Affinität an beide Orexin-Rezeptoren, während Orexin B eine 10fach erhöhte Affinität für den Orexin-Rezeptor 2 besitzt.

1.3.2 Systemische Effekte

Orexine und ihre Rezeptoren werden vor allem in hypothalamischen Neuronen exprimiert. In ersten Untersuchungen wurde ein Appetit-stimulierender Effekt der Orexine beschrieben (Sakurai et al., 1998). Neben der Kontrolle bei der Nahrungsaufnahme ist die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus der bisher am besten untersuchte systemische Effekt des orexinergen Systems. So zeigte sich vor allem eine Orexin- und Orexin-Rezeptor-Expression in der Hirnregion, die im Schlaf-Wach-Rhythmus eine Rolle spielt (Peyron et al., 1998). Zudem wurde beobachtet, dass eine genetische Zerstörung von orexinergen Neuronen zu einem narkoleptischen Phänotyp führt (Hara et al., 2001). Ein weiterer Effekt des orexinergen Systems ist der Einfluss auf die neuroendokrine Homöostase. So kann durch die intrazerebroventrikuläre Zugabe von Orexin die Plasmakonzentration von Prolaktin vermindert (Russell et al., 2000; Hagan et al., 1999) und die Konzentration von Corticosteron (Hagan et al., 1999; Malendowicz et al., 1999) erhöht werden. Zudem vermittelt Orexin im Rahmen der Stress- und Abwehrreaktion eine Erhöhung des Blutdrucks (Samson et al., 1999) und der Herz- und Atemfrequenz (Shirasaka et al., 1999). Neben dem Vorkommen im Gehirn wurde die Expression der Orexine und ihrer Rezeptoren auch in anderen

Gewebetypen beschrieben, so zum Beispiel im Pankreas (Nakabayashi et al., 2003; Nowak et al., 2000), in der Schilddrüse (Johren et al., 2001; Lopez et al., 1999), in den Hoden (Karteris et al., 2004), in der Niere und in der Lunge (Johren et al., 2001). In der Nebennierenrinde spielt das Orexin-System eine Rolle bei der Produktion und Freisetzung der Hormone Corticosteron und Aldosteron (Malendowicz et al., 1999), während es im Gastrointestinaltrakt an der Regulation der Darmmotilität beteiligt ist (Kirchgessner and Liu, 1999). Weiterhin beschreiben aktuelle Untersuchungen die Expression der Orexin-Rezeptoren in Adipozyten und eine Beteiligung der Orexine an der Adipogenese (Digby et al., 2006). Zudem wurde von unserer Arbeitsgruppe die Expression von Orexin-Rezeptoren auf hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen entdeckt (Steidl et al., 2004). In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass das blutbildende System ein weiteres nicht-neuroendokrines System ist, das durch Orexin beeinflusst werden könnte.

1.3.3 Zelluläre Effekte

Bezüglich der zellulären Effekte wurde in den Originalarbeiten und auch in späteren Untersuchungen die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration als der Haupteffekt einer Orexin-Rezeptor-Stimulation beschrieben (Ammoun et al., 2006a; Lund et al., 2000; Sakurai et al., 1998). Nachdem zunächst beobachtet wurde, dass für diesen Effekt eine G_q-Protein-Kopplung der Orexin-Rezeptoren notwendig ist, wies Lund im Jahre 2000 nach, dass die Erhöhung der Calciumkonzentration über zwei Wege vermittelt wird. Zum einen erfolgt die Freisetzung aus intrazellulären Speichern durch Aktivierung der PLCβ. Zusätzlich kommt es zu einer Erhöhung des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum über Ionenkanäle (Lund et al., 2000). Dass beide Signalwege zur Erhöhung der Calciumkonzentration miteinander verknüpft sind, zeigt die Beobachtung, dass eine PLCβ-vermittelte Antwort und die dadurch bedingte IP3-Synthese von einem extrazellulären Calciumeinstrom abhängig sind. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch die Adenylatzyklase-Aktivität durch eine Orexin-Rezeptor-Stimulation beeinflusst werden kann. Nach diesen Ergebnissen kann eine Aktivierung des OXR1 einen dualen Effekt auf die cAMP-Synthese haben. Dabei wird eine inhibitorische Beeinflussung durch G_i-Proteine und ein stimulatorischer Effekt über G_s-Proteine und eine G_q-gekoppelte PKC-Aktivierung vermittelt (Holmqvist et al., 2005). Eine Erniedrigung der cAMP-Konzentration wird vermutlich auch über den OXR2 erreicht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Orexin-Rezeptoren sowohl an G_q-, G_i- als auch an G_s-Proteine gekoppelt sein können, wobei die Art der Kopplung vermutlich vom Gewebe- und Zelltyp abhängig ist.

Neben neurophysiologischen Funktionen sind die Orexin-Rezeptoren über die Aktivierung von „Mitogenaktivierten Protein Kinasen“ (MAPK)-Signalwegen auch an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod beteiligt. So zeigte sich in einer aktuellen

Untersuchung, dass eine Stimulation des OXR1 zu einer Phosphorylierung der „extracellular signal regulated kinases 1 and 2“ (ERK1/2) und einer p38-MAPK-vermittelten Apoptose führt (Ammoun et al., 2006a). Zudem wird für Orexin A und Orexin B ein apoptoseinduzierender Effekt bei Kolonkarzinom- und Neuroblastom-Zelllinien beschrieben (Rouet-Benzineb et al., 2004).

Da die Orexine und ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit Blick auf ihre wissenschaftlichen Entdeckung ein noch relativ unerforschtes Gebiet darstellen und die zellulären Signale, die durch die Aktivierung der Orexin-Rezeptoren induziert werden, zum großen Teil noch unbekannt sind, müssen weitere Untersuchungen zur Klärung der orexinergen Signalkaskade beitragen.

1.4 Ziel der Arbeit

Vor drei Jahren konnte unserer Arbeitsgruppe in Genexpressionsanalysen zum ersten Mal zeigen, dass humane hämatopoetische CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen neben einer Reihe von neurobiologisch relevanten Genen auch die G-Protein-gekoppelten Orexin-Rezeptoren 1 und 2 exprimieren. Mit Blick auf diese Befunde ist es das Ziel dieser Arbeit, die funktionelle Bedeutung der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen zu analysieren.

In einer Reihe von funktionellen Assays soll der Effekt der Orexin-Rezeptor-Stimulation mit den Liganden Orexin A und Orexin B auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht werden. Verschiedene Zellkulturexperimente sollen zeigen, ob und wie die bisher beschriebenen orexinergen Signalwege auch in hämatopoetischen CD34⁺ Zellen beeinflusst werden. Durch klonogene Wachstumsstudien soll ermittelt werden, ob die Orexin-Rezeptoren einen Einfluss auf die hämatologische Differenzierung nehmen. Zudem sollen anhand von Genexpressionsanalysen mögliche Signalwege identifiziert werden, die durch eine Orexin-Rezeptor-Stimulation aktiviert oder gehemmt werden.

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit können möglicherweise einen Hinweis darauf geben, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Orexin-System und der Blutbildung besteht und die Hypothese einer möglichen Regulation der Hämatopoese durch das Nervensystem weiter beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Firma
NanoDrop ND - 1000 Spektralphotometer	<i>PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
AlphaMager™ Geldokumentationsanlage	<i>Biozym Scientific GmbH, Oldendorf</i>
Axiovert 25 CFL Mikroskop mit Sony Power HAD 3CCD Kamera	<i>Carl Zeiss AG, Oberkochen</i>
Axioskop 2 Mikroskop	<i>Carl Zeiss AG, Oberkochen</i>
Biofuge fresco mit Heraeus Rotor #3325	<i>Thermo Electron Corporation, Langenselbold</i>
Canon Power Shot G5 Kamera	<i>Canon Deutschland GmbH, Krefeld</i>
Durchflusszytometer FACSCalibur mit Software CellQuest™	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
EasyCast™ Mini Gel Electrophoresis System	<i>Owl Separation Systems, Portsmouth, USA</i>
HERAcell® CO ₂ - Inkubator	<i>Thermo Electron Corporation, Langenselbold</i>
HERAsafe® HS 12 Sicherheitswerkbank	<i>Thermo Electron Corporation, Langenselbold</i>
Hybridisierungsöfen Mini-38	<i>Saur Laborbedarf, Reutlingen</i>
Megafuge 1.0R mit Heraeus Rotor #2704	<i>Thermo Electron Corporation, Langenselbold</i>
PCR Mastercycler®gradient	<i>Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf</i>
Wallac 1420 Victor ² Mikroplatten-Reader	<i>Perkin Elmer Deutschland, Überlingen</i>
Zellcoulter MD II Series Analyzer	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>

Tabelle 2.1: verwendete Geräte

2.2 Materialien

Alle Materialien für Zellkulturexperimente wurden von der Firma *PAA Laboratories GmbH* (Cölbe) bezogen.

Material	Firma
5 ml FACS-Röhrchen	<i>SARSTEDT AG, Nümbrecht</i>
24 Transwell-Platten (5 µm Poren)	<i>Corning Life Sciences, Schiphol-Rijk, NL</i>
Human Genome Focus Array	<i>Affymetrix, Santa Clara, USA</i>
LS Separation Columns	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach</i>
MACS MultiStand	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach</i>
MidiMACS Separation Unit	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach</i>
MicroAmp [®] Fast Optical 96 Well-Platte	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
MicroAmp [®] Optical Adhesive Cover	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
QIASHredder Säulen	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>

Tabelle 2.2: verwendete Materialien

2.3 Puffer, Medien und Zusätze

Puffer, Medium, Zusatz	Firma
Dulbeccos PBS	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
FBS (Foetal Bovine Serum)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
HBSS-Puffer	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Hepes-Puffer (1 M)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
L-Glutamin (200 mM)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Methocult SF ^{BIT} H4439 (Methylzellulose)	<i>CellSystems, St. Katharinen</i>
Penicillin / Streptomycin (100 x)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
RPMI-1640 Medium	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Seelze</i>

Tabelle 2.3: verwendete Puffer, Medien und Zusätze

2.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma
AlbuRx [®] 5 Humanalbumin-Lösung (5%)	<i>ZLB Behring GmbH, Marburg</i>
Agarose	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Seelze</i>
Borsäure	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
BSA-Lösung (30%)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
CaliBRITE-Microbeads	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
DMSO-Lösung	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Seelze</i>
EDTA-Lösung (0,5 M)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Seelze</i>
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Seelze</i>
Fibronectin-Lösung (1 mg/ml)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Seelze</i>
LymphoPrep [™]	<i>PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg</i>
Fluo4-AM-Lösung (1 mM)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Glucose	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Human Interleukin-3 (IL3)	<i>BioSource Deutschland GmbH, Solingen</i>
Human Interleukin-6 (IL6)	<i>BioSource Deutschland GmbH, Solingen</i>
Human Stem Cell Factor (SCF)	<i>BioSource Deutschland GmbH, Solingen</i>
Human SDF-1β/CXCL12	<i>R&D Systems GmbH, Wiesbaden</i>
Loading Dye (6 x)	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Tris-Base	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Trypanblau-Lösung (0,5%)	<i>BIOCHROM AG, Berlin</i>
100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µl)	<i>GeneCraft GmbH, Lüdinghausen</i>

Tabelle 2.4: verwendete Chemikalien

2.5 Kit-Systeme

Kit-System	Firma
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit	<i>Becton Dickinson GmbH</i> , Heidelberg
BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling System	<i>ENZO Life Sciences</i> , Farmingdale, USA
cAMP Enzym Immunoassay Kit	<i>Sigma-Aldrich GmbH</i> , Seelze
GeneChip Sample Cleanup Module	<i>Affymetrix</i> , Santa Clara, USA
High Capacity cDNA Archive Kit	<i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA
Human CD34 MicroBead Kit	<i>Miltenyi Biotec GmbH</i> , Bergisch Gladbach
MessageAmp™ aRNA Kit	<i>Ambion</i> , Austin, USA
RNeasy Mini Kit mit	<i>Qiagen GmbH</i> , Hilden
RNase-Free DNase Set	<i>Qiagen GmbH</i> , Hilden

Tabelle 2.5: verwendete Kit-Systeme

2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 µl auf 1×10^5 Zellen in 50 µl PBS eingesetzt.

Primärantikörper (Klon)	Firma
CD34 FITC gekoppelt (8G12)	<i>Becton Dickinson GmbH</i> , Heidelberg
CD38 FITC gekoppelt (HB7)	<i>Becton Dickinson GmbH</i> , Heidelberg
Mouse IgG ₁ Isotyp, FITC gekoppelt (X40)	<i>Becton Dickinson GmbH</i> , Heidelberg
normaler Ziegen IgG ₁ Isotyp	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Heidelberg
Ziege-anti-Orexin-Rezeptor 1 (C-19)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Heidelberg
Ziege-anti-Orexin-Rezeptor 2 (N-20)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Heidelberg

Tabelle 2.6: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie

Sekundärantikörper	Firma
Esel-anti-Ziege IgG, FITC gekoppelt	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Heidelberg
Esel-anti-Ziege IgG, Rhodamin gekoppelt	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Heidelberg

Tabelle 2.7: Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie

2.7 Orexin-Rezeptor-Liganden

Ligand	Firma
Human Orexin A (Hypocretin 1)	<i>Sigma-Aldrich GmbH</i> , Seelze
Human Orexin B (Hypocretin 2)	<i>Sigma-Aldrich GmbH</i> , Seelze
Orexin-Rezeptor-1-Antagonist SB-334867 (<i>N</i> -(2-Methyl-6-benzoxazolyl)- <i>N'</i> -1,5-naphthyridin-4-yl urea)	<i>Tocris Bioscience</i> , Ellisville, USA

Tabelle 2.8: Liganden für die Orexin-Rezeptoren 1 und 2

Für die funktionelle Untersuchung der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf den hämatopoetischen CD34⁺ Zellen wurden die Rezeptoren in verschiedenen zellbiologischen Ansätzen mit den Rezeptoragonisten Orexin A oder Orexin B in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Zusätzlich wurde in einigen Ansätzen auch der Orexin-Rezeptor-1-Antagonist SB-334867 in Kombination mit Orexin A oder Orexin B eingesetzt. Die Effekte der Stimulation wurden dann im Vergleich zu unstimulierten Zellen gemessen.

Von den Orexin-Rezeptor-Liganden Orexin A und Orexin B wurden vier verschiedene Stammlösungen in PBS in den Konzentrationen von 1 mM, 100 µM, 10 µM und 1 µM hergestellt. In den Experimenten wurden die Stammlösungen dann jeweils in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt, um die entsprechende Endkonzentration von Orexin A und Orexin B zu erhalten. Als Kontrolle wurde jeweils das entsprechende Volumen an PBS eingesetzt. Der Orexin-Rezeptor-1-Antagonist SB-334867 wurde zunächst in DMSO in einer Ausgangskonzentration von 5 mM gelöst. Aus dieser Konzentration wurden dann durch Verdünnungen in PBS vier Stammlösungen mit den Konzentrationen 1 mM, 100 µM, 10 µM und 1 µM hergestellt. In den Experimenten wurden die Stammlösungen bezogen auf die Endkonzentration in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO in der gleichen Konzentration wie in der eingesetzten Stammlösung verwendet.

2.8 Primer und Sonden für die quantitative TaqMan-PCR

Alle Primer und Sonden für die quantitative „Real-Time“-PCR unter Verwendung der TaqMan-Technologie wurden von der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) bezogen.

Primersonde	Genname nach NCBI	Symbol
Hs99999903_m1	actin, beta	ACTB
Hs00244871_m1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	ACSL4
Hs00544877_m1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	ATP2A2
Hs00180319_m1	cyclin E2	CCNE2
Hs00269972_s1	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	CEBPA
Hs00237052_m1	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4
Hs00365956_m1	homeo box A9	HOXA9
Hs00183279_m1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	IMPA1
Hs00382671_m1	jumonji domain containing 1B	JMJD1B
Hs00534289_s1	jun D proto-oncogene	JUND

Tabelle 2.9: Primersonden für die quantitative TaqMan-PCR

2.9 Methoden

2.9.1 Gewinnung von hämatopoetischen CD34⁺ Zellen

Primäre, hämatopoetische CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen wurden nach Leukapherese [2.9.1.1] aus dem peripheren Blut (PB) von gesunden Spendern gewonnen. Nach schriftlicher Einverständniserklärung der Spender wurde ein Teil der für die allogene Transplantation gespendeten Zellen zunächst zur Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs) [2.9.1.2] verwendet, um aus diesen dann durch immunmagnetische Isolierung [2.9.1.3] die CD34⁺ Zellen zu gewinnen.

2.9.1.1 Leukapherese

Zur Mobilisierung der hämatopoetischen CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut wurden Familien- oder Fremdspender für eine allogene Transplantation über 5 Tage mit 12 µg pro Kilogramm Körpergewicht humanem rekombinanten G-CSF (Granulocyte Colony Stimulation Factor, NEUPOGEN[®]; Amgen, Thousand Oaks, USA) behandelt (Steidl et al., 2004). Sobald die Konzentration von 4 x 10⁶ CD34⁺ Zellen pro kg Körpergewicht erreicht war, erfolgte die Leukapherese mittels des COBE Spectra Apheresesystems (*Gambro BCT*, Planegg-Martinsried).

2.9.1.2 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von MNCs

Zur Isolierung der mononukleären Zellen (MNCs) aus den Leukaphereseprodukten wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Diese Methode beruht darauf, dass Ficoll mit 1,077 g/ml eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten besitzt, aber eine größere als Lymphozyten und Monozyten. Somit können die Zellen in einer Gradientenzentrifugation aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte voneinander aufgetrennt werden.

Die Zellsuspension aus der Leukapherese wurde zunächst in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Lymphoprep[™] aufgeschichtet. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 400 g ohne Bremse haben Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte die Ficoll-Phase passiert und sind sedimentiert. Die MNCs (Lymphozyten und Monozyten) haben sich aufgrund ihrer geringeren Dichte als helle Interphase über der Ficoll-Phase angesammelt.

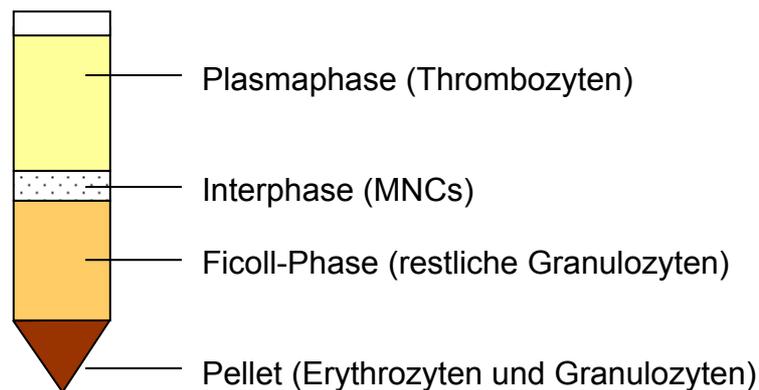


Abbildung 2.1: Phasen Auftrennung von Vollblut nach einer Dichtegradientenzentrifugation.

Der Interphasering mit den mononukleären Zellen wurde sorgfältig abpipettiert und zum Waschen in einem neuen Röhrchen mit 30 ml PBS verdünnt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 400 g wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Zellpellet ein weiteres Mal mit 30 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach der erneuten Dekantierung des Überstandes wurde das Zellpellet in 20 ml PBS resuspendiert und der Anteil der MNCs mit Hilfe des Coulter MD II Series Analyzer (*Beckman Coulter GmbH*, Krefeld) automatisch ermittelt.

2.9.1.3 Immunmagnetische Isolierung

Die Isolierung von $CD34^+$ Zellen aus der MNC-Fraktion der Leukaphereseprodukte erfolgte über eine immunmagnetische Separation mit Hilfe des CD34 MicroBead Kit (*Miltenyi Biotec GmbH*, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers.

Das Prinzip besteht darin, dass die $CD34$ -exprimierenden Zellen in der Suspension zunächst an monoklonale anti- $CD34$ Antikörper gebunden werden, die an magnetische Partikel, die MACS „Microbeads“, gekoppelt sind. In einem ersten Schritt lässt man dann die Zellsuspension in einem Magnetfeld über eine spezielle Separationssäule laufen. Dabei bleiben die magnetisch markierten $CD34^+$ Zellen in der Säule hängen, während alle unmarkierten Zellen hindurchfließen. Nach Entfernung des Magnetfeldes können dann in einem zweiten Schritt die $CD34^+$ Zellen aus der Säule gewaschen werden.

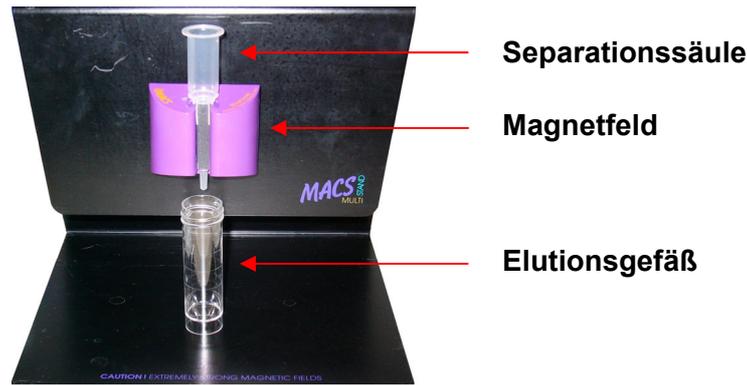


Abbildung 2.2: Säulensystem für die immunmagnetische Isolierung.

Um die $CD34^+$ Zellen zunächst magnetisch zu markieren, wurden die zuvor isolierten MNCs pro 10^8 Zellen in 300 μ l MACS Puffer resuspendiert und mit 100 μ l Blockierungslösung (F_cR -Blocking-Reagenz) und 100 μ l magnetisch konjugiertem $CD34$ Antikörper ($CD34$ Microbeads) vermischt. Das Zell-Antikörpergemisch wurde danach für 30 min bei $4^\circ C$ inkubiert, anschließend mit MACS Puffer auf 30 ml aufgefüllt und für 10 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet pro 10^8 Zellen in 500 μ l MACS Puffer resuspendiert. Für die eigentliche Isolierung wurde die Separationssäule (LS Separation Columns) zunächst in den Magneten (MidiMACS Separation Unit) eingespannt und einmal mit 3 ml MACS Puffer gespült. Anschließend konnte die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und diese nach dem Durchlauf 3-mal mit je 3 ml MACS Puffer gewaschen werden. Zur Elution wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die selektionierten $CD34^+$ Zellen mit 5 ml MACS Puffer eluiert. Um die Reinheit der $CD34^+$ Fraktion zu erhöhen, wurden die selektionierten Zellen ein weiteres Mal auf eine Separationssäule aufgetragen und die entsprechenden Waschschrte wiederholt.

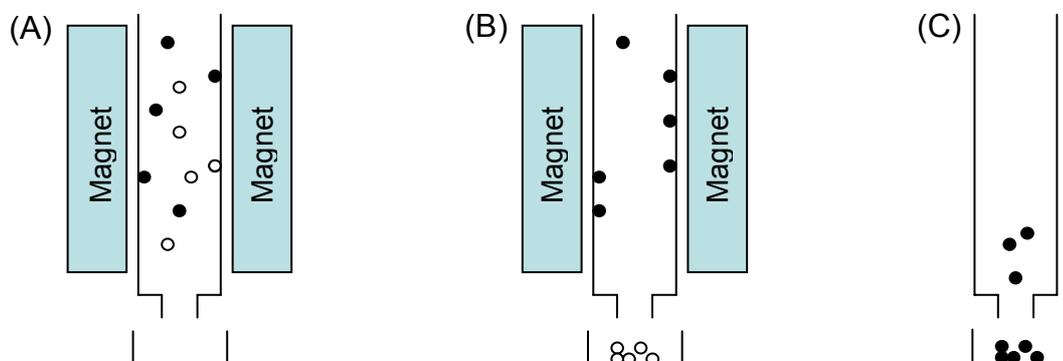


Abbildung 2.3: Schema der immunmagnetischen Isolierung. (A) Die magnetisch gekoppelten $CD34^+$ Zellen (schwarz) fließen zusammen mit den unmarkierten Zellen (weiß) über die vom Magneten umgebene Säule. (B) Während die unmarkierten Zellen durch die Säule fließen, bleiben die $CD34^+$ Zellen in der magnetisch aufgeladenen Matrix aus Stahlwolle hängen. (C) Nach Entfernung des Magnetfeldes können die $CD34^+$ Zellen aus der Säule ausgewaschen und aufgefangen werden.

Die isolierten CD34⁺ Zellen wurden mittels Neubauerkammer [2.9.2] gezählt und je nach weiterer Verwendung über Nacht in Suspensionskultur [2.9.4] gegeben oder direkt in weitere Experimente eingesetzt. Die Reinheit der immunmagnetisch angereicherten CD34⁺ Zellen erfolgte mittels direkter Durchflusszytometrie [2.9.3.1] und lag immer über 95%.

MACS Puffer 0,5% Humanes Albumin
 2 mM EDTA
 in PBS, bei 4°C lagern

2.9.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer

Die Anzahl der isolierten CD34⁺ Zellen wurde mittels einer Neubauer Zählkammer (*Paul Marienfeld GmbH*, Lauda-Königshofen) ermittelt. Das Prinzip besteht darin, dass durch Auflegen eines Deckglases auf die Zählkammer ein Zwischenraum bekannter Größe entsteht, so dass man anhand der gezählten Zellen auf die Absolutzellzahl in der Ausgangssuspension schließen kann.

20 µl der CD34⁺ Zellsuspension wurden mit 20 µl 0,5%igem Trypanblau verdünnt und dann 10 µl des Zellgemisches zwischen Deckglas und Neubauer Zählkammer pipettiert. Da Trypanblau nur bei toten Zellen membrangängig ist und diese blau anfärbt, hat man die Möglichkeit, lebende und tote Zellen voneinander zu unterscheiden. Die lebenden CD34⁺ Zellen in den 4 großen Eckquadraten der Zählkammer (Abb.2.4) wurden gezählt und anhand folgender Formel die absolute Anzahl der Zellen in der CD34⁺-Suspension bestimmt:

$$\text{gezählte Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen pro ml Suspension}$$

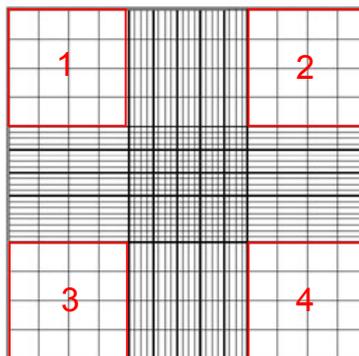


Abbildung 2.4: Zählkreuz der Neubauer Zählkammer mit 4 großen Eckquadraten (rote Markierung).

2.9.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften. Dabei ist es möglich, simultan die relative Zellgröße, die Granularität, sowie zwei bis vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe für mehrere tausend Einzelzellen in wenigen Sekunden zu messen.

Zunächst werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren inkubiert. Um zwischen Oberflächenmolekül-positiven und -negativen Zellen zu unterscheiden, werden weitere Zellen zur Kontrolle mit unspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps markiert. Im Durchflusszytometer wird die Zellsuspension mittels Überdruck über ein Schlauchsystem in den Messbereich eingeführt. Beim Eintritt in die Messkuvette kommt es zur Beschleunigung der Zellen, was eine Auftrennung von kleineren Zellaggregaten zur Folge hat, so dass die Zellen den Analysepunkt einzeln hintereinander passieren (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt trifft ein monochromatischer Laserstrahl für den Bruchteil einer Sekunde auf die durchströmende Zelle. Die erzeugten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden von einem optischen Detektionssystem erfasst und in elektrische Signale konvertiert. Dabei wird die Abschwächung des Laserstrahls in seinem geraden Verlauf als „forward scatter“ (FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Größe einer Zelle. Die Streuung des Laserstrahls beim Durchtritt durch granuläre Zellbestandteile wird als „side scatter“ (SSC) gemessen und steht als Maß für die Dichte und Granularität einer Zelle. Die emittierte Fluoreszenz der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wird in verschiedenen Kanälen aufgezeichnet und ist neben der Unterscheidung zwischen Vorliegen und Abwesenheit eines Oberflächenmoleküls auch ein Maß für den Expressionsgrad, da die Intensität der emittierten Fluoreszenz direkt proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper ist.

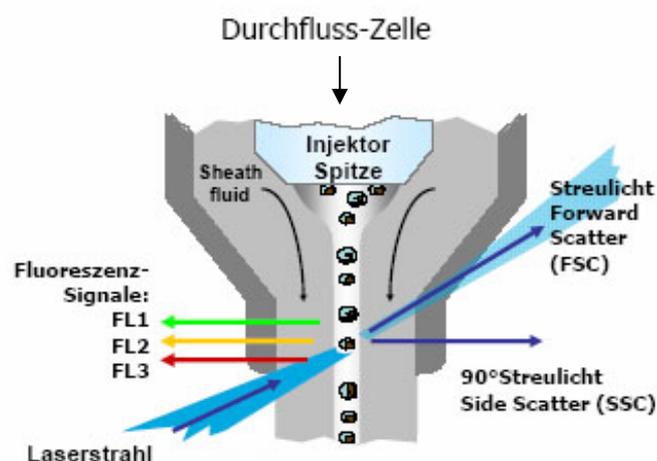


Abbildung 2.5: Schematische Parameterdetektion in einem Durchflusszytometer (nach J.A.Schmid, Centre for Biomolecular Medicine and Pharmacology, Medizinische Universität Wien).

Die durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit erfolgten mit einem FACSCalibur (*Becton Dickinson GmbH*, Heidelberg). In diesem Gerät treffen ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und optional ein Diodenlaser mit der Wellenlänge von 635 nm auf die Zellen. Für die Fluoreszenzerfassung standen die drei Kanäle FL1 ($\lambda_{FL1} = 530$ nm), FL2 ($\lambda_{FL2} = 585$ nm) und FL3 ($\lambda_{FL3} = 650$ nm) zur Verfügung. Als Antikörper-konjugierte Fluochrome wurden deshalb Fluoreszenz-farbstoffe mit dem passenden Absorptions- und Emissionsspektrum verwendet, in diesem Fall Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) und Rhodamin (R). Die emittierten Signale von FITC wurden auf dem ersten Fluoreszenzkanal detektiert und die Signale von Rhodamin auf dem zweiten Kanal. Für jede Messung wurden 10.0000 Zellen mit der Software CellQuest (*Becton Dickinson GmbH*, Heidelberg) analysiert. Mit der Software WinMDI (Version 2.8) erfolgte dann die Verarbeitung und Darstellung der ermittelten Daten.

2.9.3.1 Bestimmung der CD34⁺ Reinheit

Nach der immunmagnetischen Isolierung von hämatopoetischen CD34⁺ Zellen erfolgte die Reinheitsbestimmung mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung (Steidl et al., 2002).

In einem 5 ml FACS-Röhrchen wurden 1×10^5 Zellen in 50 μ l PBS mit 10 μ l eines FITC-konjugierten anti-CD34-Antikörpers versetzt. Um bei der Analyse zwischen CD34-positiven und CD34-negativen Zellen zu unterscheiden, wurden weitere 10^5 Zellen zur Kontrolle mit 10 μ l eines unspezifischen, aber FITC-konjugierten Antikörpers des gleichen Isotyps markiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss wurden beide Ansätze mit 1 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet für die durchflusszytometrische Messung in 250 μ l PBS resuspendiert.

Die Auswertung erfolgte anhand eines Punktwolkendiagramms („Dot Plot“). Dabei wurde der FSC-Parameter auf der X-Achse und die FITC-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse dargestellt. Durch das Festsetzen einer Fluoreszenz-Intensitätsschwelle in Abhängigkeit von der Bindungseigenschaft des Isotyps konnten CD34-negative von CD34-positiven Zellen abgegrenzt und der Anteil an CD34-positiven Zellen (Reinheit) prozentual bestimmt werden.

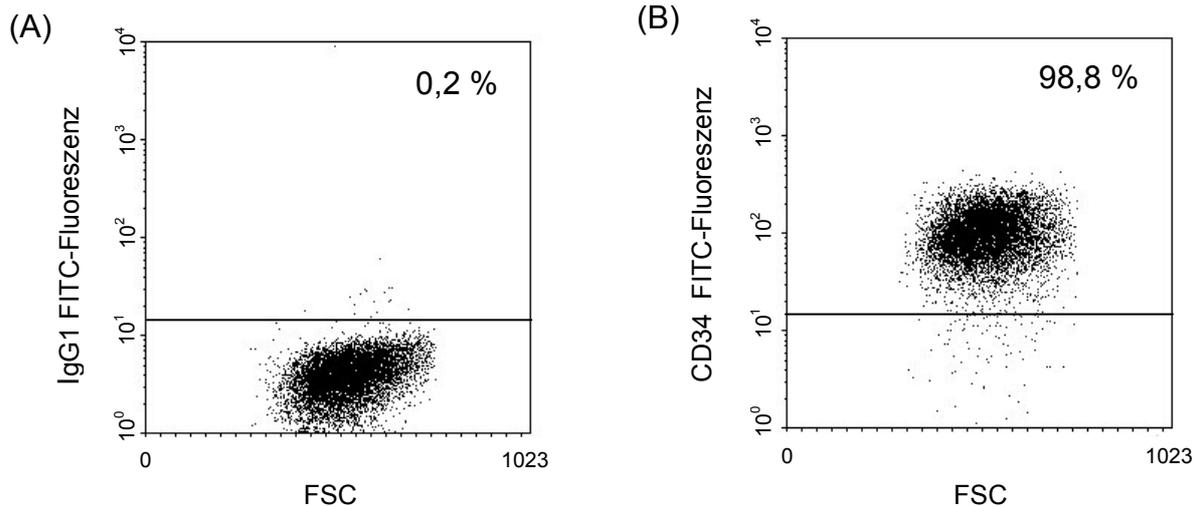


Abbildung 2.6: Reinheitsbestimmung von CD34⁺ Zellen. „Dot Plot“-Darstellung der FITC-Fluoreszenz der Isotyp-Kontrolle (A) und des CD34-Ansatzes (B). Anhand der Fluoreszenz-Intensitätsschwelle (waagerechte Linie) definiert man die Zellen oberhalb als CD34-positiv, die unterhalb als CD34-negativ. Dabei gibt die Prozentzahl den prozentualen Anteil an CD34-positiven Zellen in beiden Ansätzen an. Da die positiven Ereignisse in der Isotyp-Kontrolle auf unspezifische Bindungen zurückzuführen sind, ergibt sich die Reinheit der CD34-positiven Zellen aus der Differenz des Anteils in dem CD34-Ansatz abzüglich des Anteils der unspezifischen Ereignisse in der Isotyp-Kontrolle. Hier wäre das eine Reinheit von $98,8\% - 0,2\% = 98,6\%$.

2.9.3.2 Bestimmung der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ Zellen

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde die Expressionsstärke von den Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf den isolierten CD34⁺ Zellen ermittelt. Dazu wurden je 1×10^5 Zellen in 50 μl PBS mit 10 μl eines Ziegen-anti-Orexin-Rezeptor 1 oder Ziegen-anti-Orexin-Rezeptor 2 Antikörpers für 20 min inkubiert. Zur Kontrolle wurden weitere Zellen mit 10 μl eines Isotyp-identischen, aber unspezifischen Ziege-IgG₁ Antikörper markiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen, 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dann wurden zu allen Ansätzen jeweils 10 μl eines FITC-konjugierten Esel-anti-Ziege Sekundärantikörpers pipettiert. Es folgte eine weitere 20-minütige Inkubation unter Lichtausschluss, bevor die Ansätze ein weiteres Mal mit 1 ml PBS gewaschen und zentrifugiert wurden. Nach Dekantierung des Überstandes konnte das Zellpellet in 250 μl PBS resuspendiert und die Ansätze im Durchflusszytometer gemessen werden.

Die Auswertung erfolgte über eine Histogramm-Analyse. Dabei wurde auch hier durch eine Fluoreszenz-Intensitätsschwelle der Anteil der Orexin-Rezeptor 1 und 2 positiven Zellen ermittelt. Zudem konnte durch Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität auch die Expressionsstärke bestimmt werden.

2.9.3.3 Zweifarbenimmunfluoreszenz

Eine Zweifarbenfluoreszenzanalyse ermöglichte die Korrelation mehrerer Zellparameter, in diesem Fall die Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in Kombination mit dem Oberflächenantigen CD38. Dazu wurden je 1×10^5 CD34⁺ Zellen in 50 μ l PBS zunächst mit 10 μ l eines Ziegen-anti-Orexin-Rezeptor 1 oder Ziegen-anti-Orexin-Rezeptor 2 Antikörpers für 20 min inkubiert. Kontrollzellen wurden mit 10 μ l eines unspezifischen, Isotyp-identischen Ziege-IgG₁ Antikörper markiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen, 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dann wurden alle Ansätze mit 10 μ l eines Rhodamin-konjugierten Esel-anti-Ziege Sekundärantikörpers vermischt. In die Orexin-Ansätze wurde zusätzlich noch 10 μ l eines FITC-konjugierten CD38 Antikörpers gegeben und in den Kontrollansatz der entsprechende Isotypidentische, aber unspezifische FITC-gekoppelte Antikörper. Nach 20 min lichtgeschützter Inkubation wurden die Ansätze mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellpellets dann in je 250 μ l PBS resuspendiert.

Zur Auswertung wurden in einer „Dot Plot“-Analyse die Expression des CD38-Oberflächenmoleküls auf der X-Achse und die Rhodamin-Intensität auf der Y-Achse dargestellt. So konnte die Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in Bezug auf das Vorhandensein des Oberflächenantigens CD38 bestimmt werden.

2.9.4 CD34⁺ Suspensionszellkultur

Für die Suspensionskultur wurden in einer 24 Well-Platte pro Well 5×10^4 CD34⁺ Zellen in 500 μ l CD34⁺ Zytokinmedium eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen über 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 24 h mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 1 μ M und 0,1 μ M stimuliert. Als Kontrolle diente ein unstimulierter Ansatz. Die Anzahl der lebenden und toten Zellen in jedem Ansatz wurde täglich über eine Trypanblau-Färbung in einer Zählkammer [2.9.2] bestimmt. Zum Vergleich der verschiedenen Ansätze wurde aus den Absolutzellzahlen der relative Zellzahlindex (= Zellzahl [Tag x] / Zellzahl [Tag 0]) ermittelt und in Form einer Wachstumskurve graphisch dargestellt.

CD34 ⁺ Zellmedium	RPMI-1640 Medium
	2 mM L-Glutamin
	1% Penicillin / Streptomycin
	10% FBS

CD34 ⁺ Zytokinmedium	CD34 ⁺ Zellmedium
	20 ng/ml human IL3
	20 ng/ml human IL6
	50 ng/ml human SCF

2.9.5 Apoptose-Test durch Annexin V- und 7-AAD-Färbung

Das Prinzip der Apoptose-Messung mit Annexin V beruht auf der Tatsache, dass apoptotische Zellen die Asymmetrie ihrer Plasmamembran verlieren und dadurch das in vitalen Zellen intrazellulär lokalisierte Phospholipid Phosphatidylserin (PS) in der äußeren Membran auftritt. Da Annexin V ein Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS ist, können apoptotische Zellen unter der Verwendung von Fluoreszenz-gekoppeltem Annexin V durchfluss-zytometrisch nachgewiesen werden. Durch eine gleichzeitige Färbung mit dem Farbstoff 7-AAD können apoptotische von nekrotischen Zellen unterschieden werden, da 7-AAD nur in Zellen mit nicht intakter Membranintegrität eindringen kann. Zellen, die sich mit Annexin V und 7-AAD anfärben lassen, sind tot und entweder durch Apoptose oder Nekrose gestorben, während Zellen, die nur eine Annexin V-Färbung zeigen, sich im frühen Prozess der Apoptose befinden. So kann man durch eine gleichzeitige Färbung mit Annexin V und 7-AAD zwischen Nekrose und früher und später Apoptose unterscheiden.

Für die Annexin V-Färbung der isolierten CD34⁺ Zellen wurde das Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit (*Becton Dickinson GmbH*, Heidelberg) nach Herstellerangaben verwendet. Je 1×10^5 CD34⁺ Zellen wurden in 200 μ l CD34⁺ Zytokinmedium [2.9.4] bei 37°C und 5% CO₂ mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 1 μ M und 0,1 μ M inkubiert. Als Kontrolle diente ein unstimulierter Ansatz. Nach 24 h wurden die Zellen 5 min bei 400 g zentrifugiert und in 100 μ l 1 x Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von je 5 μ l Annexin V-PE- und 5 μ l 7-AAD-Färbelösung erfolgte eine Inkubation für 15 min bei RT unter Lichtausschluss. Anschließend wurden je 200 μ l 1 x Annexin V-Bindungspuffer zu den Ansätzen gegeben und der Anteil der Annexin V-positiven und 7-AAD-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Steidl et al., 2003b).

Die Auswertung erfolgte anhand eines Punktwolkendiagramms („Dot Plot“). Dabei wurde die Annexin V-PE-Fluoreszenz auf der X-Achse und die 7-AAD-Intensität auf der Y-Achse dargestellt. Durch die Einteilung des „Dot Plots“ in vier Quadranten konnten Annexin V-negative von Annexin V-positiven Zellen und gleichzeitig vitale von toten Zellen abgegrenzt und der jeweilige Anteil prozentual bestimmt werden.

2.9.6 cAMP-Enzymimmunoassay

Ein Enzymimmunoassay ist eine Technik, bei der mittels einer immunologischen Reaktion der qualitative und quantitative Nachweis einer Substanz durchgeführt werden kann. Die Methode beruht auf der Fähigkeit von Antikörpern, die zu bestimmende Substanz als spezifisches Antigen zu erkennen und mit ihm eine Bindung einzugehen. Das Ausmaß dieses primären Antigen-Antikörper-Komplexes wird dann durch eine enzymatische Farbreaktion angezeigt. Das Prinzip eines kompetitiven Enzymimmunoassays beruht dabei auf einer Signalabschwächung, hervorgerufen durch die konkurrenzbedingte Verdrängung der enzymmarkierten Substanz von den Bindungsstellen des Antikörpers durch die Substanz aus der Probe. Deshalb ist die resultierende Farbintensität umgekehrt proportional zur Konzentration der Substanz in der zu bestimmenden Probe.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten kompetitiven cAMP-Enzymimmunoassay ist eine Mikrotiterplatte mit hochspezifischen Antikörpern gegen cAMP beschichtet. Der Test beruht auf der Konkurrenzreaktion (Kompetition) um die Antikörperstellen auf der Mikrotiterplatte zwischen cAMP aus einem Standard oder einer Probe und einem Enzymkonjugat, bestehend aus an Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem cAMP. Je mehr cAMP in der Standard- bzw. Probenlösung vorhanden ist, desto weniger Enzymkonjugat wird an den Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe des farblosen Substrates p-Nitrophenylphosphat, das durch Katalyse des Enzymkonjugates zu einem gelben Farbstoff reagiert. Sobald die Farbreaktion gestoppt wurde, kann die Farbintensität (Absorption) bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Reader gemessen werden. Sie ist umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration.

Pro Ansatz und Doppelbestimmung wurden 2×10^6 CD34⁺ Zellen in 2 ml CD34⁺ Zytokinmedium für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ mit Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 1 µM und 0,1 µM inkubiert. Als Kontrolle diente ein unstimulierter Ansatz. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration in den stimulierten Proben erfolgte mit Hilfe des cAMP-Kits von *Sigma-Aldrich* (Seelze) nach Herstellerangaben.

Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde für 20 min bei RT in 200 µl 0,1 M HCl-Lösung lysiert und erneut für 5 min bei 600 g zentrifugiert. Um die Degradierung von cAMP zu vermindern und somit die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurden sowohl der Lysat-Überstand als auch je 200 µl der im Kit enthaltenen cAMP-Standardproben (0,078 pmol/ml; 0,312 pmol/ml; 1,25 pmol/ml; 5 pmol/ml; 20 pmol/ml) mit 10 µl Acetylierungsreagenz vermischt. Je 100 µl der Proben und des Standards wurden im Doppelansatz in die Wells einer mit Ziege-anti-Kaninchen Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Dann

folgte die Zugabe von 50 μl eines polyklonalen Kaninchen-anti-cAMP Antikörpers und 50 μl Alkalische-Phosphatase-konjugiertes cAMP. Nach einer Inkubation von 2 h wurden die Wells 3-mal mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen und anschließend 200 μl einer p-Nitrophenyl-Phosphatlösung als Substrat für die Alkalische-Phosphatase in jedes Well gegeben. Nach einer weiteren 1-stündigen Inkubation konnte die Farbreaktion durch Zugabe von 50 μl Stopplösung beendet und die Absorption bei 450 nm mit einem Wallac 1420 Victor² Mikroplatten-Reader (*Perkin Elmer Deutschland, Überlingen*) gemessen werden. Die Konzentration der cAMP in den Proben wurde anhand des Standards ermittelt und in prozentualer Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

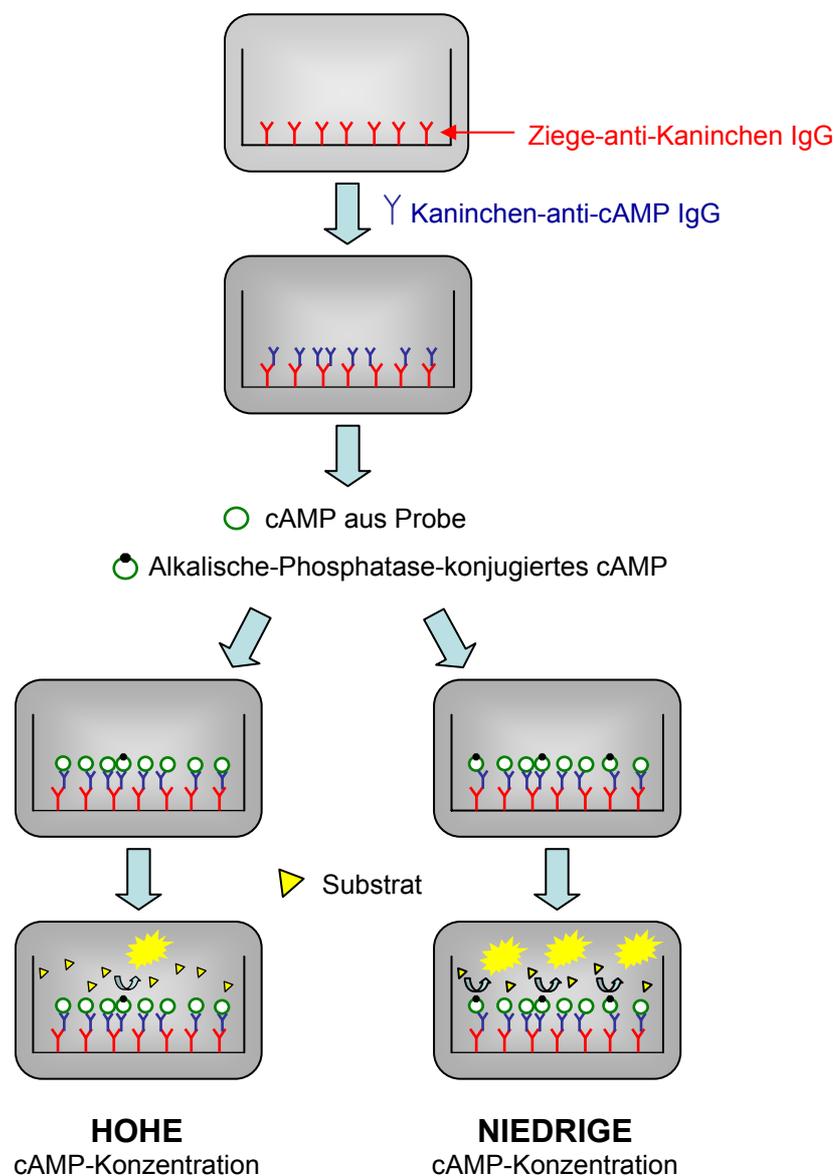


Abbildung 2.7: Schematischer Ablauf eines kompetitiven cAMP-Enzymimmunoassays.

2.9.7 Intrazelluläre Calcium-Messung mittels Durchflusszytometrie

Die Messung der zytosolischen Calciumkonzentration erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Bautz et al., 2001). Das Prinzip der Messung beruht auf der Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die membrangängig sind und die ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit intrazellulärer Calciumkonzentration verändern. Ein solcher Farbstoff ist der hier verwendete Calcium sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fluo4-Acetoxymethylester (Fluo4-AM). In seiner Form als Acetoxymethylester (AM) ist der Farbstoff zunächst lipophil und somit membrangängig. Bei einer Inkubation mit den Zellen diffundiert er durch die Zellmembran und gelangt so ins Zytosol der Zellen. Dort spalten unspezifische Esterasen den Farbstoff und wandeln ihn in seine hydrophile Form um. Diese ist nicht mehr membrangängig und reichert sich somit im Zytosol an. Die eigentliche Messung der zytosolischen Calciumkonzentration beruht nun darauf, dass sich das Absorptionsspektrum von Fluo4 in Abhängigkeit von der Bindung an Calciumionen verschiebt. So besitzt calciumfreies Fluo4 ein Absorptionsmaximum von 416 nm, das sich durch Bindung von Calciumionen auf 494 nm verlagert.

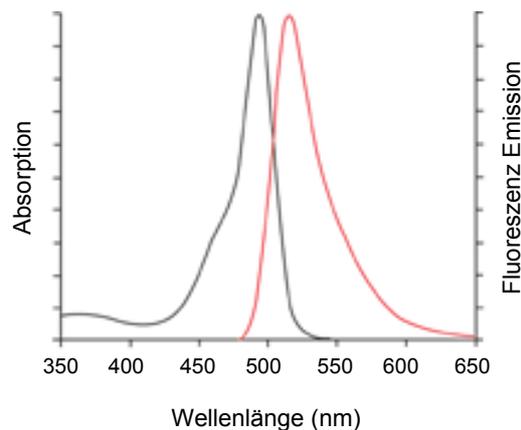


Abbildung 2.8: Das Absorptionsspektrum von calciumfreiem Fluo4 (graue Kurve) verschiebt sich durch Bindung von Calciumionen (rote Kurve).

Da das Emissionsmaximum von Fluo4 in beiden Fällen bei 516 nm liegt, ist die Intensität der Emission ein Maß für die Calciumkonzentration in der Zelle. So kann man durch Messung der Emission bei 516 nm die durch Zugabe von Substanzen hervorgerufene zeitliche Veränderung der Calciumkonzentration in der Zelle messen.

Stimulation der CD34⁺ Zellen

Pro Ansatz wurden je 3×10^5 CD34⁺ Zellen in 30 μ l HBSS-Puffer mit 10 μ M Fluo4-AM bei 37°C für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 Volumen HBSS mit 1% FBS und eine weitere Inkubation bei 37°C für 40 min unter Lichtausschluss.

Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl HEPES-Waschpuffer gewaschen, bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und das Zellpellet danach in 300 µl HEPES-Waschpuffer resuspendiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation bei 37°C konnten die Proben direkt am Durchflusszytometer gemessen werden.

Intrazelluläre Ca²⁺ - Messung am Durchflusszytometer

Die Messung der Ansätze erfolgte mit einem FACSCalibur. Dabei wurden die Probe mit einem Laserlicht der Wellenlänge 488 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzlicht bei 519 nm über einen Zeitraum von 104 sec detektiert. Zunächst wurde über 16 sec ein Basislevel jedes Ansatzes gemessen. Direkt im Anschluss wurden die Orexin-Rezeptor-Agonisten Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 10 µM, 1 µM oder 0,1 µM in die Probe gegeben und die Messung der Fluoreszenzemission bis zum Ende durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die durch SDF-1β (100 ng/ml) vermittelte Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen (Mohle et al., 2001).

Um den Effekt der Rezeptoragonisten Orexin A und Orexin B auf die SDF-1β-vermittelte Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration zu analysieren, wurden die Zellen während der gesamten Inkubation zusammen mit Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 10 µM, 1 µM oder 0,1 µM inkubiert. Bei der Messung erfolgte dann in allen Fällen die Zugabe von 100 ng/ml SDF-1β.

Auswertung

Die Auswertung der Fluoreszenzmessung erfolgte mittels der Software CellQuest (*Becton Dickinson GmbH*, Heidelberg) anhand einer „Dot Plot“-Analyse. Dazu wurde die Zeit über die X-Achse und auf der Y-Achse die Fluo4-Emissionsintensität dargestellt (Abb.2.9). Die X-Achse wurde in 13 Zeitbereiche unterteilt und der Mittelwert der Intensität (Y-Mean-Wert) für alle 8 sec ermittelt (Abb.2.9 (B)). Zur Berechnung der durch die Orexin-Rezeptor vermittelten Veränderung der Calciumkonzentration in Bezug auf die Positivkontrolle wurde der Mittelwert des Basislevels auf 0 und der maximale Y-Mean-Wert der SDF-1β Positivkontrolle auf 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden in Relation dazu berechnet und graphisch dargestellt.

Hepes-Waschpuffer	0,1% BSA
	10 mM Hepes-Puffer
	5 mM Glucose
	in PBS mit Ca ²⁺ Mg ²⁺

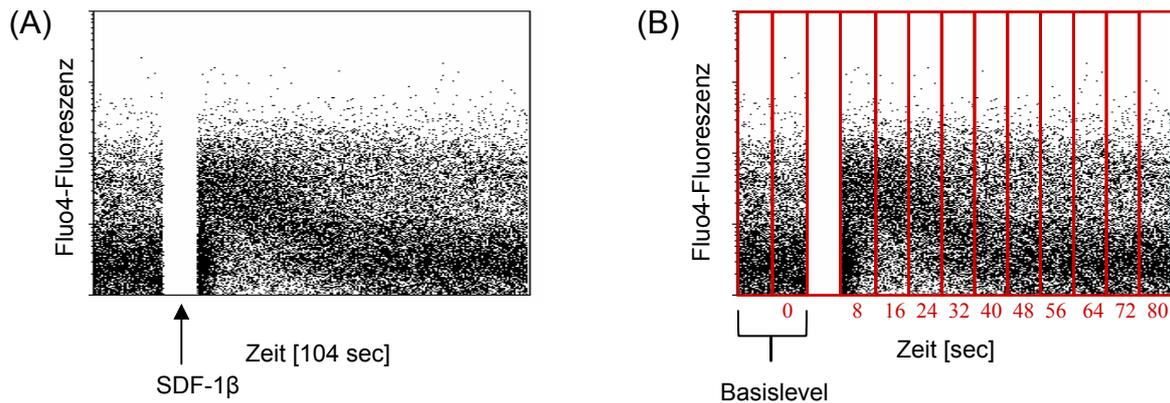


Abbildung 2.9: Calciummessung am Durchflusszytometer. (A) Nach der Messung eines Basislevels wurde durch Zugabe von SDF-1 β (Pfeil) ein intrazellulärer Calciumstrom ausgelöst und die Fluo4-Emission als Maß der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen. (B) Durch Unterteilung der Messung in ein Raster konnte alle 8 sec ein Y-Mean-Wert ermittelt und als relative Fluo4-Intensität zum maximalen Wert (hier bei 16 sec) berechnet werden.

2.9.8 Migrationsassay

Der Einfluß der Orexin-Rezeptoren auf das Migrationsverhalten von hämatopoetischen CD34⁺ Zellen wurde mit einer Transwell-Platte in Anlehnung an den Chemotaxis-Assay in einer Boyden-Kammer untersucht (Bautz et al., 2001). Das Prinzip dabei besteht darin, dass jedes Well durch eine Polycarbonat-Membran mit definierter Porengröße in zwei Kompartimente eingeteilt wird. Nach Einsatz einer definierten Anzahl von Zielzellen in die obere Kammer und Zugabe eines Chemokins in die untere Kammer, durchqueren die Zellen die Membran auf den chemotaktischen Stimulus hin. Durch Auszählung der migrierten Zellen aus der unteren Kammer lässt sich eine Aussage über das Migrationsverhalten von Zellen auf einen bestimmten Stimulus hin machen.

Stimulation der CD34⁺ Zellen

Vor dem Einsatz in die Transwell-Platte wurden die CD34⁺ Zellen mit den entsprechenden Orexin-Rezeptor-Liganden vorinkubiert. Dazu wurden pro Doppelansatz 3×10^5 CD34⁺ Zellen in 300 μ l CD34⁺ Zellmedium mit Orexin A oder Orexin B alleine, oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867, in den Konzentrationen 1 μ M oder 0,1 μ M für 3 h bei 37°C inkubiert.

Migrationsassay

Für den Migrationsversuch wurde eine 24 Transwell-Platte mit einer Porengröße von 5 μ m benutzt. Vor Zugabe der Zellen wurden die Transwell-Membranen über Nacht mit 300 μ l Fibronectin (30 μ g/cm²) bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Fibronectin-Lösung vorsichtig entfernt und die Membranen mit je 300 μ l BSA-Waschlösung für 30 min bei 37°C

2.9.9 Klonogener Wachstumstest

Determinierte Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungsgrade können durch Zellkultur in semisoliden Medien (z.B. Methylzellulose) nachgewiesen werden (Bartolovic et al., 2004). So bilden hämatopoetische Vorläuferzellen unter bestimmten Differenzierungsbedingungen mikroskopisch sichtbare Kolonien von Tochterzellen, die soweit ausreifen, dass ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Abschnitten des myeloiden Systems bestimmt werden kann. Dazu werden die hämatopoetischen Vorläuferzellen in semisolidem Methylzellulosemedium inkubiert. Die im Medium enthaltenen Zytokine Erythropoietin (EPO), SCF, GM-CSF und IL3 bewirken eine Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen, wobei die Wanderung der Zellen aufgrund der Viskosität des Mediums verhindert wird. So bilden die Tochterzellen der Vorläufer myeloide Kolonien, die unter dem Invertmikroskop auszählbar sind und sich anhand Form, Farbe und Morphologie typisieren lassen.

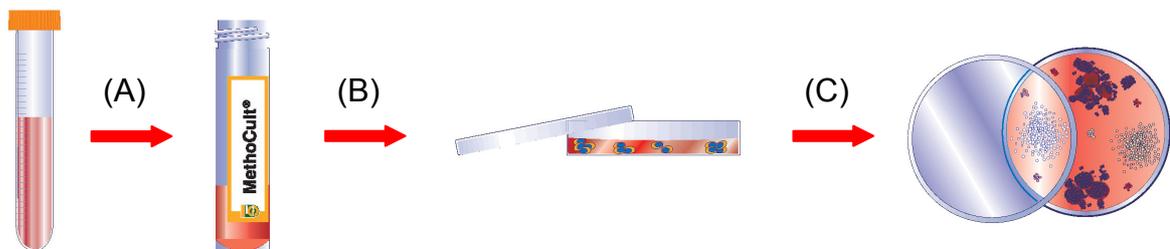


Abbildung 2.11: Methyzelluloseassay (nach StemCell Technologies, www.stemcell.com). (A) Die Zellen werden mit der Methylzellulose vermischt und (B) in Kulturschalen ausplattiert. (C) Nach 14 Tagen Inkubation können die gebildeten Kolonien aus den Tochterzellen ausgezählt werden.

Pro Doppelansatz wurden zunächst 2,7 ml Methocult SF^{BIT} H4436 (*CellSystems*, St. Katharinen) in ein 5 ml Röhrchen gefüllt. Zur Methylzellulose wurden dann 1×10^3 CD34⁺ Zellen in 300 µl CD34⁺ Zytokinmedium mit oder ohne Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Rezeptorantagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 1 µM, 0,1 µM oder 0,01 µM hinzugegeben. Das Methylzellulose-Zellgemisch wurde kurz aber gründlich durch „vortexen“ gemischt und nach Entweichen der Luftblasen mit einer 1 ml Insulinspritze 2-mal je 1 ml in eine kleine Gewebekulturschale (ø 35mm) verteilt. Um das Austrocknen der Methylzellulose zu verhindern, wurde der Doppelansatz zusammen mit einer mit 3 ml Wasser gefüllten, dritten Kulturschale in eine große Gewebekulturschale (ø 94mm) gestellt. Nach einer 14-tägigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Auszählung der Kolonien an einem Axiovert 25 CFL Mikroskop (*Carl Zeiss AG*, Oberkochen). Dabei ließen sich die Kolonien morphologisch in zwei Gruppen einteilen. Weiß erscheinende Kolonien, bestehend aus Granulozyten und Monozyten, bildeten die so genannten „colony forming unit granulocyte/macrophage“ (CFU-GM). Kolonien aus

Erythrozyten, die so genannten „burst-forming unit erythrocyte“ (BFU-E), erschienen im Mikroskop durch das enthaltene Hämoglobin rot. Zu Auswertung wurde von jedem Doppelansatz der Mittelwert der CFU-GM und BFU-E Kolonien pro Platte ermittelt und prozentual in Relation zur unstimulierten Kontrolle dargestellt.

2.9.10 Genexpressionsanalysen

Der Effekt der Stimulation der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf das Genexpressionsmuster der hämatopoetischen CD34⁺ Zellen wurde mittels „High Density Oligonucleotid Arrays“ der *Affymetrix*-Microarray-Technologie untersucht. Anhand dieser Technologie ist es möglich, das relative Expressionsniveau der RNA von Genen in unterschiedlichen Organismen, Geweben und Zellen zu untersuchen. Durch die simultane Messung der Expression von tausenden Genen in einem Versuchsansatz kann man die transkriptionelle Aktivität einer Zelle oder eines Gewebes in verschiedenen physiologischen Zuständen analysieren und miteinander vergleichen. Das Prinzip dieser funktionellen Genexpressionsanalyse mit Hybridisierungsassays besteht darin, dass genspezifische Sequenzen (Sonde, engl. probe) auf einer festen Matrix immobilisiert werden und dann mit markierter RNA aus den zu untersuchenden Zellen hybridisieren können. Je stärker dabei die Expression eines Gens ist, desto größer ist auch die Menge an markierter RNA und desto stärker ist folglich das zu detektierende Signal.

Zunächst wird die isolierte RNA mit Hilfe eines Oligo(dT)-Primers mit vorgeschaltetem T7-Promotor in einer Reversen-Transkriptions-Reaktion [2.9.10.2] in cDNA (copyDNA) umgeschrieben. Diese wird in einer in vitro Transkriptions-Reaktion (IVT) amplifiziert [2.9.10.3] und unter Verwendung von biotinylierten Nukleotiden in markierte cRNA umgewandelt. Nach der Fragmentierung der cRNA [2.9.10.4] erfolgt die Hybridisierung [2.9.10.7] mit den genspezifischen Sonden auf dem Microarray. Ungebundene Fragmente werden durch einen Waschgang entfernt und der Array unter Verwendung von Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin „gefärbt“. Die Bindung des Streptavidins an die biotinylierten Nukleotide führt zur Fluoreszenzmarkierung der hybridisierten cRNA-Fragmente. Durch einen konfokalen Laserscanner können die Fluoreszenzsignale dann detektiert und mit Hilfe von Softwareprogrammen und Auswertalgorithmen in Expressionsintensitäten umgewandelt werden. Dabei ist die Linearität aller experimentellen Schritte eine Voraussetzung für die reproduzierbare Aussage über das Expressionslevel hoch oder niedrig exprimierter Gene

Stimulation der CD34⁺ Zellen

Für die Genexpressionsanalysen wurden 3×10^6 isolierte CD34⁺ Zellen aus einem Leukaphereseprodukt in drei verschiedenen Ansätzen mit oder ohne Orexin A oder Orexin B inkubiert. Während die Zellen der Kontrollgruppe unstimuliert blieben, wurden die Zellen der Orexin A-Gruppe mit 1 μ M Orexin A und die der Orexin B-Gruppe mit 0,1 μ M Orexin B behandelt. Dazu wurden die Zellen von 5 verschiedenen Spendern in einer Konzentration von 1×10^6 /ml CD34 Zytokinmedium für 1 h mit der entsprechenden Orexin-Konzentration stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den CD34⁺ Zellen [2.9.10.1] isoliert.

2.9.10.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der RNA aus den mit Orexin stimulierten CD34⁺ Zellen erfolgte mit Hilfe des ‚RNeasy Mini Kit‘ und des ‚RNase-Free DNase Set‘ der Firma *Qiagen* (Hilden) nach Herstellerangaben.

Die pro Ansatz 1×10^6 stimulierten Zellen wurden für 5 min bei 300 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 μ l PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 600 μ l RLT-Lysepuffer resuspendiert und durch gutes Mischen lysiert. Um hoch molekulare Zellbestandteile zu entfernen, wurde das Lysat auf eine QIAshredder-Säule (*Qiagen*, Hilden) gegeben und bei 14.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 600 μ l 70% Ethanol gut gemischt und auf eine RNeasy Spin-Säule gegeben. Diese wurde bei 14.000 g 15 sec abzentrifugiert und einmal mit 350 μ l RW1-Puffer gewaschen. Danach erfolgte ein DNase-Verdau auf der Säule. Dazu wurden pro Säule 10 μ l DNase I-Lösung mit 70 μ l RDD-Puffer gemischt und dann direkt auf die Säulenmembran pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die Säule zunächst noch einmal mit 350 μ l RW1-Puffer und anschließend noch zweimal mit je 500 μ l RPE gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die trockene Säule für 1 min bei 14.000 g. zentrifugiert, um alle Ethanolreste aus der Membran zu entfernen. Zur Elution der RNA wurden 30 μ l RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und diese nach 1 min Inkubation bei RT für 1 min bei 14.000 g zentrifugiert. Die Konzentration der eluierten RNA wurde photometrisch bestimmt [2.9.11] und die Qualität mittels Bioanalyzer [2.9.12] überprüft.

RLT-Lysepuffer

RLT-Puffer (*Qiagen*, Hilden)

mit 10 μ l/ml β -Mercaptoethanol

2.9.10.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die Reverse Transkription erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ‚MessageAmp™ aRNA Kit‘ (Ambion, Austin, USA).

Für die Primer-Hybridisierung wurde 1 µl T7-Oligo(dT)-Primer (Sequenz 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3') zu 11 µl RNA-Lösung (zwischen 350 ng und 650 ng isolierter RNA) gegeben und der RNA-Primer-Mix für 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend für 5 sec zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die Erststrang-Synthese, in der an die vorhandene RNA ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird, wurde in einem Volumen von 20 µl mit folgenden Komponenten angesetzt:

12 µl	RNA-Primer Mix
2 µl	10 x First Strand Buffer
1 µl	Ribonuclease Inhibitor
4 µl	dNTP Mix
1 µl	Reverse Transkriptase

Tabelle 2.10: Erststrang-Synthese-Ansatz

Einer 2-stündigen Inkubation bei 42°C folgte die Zweitstrang-Synthese, in der ein DNA-Doppelstrang gebildet und der ursprüngliche RNA-Strang abgebaut wird. Dazu wurde der Ansatz für 5 sec zentrifugiert und mit folgenden Komponenten für 2 h bei 16°C inkubiert:

20 µl	Erststrang-Synthese-Ansatz
63 µl	Nuklease-freies Wasser
10 µl	10 x Second Strand Buffer
4 µl	dNTP Mix
1 µl	RNase H
2 µl	DNA-Polymerase

Tabelle 2.11: Zweitstrang-Synthese-Ansatz

Anschließend erfolgte die Aufreinigung der synthetisierten cDNA mittels der cDNA Filtersäulen aus dem ‚MessageAmp™ aRNA Kit‘. Dazu wurden zunächst eine cDNA Filtersäule für 5 min bei RT mit 50 µl cDNA-Bindungspuffer äquilibriert. Der Syntheseansatz wurde mit 250 µl cDNA-Bindungspuffer vermischt, das Gemisch auf die Säule gegeben und

für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen worden war, wurde die Säule mit 500 µl cDNA-Waschpuffer für 1 min bei 10.000 g gewaschen und danach zum Trocknen noch einmal ohne Puffer zentrifugiert. Dann wurde die cDNA aus der Säule in einem neuen Reaktionsgefäß eluiert. Dazu wurden 10 µl 50°C heißes Nuklease-freies Wasser auf die Säule gegeben, diese für 2 min bei RT inkubiert und anschließend für 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die eluierte cDNA in die IVT-Reaktion eingesetzt.

2.9.10.3 In vitro Transkription (IVT-Reaktion)

Bei der in vitro Transkription (IVT) wird die doppelsträngige cDNA in cRNA umgeschrieben. Dabei werden sowohl unmarkierte als auch Biotin-gekoppelte Ribonukleotide verwendet. Die Synthese der fluoreszenzmarkierten cRNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ‚MessageAmp™ aRNA Kit‘ (Ambion, Austin, USA) und dem ‚BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit‘ (ENZO Life Sciences, Farmingdale, USA). Der IVT-Ansatz wurde in einem Volumen von 40 µl mit folgenden Komponenten angesetzt:

16 µl	eluierte cDNA-Lösung
4 µl	10 x Biotin-gekoppelte Ribonukleotide
4 µl	T7 10 x Reaction Buffer
12 µl	RNase-freies Wasser
4 µl	T7 Enzym-Mix

Tabelle 2.12: IVT Synthese-Ansatz

Nach einer 6-stündigen Inkubation bei 37°C wurde die cRNA mit Hilfe der aRNA Filtersäulen aus dem ‚MessageAmp™ aRNA Kit‘ aufgereinigt. Zunächst wurde der cRNA-Ansatz mit 60 µl Elutionslösung, anschließend mit 350 µl aRNA-Bindungspuffer und anschließend mit 250 µl 100% Ethanol gemischt. Das cRNA-Ethanol-Gemisch wurde dann auf eine aRNA-Filtersäule gegeben und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, mit 650 µl aRNA-Waschpuffer für 1 min bei 10.000 g gewaschen und anschließend zum Trocknen noch einmal ohne Puffer zentrifugiert. Zur Elution der cRNA wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl 50°C heißer Elutionslösung für 2 min bei RT inkubiert. Nach anschließender 2-minütiger Zentrifugation bei 10.000 g wurde der Elutionsschritt wiederholt und die Konzentration [2.9.11] und Qualität [2.9.12] der eluierten cRNA bestimmt.

2.9.10.4 Fragmentierung der cRNA

Vor der Hybridisierung mit den Oligonukleotidsonden auf dem Microarray muss die cRNA fragmentiert werden. Dabei entstehen 35 bis 200 Basenpaar lange RNA-Fragmente, die eine bessere Hybridisierung als große Fragmente ermöglichen.

Für die Fragmentierung wurden 5 µg cRNA in einem Volumen von 24 µl benötigt. Wurde diese Konzentration nicht erreicht, wurde die entsprechende Menge an IVT-Produkt in einer Speedvac (Concentrator 5301, *Eppendorf GmbH*, Wesseling-Berzdorf) unter Vakuum eingetrocknet und in 24 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Der eigentliche Fragmentierungsansatz, bestehend aus 24 µl cRNA-Lösung und 6 µl eines 5 x Fragmentierungspuffers (aus dem ‚GeneChip Sample Cleanup Module‘Kit‘ von *Affymetrix*), wurde dann für 35 min bei 95°C inkubiert, anschließend für 10 sec zentrifugiert und bis zur Hybridisierung auf Eis aufbewahrt. Das Prinzip der Fragmentierung beruht dabei auf der Hydrolyse der cRNA, induziert durch die im Fragmentierungspuffer enthaltenen Metallionen.

2.9.10.5 Human-Genome-Focus-Microarrays

Mit Hilfe der in diesem Versuch verwendeten „Human-Genome-Focus-Arrays“ der Firma *Affymetrix* kann das Expressionsniveau von 8.400 Genen bestimmt werden. Jedes Gen (probe set) wird durch 11 verschiedene, 25 Basen lange Oligonukleotid-sequenzen (Sonden) präsentiert, die sich vom 3' zum 5' Ende über das komplette Gen verteilen. Die Sequenzen, auf denen die Sonden beruhen, entstammen der „UniGene Database (Build 133, 20.04.2001)“ und wurden zusätzlich mit Daten aus zwei weiteren, öffentlich zugänglichen Datenbanken ergänzt („Washington University EST Trace Repository“ und „University of California, Santa Cruz Golden Path Human Genome Database“). Zu jeder sequenz-spezifischen Sonde (perfect match probe (PM)) existiert auf dem Microarray eine Sonde, bei der die 13. Base durch die komplementäre Base ausgetauscht wurde (mismatch probe (MM)). Dadurch ist es möglich, unspezifische Hybridisierungssignale zu erkennen und bei der Auswertung auszuschließen. In einem speziellen photolithographischen Verfahren werden alle Oligonukleotidsonden für die 8.400 Gene *in situ* auf dem Microarray auf einer Fläche von 18 µm x 18 µm synthetisiert und können dann mit der markierten cRNA hybridisiert werden.

2.9.10.6 Affymetrix-System

Die Hybridisierung und das anschließende Scannen der in dieser Arbeit verwendeten Microarrays erfolgte in der *Affymetrix-Core-Lab-Facility* des Instituts für Onkologische Chemie unter der Leitung von Prof. Bojar. Das dafür verwendete ‚Gene Chip Instrument System‘ der Firma *Affymetrix* (Santa Clara, USA) besteht aus vier Geräte-

komponenten. Über eine zentrale Computerplattform können die übrigen Geräte und die Analyse der Messdaten gesteuert werden. Im GeneChip® Hybridization Oven 640 werden die Arrays unter Rotation mit der cRNA hybridisiert und anschließend in der GeneChip® Fluidics Station 400 automatisch nach einem definierten Programm gewaschen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dieser wird dann mit Hilfe des Argonlasers im konfokalen Agilent GeneArray® Laserscanner angeregt und das emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

2.9.10.7 Hybridisierung der Microarrays

Für die Hybridisierung wurde zunächst eine Hybridisierungslösung aus folgenden Komponenten hergestellt:

30 µl	fragmentierte cRNA-Lösung
3,3 µl	Control Oligonucleotide B2 (3 nM)
10 µl	20 x Eucaryotic Hybridization Controls
2 µl	Hering Sperm DNA (10 mg/ml)
4 µl	acetylierte BSA-Lösung (50 mg/ml)
100 µl	2 x Hybridisierungspuffer
52,7 µl	Nuklease-freies Wasser

Tabelle 2.13: Hybridisierungslösungs-Ansatz

Der Ansatz wurde zunächst für 5 min bei 99°C und anschließend für 5 min bei 45°C erhitzt. Danach wurde die Hybridisierungslösung für 5 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu sedimentieren. Die Microarrays wurden auf RT erwärmt und mit 130 µl des 1x Hybridisierungspuffers für 10 min bei 45°C unter Rotation (60 rpm) im GeneChip® Hybridization Oven 640 präinkubiert. Nach der Entnahme des Puffers wurden die Arrays mit 160 µl der Hybridisierungslösung befüllt und weitere 16 h im Hybridisierungsöfen bei 45°C und 60 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung aus den Microarrays entfernt und konnte bei -80°C für eine erneute Verwendung eingelagert werden.

2 x Hybridisierungspuffer	200 mM MES
	2 M MES-Natriumsalz
	40 mM EDTA
	0,02% Tween20, in dH ₂ O, bei 4°C lichtgeschützt lagern

2.9.10.8 Waschen und Färben der Microarrays

Direkt nach Entfernung der Hybridisierungslösung wurden die Microarrays mit 160 µl Waschpuffer A befüllt und in die GeneChip® Fluidics Station 400 eingespannt. Nach Vorgabe des GeneChip® Expression Analysis Manual und des Softwareprogramms EukGE-WS2V4 (*Affymetrix*) folgten dann automatische Wasch- und Färbeschritte der Arrays. Dabei wurden die Arrays zunächst mit Waschpuffer A und Waschpuffer B und anschließend mit der SAPE-Färbelösung inkubiert. Nach einem Zwischenschritt mit Waschpuffer A wurden zur Verstärkung der Fluoreszenzsignale biotinylierte anti-Streptavidin Antikörper (Antikörper-Färbelösung) eingesetzt und eine zweite Färbung mit der SAPE-Färbelösung durchgeführt. Nach einer letzten Waschung konnten die Arrays dann gescannt eingesetzt werden.

Waschpuffer A	6 x SSPE 0,01% Tween20, in dH ₂ O, sterilfiltriert
20 x SSPE	3 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 0,02 M EDTA, in dH ₂ O, sterilfiltriert
Waschpuffer B	100 mM MES 0,1 M MES-Natriumsalz 0,01% Tween20, in dH ₂ O, sterilfiltriert
SAPE-Färbelösung	1 x MES-Färbepuffer 2 mg/ml acetyliertes BSA 10 µg/ml Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) in dH ₂ O, lichtgeschützt lagern
2x MES-Färbepuffer	200 mM MES 2 M MES-Natriumsalz 0,1% Tween20, in dH ₂ O, sterilfiltriert,
Antikörper-Färbelösung	1 x MES Färbepuffer 2 mg/ml acetyliertes BSA 0,1 mg/ml normal Goat IgG 3 µg/ml biotinylierter Ziege-anti-Strepatividin Antikörper, in dH ₂ O

2.9.10.9 Scannen der Microarrays

Die gefärbten Microarrays wurden in einem Agilent GeneArray® Scanner bei einer Wellenlänge von 570 nm (Anregungswellenlänge 488nm) und bei einer Auflösung von 3 µm mit einer Wiederholung gescannt. Dabei wird jedes Sondenfeld des Arrays durch das Laserlicht des Scanners angeregt, die Photonenemission der fluoreszenzmarkierten und hybridisierten cRNA detektiert und das Lichtsignal in einen Intensitätswert übertragen. Die gemessenen Lichtintensitäten aus beiden Scanvorgängen wurden automatisch gemittelt und als Rohdaten gespeichert. Durch die Aufteilung des gescannten Arrays in ein Raster (engl. grid) konnten die gemessenen Lichtintensitäten den einzelnen Genen zugeordnet werden. Nach der automatischen Korrektur des Hintergrundes und der Normalisierung der ermittelten Rohdaten erhielt man so einen Wert für die Expressionsstärke jedes Gens.

2.9.10.10 Normalisierung

Trotz der standardisierten Methode zur Untersuchung der differentiellen Genexpression können geringe Unterschiede nichtbiologischer Faktoren in den einzelnen experimentellen Schritten eine Variabilität der Daten hervorrufen. So können zum Beispiel geringe Variationen in Menge und Qualität der hybridisierten Proben die Hybridisierungsintensitäten beeinflussen. Um die Unterschiede dieses nichtbiologischen Ursprungs zu minimieren, muss vor der Auswertung eine Normalisierung der Arraydaten erfolgen.

In diesem Fall wurde der Normalisierungsprozess mit der VSN (Variance Stabilization Normalization) Methode am Institut für Bioinformatik unter Leitung von Prof. von Haeseler durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Maximum-Likelihood-Schätzung und ist unabhängig von der mittleren Lichtintensität eines jeden Microarrays (Huber et al., 2002). Auf der Grundlage bestimmter Algorithmen wurden die ermittelten Rohdaten aller Microarrays skaliert und für jedes Gen der normalisierte Wert als natürlicher Logarithmus der Expressionsstärke dargestellt. So konnten die Daten der Microarrays miteinander verglichen und Unterschiede in der Genexpression ermittelt werden.

2.9.10.11 Identifikation signifikanter Gene

Zu Auswahl signifikant unterschiedlich exprimierter Gene in den mit Orexin A oder Orexin B behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle benutzten wir den ‚Significance Analysis of Microarrays‘ (SAM) Algorithmus v2.23 (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Auf der Grundlage von Daten-Permutationen und statistischen Algorithmen erhält man bei einer SAM-Analyse für jedes Gen die relative Expressionsstärke in Bezug auf die Kontrolle, den so genannten „Fold-Change“. Zudem werden signifikant hoch- und herunterregulierte Gene

ermittelt und anhand ihrer Signifikanzstärke, der so genannten ‚false discovery rate‘ (FDR), skaliert.

In diesem Fall wurden die aus 5 Leukaphereseprodukten ermittelten Expressionsdaten für jedes Gen gruppenbezogen (Kontroll-, Orexin A-, und Orexin B-Gruppe) zunächst in eine zweiseitig gepaarte SAM-Analyse eingesetzt und eine Anzahl von 1000 Permutationen gewählt. Da auf diese Weise keine Gene mit einer FDR < 15% ermittelt werden konnten, wurde zu jedem „Fold-Change“ mit dem Programm Microsoft Excel (*Microsoft*, Version 2003) in einem zweiseitigen T-Test für gepaarte Proben das Signifikanzniveau p in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Alle Gene mit einem „Fold-Change“ $\geq 1,2$ und $\leq 0,83$ und einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ wurden als signifikant unterschiedlich exprimiert akzeptiert.

2.9.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen kann mittels Spektralphotometrie ermittelt werden. Dabei basiert die Konzentrationsbestimmung auf dem Extinktionsmaximum (E) der Nukleinsäuren bei 260 nm, wofür die aromatischen Ringe der einzelnen Basen verantwortlich sind. Das Extinktionsmaximum für Proteine hingegen liegt aufgrund der Absorption der aromatischen Aminosäurereste Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm.

Durch Messung der Extinktion bei 260 nm lässt sich die Konzentration der Nukleinsäurelösung und durch Bestimmung des Verhältnisses E_{260}/E_{280} die Reinheit der Lösung abschätzen. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt dieser Wert bei 1,8 und bei einer RNA-Lösung bei 2,0, während eine mit Proteinen kontaminierte Lösung einen kleineren Wert aufweist. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit erfolgt zunächst die Kalibrierung gegen das Lösungsmittel (Referenzwert) und dann die Messung der entsprechenden Extinktion. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der Extinktionswert im linearen Messbereich bei maximal 1,0 liegt. Die Konzentration der Nukleinsäure kann durch die folgende Beziehung berechnet werden:

$$c [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times V \times M$$

c = Konzentration, E = Extinktion bei 260 nm, V = Verdünnungsfaktor, M = Multiplikationsfaktor [50 für doppelsträngige DNA, 37 für einzelsträngige DNA und 40 für einzelsträngige RNA]

Die Konzentration der in dieser Arbeit isolierten RNA und amplifizierten cRNA wurde mit einem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (*PEQLAB Biotechnologie GmbH*, Erlangen) ermittelt. Dabei wurde die Konzentration und durch das E_{260}/E_{280} Verhältnis die Reinheit der RNA automatisch berechnet und angezeigt.

2.9.12 Bestimmung der RNA-Qualität mittels LabChip®

Die Qualität der isolierten RNA und der fluoreszenzmarkierten cRNA aus der IVT-Reaktion wurde mittels RNA 6000 LabChip® und einem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen) nach Angaben des Herstellers im Molekularbiologischen Zentrallabor des Biomedizinischen Forschungszentrums Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Köhrer bestimmt. Diese auf einem Chip durchgeführte Methode der Nukleinsäure-Analyse basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. Dabei werden RNA-Fragmente (ribosomale und RNA Transkripte) in Mikrokapillar-Kanälen entlang eines elektrischen Feldes ihrer Masse entsprechend aufgetrennt und anhand eines eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Hierfür wird ein sehr geringes Probenvolumen von 1 µl bzw. eine Probenmenge von etwa 25 ng benötigt. Die Ergebnisse werden aufgezeichnet, mit der Agilent 2100 BioAnalyzer Software analysiert und als Elektropherogramm dargestellt. Anhand eines Größenstandards können Qualität und Quantität der Probe bestimmt werden. Dabei erhält man je nach gewählter RNA-Isolierungsmethode und mRNA-Fragmentgröße unterschiedliche Ergebnisse.

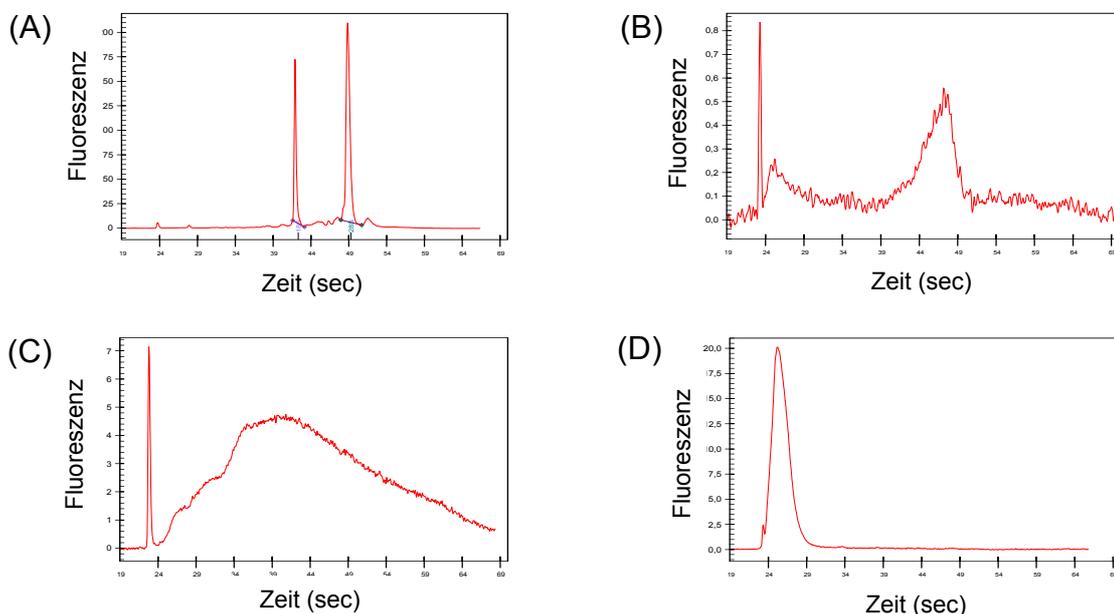


Abbildung 2.12: Elektropherogramm isolierter Gesamt-RNA. (A) Qualitativ hochwertige Gesamt-RNA zeichnet sich nach Isolierung mittels Qiagen-Säulen und DNase-Behandlung durch 2 scharfe Peaks der 18S und 28S ribosomalen RNA aus, die den größten Anteil der RNA in einer Zelle ausmachen. (B) Beispiel für degradierte Gesamt-RNA. (C) Die in der IVT-Reaktion amplifizierte cRNA stellt sich als eine Mischung von verschiedenen langen cRNA-Fragmenten dar. (D) Nach der Fragmentierung der RNA entstehen 35 – 200 bp lange Fragmente, die man als einzelnen Peak erkennt.

2.9.13 Quantitative „Real-Time“- PCR mittels TaqMan-Technologie

Eine Möglichkeit, die Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalyse zu überprüfen, bietet die quantitative „Real-Time“ TaqMan-PCR. Diese hochsensitive Methode zur quantitativen DNA-Analyse beruht auf dem Prinzip einer konventionellen PCR, wobei sämtliche Schritte der herkömmlichen PCR bei der TaqMan-PCR in der gleichen Weise ablaufen. Bei der PCR werden definierte Genabschnitte spezifisch vervielfältigt. Erreicht wird dies durch die Wiederholung von mehreren Verdopplungszyklen. Dabei setzt sich jeder Zyklus aus drei Reaktionsschritten zusammen.

Zunächst erfolgt bei einer Temperatur von 92-98°C die **Denaturierung** des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts in Einzelstränge. Damit auch GC-reiche Sequenzen vollständig denaturiert werden, wählt man für die erste Denaturierung einen Zeitraum von ca. 5-10 min. In den folgenden Zyklen reicht dann eine Denaturierungsdauer von 30 sec. In einem zweiten Schritt werden die entsprechenden ‚forward‘ und ‚reverse‘ Primer, meist synthetische Oligonukleotide, mit den DNA-Einzelsträngen hybridisiert, das sogenannte **„Annealing“**. Dafür muss der Reaktionsansatz auf eine den Primern angepasste Temperatur abgekühlt werden. Annähernd lässt sich die Annealing Temperatur für einen Primer nach folgender Formel bestimmen :

$$T_M (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{A}+\text{T}) + 4 \times (\text{C}+\text{G})$$

Im Verlauf der nachfolgenden Inkubation mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase (Taq- oder Pfu-Polymerase) und den vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten ATP, GTP, TTP und CTP wird die neue DNA entlang der Einzelstränge synthetisiert (**Elongation**). Dafür erhöht man die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der verwendeten Polymerase. Nach wenigen Minuten kann dann der nächste Zyklus beginnen, bei dem jetzt auch die verlängerten DNA-Stränge als Matrize zur Verfügung stehen und die DNA weiter exponentiell vervielfacht wird.

Prinzip

Im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Verfahren, bei denen höchstens eine semiquantitative Messung der Endpunktprodukte möglich ist, kann man anhand einer quantitativen „Real-Time“ TaqMan-PCR Aussagen über die DNA-Ausgangsmenge machen.

Das Prinzip dabei beruht auf der 5'→3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase und der Verwendung einer fluorogene Sonde, die genspezifisch zwischen Forward- und Reverse-Primer am DNA-Matrizenstrang bindet. Das 5' Ende dieser Oligonukleotidsonde ist mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)) markiert, während sich am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA)) befindet (Abb.2.13).

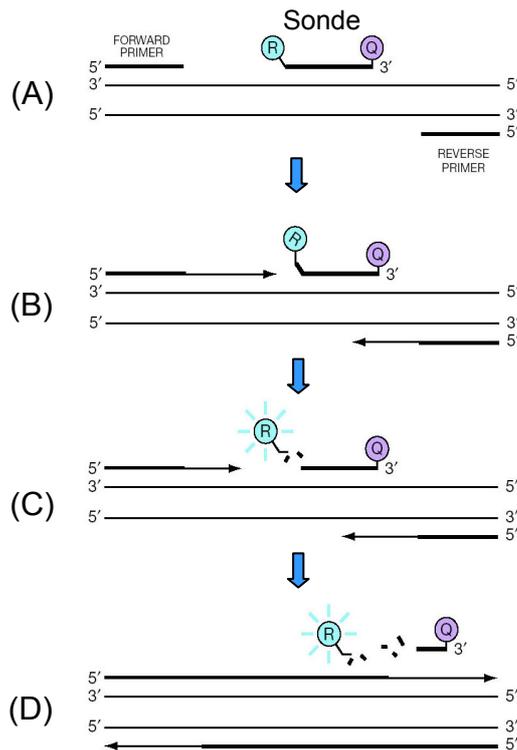


Abbildung 2.13: Prinzip der „Real-Time“ TaqMan-PCR.

(A) sequenzspezifische Hybridisierung der Primer und Sonde; (B) Elongation durch die AmpliTaq Polymerase; (C) Verdrängung und Spaltung der Sonde; (D) Freisetzung der Reporter-Fluoreszenz (nach *Applied Biosystems*, verändert); R: Reporter; Q: Quencher

Regt man die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (z.B. 518 nm bei FAM) an, wird die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Im Verlauf der PCR-Reaktion hybridisieren zunächst die genspezifischen Primer und die dazugehörige Sonde an den DNA-Matrizenstrang, bevor die Taq-Polymerase in der Elongationsphase auf die Sonde trifft und beginnt diese vom Strang zu verdrängen. Durch die dabei entstehende Y-förmige Sekundärstruktur wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase aktiviert und die Sonde in 5'-3'-Richtung gespalten. Aufgrund der Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher und der damit verbundene Fluoreszenz-Energietransfer aufgehoben. Dadurch kann bei einer Anregung das Fluoreszenz-Signal des Reporter-Farbstoffes freigesetzt werden. Da nur die hybridisierten und nicht die freien Sonden gespalten werden, ist die Zunahme der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes zu jedem Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz. Mit Hilfe des ‚ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systems‘ (*Applied Biosystems*, Foster City, USA) kann das Reporter-Fluoreszenzsignal während des gesamten Verlaufs der PCR-Reaktion verfolgt und detektiert werden.

In Bezug auf den Verlauf der Reporter-Fluoreszenz über die Anzahl der Zyklen hinweg, kann man „Real-Time“ TaqMan-PCR in vier Phasen einteilen (Abb.2.14). Zu Beginn liegt die entstandene Reporter Fluoreszenz noch unterhalb der Nachweisgrenze, so dass nur die von

Anfang an vorhandene, aber nicht die auf die Amplifikation des PCR Produktes beruhende **Baselinefluoreszenz** (Phase 1) detektiert wird. Dieses Signal wird meistens während der ersten 15 Zyklen der PCR gemessen und gleich Null gesetzt. Sobald die entstehende Reporter Fluoreszenz zum ersten Mal detektiert wird, beginnt Phase 2, die **sichtbare exponentielle Replikation**. Diese Phase spielt eine wichtige Rolle in der TaqMan-PCR, da in diesem Bereich der DNA-Verdopplung die Threshold-Cycles (C_T Werte) für die anschließende Quantifizierung gesetzt werden. Die Phase kann am besten in der logarithmischen Darstellung beobachtet werden und endet an dem Punkt, an dem zum ersten Mal keine Verdopplung des PCR-Produktes pro Zyklus stattfindet. Nach diesen 2 Phasen der exponentiellen Replikation der DNA-Fragmente verlangsamt sich aufgrund von verschiedenen limitierenden Faktoren wie Nukleotid- und Primermangel oder verminderter Enzymaktivität der PCR-Prozess bis hin zu einem **linearen Wachstum** (Phase 3). Sobald eines der Reagentien verbraucht ist, kommt es zum vollständigen Erliegen der Amplifikation in Form eines **Plateaus** (Phase 4).

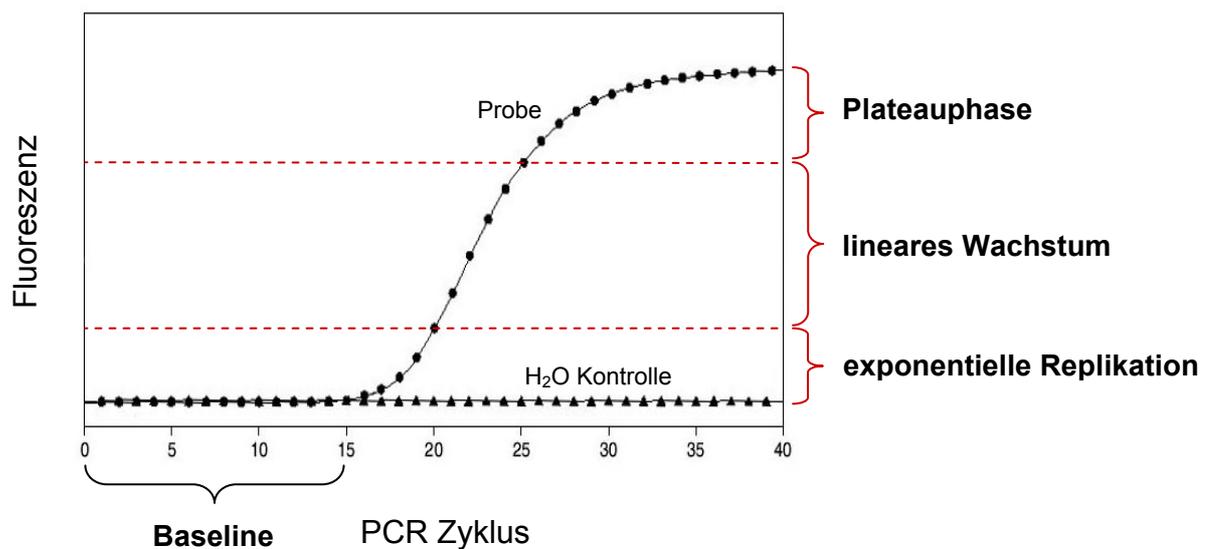


Abbildung 2.14: Phaseneinteilung der detektierten Reporter-Fluoreszenz bei der „Real-Time“-TaqMan-PCR (nach Applied Biosystems, verändert).

2.9.13.1 cDNA-Synthese

Da RNA nicht direkt als Vorlage für die Taq-Polymerase dienen kann, musste die isolierte RNA aus den mit Orexin A oder Orexin B stimulierten oder unbehandelten Zellen zunächst mit Hilfe eines Enzyms, der Reversen Transkriptase, in cDNA umgeschrieben werden.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des ‚High capacity cDNA Archive Kit‘ (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Herstellerangaben. Dabei wird die Erststrang-Synthese

von einer M-MuLV (engl. Moloney Murine Leukemia Virus) MultiScribe Reversen Transkriptase katalysiert, ein Enzym, das mit Hilfe seiner endogenen RNase H-Aktivität das mRNA-Template aus den cDNA:RNA Hybrid-Doppelsträngen direkt während der Reaktion abbaut. Als Primer dienten Random-Hexamer Oligonukleotide, die die gesamte RNA als Template verwenden. Die Reaktion der Reversen Transkription wurde in einem Volumen von 90 µl mit folgenden Komponenten angesetzt:

45 µl	mRNA (600 ng)
9 µl	10 x RT Buffer
3,6 µl	25 x dNTP Mix
9 µl	10 x Random Primer
4,5 µl	MultiScribe RT Enzym (50 U/µl)
18,9 µl	RNase-freies Wasser

Tabelle 2.14: Ansatz für die Reverse Transkription

Die Inkubation erfolgt zunächst für 10 min bei 25° C und anschließend für weitere 2 h bei 37°C. Danach konnte die cDNA in die eigentliche PCR-Reaktion der quantitativen „Real-Time“ TaqMan-PCR eingesetzt werden.

2.9.13.2 „Real-Time“-TaqMan-PCR

Für die TaqMan-PCR wurde der „TaqMan® Universal PCR Master Mix plus“ von *Applied Biosystems* (Foster City, USA) verwendet. In diesem optimierten Puffer sind außer den Primern, der Sonde und der entsprechenden cDNA alle notwendigen Komponenten enthalten. Dazu zählt auch das Enzym AmpErase UNG, eine Uracil-N-glycosylase, die Uracil-Reste aus doppelsträngiger DNA entfernt und somit die Reamplifikation von Kontaminationen verhindert. Des Weiteren enthält der Puffer den Referenz Farbstoff 6-Carboxy-X-Rhodamin (ROX), der als interne, passive Referenz dazu dient, mögliche Fluoreszenzschwankungen aufgrund von Konzentrations- oder Volumenunterschieden zu normalisieren. Die Primer und Sonden für ein spezifisches Gen standen als Primer-Sonden-Mix (Assay-on-demand Gene Expression Target) direkt von *Applied Biosystems* zur Verfügung. Dabei waren die Sonden mit FAM als Reporter- und TAMRA als Quencherfarbstoff markiert. Der PCR-Ansatz wurde in einer MicroAmp® Fast Optical 96 Well-Platte (*Applied Biosystems*, Foster City, USA) mit folgenden Komponenten pro Well angesetzt:

12,5 µl	2 x qPCR Mastermix Plus
1,25 µl	Primer Sonden Mix
9,6 µl	RNase-freies Wasser
1,65 µl	cDNA aus der Reversen Transkription

Tabelle 2.15: Ansatz für die quantitative „Real-Time“ TaqMan-PCR

Die 96 Well-Platte wurde mit einer MicroAmp® Optical Adhesive Cover Folie (*Applied Biosystems*, Foster City, USA) abgedeckt und kurz zentrifugiert. Dann wurde die PCR-Reaktion in einem ABI PRISM 7900HT Detection System bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Schritt	Dauer	Temperatur	Funktion
1	2 min	50°C	AmpErase UNG-Aktivierung
2	10 min	95°C	Hitze-Aktivierung der AmpliTaq DNA-Polymerase
3	15 sec	95°C	Denaturierung der cDNA
4	1 min	60°C	Primer-Annealing und -Extension
5	Schritt 3 und 4 werden 40-mal wiederholt (40 Zyklen)		

Nach der PCR konnten die spezifischen PCR-Produkte durch eine Agarosegelelektrophorese [2.9.15] nachgewiesen werden.

2.9.13.3 Quantifizierung der TaqMan-PCR

Für die relative Quantifizierung der PCR wird die Expression des Ziel-Gens mit der eines Referenz-Gens (Housekeeping Gen) verglichen. Diese Methode der Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes, dem so genannten Threshold-Cycle oder C_T -Wert. Der C_T -Wert gibt diejenige Zykluszahl an, bei der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal signifikant übersteigt. Da die PCR zu diesem Zeitpunkt exponentiell verläuft kann der C_T -Wert am besten in der logarithmischen Darstellung der Reporterfluoreszenz versus PCR-Zyklus ermittelt werden. In diesem Fall wurde der C_T - Wert nach der TaqMan-PCR von der ABI 7900HT SDS2.1 Software automatisch für jedes Gen angegeben.

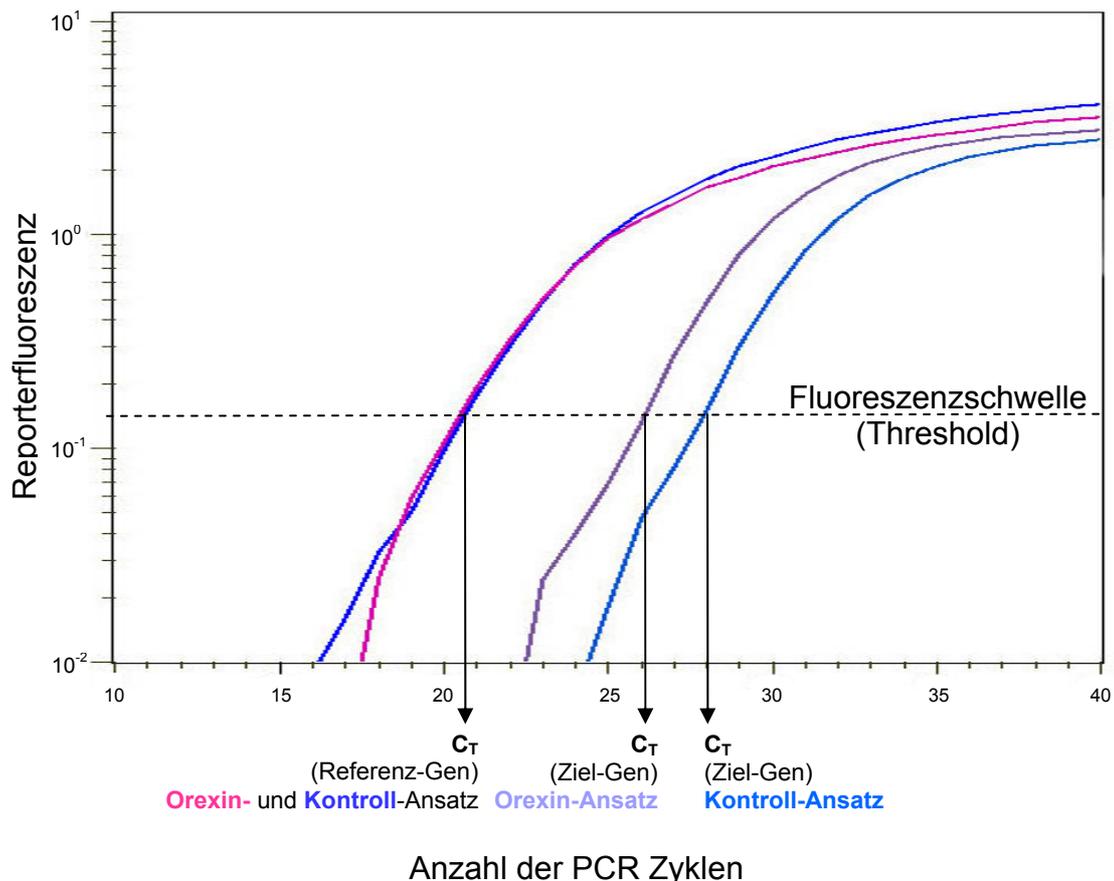


Abbildung 2.15: Bestimmung der C_T -Werte bei einer quantitativen „Real-Time“ TaqMan-PCR. Gezeigt ist der logarithmisch dargestellte Kurvenverlauf der Reporterfluoreszenz von dem Referenz-Gen β -Actin und dem Ziel-Gen JunD für einen Orexin-Ansatz und den Kontroll-Ansatz. Durch das Setzen einer Fluoreszenzschwelle (Threshold) im linearen Bereich wird jedem Kurvenverlauf ein C_T -Wert zugeteilt. Der C_T -Wert für β -Actin ist sowohl im Orexin-Ansatz (rosa Kurve) als auch im Kontroll-Ansatz (dunkelblaue Kurve) gleich. Mit Blick auf das Zielgen JunD ist der C_T -Wert im Orexin-Ansatz (graue Kurve) kleiner als der im Kontroll-Ansatz (hellblaue Kurve). Je mehr Kopien eines DNA-Fragmentes in einer Probe enthalten sind, desto kleiner ist der zugrunde liegende C_T -Wert.

Zur Untersuchung der Wirkung von Orexin A oder Orexin B auf die Genexpression in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle wurde zunächst für jedes Gen innerhalb der 3 Gruppen (Orexin A, Orexin B und unbehandelte Kontrolle) der ΔC_T -Wert als die Differenz aus dem zu untersuchenden Ziel-Gen und dem internen Referenz-Gen berechnet. Da für jedes Gen Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, wurden die ΔC_T -Mittelwerte identischer Replikate berechnet:

$$\text{Beispiel 1: } \Delta C_{T(\text{Kontroll-Ansatz})} = C_{T(\text{Ziel-Gen aus Kontroll-Ansatz})} - C_{T(\text{Referenz-Gen aus Kontroll-Ansatz})}$$

$$\text{Beispiel 2: } \Delta C_{T(\text{Orexin-Ansatz})} = C_{T(\text{Ziel-Gen aus Orexin-Ansatz})} - C_{T(\text{Referenz-Gen aus Orexin-Ansatz})}$$

Dann wurde für die einzelnen Gene der $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmt, der sich aus der Differenz des ΔC_T -Wertes der unbehandelten Kontrolle minus des entsprechenden ΔC_T -Wertes der mit Orexin A oder Orexin B stimulierten Zellen ergibt:

$$\text{Beispiel 3: } \Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Kontroll-Ansatz}) - \Delta C_T (\text{Orexin-Ansatz})$$

Ein Maß für die quantitative Expression („Fold-Change“) eines Gens in den mit Orexin A oder Orexin B stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle konnte bei einer vorausgesetzten PCR-Effizienz von 2 aus dem Wert $2^{(\Delta\Delta C_T)}$ ermittelt werden.

2.9.14 Vergleich der Microarray-Technologie mit der TaqMan-PCR

Für die vergleichende Darstellung der durch die Microarray-Technologie und der TaqMan-PCR ermittelten Expressionsdaten wurden die „Fold-Change“ Werte der Microarray-Daten mit folgender Formel logarithmiert:

$$\log_2 (\text{„Fold-Change“}) = \ln (\text{„FoldChange“}) / \ln (2)$$

Diese \log_2 („Fold-Change“) - Werte wurden dann direkt mit den $\Delta\Delta C_T$ -Werten aus der TaqMan-PCR verglichen und graphisch linear dargestellt.

2.9.15 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese besteht darin, dass Moleküle wie Nukleinsäuren oder Proteine eine Eigenladung besitzen und deshalb in einem elektrischen Feld gerichtet bewegt werden können. Dabei wandern negativ geladenen Moleküle wie Nukleinsäuren innerhalb eines festen Trägermaterials (Agarose oder Polyacrylamid) zur Anode, positiv geladene zur Kathode. Moleküle gleicher Ladung laufen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe verschieden schnell und trennen sich voneinander auf.

Dabei hängen die Geschwindigkeit der Wanderung und die Auftrennung der Moleküle von unterschiedlichen Komponenten ab, zum Beispiel von der Größe und Konformation der einzelnen Moleküle, von dem pH-Wert und der Konzentration des Puffers, von der elektrischen Spannung und der Konzentration der Trägermatrix im Gel.

Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das durch Aufkochen in geeignetem Puffer geschmolzen wird und dann in Gelformen gegossen zu einer homogenen Gelmatrix auskühlt. In solchen Agarosegelen erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte aus der

quantitativen „Real-Time“-TaqMan-PCR [2.9.13.2]. Dazu wurde 1 Gramm Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht und das Gel in eine abgedichtete Gelkammer gegossen. Die Proben wurden vor der Auftragung mit 1/6 Volumen 6 x Loading Dye (*Promega GmbH*, Mannheim) versetzt und bei einer konstanten Spannung von 120 V für 1 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 40 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Danach erfolgt die Detektion der Nukleinsäure-Banden über die Fluoreszenz der in den Doppelstrang interkalierten Ethidiumbromidmoleküle bei einer Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm). Anhand eines Standards konnte so die Größe der PCR-Fragmente ermittelt werden.

Ethidiumbromid-Lösung	1 µg /ml Ethidiumbromid in dH ₂ O
5 x TBE-Puffer	445 mM Tris-Base 445 mM Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0 in dH ₂ O
100 bp Größenstandard	1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

2.9.16 Statistische Auswertungen

Alle durchgeführten Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und ergaben gleichwertige Ergebnisse. Aus allen Versuchsdaten wurden unter Verwendung von Microsoft Excel (*Microsoft*, Version 2003) Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zur Untersuchung des statistischen Signifikanzniveaus wurde ein Student T-Test angewandt. Verglichen wurden jeweils die mit Orexin A oder Orexin B stimulierten Zellen mit der unbehandelten Kontrolle. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinexpression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ Zellen

Nachdem unsere Arbeitsgruppe anhand von Genexpressionsprofilen von hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen die Expression der G-Protein-gekoppelten Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf RNA-Ebene gezeigt hatte (Steidl et al., 2004), sollte die Expression auf Proteinebene bestätigt werden. Dazu wurden immunmagnetisch isolierte CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert. Unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper gegen die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 konnte so die Rezeptorexpression und der prozentuale Anteil der Rezeptor-exprimierenden Zellen bestimmt werden. In Abbildung 3.1 ist ein repräsentatives Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung dargestellt. Insgesamt konnten wir anhand von 5 unterschiedlichen Spendern zeigen, dass 70% (SD ± 2,91) der isolierten CD34⁺ Zellen den Orexin-Rezeptor 1 und 63% (SD ± 6,21) der Zellen den Orexin-Rezeptor 2 exprimierten.

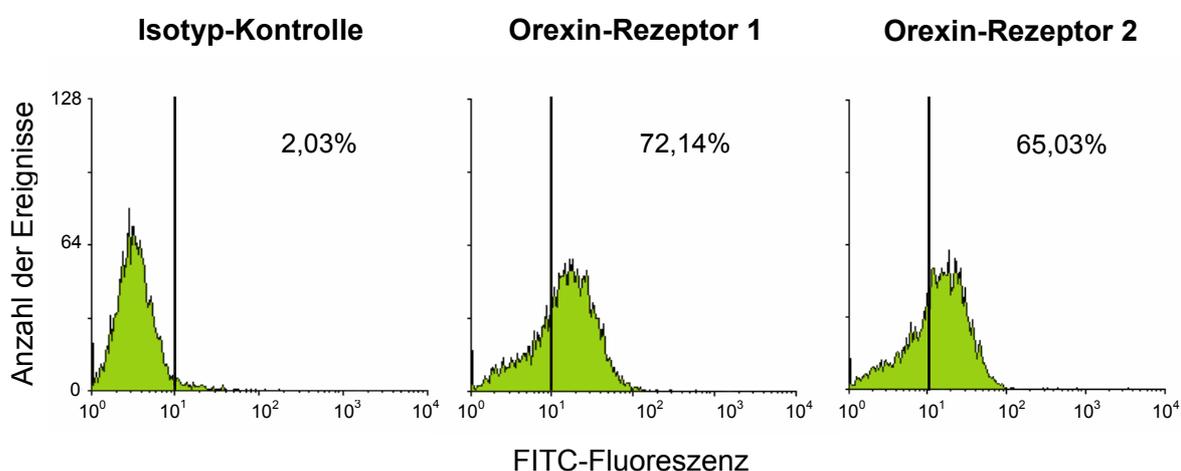


Abbildung 3.1: Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ Zellen. Isolierte CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die Zellen wurden zunächst mit einem Orexin-Rezeptor-1- oder Orexin-Rezeptor-2-spezifischen Primärantikörper und anschließend mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Rezeptorexpression ist als FITC-Fluoreszenz auf der X-Achse gegen die Anzahl der Zellen auf der Y-Achse aufgetragen. Die Fluoreszenz-Intensitätsschwelle (schwarze Linie) wurde anhand der Isotyp-Kontrolle bei einer FITC-Intensität von 10¹ festgelegt. Der prozentuale Anteil der Rezeptor-positiven Zellen ist in jedem Histogramm angegeben. Ein repräsentatives von 5 durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Um in einem weiteren Schritt die Stärke der Expression zu bestimmen, wurde für jede CD34⁺ Probe die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Isotyp-Kontrolle und jeweils der beiden Orexin-Rezeptor-Ansätze ermittelt. Aus dem Quotienten der MFI des jeweiligen Rezeptor-Ansatzes und der Kontrolle konnten wir auf diese Weise die relative Bindung der spezifischen Antikörper errechnen, welche wiederum ein Maß für die relative Expressionsstärke des jeweiligen Rezeptors auf Proteinebene ist. Diese lag für den Orexin-Rezeptor 1 bei 4,90 (SD \pm 0,98) und für den Orexin-Rezeptor 2 bei 3,98 (SD \pm 1,42).

Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnten wir in unseren Genexpressionsanalysen auch auf RNA-Ebene eine 1,18fach höhere Expression des Orexin-Rezeptors 1 im Vergleich zum Orexin-Rezeptor 2 beobachten. Dabei ergab sich eine normalisierte Expressionsstärke von 49,09 (SD \pm 2,33) für den Orexin-Rezeptor 1 und von 41,73 (SD \pm 1,99) für den Orexin-Rezeptor 2 (Abb.3.2).

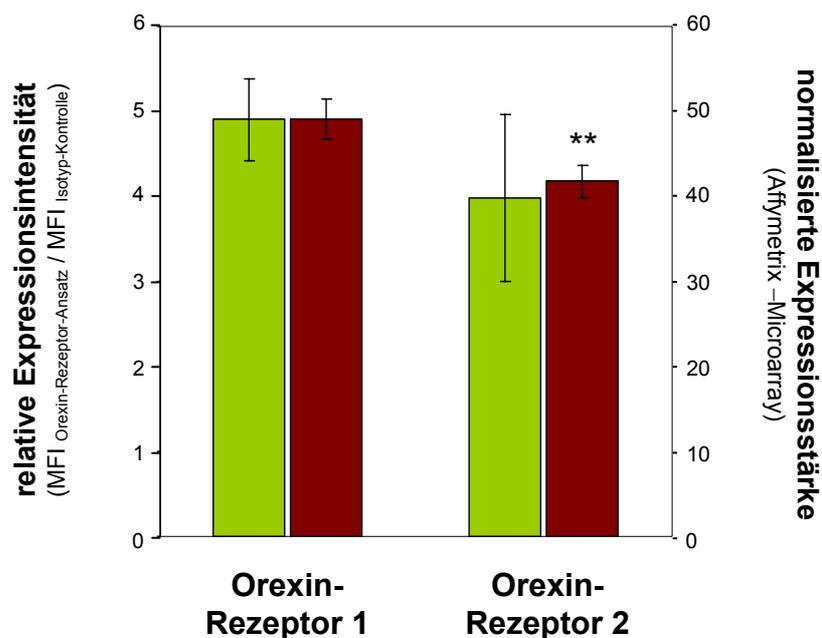


Abbildung 3.2: Expressionsstärke der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf Protein- und RNA-Ebene. Für jede CD34⁺ Probe wurde durchflusszytometrisch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Isotyp-Kontrolle und der beiden Orexin-Rezeptor-Ansätze ermittelt. Aus dem Quotienten der MFI des Rezeptor-Ansatzes und der Kontrolle ergab sich so die relative Expressionsintensität auf Proteinebene (grün). Im Vergleich wurde die normalisierte Expressionsstärke der Orexin-Rezeptoren auf RNA-Ebene aus unseren Genexpressionsanalysen ermittelt (rot). Mittelwert und Standardabweichung aus 5 durchgeführten Experimenten sowie die Signifikanz des Orexin-Rezeptors 2 zum Orexin-Rezeptor 1 ist angegeben (** p < 0,001).

3.2 Differenzierungsabhängige Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2

Konnten wir in einem ersten Schritt die Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf hämatopoetischen CD34⁺ Zellen bestätigen, so wollten wir in einem zweiten Schritt diese Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zellen ermitteln.

Da frühe hämatopoetische Stammzellen eine niedrigere CD38-Expression aufweisen als reifere liniendeterminierte Vorläuferzellen, ließ sich anhand einer Zweifarbenimmunfluoreszenz mit CD38 und Orexin-Rezeptor-spezifischen Antikörpern die Orexin-Rezeptor-Expression in frühen und reiferen CD34⁺ Zellen untersuchen. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Messung wurde die CD38-Expression gegen die Orexin-Rezeptor-Expression in einem „Dot Plot“-Diagramm aufgetragen (Abb.3.3). Dabei konnten wir bei einer stärkeren CD38-Expression eine niedrigere Expression der Orexin-Rezeptoren beobachten.

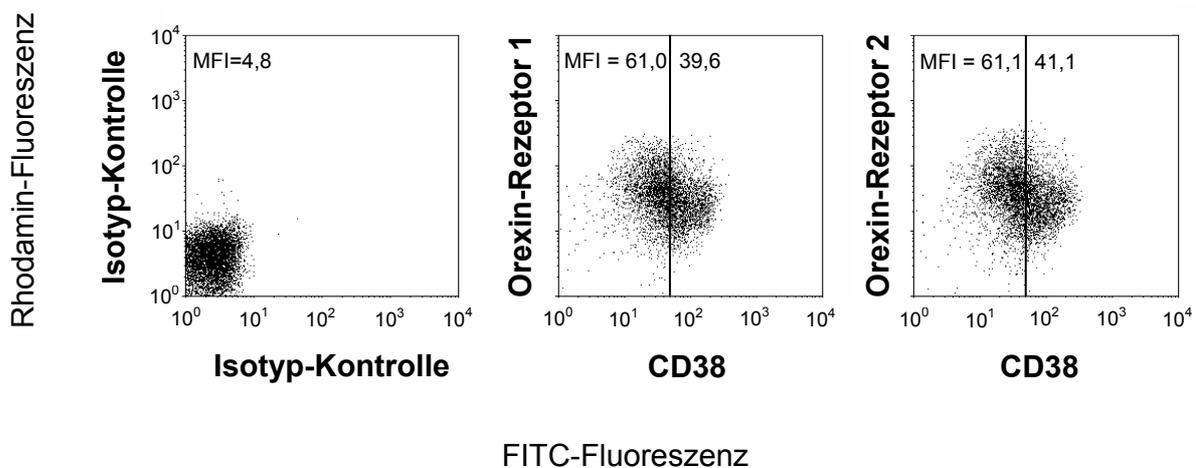


Abbildung 3.3: Differenzierungsabhängige Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ Zellen. Isolierte CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut wurden mittels Zweifarbenimmunfluoreszenz analysiert. Zur Messung der Rezeptorexpression wurden zunächst ein Orexin-Rezeptor-1- oder -2-spezifischer Primärantikörper und anschließend ein Rhodamin-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die CD38-Expression wurde anhand eines anti-CD38 FITC-gekoppelten Antikörpers ermittelt. Eine CD38-Intensitätsschwelle bei einer FITC-Intensität von 5×10^1 teilt die Gesamtpopulation in eine CD38-gering (CD38^{dim}) und eine CD38-stark (CD38^{bright}) exprimierende Zellpopulation. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) jeder Population ist im „Dot Plot“-Diagramm angegeben. Ein repräsentatives von 5 durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Um diese visuellen Unterschiede statistisch zu belegen, wurde die gesamte CD34⁺ Zellpopulation im „Dot Plot“-Diagramm anhand einer CD38-Intensitätsschwelle in eine CD38-gering (CD38^{dim}) und eine CD38-stark (CD38^{bright}) exprimierende Zellpopulation unterteilt. Von beiden Populationen konnten wir dann die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Bezug auf die Isotyp-Kontrolle ermitteln und als relative Expressionsintensität graphisch darstellen (Abb 3.4). Dabei zeigte sich anhand von 5 unterschiedlichen Proben, dass die CD34⁺ CD38^{dim} Zellen, in diesem Fall also die früheren CD34⁺ Zellen, sowohl für den Orexin-Rezeptor 1 als auch für den Orexin-Rezeptor 2 eine 1,5fach signifikant stärkere Expression als die reiferen CD34⁺ CD38^{bright} Zellen aufweisen.

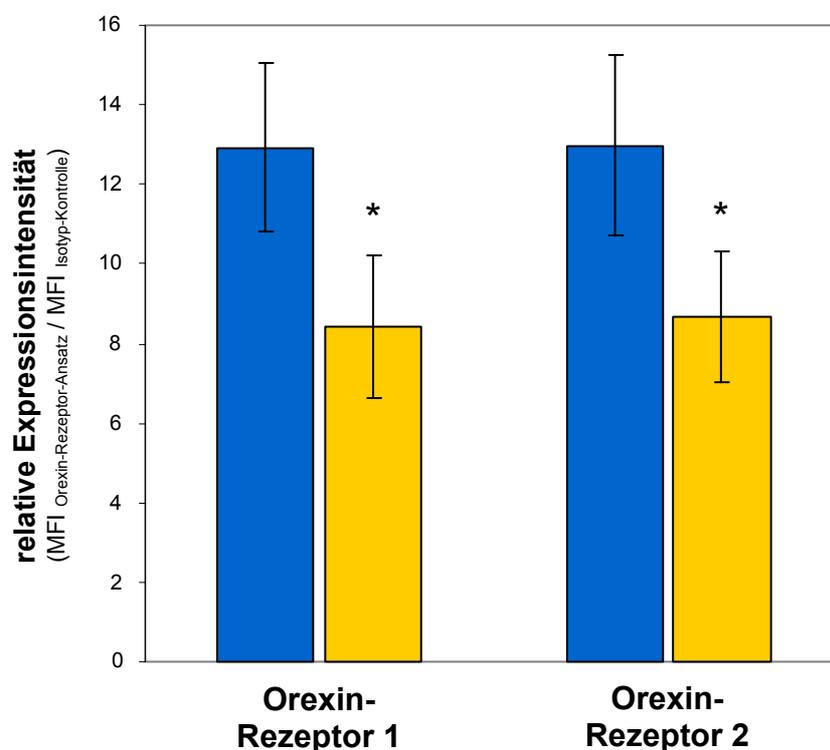


Abbildung 3.4: Relative Expressionsintensität der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ CD38^{dim} und CD34⁺ CD38^{bright} Zellen. Jede CD34⁺ Probe wurde anhand der CD38-Intensitätsschwelle in eine CD38-gering (CD38^{dim}) und eine CD38-stark (CD38^{bright}) exprimierende Zellpopulation eingeteilt. In der Isotyp-Kontrolle und beiden Orexin-Rezeptor-Ansätzen wurde für jede Population und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Aus dem Quotienten der MFI der jeweiligen Population und der Kontrolle konnte so für den Orexin-Rezeptor 1 und den Orexin-Rezeptor 2 die relative Expressionsintensität in den früheren CD34⁺ CD38^{dim} (blau) oder den reiferen CD34⁺ CD38^{bright} (orange) Zellen errechnet werden. Mittelwert und Standardabweichung aus 5 durchgeführten Experimenten sowie die Signifikanz der CD38^{bright} zu den CD38^{dim} Werten ist angegeben (* p < 0,05).

3.3 Orexin A und Orexin B reduzieren die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Nachdem wir anhand von Genexpressionsanalysen und FACS-Messungen gezeigt hatten, dass die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert werden, wollten wir in einem weiteren Schritt die Frage nach der funktionellen Aktivität der Rezeptoren beantworten. Da neben der Calciumerhöhung vor allem auch die Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration als Haupteffekt der Orexin-Rezeptor-Stimulation beschrieben wird (Holmqvist et al., 2005; Mazzocchi et al., 2001), wollten wir untersuchen, ob die auch Aktivierung der Orexin-Rezeptoren in CD34⁺ Zellen einen solchen Effekt zeigt. Dazu wurden die isolierten CD34⁺ Zellen zunächst mit Orexin A oder Orexin B alleine in den Konzentrationen 1 µM oder 0,1 µM stimuliert und nach 30 min die intrazelluläre cAMP-Konzentration [cAMP]_i bestimmt.

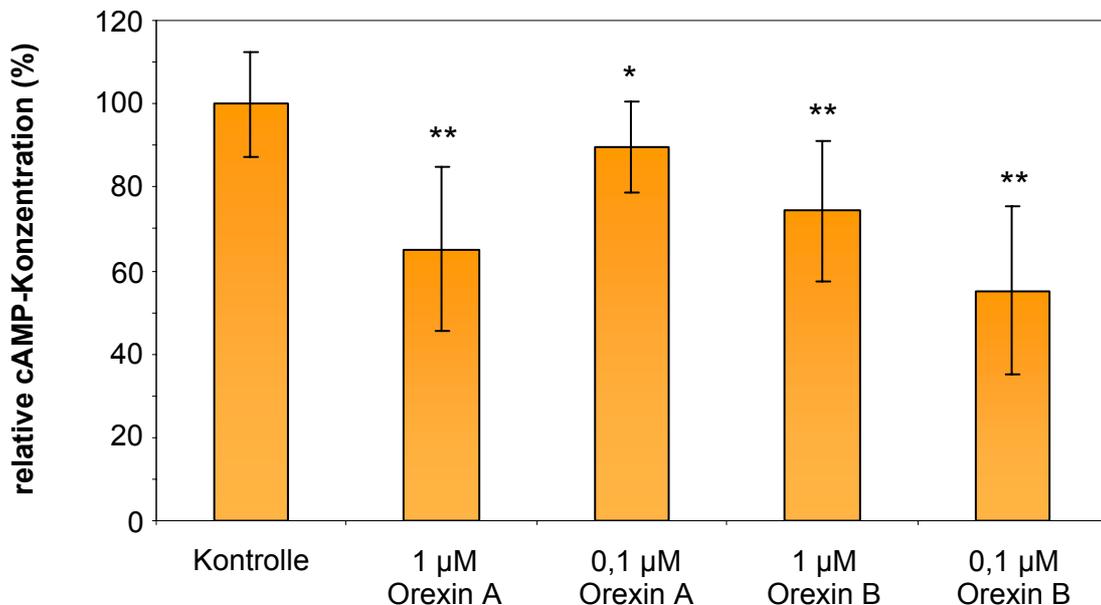


Abbildung 3.5: Signifikante Reduktion der cAMP-Konzentration in CD34⁺ Zellen nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B. Isolierte CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen wurden mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 1 µM oder 0,1 µM inkubiert. Nach 30 min wurde die cAMP-Konzentration in den Proben anhand eines kompetitiven cAMP-Enzymimmunoassays ermittelt und in prozentualer Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die zur Kontrolle signifikanten Mittelwerte und Standardabweichung von 5 durchgeführten Experimenten im Doppelansatz sind angegeben (* p < 0,05; ** p < 0,001).

Sowohl nach einer Stimulation mit Orexin A als auch nach einer Stimulation mit Orexin B konnten wir eine signifikant verminderte [cAMP]_i im Vergleich zu unstimulierten Zellen beobachten (Abb.3.5). So fanden wir eine signifikante Reduktion der [cAMP]_i um 34,8% (SD ± 19,5) nach Inkubation mit 1 µM Orexin A und um 10,4% (SD ± 10,7) nach

Inkubation mit 0,1 μM Orexin A. Im Gegensatz zu dieser dosisabhängigen Wirkung zeigte sich für Orexin B ein stärkerer Effekt bei der geringeren Konzentration. So verminderte sich die $[\text{cAMP}]_i$ nach einer Stimulation mit 1 μM Orexin B signifikant um 25,7% ($\text{SD} \pm 16,8$), während eine Stimulation in der Konzentration von 0,1 μM zu einer fast doppelt so starken, signifikanten Reduktion um 44,8% ($\text{SD} \pm 20,1$) führte.

Da bei der Stimulation mit Orexin A oder Orexin B stets beide Orexin-Rezeptoren aktiviert werden, wiederholten wir die cAMP-Messung unter Verwendung des spezifischen Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 (Smart et al., 2001), um den Orexin-Rezeptor-1-vermittelten Signalweg zu hemmen. Die Ergebnisse sollten uns einen Hinweis darauf geben, welche Rolle die beiden Orexin-Rezeptoren bei dem inhibierenden Effekt auf die cAMP-Konzentration spielen und an welches G-Protein sie möglicherweise gekoppelt sind. Für den Ansatz wurden die Liganden Orexin A oder Orexin B jeweils in ihrer effektiveren Konzentration in Kombination mit dem Antagonisten SB-334867 eingesetzt (Abb.3.6).

Nach einer Stimulation mit 1 μM Orexin A konnte wir beobachten, dass sich die ursprünglich Verminderung der $[\text{cAMP}]_i$ von 34,8% ($\text{SD} \pm 19,5$) durch die Kombination mit dem Antagonisten noch einmal signifikant um fast das Doppelte auf 62% ($\text{SD} \pm 14$) steigerte (Abb.3.6 (A)). Auch die durch 0,1 μM Orexin B vermittelte Reduktion der $[\text{cAMP}]_i$ verstärkte sich durch die kombinierte Inkubation mit dem Antagonisten auf 51,9% ($\text{SD} \pm 22,9$), wobei dieser Effekt keine statistische Signifikanz zeigte (Abb.3.6 (B)). Daneben führte auch eine alleinige Inkubation mit 1 μM oder 0,1 μM des Antagonisten zu einer um 54,4% ($\text{SD} \pm 14$) und 67,6% ($\text{SD} \pm 13,5$) verminderten $[\text{cAMP}]_i$, während das Lösungsmittel DMSO keinen signifikanten Effekt zeigte.

Insgesamt konnten wir anhand dieser funktionellen cAMP-Messung zeigen, dass sowohl Orexin A als auch Orexin B in CD34^+ Zellen eine signifikante Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration vermitteln, die im Fall von Orexin A durch die Verwendung des Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 noch signifikant verstärkt werden kann.

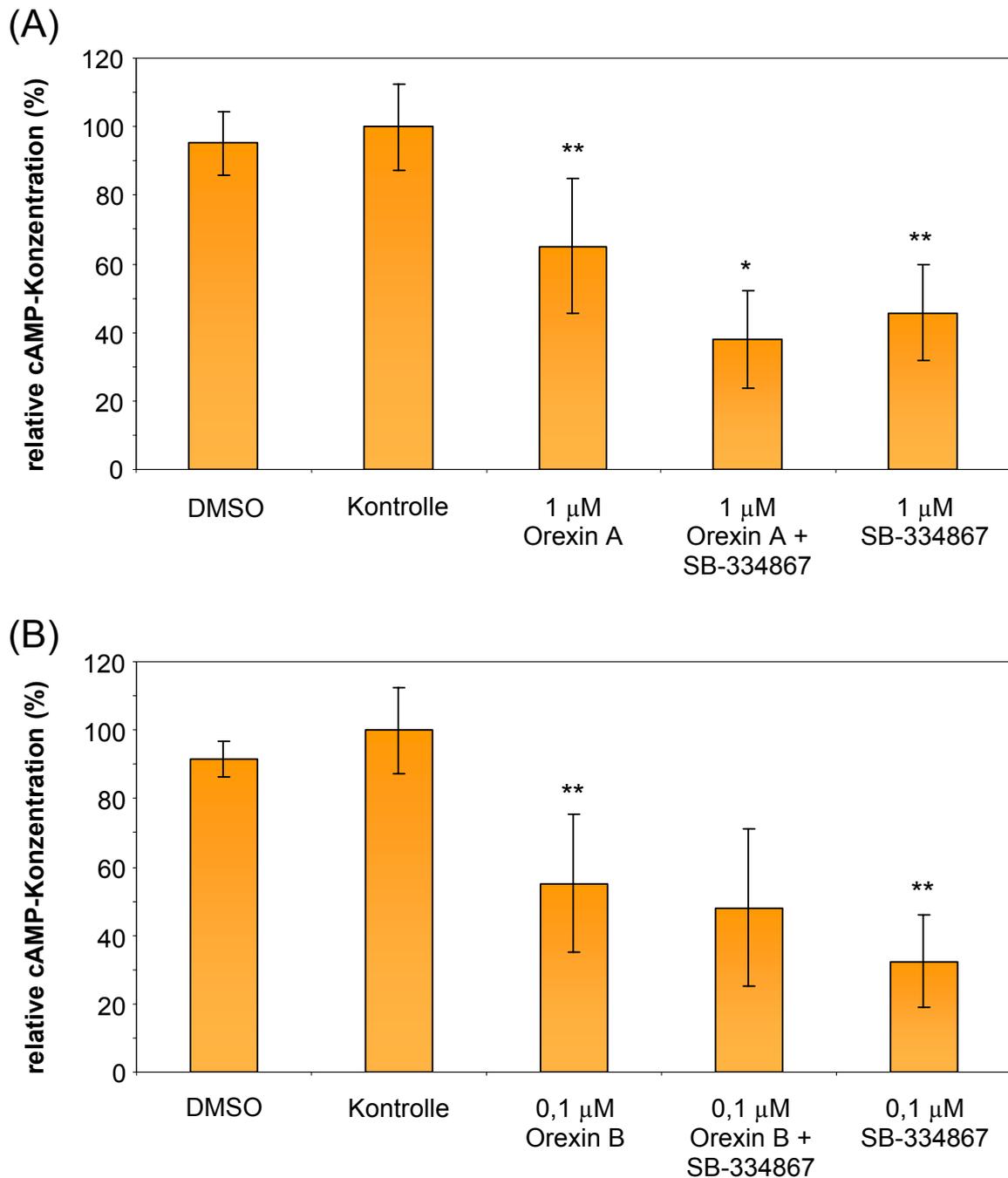


Abbildung 3.6: Die signifikante Reduktion der cAMP-Konzentration in CD34⁺ Zellen durch Stimulation mit Orexin A oder Orexin B kann in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 verstärkt werden. Isolierte CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen wurden mit Orexin A (A) oder Orexin B (B) alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 inkubiert. Nach 30 min wurde die cAMP-Konzentration in den Proben anhand eines kompetitiven cAMP-Enzymimmunoassays bestimmt und in prozentualer Relation zur unstimulierten Kontrolle dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung von 3-5 durchgeführten Experimenten im Doppelansatz sind angegeben. Die statistische Signifikanz der Ansätze mit den Orexinen oder dem Antagonisten alleine wurde in Bezug auf die Kontrolle ermittelt, die Signifikanz der Ansätze mit der Orexin-Antagonisten-Kombination in Bezug auf den zugehörigen Orexin-Ansatz mit der gleichen Konzentration (* p < 0,05; ** p < 0,001).

3.4 Orexin A und Orexin B reduzieren die intrazelluläre Calciumkonzentration

Neben einer veränderten intrazellulären cAMP-Konzentration wird die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ als ein Haupteffekt der Orexin-Rezeptor-Stimulation beschrieben (Ammoun et al., 2006a; Lund et al., 2000). Zudem wurde dieser Effekt auch schon für andere, auf $CD34^+$ Zellen exprimierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gezeigt wie zum Beispiel für den Zytokinrezeptor CXCR4, den Leukotrienrezeptor CysLT1 oder den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor S1P1 (Kimura et al., 2004; Bautz et al., 2001; Aiuti et al., 1997). Um zu untersuchen, ob die Orexin-Rezeptoren auch in $CD34^+$ Zellen die $[Ca^{2+}]_i$ erhöhen, führten wir eine intrazelluläre Calciummessung mittels Durchflusszytometrie durch. Dabei wurden isolierte $CD34^+$ Zellen zunächst mit dem Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4-Acetoxymethylester (Fluo4-AM) inkubiert, der seine Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit von der Bindung an Calcium verändert. Nach Zugabe von Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 10 μ M, 1 μ M oder 0,1 μ M wurde die Fluo4-Fluoreszenzemission als ein Maß für die Calciumkonzentration in der Zelle über einen Zeitraum von 80 sec gemessen. Als Positivkontrolle diente uns die schon in der Literatur beschriebene SDF-1 β -vermittelte Calciumerhöhung in $CD34^+$ Zellen (Aiuti et al., 1997).

Abbildung 3.7 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluo4-Fluoreszenzemission nach Stimulation mit SDF-1 β oder Orexin A oder Orexin B. Nach einer Zugabe von SDF-1 β kam es zunächst zu einer Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$, die nach 16 sec einen Maximalwert erreichte und dann in den folgenden 64 sec wieder auf 18% der ursprünglichen $[Ca^{2+}]_i$ absank. Zum Vergleich der durch Orexin veränderten Calciumkonzentration mit der SDF-1 β -vermittelten Calciumerhöhung wurde das durch SDF-1 β erzielte Maximum der $[Ca^{2+}]_i$ auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte in Relation zu diesem Wert angegeben.

Weder durch Zugabe von Orexin A noch durch Zugabe von Orexin B konnte eine Calciumerhöhung beobachtet werden. Dennoch kam es in allen Fällen zu einer Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$, die in ihrem zeitlichen Verlauf immer ein ähnlichen Muster zeigte: Sofort nach Zugabe der Orexine verminderte sich die $[Ca^{2+}]_i$, stieg nach 8 sec wieder an, um nach weiteren 16 sec erneut abzusinken. Dieser Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ fiel je nach eingesetzter Orexin-Konzentration unterschiedlich stark aus (Abb.3.7).

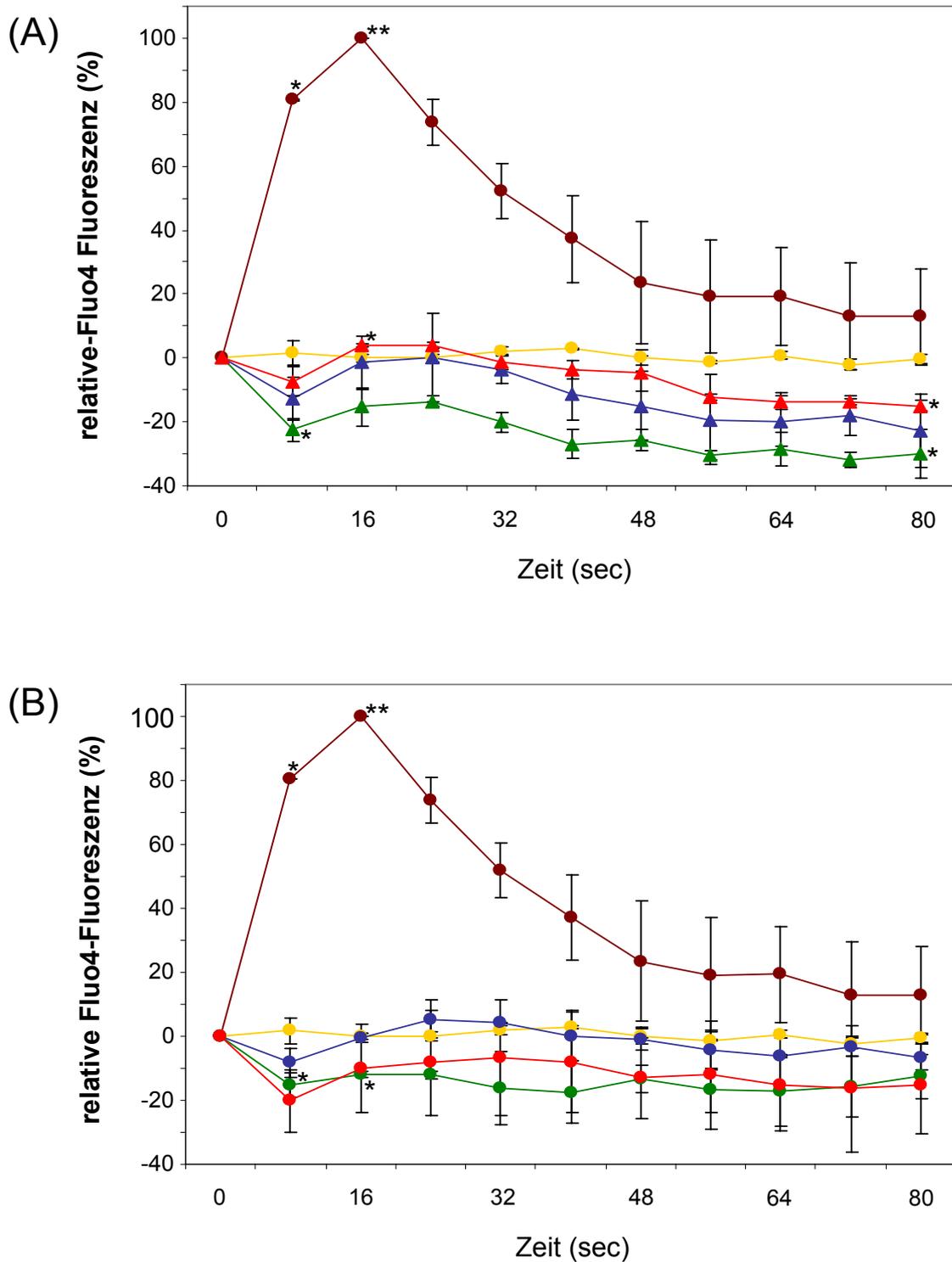


Abbildung 3.7: Intrazelluläre Calciummessung nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B. CD34⁺ Zellen wurden zunächst mit Fluo4 inkubiert. Nach Zugabe von Puffer (●) oder 100 ng/ml SDF-1 β (●) oder Orexin A (A) oder Orexin B (B) in den Konzentrationen 10 μ M (▲/●), 1 μ M (▲/●) oder 0,1 μ M (▲/●) wurde die Fluo4-Fluoreszenzemission als Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration über 80 sec gemessen. Jeder Datenpunkt beinhaltet Mittelwert und Standardabweichung von 3 durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz in Bezug auf die Puffer-Kontrolle ist für die Zeitpunkte 8, 16 und 80 sec angegeben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Wie bei cAMP-Messung zeigte die Stimulation mit Orexin A eine dosisabhängige Wirkung (Abb.3.7). Die Zugabe mit 10 μM Orexin A führte nach 8 sec zu einer signifikante Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 22,5% (SD \pm 3,6), während wir nach Stimulation mit 1 μM oder 0,1 μM Orexin A zwar eine um 12,7% (SD \pm 6,7) oder um 7,3% (SD \pm 4,6), aber keine signifikant verringerte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ messen konnten. Einem anschließenden Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ folgte dann 24 sec nach Orexin-Zugabe ein erneuter Abfall, der am Ende der Messung im Fall von 10 μM und 0,1 μM Orexin A zu einer signifikanten Reduktion um 30% (SD \pm 7,7) und 14,5% (SD \pm 1,7) führte.

Auch bei Zugabe von Orexin B (Abb.3.7) zeigte die höchste Konzentration von 10 μM nach 8 sec eine signifikante Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 15,4% (SD \pm 3,8), die bis zum Ende der Messung um diesen Wert schwankte und nach 80 sec 12,6% (SD \pm 6,9) betrug. Die Stimulation mit 0,1 μM Orexin B führte nach 8 sec zwar auch zu einer um 20,2% (SD \pm 9,9), aber nicht signifikant verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während 1 μM Orexin B die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 8,3% (SD \pm 4,4) verringerte. Im weiteren Verlauf konnten wir dann in den Ansätzen mit 1 μM und 0,1 μM den zuvor schon beschriebenen Anstieg und erneuten Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachten, der am Ende der Messung zu einer Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 15,08% (SD \pm 10,7) und 6,5% (SD \pm 4,1) führte.

Nachdem wir also zunächst gezeigt hatten, dass die Stimulation mit Orexinen in CD34^+ Zellen zu keiner Calciumerhöhung, sondern vielmehr zu einer Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt, wollten wir in einem zweiten Ansatz untersuchen, ob der beobachtete Orexin-Effekt die SDF-1 β -vermittelte Calciumerhöhung beeinflusst. Dazu wurden die CD34^+ Zellen in Gegenwart von Fluo4-AM mit Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 10 μM , 1 μM oder 0,1 μM inkubiert. Als Kontrolle dienten nur mit Fluo4-AM inkubierte Zellen. Nach Zugabe von SDF-1 β zu allen Ansätzen wurde dann über einen Zeitraum von 80 sec die intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen. Abbildung 3.8 zeigt die ermittelte Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Inkubation mit Orexin A oder Orexin B, wobei wir die in den Kontrollzellen durch SDF-1 β erzielte Calciumerhöhung nach 16 sec als Maximalwert von 100% definierten. Bei den Messungen konnten wir beobachten, dass eine vorherige Inkubation mit Orexin A oder Orexin B zu einer Verminderung des nach 16 sec durch SDF-1 β vermittelten Calciumsignals führte. Dabei fiel die Reduktion je nach eingesetzter Orexin-Konzentration unterschiedlich stark aus.

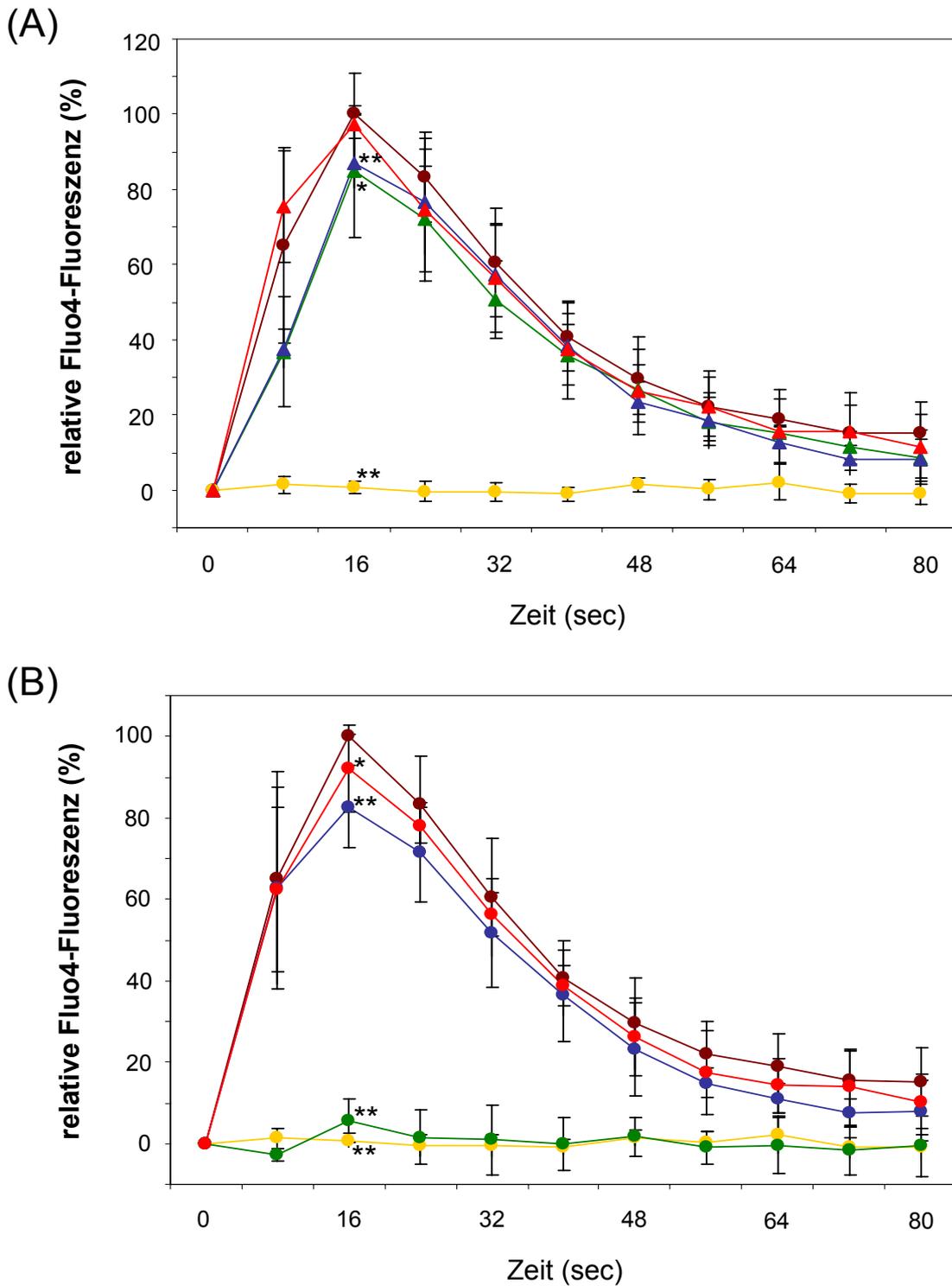


Abbildung 3.8: Intrazelluläre Calciummessung nach Inkubation mit Orexin A oder Orexin B und SDF-1 β Stimulation. CD34⁺ Zellen wurden nur mit Fluo4 (●) oder mit Fluo4 und Orexin A (A) oder Orexin B (B) in den Konzentrationen 10 μ M (▲/●), 1 μ M (▲/●) oder 0,1 μ M (▲/●) inkubiert. Nach Zugabe von 100ng/ml SDF-1 β oder Puffer (●) wurde die Fluo4-Fluoreszenzemission als Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration über 80 sec gemessen. Jeder Datenpunkt beinhaltet Mittelwert und Standardabweichung von mindestens 3 durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz in Bezug auf die SDF-1 β -vermittelte Calciumkonzentration ist für die Messwerte zum Zeitpunkt 16 sec nach SDF-1 β -Stimulus angegeben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Zum direkten Vergleich der Effekte der Orexin-Inkubation auf die maximale SDF-1 β -vermittelte Calciumerhöhung wurden die Messwerte aller Ansätze vom Zeitpunkt 16 sec nach SDF-1 β -Zugabe graphisch nebeneinander dargestellt (Abb.3.9). Sowohl eine vorherige Stimulation mit Orexin A als auch eine Stimulation mit Orexin B führten zu einer dosisabhängigen Reduktion des SDF-1 β -Signals. So zeigte sich nach einer Inkubation mit 10 μ M Orexin A eine um 15,1% (SD \pm 17,5) signifikant verringerte Calciumerhöhung, die sich auch durch Zugabe des Antagonisten SB-334867 nicht veränderte (Abb.3.9 (A)). Im Gegensatz dazu konnte die durch 1 μ M Orexin A vermittelte signifikante Hemmung des SDF-1 β -Signals um 13% (SD \pm 6,6) durch Kombination mit dem Antagonisten aufgehoben werden. Keinen signifikanten Effekt auf die SDF-1 β -vermittelten Calciumerhöhung zeigte eine vorherige Inkubation mit 0,1 μ M Orexin A, weder alleine noch in Kombination mit dem Antagonisten.

Neben Orexin A zeigte auch eine Inkubation mit Orexin B eine signifikante Hemmung der SDF-1 β -vermittelten Calciumerhöhung (Abb.3.9 (B)). So reduzierte sich das nach 16 sec gemessene SDF-1 β -Signal durch 1 μ M oder 0,1 μ M Orexin B signifikant um 17,3% (SD \pm 10,1) und 8,0% (SD \pm 10,6). Die Inkubation mit 10 μ M Orexin B führte sogar zu einer signifikanten Hemmung um 94,3% (SD \pm 5,3). Diese durch Orexin B vermittelten Effekte ließen sich zwar durch die kombinierte Inkubation mit dem Antagonisten abschwächen, aber nicht signifikant verändern. Neben dieser Orexin-vermittelten Hemmung führte auch die alleinige Inkubation mit 10 μ M des Antagonisten zu einer Reduktion des SDF-1 β -Signals um 17,5% (SD \pm 10,9), während das Lösungsmittel DMSO keinen signifikanten Effekt zeigte.

Insgesamt konnten wir somit zeigen, dass sich durch Stimulation mit Orexin A oder Orexin B die intrazelluläre Calciumkonzentration in CD34⁺ Zellen signifikant reduzieren lässt und sich dieser Effekt auch unter Verwendung des Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 nicht signifikant verändert.

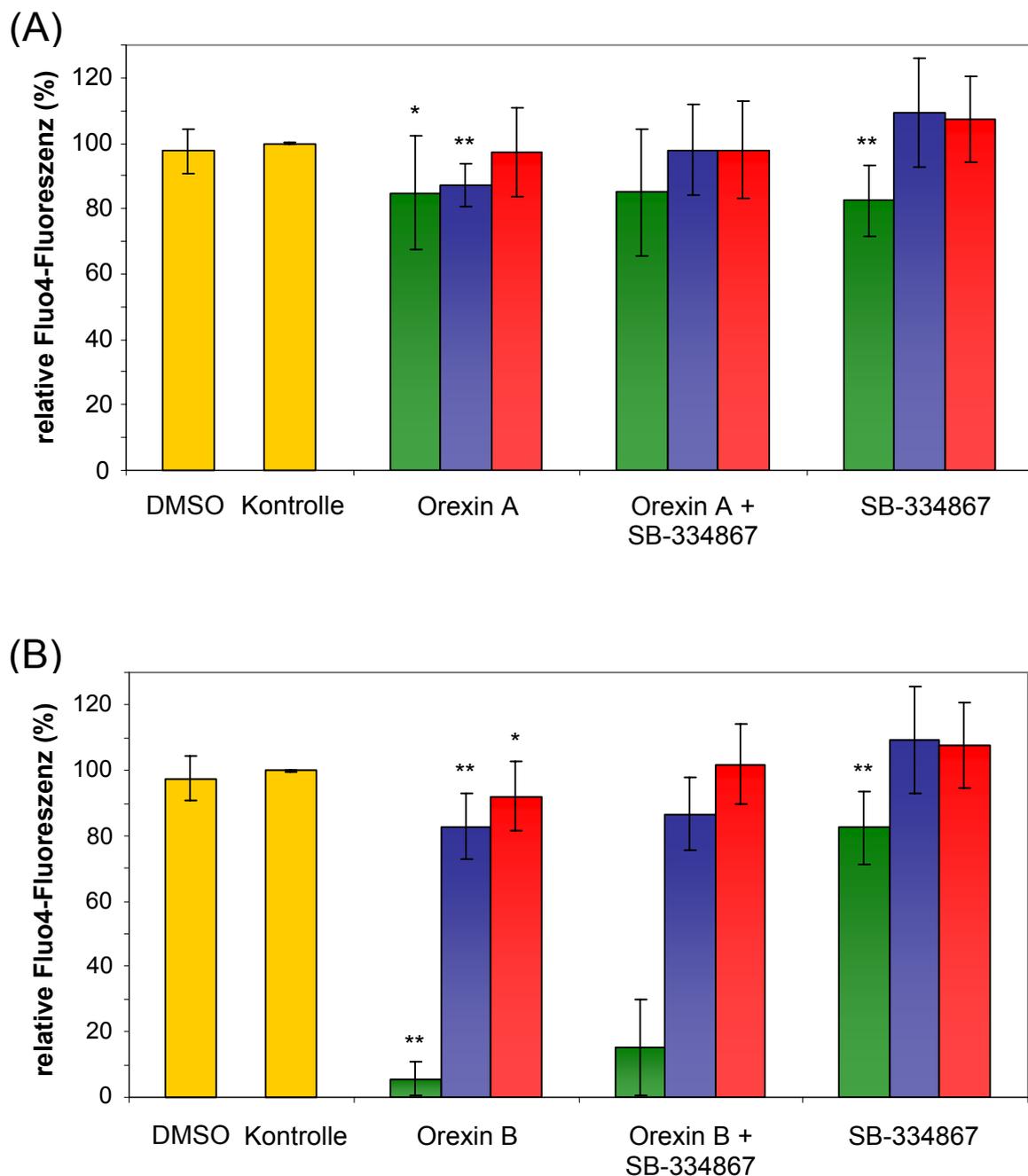


Abbildung 3.9: Intrazelluläre Calciummessung 16 sec nach Inkubation mit Orexin A oder Orexin B und SDF-1 β -Stimulation. CD34⁺ Zellen wurden nur mit Fluo4 (Kontrolle) oder mit Fluo4 und Orexin A (A) oder Orexin B (B) alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 10 μ M (grün), 1 μ M (blau) oder 0,1 μ M (rot) inkubiert. 16 sec nach Zugabe von 100 ng/ml SDF-1 β wurde die Fluo4-Fluoreszenzemission als Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen. Mittelwert und Standardabweichung von 3-6 durchgeführten Experimenten sind angegeben. Die statistische Signifikanz der Ansätze mit den Orexinen oder dem Antagonisten alleine wurde in Bezug auf die Kontrolle ermittelt, die Signifikanz der Ansätze mit der Orexin-Antagonisten-Kombination in Bezug auf den zugehörigen Orexin-Ansatz mit der gleichen Konzentration (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

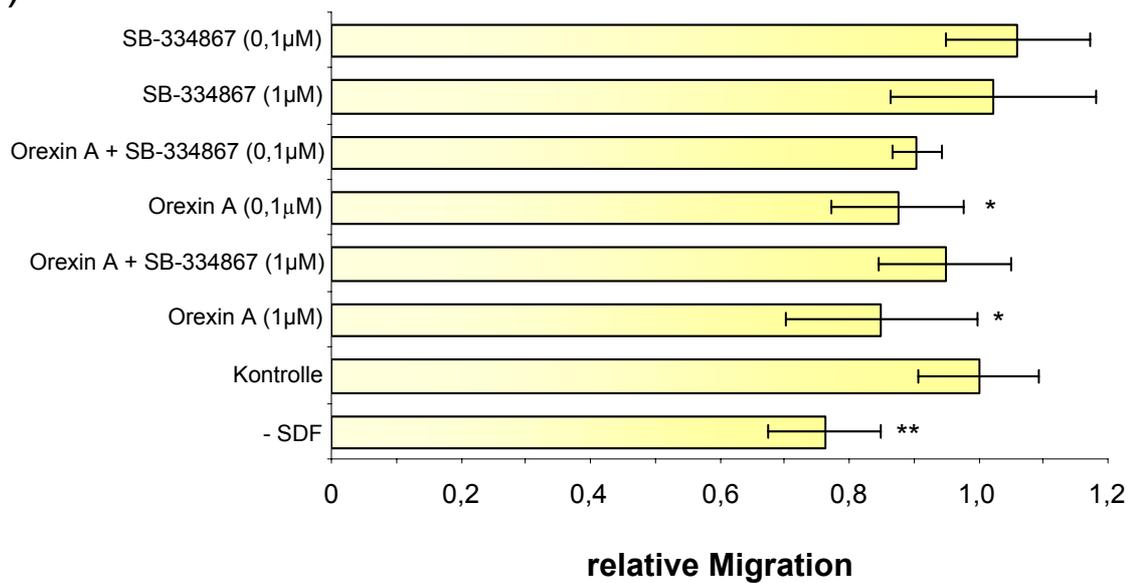
3.5 Hemmung der Migration durch Orexin A und Orexin B

Die Fähigkeit der transendothelialen Migration von hämatopoetischen Stammzellen durch das Endothel des Knochenmarks spielt eine bedeutende Rolle bei der Stammzelltransplantation und bei Endzündungsreaktionen oder nekrotischen Gewebeschäden im Körper. Da auch schon für andere Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie SDF-1 β (Mohle et al., 1998) und LTD4 (Bautz et al., 2001) eine Beteiligung an dieser Reaktion beschrieben wurde, wollten wir den Einfluss der Orexin-Rezeptoren auf das Migrationsverhalten von hämatopoetischen CD34⁺ Zellen untersuchen. Dazu benutzten wir das Modell der Zellmigration in einer Transwell-Platte, bei dem die Zellen durch eine Fibronectin-beschichtete Membran in Richtung eines chemokinen SDF-1 β -Stimulus migrieren. Immunmagnetisch isolierte CD34⁺ Zellen wurden zunächst mit Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 inkubiert und anschließend in die obere Kammer einer Transwell-Platte eingesetzt, während SDF-1 β in die untere Kammer als chemokiner Stimulus gegeben wurde. Nach 8 h konnten die durch die Membran in die untere Kammer migrierten Zellen gemessen und in Relation zu den migrierten Zellen in der unbehandelten Kontrolle dargestellt werden. Ein Ansatz ohne SDF-1 β diente als Beispiel für eine ungerichtete Migration.

Abbildung 3.10 zeigt die veränderte Migrationsrate in Abhängigkeit von der Inkubation mit 1 μ M oder 0,1 μ M Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867. Im Vergleich zu einer ungerichteten Migration (-SDF) konnten wir durch Einsatz des chemokinen SDF-1 β -Stimulus in der Kontrolle eine um 23,6% (SD \pm 8,6) signifikant erhöhte Migrationsrate der CD34⁺ Zellen beobachten. Dieser Effekt wurde durch eine vorherige Stimulation der Zellen mit Orexin A oder Orexin B dosisabhängig reduziert. So führte eine Inkubation mit 1 μ M oder 0,1 μ M Orexin A zu einer um 15,1% (SD \pm 14,8) und 12,4% (SD \pm 10,3) signifikant reduzierten Migration (Abb.3.10 (A)). Im Fall von Orexin B fiel der hemmende Effekt etwas geringer aus. So zeigte sich nach Stimulation mit 1 μ M eine signifikante Migrationshemmung von 12,9% (SD \pm 14,0), während die Inkubation mit 0,1 μ M zu einer um 6,9% (SD \pm 13,4) verminderten, aber nicht signifikanten Reduktion führte (Abb.3.10 (B)).

In allen Fällen konnten wir beobachten, dass der inhibierende Effekt durch die Kombination mit dem Antagonisten zwar vermindert, aber nicht signifikant verändert wurde (Abb.3.10). So führte eine kombinierte Inkubation mit 1 μ M oder 0,1 μ M Orexin A und dem Antagonisten zu einer um 5,1% (SD \pm 10,5) und 9,2% (SD \pm 3,8) reduzierten Migrationsrate. Durch Kombination mit 1 μ M Orexin B und dem Antagonisten verringerte sich der inhibierende Effekt auf 7,0% (SD \pm 8,6) und wurde bei einer Konzentration von 0,1 μ M ganz aufgehoben. Der Antagonist alleine zeigte in beiden Konzentrationen keine signifikante Veränderung der Migrationsrate.

(A)



(B)

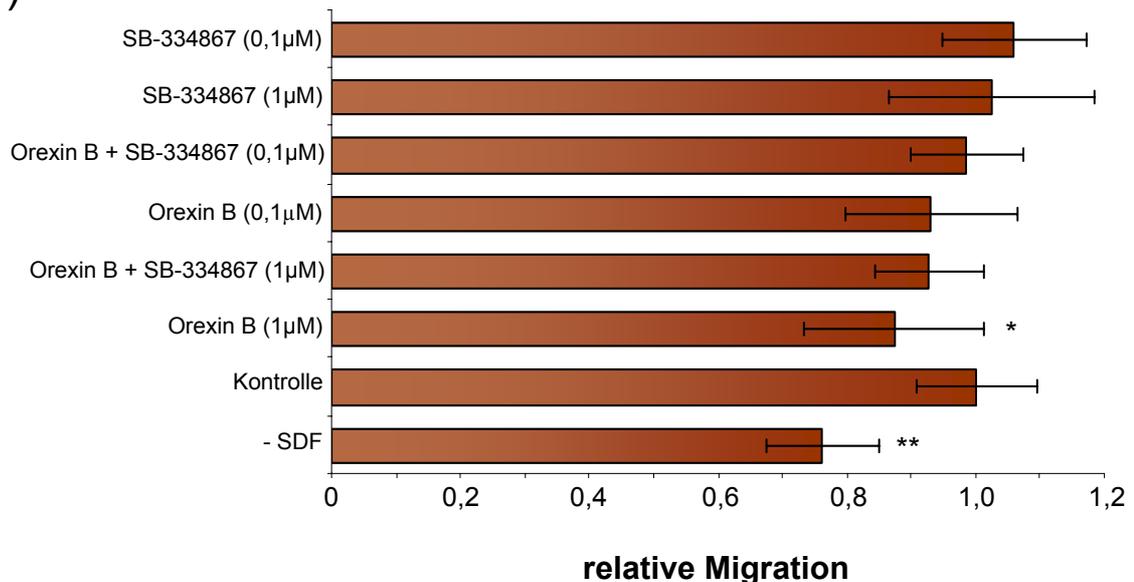


Abbildung 3.10: Hemmung der Migration durch Stimulation mit Orexin A oder Orexin B. CD34⁺ Zellen wurden mit Orexin A (A) oder Orexin B (B) alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 1 µM oder 0,1 µM inkubiert und in einen Transwell-Migrationsansatz mit SDF-1β-Stimulus eingesetzt. Nach 8 h wurde die Anzahl der Zellen in der unteren Kammer bestimmt und die Relation zu den migrierten Zellen in einem unstimulierten Ansatz (Kontrolle) dargestellt. Ein Ansatz ohne SDF-1β (-SDF) diente als Kontrolle für eine ungerichtete Migration. Mittelwert und Standardabweichung von 4 durchgeführten Experimenten im Doppelansatz sind angegeben. Die statistische Signifikanz der Ansätze mit den Orexinen oder dem Antagonisten alleine wurde in Bezug auf die Kontrolle ermittelt, die Signifikanz der Ansätze mit der Orexin-Antagonisten-Kombination in Bezug auf den zugehörigen Orexin-Ansatz mit der gleichen Konzentration (* p < 0,05; ** p < 0,001).

Insgesamt lässt sich anhand dieses Experimentes zeigen, dass die Migration von CD34⁺ Zellen durch Orexin A und Orexin B signifikant reduziert wird, wobei Orexin A einen etwas stärkeren Effekt vermittelt. Weiterhin kann der inhibierende Effekt unter Verwendung des Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 zwar verringert, aber nicht signifikant vermindert werden kann.

3.6 Orexin A und Orexin B hemmen das klonogene Wachstum

Die Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in alle Blut bildenden Zellen wird durch eine Reihe von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsmolekülen sowie die Interaktion der CD34⁺ Zellen mit zellulären Faktoren und Matrixkomponenten des Knochenmarkstromas bestimmt. Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Orexinen die Differenzierung von CD34⁺ Zellen verändert, setzten wir die Zellen in einen klonogenen Wachstumstest ein. Dazu wurden immunmagnetisch isolierte CD34⁺ Zellen in semisolidem Methylzellulosemedium mit oder ohne Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 inkubiert. Nach 2 Wochen konnte der Anteil der ausdifferenzierten BFU-E-Kolonien (Erythrozyten) und der CFU-GM-Kolonien (Granulozyten und Monozyten) ausgezählt und prozentual in Relation zur unstimulierten Kontrolle dargestellt werden.

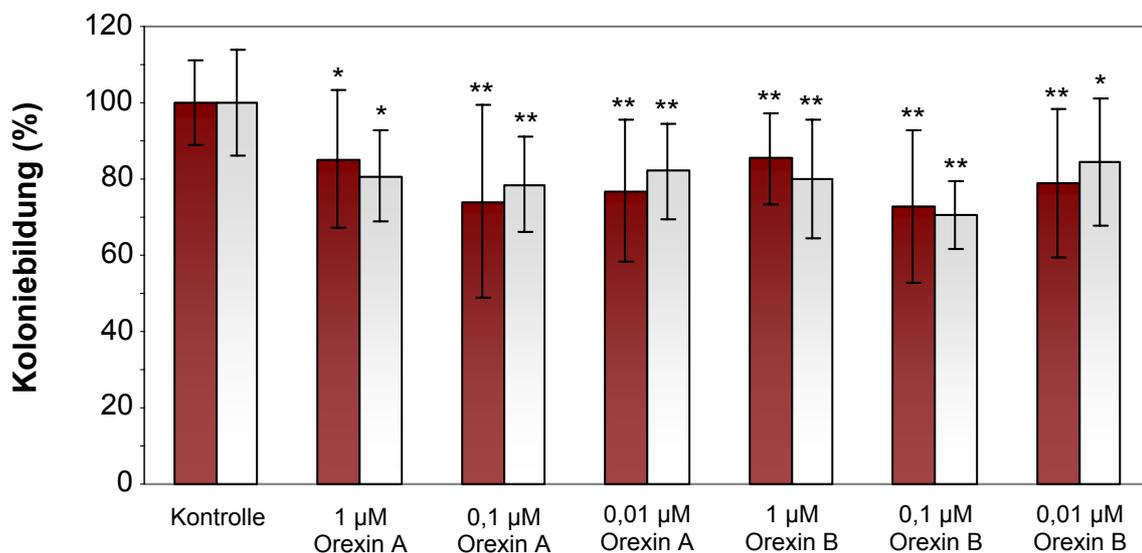


Abbildung 3.11: Hemmung des klonogenen Wachstums von humanen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen durch Orexin A und Orexin B. CD34⁺ Zellen wurden in semisolidem Methylzellulosemedium mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 1 µM, 0,1 µM oder 0,01 µM inkubiert. Nach 2 Wochen wurde die Anzahl der BFU-E-Kolonien (rot) und CFU-GM-Kolonien (weiß) ausgezählt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung von 4 durchgeführten Experimenten im Doppelansatz sind angegeben (* p < 0,05; ** p < 0,001).

Abbildung 3.11 zeigt zunächst die Effekte von Orexin A oder Orexin B auf die Bildung der Kolonien in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen 1 μM , 0,1 μM oder 0,01 μM . Wir konnten beobachten, dass eine Inkubation mit Orexin A oder Orexin B in allen drei Konzentrationen die Anzahl an BFU-E- und CFU-GM-Kolonien signifikant um 15% bis 30% reduziert. Dabei war die durch Orexin A und Orexin B vermittelte Hemmung der Kolonien in den jeweiligen Konzentrationen annähernd gleich und zeigte bei einer Konzentration von 0,1 μM den stärksten Effekt.

Zur detaillierten Auswertung sind in Abbildung 3.12 die Ergebnisse der kombinierten Inkubation mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 für die Konzentrationen 1 μM und 0,1 μM dargestellt. Mit Blick auf die BFU-E-Kolonien konnten wir beobachten, dass die durch 1 μM Orexin A oder Orexin B vermittelte Hemmung von 14,8% (SD \pm 18,1) und 14,7% (SD \pm 11,8) durch Kombination mit dem Antagonisten signifikant aufgehoben werden konnte. Die Hemmung der CFU-GM-Kolonien wurde in dieser Konzentration durch Zugabe des Antagonisten zwar verringert, aber nicht signifikant vermindert. So zeigte sich nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B eine um 19,2% (SD \pm 12,0) und 20,0% (SD \pm 15,3) signifikant reduzierte Koloniebildung, die in Kombination mit dem Antagonisten noch 5,2% (SD \pm 28,4) und 15,2% (SD \pm 22,7) betrug. Eine Inkubation mit 1 μM des Antagonisten oder DMSO zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Bildung der BFU-E- und CFU-GM-Kolonien (Abb.3.12 (A)).

Bei der geringeren Konzentration von 0,1 μM konnten wir beobachten, dass die Stimulation mit Orexin A oder Orexin B zu einer signifikanten Reduktion der BFU-E-Kolonien um 26,0% (SD \pm 25,4) und 27,1% (SD \pm 20,0) führte. Dieser Effekt wurde durch kombinierte Inkubation mit dem Antagonisten zwar auf 11,3% (SD \pm 13,1) und 13,8% (SD \pm 18,6) verringert, stellte aber dennoch keine signifikante Verminderung der Orexin-vermittelten Hemmung dar. Ebenso konnte auch die durch 0,1 μM Orexin A oder Orexin B um 21,6% (SD \pm 12,6) und 29,3% (SD \pm 9,3) reduzierte Bildung der CFU-GM-Kolonien in Kombination mit dem Antagonisten nicht signifikant verändert werden, sondern verminderte sich nur auf 13,5% (SD \pm 13,5) und 23,5% (SD \pm 9,0). Daneben führte auch eine alleinige Stimulation mit 0,1 μM des Antagonisten zu einer um 10,3% (SD \pm 14,1) und 11,9% (SD \pm 16,5) signifikanten Hemmung der BFU-E- und CFU-GM-Kolonien (Abb.3.12 (B)), während das Lösungsmittel DMSO keinen signifikanten Effekt zeigte.

Insgesamt konnten wir damit zeigen, dass Orexin A und Orexin B in den Konzentrationen 1 μM , 0,1 μM oder 0,01 μM die Bildung von BFU-E- und CFU-GM- Kolonien signifikant hemmt, wobei durch 0,1 μM der stärkste Effekt erzielt wird. Dieser inhibierende Effekt kann in den Konzentrationen 1 μM und 0,1 μM durch die Zugabe des Antagonisten zwar vermindert, aber größtenteils nicht signifikant verringert werden. Nur die durch 1 μM Orexin A

oder Orexin B vermittelte Hemmung der BFU-E-Kolonien wird durch kombinierte Inkubation mit dem Antagonisten signifikant aufgehoben.

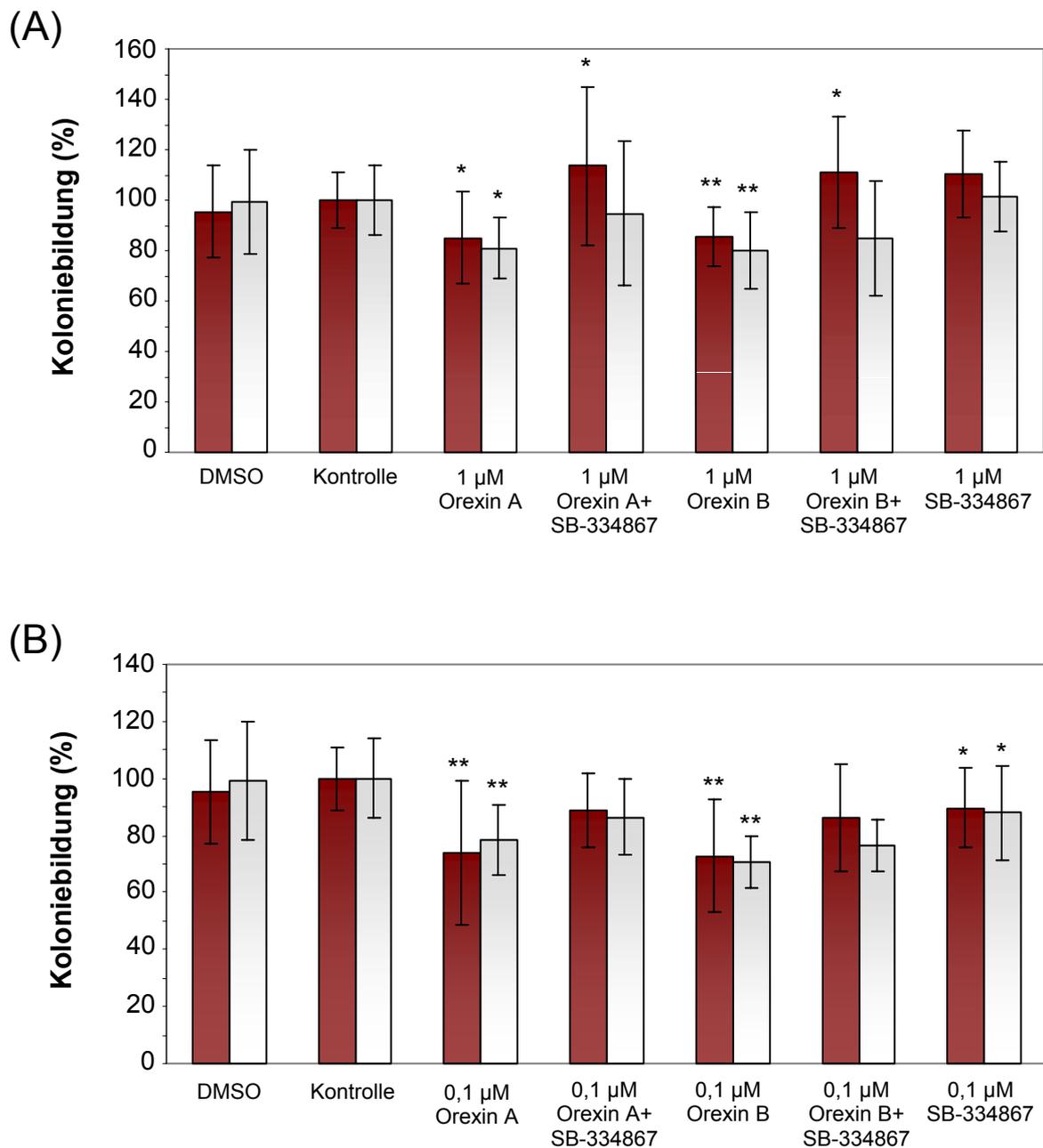


Abbildung 3.12: Verminderte Hemmung des klonogenen Wachstums durch kombinierte Inkubation mit Orexin A oder Orexin B und dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867. CD34⁺ Zellen wurden in semisolidem Methylzellulosemedium mit Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867 in den Konzentrationen 1 µM (A) oder 0,1 µM (B) inkubiert. Nach zwei Wochen wurde die Anzahl der BFU-E-Kolonien (rot) und CFU-GM-Kolonien (weiß) ausgezählt und in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung von 4 durchgeführten Experimenten im Doppelsatz sind angegeben. Die statistische Signifikanz der Ansätze mit den Orexinen oder dem Antagonisten alleine wurde in Bezug auf die Kontrolle ermittelt, die Signifikanz der Ansätze mit der Orexin-Antagonisten-Kombination in Bezug auf den zugehörigen Orexin-Ansatz mit der gleichen Konzentration (* p < 0,05; ** p < 0,001).

3.7 Orexine zeigen keinen Effekt auf die Proliferation

Im Rahmen der Hämatopoese spielt die Proliferation der Stammzellen bei der Selbsterneuerung eine wichtige Rolle. Zudem können die Stammzellen nur durch Proliferation dafür sorgen, dass sich immer eine ausreichende Zahl an differenzierten Zellen bildet. Um einen möglichen Effekt der Orexin-Rezeptor-Liganden Orexin A und Orexin B auf die Proliferation von $CD34^+$ Stamm- und Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden $CD34^+$ Zellen für 5 Tage in einem $CD34^+$ Zytokinmedium in einer Suspensionskultur inkubiert. Alle 24 h wurden die Zellen je nach Ansatz entweder mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ oder $0,1 \mu\text{M}$ stimuliert und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Aus dem Quotienten der Zellzahl des jeweiligen Tages und der Zellzahl vom Tag 0 konnte dann pro Tag und pro Ansatz der jeweilige Zellzahlindex bestimmt und graphisch dargestellt werden (Abb.3.13). Bei der Auswertung konnten wir beobachten, dass sich die Zellzahl in der Kontrolle nach 5 Tagen um den Faktor 7,28 ($SD \pm 2,98$) erhöhte, während eine Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ oder $0,1 \mu\text{M}$ Orexin A eine Steigerung um 7,52 ($SD \pm 4,79$) und 7,86 ($SD \pm 5,05$) zeigte. Die tägliche Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Orexin B führte zu einer um den Faktor 6,59 ($SD \pm 2,05$) erhöhten Zellzahl, während die Zugabe von $0,1 \mu\text{M}$ Orexin B eine Zunahme von 7,63 ($SD \pm 4,69$) bewirkte.

Somit konnten wir zeigen, dass die Stimulation mit Orexin A oder Orexin B keinen signifikanten Effekt auf das Proliferationsverhalten von kultivierten $CD34^+$ Stamm- und Vorläuferzellen hat.

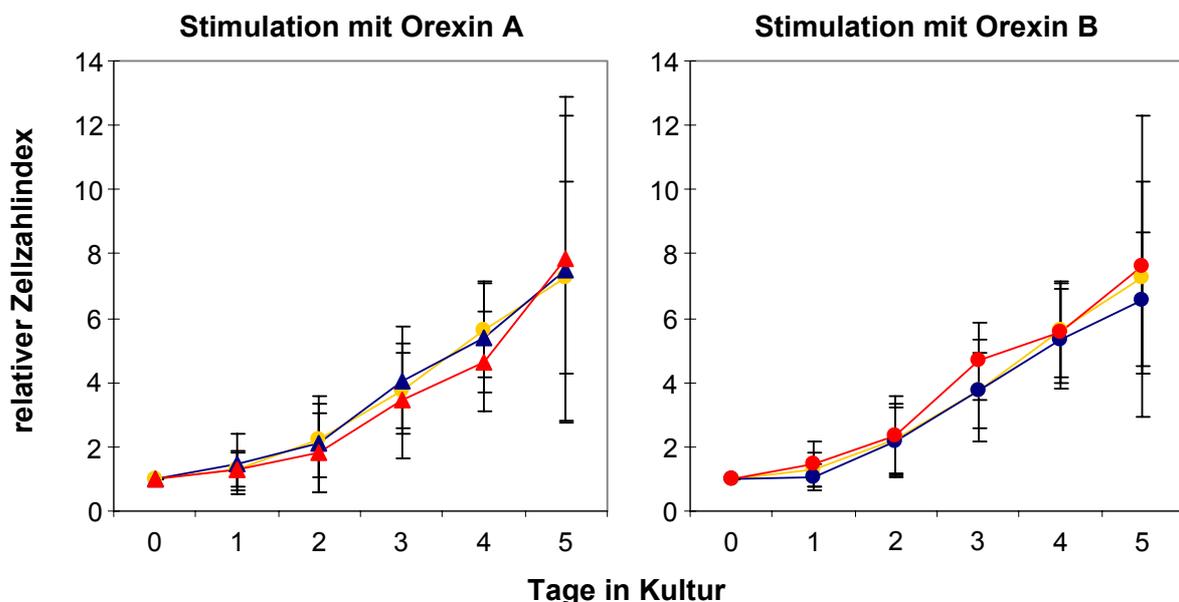


Abbildung 3.13: Relativer Zellzahlindex nach 5-tägiger Inkubation mit Orexin A oder Orexin B. Isolierte $CD34^+$ Zellen wurden für 5 Tage in Kultur mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ (▲ / ●) oder $0,1 \mu\text{M}$ (▲ / ●) inkubiert. Ein unbehandelter Ansatz diente als Kontrolle (●). Aus dem Quotienten der täglich bestimmten Zellzahl und der Zellzahl vom Tag 0 wurde der jeweilige Zellzahlindex bestimmt. Mittelwert und Standardabweichung von 5 durchgeführten Experimenten sind angegeben.

3.8 Orexine zeigen keinen Effekt auf die Apoptose

Da für die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in aktuellen Untersuchungen die Beteiligung an der Induktion von Apoptose in Kolonkarzinom- und Neuroblastom-Zelllinien beschrieben wird (Rouet-Benzineb et al., 2004), wollten wir den Einfluss der Orexin-Liganden auf das Apoptoseverhalten von CD34⁺ Zellen untersuchen. Dazu wurden immunmagnetisch isolierte CD34⁺ Zellen mit 1 μ M oder 0,1 μ M Orexin A oder Orexin B stimuliert und nach 24 h der Anteil an apoptotischen Zellen anhand einer Annexin V- und 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 3.14 zeigt repräsentativ das Ergebnis einer solchen durchflusszytometrischen Messung unter Angabe der Annexin V- und 7-AAD-positiven und -negativen Zellen.

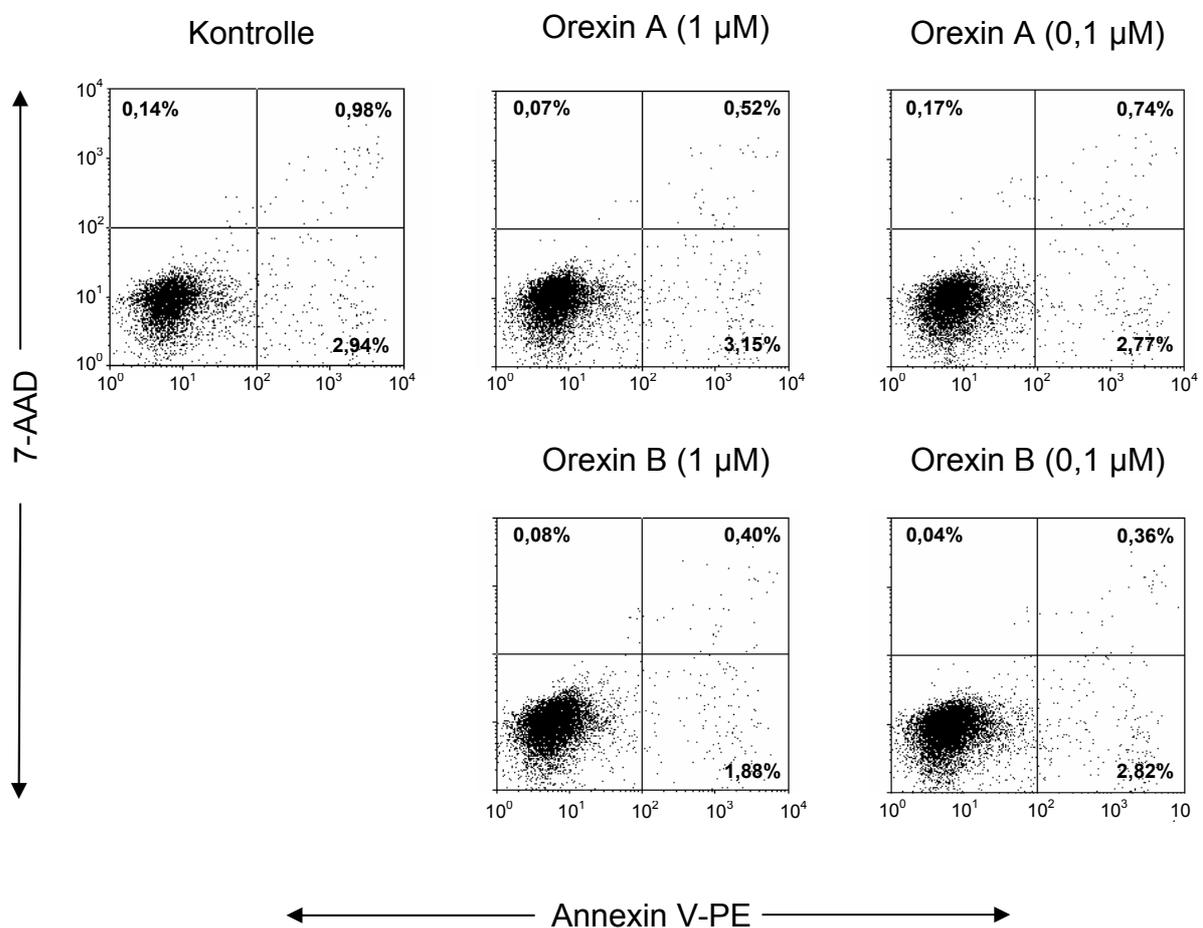


Abbildung 3.14: Bestimmung des Anteils an apoptotischen CD34⁺ Zellen nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B. Nach 24-stündiger Inkubation mit Orexin A oder Orexin B in den Konzentrationen 1 μ M oder 0,1 μ M wurde der Anteil an apoptotischen Zellen anhand einer Annexin V- und 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Durch die Aufteilung eines „Dot Plot“-Diagramms in vier Quadranten konnte der Anteil an Annexin V- und 7-AAD-positiven und -negativen Zellen prozentual ermittelt werden und ist für die jeweiligen Quadranten angegeben. Ein repräsentatives von 4 durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Da die Annexin V-positiven Zellen ein Maß für den Anteil an apoptotischen Zellen darstellen, ist die Summe der Annexin V-positiven Zellen für jeden Orexin-Ansatz und die unbehandelte Kontrolle in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

<u>Kontrolle</u>	Konzentration	<u>Orexin A</u>	<u>Orexin B</u>
3,19% ± 1,54	1 µM	2,65% ± 1,55	2,16% ± 0,79
	0,1 µM	3,06% ± 1,68	3,34% ± 2,5

Tabelle 3.1: Anteil der apoptotischen CD34⁺ Zellen nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B. Mittelwert und Standardabweichung von 4 durchgeführten Experimenten sind angegeben.

Wir konnten beobachten, dass der Anteil an apoptotischen Zellen in der Kontrolle nach einem Tag 3,19% (SD ± 1,54) betrug, während nach einer Stimulation mit 1 µM oder 0,1 µM Orexin A 2,65% (SD ± 1,55) und 3,06% (SD ± 1,68) der Zellen apoptotisch waren. Ein ähnlicher Anteil fand sich in den Orexin B-Ansätzen. Hier befanden sich 24 h nach Stimulation mit 1 µM oder 0,1 µM insgesamt 2,16% (SD ± 0,79) oder 3,34% (SD ± 2,5) der Zellen in einem apoptotischen Zustand. Somit zeigt eine Stimulation mit Orexin A oder Orexin B keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose von kultivierten CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen.

3.9 Transkriptionelle Veränderungen nach Orexin-Rezeptor-Stimulation

Anhand von Genexpressionsprofilen von Orexin-stimulierten CD34⁺ Zellen war es unser Ziel, Signalwege zu identifizieren, die durch eine Orexin-Rezeptor-Stimulation transkriptionell aktiviert oder gehemmt werden. Dazu wurden CD34⁺ Zellen von 5 verschiedenen Spendern für eine Stunde mit 1 µM Orexin A oder 0,1 µM Orexin B inkubiert und anschließend das Genexpressionsprofil im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle bestimmt. Dabei wurden alle Gene mit einem „Fold-Change“ $\geq 1,2$ und $\leq 0,83$ und einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich exprimiert akzeptiert.

Beim Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle fanden wir so im Orexin B-Ansatz insgesamt 44 von den insgesamt 8.746 Genen signifikant hochreguliert. Ein wesentlich stärkerer Effekt auf die Genexpression zeigte sich nach Stimulation mit Orexin A. Hier waren insgesamt 161 Gene differentiell exprimiert, davon 156 hochreguliert und 5 herunterreguliert. In Tabelle 6.1 (Anhang) sind alle signifikanten Gene aus den Orexin A- oder Orexin B-stimulierten Zellen mit ihrem „Fold-Change“ in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Zur detaillierten Auswertung wurden die signifikanten Gene aus den Orexin-Ansätzen anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion und unter Berücksichtigung der Zielsetzung dieser Arbeit in 9 funktionelle Gruppen eingeteilt:

- 1) Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34⁺ Zellen
- 2) Cytoskelett, Adhäsion und Migration
- 3) Calciumtransport
- 4) Glucose- und Lipidmetabolismus
- 5) Oxidativer Stress (Hypoxie)
- 6) Gene aus Orexin-exprimierenden Geweben
- 7) Proliferation und Apoptose
- 8) RAS/MAPK-Signalweg
- 9) weitere differentiell exprimierte Gene

Im Folgenden werden die wichtigsten signifikanten Gene aus den Gruppen anhand ihrer Funktion näher beschrieben und erläutert.

3.9.1 Selbsterneuerung und Differenzierung von CD34⁺ Zellen

Unter dem Aspekt der Fragestellung, ob Orexine einen Einfluss auf die Hämatopoese haben, konnten wir anhand der Genexpressionsdaten einige Gene identifizieren, die eine Rolle bei der Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen spielen. Die wichtigsten davon sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Es zeigte sich, dass Gene wie KIT, HOXA9 oder MYST3, für die eine Rolle bei der Erhaltung bzw. Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen beschrieben wird, nur nach Stimulation mit Orexin A hochreguliert waren.

In beiden Orexin-Ansätzen konnten wir allerdings Gene identifizieren, die in Bezug zu einer myeloiden Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen stehen. Während der größte Teil dieser Gene wie CBFA2T3, EGR1, HDC, JUND, CEBPA, CPNE3 und ID2 eine Differenzierung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen induziert, zeigen JMJD1B, YY1 und ARIH2 einen hemmenden Effekt auf die Ausbildung von CFU-GM Kolonien. Zudem wird die Genexpression von CEBPZ in myeloiden Leukämien als herunterreguliert (Qian et al., 2005) und das Genprodukt als negativer Regulator von CEBPA beschrieben (Lacasa et al., 2001).

Tabelle 3.2 (folgende Seite): Gene für die Selbsterneuerung und Differenzierung. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Funktion bei der Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoetischer CD34⁺ Zellen eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

Symbol	Genname	Funktion	Fold-Change	
Selbsterneuerung			Ox A	Ox B
HOXA9	homeo box A9	Selbsterneuerung (Lawrence et al., 2005)	1,28	
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	Selbsterneuerung (Yanai et al., 1995; Metcalf and Nicola, 1991)	1,31	
MYST3	MYST histone acetyltransferase 3	Selbsterneuerung (Katsumoto et al., 2006)	1,24	
Myeloide Differenzierung				
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	Differenzierung von Granulozyten (Ibanez et al., 2004)	1,27	
EGR1	early growth response 1	Differenzierung von Makrophagen (Krishnaraju et al., 2001)	1,22	
HDC	histidine decarboxylase	reguliert die myeloide Differenzierung (Dy et al., 1999)	1,24	
JUND	jun D proto-oncogene	myeloide Differenzierung (Lord et al., 1993)	1,40	1,21
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein, Ipha	Differenzierung von Granulozyten (Friedman et al., 2003)		1,22
CPNE3	copine III	Differenzierung von neutrophilen Granulozyten (Cowland et al., 2003)		1,47
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	Differenzierung von Monozyten und Granulozyten (Heinz et al., 2006)		1,26
JMJD1B	jumonji domain containing 1B	hemmt die Ausbildung von myeloiden Kolonien (Hu et al., 2001)	1,20	
YY1	YY1 transcription factor	hemmt die Ausbildung von CFU-GM Kolonien (Erkeland et al., 2003)	1,3	
ARIH2	ariadne homolog 2	hemmt die Ausbildung von myeloiden Kolonien (Marteijn et al., 2005)		1,28
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein zeta	negativer Regulator von CEBPA (Lacasa et al., 2001)	1,28	
Erythroide Differenzierung				
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	aktiviert die erythroide Proliferation (Fujiwara et al., 2006)	1,22	
HBB	hemoglobin, beta	Hämoglobinbestandteil (Forget, 1979)		1,21
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	stimuliert die frühe IL-3 induzierte Erythropoese (Bohmer, 2004)		1,22
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	inhibiert die EPO-Rezeptor-vermittelte Signalkaskade (Cohen et al., 2004)	1,23	
Lymphoide Differenzierung				
STAM	signal transducing adaptor molecule 1	Differenzierung von T-Lymphozyten (Yamada et al., 2002)	1,23	
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma	Differenzierung von Lymphozyten (Shultz et al., 2005)		1,29

Auch Gene zur Differenzierung von Erythrozyten sind in beiden Orexin-Ansätzen hochreguliert. So spielen die Gene NUSAP1, HBB und TGFB1 eine Rolle bei der Induktion der erythropoetischen Differenzierung, während PTPN1 die Signaltransduktion des durch EPO stimulierten EPO-Rezeptors hemmen kann. Zusätzlich zur myeloiden Differenzierung sind in den Orexin-Ansätzen auch die zwei Gene STAM und IL2RG hochreguliert, die eine Rolle bei der T-Zell-Entwicklung und somit bei der lymphoiden Differenzierung spielen. Insgesamt konnten wir nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B differentiell exprimierte Gene identifizieren, die in Bezug zur Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen stehen, wobei Gene, die eine Selbsterneuerung induzieren, nur nach Inkubation mit Orexin A hochreguliert waren.

3.9.2 Cytoskelett, Adhäsion und Migration

Neben der Selbsterneuerung und Differenzierung spielen die Zelladhäsion und das Migrationsverhalten der hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Hämatopoese. Dass auch Orexine einen Einfluss auf diesen Prozess haben und die Migration von CD34⁺ Zellen reduzieren, konnten wir im Rahmen dieser Arbeit schon in funktionellen Transwellexperimenten zeigen. In Übereinstimmung damit fanden wir nach Stimulation mit Orexin A differentiell exprimierte Gene mit einer Verbindung zum Cytoskelett, zur Adhäsion oder zum Migrationsverhalten von Zellen (Tab.3.3).

Zum einen wurde die Expression der Gene für die Aktin-bindenden Proteine ABLIM1, MACF1, TNS, VCL und MSN hochreguliert, die zur Stabilität des Cytoskeletts beitragen. So sind TNS und VCL als Bestandteil von fokalen Adhäsionen an der Kopplung der Zelle an die extrazelluläre Matrix beteiligt, während MACF1 die Bindung von Aktin mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten in der Zelle vermittelt und MSN als Bindeglied zwischen Aktin und der Plasmamembran das Cytoskelett der Zelle stabilisiert. Zudem wurde mit dem Gen GJA10 ein Bestandteil der Gap-Junctions überexprimiert, der durch die Protein-Phosphatase PPP1CB dephosphoryliert und dadurch deaktiviert werden kann.

In Bezug auf das Migrationsverhalten wurden durch Orexin A Gene hochreguliert, für die ein hemmender Effekt in diese Richtung beschrieben wird. So kann CAST als Inhibitor von Calpain-Proteasen durch Stabilisierung der fokalen Adhäsionen eine verminderte Ablösung von der extrazellulären Matrix und dadurch eine verminderte Migration bewirken. Auch die Überexpression der Gene NISCH, PNN und PTPN12 führt zu einem reduzierten Migrationsverhalten, während die Bindung des von Endothelzellen und Osteoblasten sezernierten SDF-1 an seinen Rezeptor CXCR4 die Stammzellen im Knochenmark hält (Katayama et al., 2006; Semerad et al., 2005; Ponomaryov et al., 2000).

Damit werden durch Orexin A-Stimulation in CD34⁺Zellen zum einen Gene hochreguliert, die die Zelladhäsion stabilisieren, und zum anderen Gene, die einen reduzierenden Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen zeigen.

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change
Aktin-bindende Proteine			OxA
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	Aktin-bindendes Protein (Roof et al., 1997)	1,29
MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1	Aktin- und Mikrotubuli-bindendes Protein (Kodama et al., 2003)	1,23
TNS	tensin	Bestandteil von fokalen Adhäsionen (Chen et al., 2000)	1,21
VCL	vinculin	Bestandteil von fokalen Adhäsionen (Geiger et al., 1980)	1,22
MSN	moesin	Bindeglied zwischen Plasmamembran und Aktin-Cytoskelett	1,23
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	Bestandteil von Gap-Junctions (Fishman et al., 1991)	1,21
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	dephosphoryliert GJA1 in Gap-Junctions (Chen et al., 2004)	1,20
Hemmung der Migration			
CAST	calpastatin	Inhibitor von Calpain-Proteasen (Bhatt et al., 2002)	1,20
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Bindung mit SDF-1 hält Stammzellen im Knochenmark (Kim and Broxmeyer, 1998)	1,37
NISCH	nischarin	hemmt die migrationsfördernde PAK-Kinase (Alahari et al., 2004)	1,24
PNN	pinin, desmosome associated protein	stabilisiert die Zelladhäsion (Joo et al., 2005; Shi et al., 2000)	1,37
PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	reduziert die Migration von Fibroblasten (Sastry et al., 2002)	1,23

Tabelle 3.3: Gene für Cytoskelett, Adhäsion und Migration. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Funktion für die Regulation des Cytoskeletts, der Adhäsion und des Migrationsverhaltens eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

3.9.3 Calciumtransport

Sowohl in der Literatur als auch in den experimentellen Untersuchungen im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, dass die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration (Ammoun et al., 2006a; Lund et al., 2000) ein Haupteffekt des zellulären Orexin-Signalling darstellt. So fanden wir auch in unseren Genexpressionsdaten differentiell exprimierte Gene mit einer Rolle im G-Protein-vermittelten Signalweg zur Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration (Tab.3.4).

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change	
Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration			Ox A	Ox B
GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	aktiviert die PLC β (Dong et al., 1995)	1,24	
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	aktiviert die PLC β (Evellin et al., 2002)	1,21	
PLCB4	phospholipase C, beta 4	hydrolysiert PIP ₂ zu DAG und IP3 (Lyu et al., 1996)	1,20	
PIP5K1B	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	katalysiert PIP zu PIP ₂ (Tolias et al., 1998)	1,31	
ITPR2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	aktiviert Calcium-freisetzende Kanäle im ER (Yamamoto-Hino et al., 1994)	1,30	
PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	phosphoryliert und aktiviert den ITPR2-Rezeptor (Wojcikiewicz and Luo, 1998)	1,22	
IMPA	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	katalysiert IP zu Inositol (McAllister et al., 1992)	1,32	
Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration				
ATP2A2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Ca ²⁺ -Transport aus dem Cytosol ins ER (Vangheluwe et al., 2005)	1,34	1,26
ATP2B4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	Ca ²⁺ -Transport aus dem Cytosol in den Extrazellulärraum (Brandt et al., 1992)	1,29	
ATP2C1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1	Ca ²⁺ -Transport aus dem Cytosol in den Golgi-Apparat (Hu et al., 2000)	1,22	
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	dephosphoryliert und inaktiviert den ITPR2-Rezeptor (DeSouza et al., 2002)	1,20	

Tabelle 3.4: Gene zur Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden anhand ihres regulatorischen Effekts auf die intrazelluläre Calciumkonzentration eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

Abbildung 3.15 zeigt schematisch die Funktion der ermittelten signifikanten Gene. Dabei lassen sich einige Gene anhand ihrer Position in der Signalkaskade zur Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration mit einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in Verbindung bringen. So kann sowohl GNAQ als α -Untereinheiten der Gq-Proteine als auch RAP2B als GTPase die Phospholipase PLC β aktivieren, die unter anderem durch das Gen PLCB4 kodiert wird. Die PLC β wiederum hydrolysiert das durch die Kinase PIP5K1B synthetisierte PIP₂ zu DAG und IP3. Das ebenso durch Orexin A hochregulierte Gen ITPR2 kodiert einen IP3-Rezeptor im ER, der durch Bindung von IP3 aktiviert wird und Calciumionen aus dem ER ins Cytosol freigibt. Zudem ist die von dem Gen PRKAR2B kodierte Untereinheit ein Bestandteil der cAMP-abhängigen Proteinkinase, die den ITPR2-Rezeptor phosphoryliert und dadurch seine Aktivität noch erhöhen kann.

In einer antagonistischen Wirkung reduzieren die von den Genen ATP2A2, ATP2B4 und ATP2C1 kodierten ATPasen die intrazelluläre Calciumkonzentration, indem sie die Calciumionen aus dem Cytosol in den extrazellulären Raum (EZR), das ER oder den Golgi-Apparat transportieren. Zudem kann die Phosphatase PPP1CB die IP3-Rezeptor-vermittelte Calciumfreigabe aus dem ER hemmen.

Somit konnten wir zeigen, dass in CD34⁺ Zellen durch Orexin A oder Orexin B Gene zur Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration induziert werden. Dabei sind in Orexin A-stimulierten Zellen sowohl Calcium-erhöhende als auch Calcium-reduzierende Gene involviert, während in Orexin B-stimulierten Zellen nur eine Calcium-vermindernde ATPase hochreguliert wird.

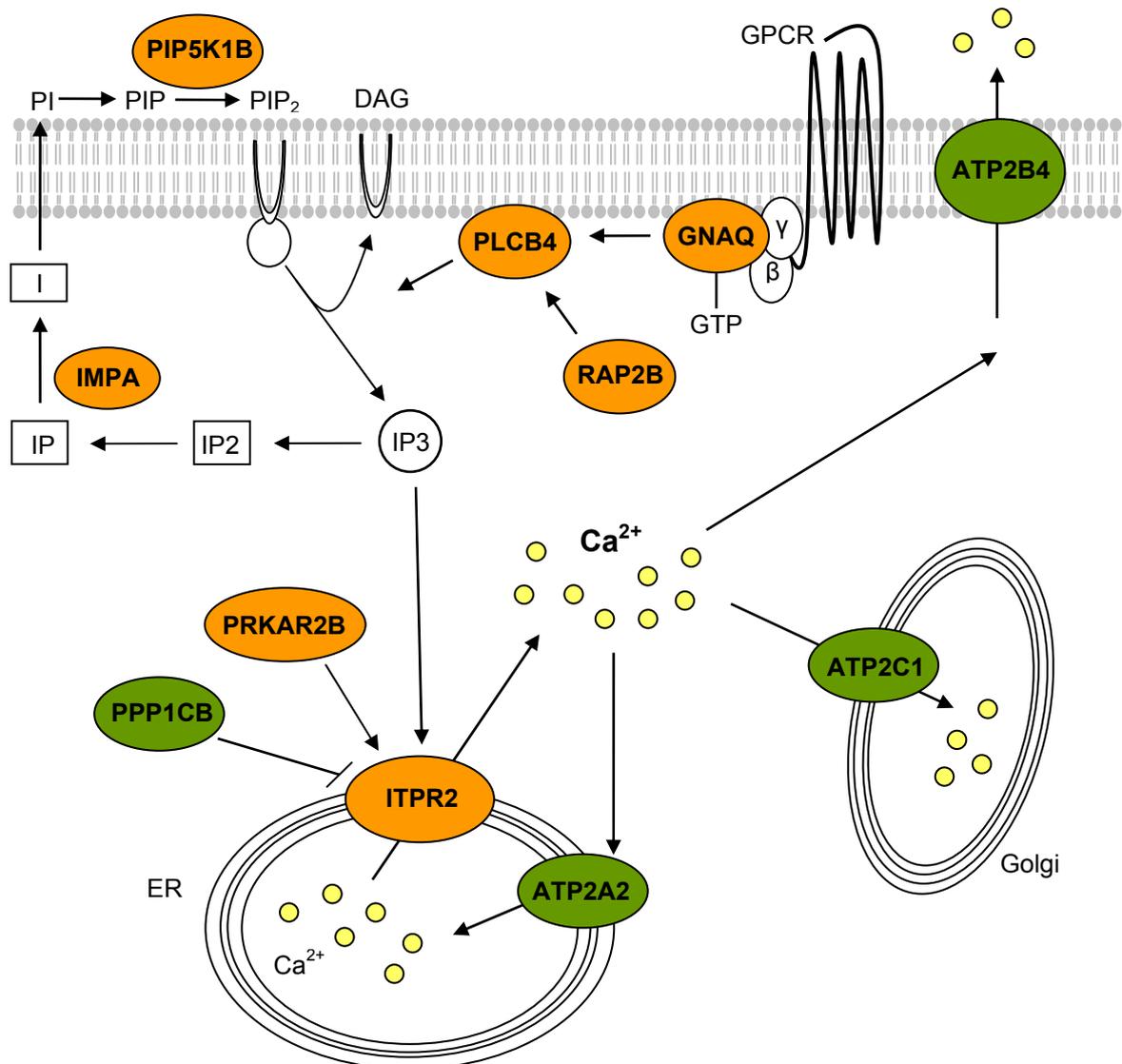


Abbildung 3.15: Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration. Die signifikanten Gene aus den Orexin A- und Orexin B- Ansätzen werden in Bezug auf ihre Beteiligung an der Erhöhung (orange) oder Reduktion (grün) der intrazellulären Calciumkonzentration dargestellt. PI: Phosphatidylinositol; PIP: Phosphatidylinositol-4-phosphat; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat; DAG: Diacylglycerin; IP₂: Inositoldiphosphat; IP: Inositolmono-phosphat; I: Inositol; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor

3.9.4 Glucose- und Lipidmetabolismus

In ersten Untersuchungen zu systemischen Effekten von Orexin und seinen Rezeptoren wurde zunächst ein Appetit-stimulierender Effekt der Orexine beschrieben (Sakurai et al., 1998). Und auch im Laufe der letzten Jahre gab es weitere Hinweise auf den Einfluss des orexinergen Systems auf die Nahrungsaufnahme und den Zellmetabolismus (Digby et al., 2006; Tsuneki et al., 2002). In diesem Zusammenhang konnten wir durch Stimulation mit Orexin eine Reihe von hochregulierten Genen identifizieren, die im zellulären Glucosemetabolismus involviert sind (Tab.3.5).

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change	
			Ox A	Ox B
Glucosemetabolismus			Ox A	Ox B
APPL	adaptor protein containing pH domain, PTB domain and leucine zipper motif 1	vermittelt den Adiponektin-induzierten Glucose-Uptake (Mao et al., 2006)	1,22	
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	stimuliert den Glucose-Uptake (Fujishiro et al., 2001)	1,24	
ACLY	ATP citrate lyase	katalysiert die Synthese von Acetyl-CoA und Oxalacetat (Elshourbagy et al., 1992)	1,30	
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	katalysiert die Reaktion von Fructose-2,6-biphosphat zu Fructose-6-Phosphat	1,22	
PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	aktiviert PFKFB3	1,22	
HK1	hexokinase 1	katalysiert die Reaktion von Glucose zu Glucose-6-Phosphat	1,24	
RANBP2	RAN binding protein 2	aktiviert die Hexokinase 1 (Aslanukov et al., 2006)	1,23	
PHKB	phosphorylase kinase, beta	stimuliert die Reaktion von Glykogen zu Glucose-1-Phosphat	1,21	
AGL	amylase-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucoamylase	katalysiert die Reaktion von Glykogen zu Glucose	1,29	
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	an der Glykogen-Synthese beteiligt (Doherty et al., 1998)	1,2	
SGKL	serum/glucocorticoid regulated kinase-like	an der Glykogen-Synthese beteiligt (Dai et al., 2002)		1,31
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	hemmt den Insulin-induzierten Glucose-Uptake (Lam et al., 2004)	1,23	

Tabelle 3.5: Gene des Glucosemetabolismus. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Beteiligung am Glucosemetabolismus eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

Während eine Überexpression der Gene APPL und MAP2K3 in Adipozyten zu einer erhöhten Glucoseaufnahme führt und ACLY eine Rolle bei der Gluconeogenese spielt,

fördern PHKB und AGL den intrazellulären Abbau von Glycogen zu Glucose. Zudem kodieren die Gene PFKFB3, PRKAR2B, HK1 und RANBP2 glykolytische Proteine, die am ATP-gewinnenden Abbau der Glucose beteiligt sind. Dazu im Gegensatz werden mit PPP1CB und SGKL zwei Gene der Glycogensynthese hochreguliert, während die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTPN1 als negativer Regulator der Insulin-stimulierenden Glucoseaufnahme beschrieben wird.

Neben der Regulation des Glucosemetabolismus fanden wir auch in Verbindung mit dem Lipidmetabolismus differentiell exprimierte Gene (Tab.3.6). So induziert die ATP-Citrat-Lyase ACSL4 die Aktivierung der Fettsäuren für die β -Oxidation und den dadurch vermittelten Abbau. Auch die Gene CEBPZ, CEBPA, PPARBP und TGFB1 werden in Verbindung mit dem Lipidmetabolismus beschrieben. Während CEBPA und PPARBP eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Adipozyten spielen, wird die CEBPA-induzierte Adipogenese durch den in Preadipozyten hochregulierten CEBPA-Inhibitor CEBPZ gehemmt. Auch TGFB1 vermittelt einen hemmenden Effekt auf die Adipozyten-Differenzierung, während die Protein-Tyrosine-Phosphatase PTPN1 die Leptin-Produktion von Adipozyten reguliert und möglicherweise eine Rolle bei der Leptin-Resistenz spielt.

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change	
Lipidmetabolismus			Ox A	Ox B
ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt	1,25	1,21
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein zeta	Inhibitor von CEBPZ (Lacasa et al., 2001)	1,28	
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein, alpha	an der Adipozyten-Differenzierung beteiligt (Rosen, 2005)		1,22
PPARBP	PPAR binding protein	an der Adipozyten-Differenzierung beteiligt (Rosen, 2005)		1,28
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	hemmt die Adipogenese (Zhou et al., 2005; Petruschke et al., 1994)		1,22
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	reguliert die Leptinproduktion von Adipozyten (Bence et al., 2006)	1,23	

Tabelle 3.6: Gene des Lipidmetabolismus. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Beteiligung am Lipidmetabolismus eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

Insgesamt konnten wir somit in CD34⁺ Zellen nach Orexin A- oder Orexin B-Stimulation Gene identifizieren, die am Glucosemetabolismus beteiligt sind, als auch Gene, die eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen und die Differenzierung von Adipozyten regulieren.

3.9.5 Oxidativer Stress (Hypoxie)

Als Antwort auf oxidativen Stress im Blut oder Gewebe wird in den betroffenen Zellen eine Signalkaskade aktiviert, die vor allem über das Hypoxie-induzierte Protein HIF1A vermittelt wird. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1A ubiquitiniert und degradiert. Vermindert sich die Sauerstoffkonzentration im Gewebe, führt dies zur Aktivierung von HIF1A, das dann als Transkriptionsfaktor eine Reihe von Genen reguliert, um die Zelle dem Sauerstoffmangel anzupassen. In Zusammenhang mit der Aktivierung dieser hypoxisch-induzierten Signalkette fanden wir auch in den Orexin-stimulierten CD34⁺ Zellen eine Reihe von Genen hoch- bzw. herunterreguliert (Tab.3.7).

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change	
Gene im HIF1A Signalweg			Ox A	Ox B
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor (Semenza et al., 1997)	1,33	
PSMA7	proteasome subunit, alpha type, 7	inhibiert HIF1A (Cho et al., 2001)	0,79	
UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	stabilisiert HIF1A (Jung et al., 2006)		1,24
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	Protein im p38-MAPK Signalweg	1,24	
MAP4K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Protein im p38-MAPK Signalweg	1,2	
SPAG9	sperm associated antigen 9	Protein im p38-MAPK Signalweg (Lee et al., 2002)	1,29	
HIF1A-induzierte Gene				
VEGF	vascular endothelial growth factor	vermittelt die Gefäßbildung (Forsythe et al., 1996)	1,21	
HYOU1	HIF upregulated Gen	an der VEGF-Sekretion beteiligt (Ozawa et al., 2001)		1,21
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase	Enzym der Glykolyse	1,22	
HK1	hexokinase 1	Enzym der Glykolyse	1,24	
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	durch HIF1A und VEGF induziert (Zagzag et al., 2006)	1,37	
BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	vermittelt die HIF1A-induzierte Hemmung der Adipogenese (Yun et al., 2002)	1,29	
PRDX1	peroxiredoxin 1	vermittelt einen antioxidativen Effekt (Neumann et al., 2003; Ishii et al., 1993)	0,81	

Tabelle 3.7: Gene der oxidativen Stress-Signalkaskade. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Beteiligung an der oxidativen Stress-Signalkaskade eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

So ist PSMA7 unter normoxischen Bedingungen an der Degradation von HIF1A beteiligt und vermindert seine transkriptionelle Aktivität, während UBE2S den Transkriptionsfaktor stabilisiert. Durch oxidativen Stress kann HIF1A sowohl über den p38-MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) Signalweg (Emerling et al., 2005) als auch über den PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) Signalweg (Mottet et al., 2003) aktiviert werden und seine Effektoren induzieren. Dabei kommt es unter anderem zu einer erhöhten Expression des Wachstumsfaktors VEGF und einer HYOU-vermittelten Sekretion von VEGF, was eine stärkere Gefäßbildung induziert. Zudem führt eine HIF1A vermittelte Expression von glykolytischen Enzymen wie der Hexokinase 1 (HK1) (Semenza, 2000) und der 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFK2) (Obach et al., 2004) zu einer gesteigerten Glykolyse-Fähigkeit. Weitere HIF1A-induzierte Gene wie CXCR4 oder BHLHB2 vermitteln als Antwort auf oxidativen Stress die Migration und Adhäsion von Tumorzellen (Liu et al., 2006) oder hemmen die Ausdifferenzierung von Adipozyten (Yun et al., 2002). Interessanterweise fanden wir die Expression des antioxidativen Enzyms Peroxiredoxin 1 (PRDX1) (Ishii et al., 1993) nach Stimulation mit Orexin A herunterreguliert.

So zeigte sich, dass in CD34⁺ Zellen nach einer Orexin-Stimulation Gene der Hypoxie-induzierten und HIF1A-regulierte Stress-Antwort differentiell exprimiert werden.

3.9.6 Gene aus Orexin-exprimierenden Geweben

Da das Vorkommen von Orexin-Rezeptoren und ihren Liganden nicht nur auf das Gehirn beschränkt ist, sondern ihre Expression auch für anderen Gewebetypen wie den Pankreas, die Schilddrüse oder die Hoden beschrieben wird (Nakabayashi et al., 2003; Nowak et al., 2000), haben wir die signifikanten Gene auf ihre funktionelle Rolle in Orexin-exprimierenden Geweben untersucht. Dabei konnten wir einige Gene mit einem Bezug zum Gehirn und Nervensystem identifizieren (Tab.3.8).

So wird für die Gene CSK, HYOU1, ID2, NAP1L3, STAM und TRIM44 eine Beteiligung an der Differenzierung und Entwicklung des Gehirns beschrieben. Andere Gene sind vor allem in der Weiterleitung von neuronalen Signalen involviert. Während ACLY in Nervenzellen an der Bildung des Neurotransmitters Acetylcholin und ALDH5A1 am Abbau des inhibitorischen Neurotransmitters GABA beteiligt sind, spielt SDFR1 eine Rolle bei der synaptischen Übertragung von Nervensignalen im Hippocampus. Das Gen ATP1B1 hingegen kodiert für die Natrium-Kalium ATPase, die die Ionenkonzentrationen von Nervenzellen aufrechterhält und den Konzentrationsgradienten nach einem Aktionspotential wieder herstellt. Des Weiteren wird im Zusammenhang mit dem Nervensystem auch die Expression von CXCR4 in Astrozyten und Neuronen beschrieben (Bajetto et al., 1999) und ein proliferationsfördernder Effekt des CXCR4-Rezeptorliganden SDF-1 in Astrozyten gezeigt

(Bonavia et al., 2003). Neben den neuronal-bezogenen Genen fanden wir auch Gene, die in einer hormonellen Signalkaskade involviert sind. So spielen C1D und TRIP12 eine Rolle als Corepressor des Thyroid-Hormonrezeptors in der Schilddrüse, während SMS und SPAG9 an der Spermasynthese beteiligt sind.

Wir konnten also zeigen, dass durch Stimulation von CD34⁺ Zellen mit Orexinen einige Gene hochreguliert werden, denen auch in anderen Orexin-exprimierenden Geweben wie dem Nervensystem, der Schilddrüse oder den Hoden eine funktionelle Rolle zugeschrieben wird.

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change	
Neuronale Funktion			Ox A	Ox B
CSK	c-src tyrosine kinase	reguliert die neuronale Differenzierung (Dey et al., 2005)	1,29	
HYOU1	hypoxia up-regulated 1	am Überleben von Neuronen beteiligt (Kuwabara et al., 1996)		1,21
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	reguliert die Differenzierung von Oligodendrozyten (Wang et al., 2001b)		1,26
NAP1L3	nucleosome assembly protein 1-like 3	an der Entwicklung des Gehirns beteiligt (Shen et al., 2001)	1,24	
STAM	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1	am Überleben von Neuronen beteiligt (Yamada et al., 2001)	1,23	
TRIM44	tripartite motif-containing 44	an der Entwicklung des Gehirns beteiligt (Boutou et al., 2001)	1,36	
ACLY	ATP citrate lyase	an der Acetylcholin-Bildung beteiligt (Beigneux et al., 2004)	1,30	
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	katalysiert den Abbau von GABA (Gibson et al., 1983)	1,28	
SDFR1	stromal cell derived factor receptor 1	an der synaptischen Übertragung im Hippocampus beteiligt (Empson et al., 2006)	1,31	
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ -transporting, beta 1 polypeptide	kodiert eine Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (Kawakami et al., 1986)		1,34
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	induziert die Proliferation von Astrozyten (Bonavia et al., 2003)	1,37	
Hormonelle Funktion				
TRIP12	thyroid hormone receptor interactor 12	Corepressor des Thyroid-Hormon-Rezeptors (Lee et al., 1995)	1,29	
C1D	nuclear DNA-binding protein	Corepressor des Thyroid-Hormon-Rezeptors (Zamir et al., 1997)	1,31	
SMS	spermine synthase	an der Spermasynthese beteiligt (Wang et al., 2004)	1,22	
SPAG9	sperm associated antigen 9	kodiert ein Sperma-assoziiertes Antigen (Shankar et al., 1998)	1,29	

Tabelle 3.8: Gene aus Orexin-exprimierenden Geweben. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf Funktion in Orexin-exprimierenden Geweben eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

3.9.7 Proliferation und Apoptose

Neben der Differenzierung spielt vor allem die Teilung und Vermehrung von Stammzellen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Hämatopoese. Da die Zellvermehrung jedoch ein komplexes Wechselspiel ist, das durch Proliferation und Apoptose reguliert wird, untersuchten wir die differentiell exprimierten Gene in Bezug auf ihre Funktion bei diesen Vorgängen. In diesem Zusammenhang konnten wir nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende Gene (Tab.3.9) und zudem apoptoseinduzierende Gene identifizieren (Tab.3.10).

Dabei zeigten sich größtenteils Gene differentiell exprimiert, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Zellzyklus spielen. Neben dem G1/S-Phase-regulierenden Zellzyklusgen CCNE2 waren vor allem Gene hochreguliert, die wie BANF1, CSPG6, SMC1L1 und TTK direkt im Mitoseablauf involviert sind oder wie BUB1, KIF4A und KIF11 für den korrekten Ablauf der Mitose erforderlich sind. Zudem konnten wir Gene identifizieren, die DNA-Reparaturproteine oder Replikationsenzyme kodieren. So zeigte sich eine erhöhte Genexpression von TDG und PPP4C sowie der DNA-Polymerase POLA und der Topoisomerase II TOP2A. Des Weiteren fanden wir das Gen ID2 hochreguliert, für das schon in Zellkulturexperimenten ein proliferationsfördernder Effekt beschrieben wurde, während das antiproliferative Gen Prohibitin (PHB) herunterreguliert war.

In der Gruppe der proliferationshemmenden Gene zeigte sich eine erhöhte Expression von BRD4, CEBPA, HIRA und MS4A3, die im Zellzyklusarrest involviert sind. Mit Ausnahme von MS4A3 waren diese Gene nur nach Stimulation mit Orexin B differentiell exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden nach Inkubation mit Orexin A die Gene JARID2 und TAX1BP3 hochreguliert, deren proliferationshemmender Effekt schon in Zellkulturexperimenten beschrieben wurde.

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change	
Proliferationsfördernd			Ox A	Ox B
CCNE2	cyclin E2	bindet an CDK2 und reguliert den G1/S-Phase-Übergang (Lauper et al., 1998)	1,21	
BANF1	barrier to autointegration factor 1	in der Mitose mit den Chromosomen assoziiert (Dechat et al., 2004)		1,34
CSPG6	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	Teil des Cohesin-Komplexes (Losada and Hirano, 2005)	1,31	
SMC1L1	SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like1 (yeast)	Teil des Cohesin-Komplexes (Losada and Hirano, 2005)	1,38	
TTK	TTK protein kinase	an der Duplikation des Centrosoms beteiligt (Fisk et al., 2003)	1,25	
BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	kontrolliert den Spindelcheckpoint (Taylor et al., 2001)	1,24	
KIF4A	kinesin family member 4A	an der korrekten Spindelbildung beteiligt (Kurasawa et al., 2004)	1,21	
KIF11	kinesin family member 11	an der korrekten Spindelbildung beteiligt (Blangy et al., 1995)	1,25	
TDG	thymine-DNA glycosylase	an der DNA-Reparatur beteiligt (Cortazar et al., 2006)	1,30	
PPP4C	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	an der DNA-Reparatur beteiligt (Cohen et al., 2005)		1,23
POLA	polymerase (DNA directed), alpha	Untereinheit der DNA-Polymerase	1,24	
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	reguliert die DNA-Konformation während der Replikation	1,25	
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	hebt den antiproliferativen Effekt des Tumorsuppressorgens RB auf (Iavarone et al., 1994)		1,26
PHB	prohibitin	vermittelt einen antiproliferativer Effekt (Mishra et al., 2005)	0,79	
Proliferationshemmend				
BRD4	bromodomain containing 4	induziert den Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase (Maruyama et al., 2002)		1,30
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	inhibiert CDK2 und CDK4 (Wang et al., 2001a)		1,22
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	induziert den Zellzyklusarrest in der S-Phase (Hall et al., 2001)		1,34
MS4A3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3	induziert den Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase (Donato et al., 2002)	1,28	
JARID2	Jumonji, AT rich interactive domain 2	inhibiert die Proliferation (Toyoda et al., 2000)	1,24	
TAX1BP3	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	inhibiert die Proliferation (Kanamori et al., 2003)	1,21	

Tabelle 3.9: Gene für die Proliferation. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Funktion bei der Proliferation eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

In Zusammenhang mit Zellvermehrung und Apoptose fanden wir neben dem proapoptotischen Gen TP53 noch weitere apoptoseinduzierende Gene wie PAWR, PRKDC oder C1D hochreguliert. Auch MCP und ADAM10, deren erhöhte Expression mit dem Ereignis der Apoptose korreliert, waren verstärkt exprimiert. Dazu im Gegensatz zeigte sich das antiapoptotische Gen HSPA1A herunterreguliert.

Insgesamt fanden sich also nach Stimulation mit Orexin A oder Orexin B sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende und apoptosinduzierende Gene mit einer differentiellen Expression.

Symbol	Gename	Funktion	Fold Change	
Apoptoseinduzierend			Ox A	Ox B
TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	induziert Apoptose (Polyak et al., 1997)	1,24	
PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	induziert Apoptose (Gurumurthy and Rangnekar, 2004)		1,33
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	induziert Apoptose (Rothbarth et al., 1999)	1,34	
C1D	nuclear DNA-binding protein	induziert Apoptose über die DNA –PK (Rothbarth et al., 1999)	1,31	
MCP	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	MCP-Freigabe korreliert mit Apoptose (Hakulinen and Keski-Oja, 2006)	1,25	
ADAM10	a disintegrin and metalloproteinase domain 10	reguliert die Freigabe von MCP (Hakulinen and Keski-Oja, 2006)	1,2	
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	vermittelt einen antiapoptotischer Effekt (Steel et al., 2004)	0,80	

Tabelle 3.10: Gene für die Apoptose. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Funktion bei der Apoptose eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

3.9.8 RAS/MAPK-Signalweg

Da in aktuellen Untersuchungen an transfizierten CHO-Zellen eine Verbindung der Orexin-Rezeptor-1-Aktivierung mit der p38-MAPK-vermittelten Signalkaskade beschrieben wurde (Ammoun et al., 2006b), wollten wir anhand der Genexpressionsanalysen Hinweise darauf bekommen, welche zellulären Signalwege an einem Orexin-vermittelten Effekt in CD34⁺ Zellen beteiligt sind. Aus diesem Grund analysierten wir die differentiell exprimierten Gene in Bezug auf bekannte intrazelluläre Signalkaskaden. In diesem Zusammenhang fanden wir nach Stimulation mit Orexin A einige Gene aus dem RAS/MAPK-Signalweg hochreguliert (Tab.3.11)

Symbol	Genname	Funktion	Fold Change OxA
RAP2C	member of RAS oncogene family	Rap-GTPase (Paganini et al., 2006)	1,24
RAP2B	member of RAS oncogene family	Rap-GTPase (Bokoch, 1993)	1,21
RRAGD	Ras-related GTP binding D	Ras-GTPase (Sekiguchi et al., 2001)	1.20
RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	GEF für Ras-GTPase (Stone, 2006)	1,29
RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	GEF für Rap-GTPase (Kuiperij et al., 2003)	1,26
G3BP2	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	bindet und aktiviert Ras-GAP (Parker et al., 1996)	1,21
RANBP2	RAN binding protein 2	bindet und aktiviert Ran-GAP (Yokoyama et al., 1995)	1,23
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	aktiviert die p38-MAPK (Enslin et al., 1998)	1.24
RREB1	ras responsive element binding protein 1	Ras/Raf aktivierter Transkriptionsfaktor (Thiagalingam et al., 1996)	1,23

Tabelle 3.11: Gene im RAS/MAPK-Signalweg. Die signifikanten Gene aus den Orexin A (OxA)-Ansätzen wurden in Bezug auf ihre Beteiligung am RAS/MAPK-Signalweg eingeteilt. Der ermittelte „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

Neben Ras gehören auch Rho, Rab, Arf, Ran und Rap zur RAS-Superfamilie der monomeren GTP-bindenden Proteine (GTPasen). In aktivierter Form regulieren diese GTPasen eine Reihe von Zellfunktionen, wie zum Beispiel den Zellzyklus, die Genexpression, das Cytoskelett oder den intrazellulären Transport. Die Aktivierung und Inaktivierung der GTPasen wird über ihre Bindung an GTP und GDP reguliert (Abb.3.16). In inaktiver Form befindet sich die GTPase in einem GDP-gebundenen Zustand. Durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl.: guanine nucleotide exchange factors = GEF), wird GDP gegen GTP ausgetauscht und das GTPase-Molekül aktiviert. In dieser Form kann die GTPase dann ihre Zielmoleküle binden und aktivieren. Erst durch Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP unter Beteiligung von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) und GAP-bindenden Proteinen (GBPs) wird das GTPase-Molekül wieder inaktiviert. Zu den Zielmolekülen von Ras gehört unter anderem die Serin/Threonin-Kinase Raf, die wiederum die Kinase MEK (MAPK/ERK Kinase) phosphorylieren und dadurch aktivieren kann. Diese ist Teil der MAPK-Signalkaskade, die letztendlich über die MAP-Kinasen ERK, p38 oder JNK zur Aktivierung einer Reihe von Effektormolekülen führt.

In Hinblick auf diesen Signalweg zeigten sich nach Stimulation mit Orexin A die Gene für die GTPasen RAP2C, RAP2B und RRAGD hochreguliert. Zudem fanden wir eine erhöhte Expression der GEF-Faktoren RASGRP1 und RAPGEF2 und der GAP-bindende Proteine (GBP) G3BP2 und RANBP2. Als Effektoren der GTPasen kann die MAPK-Kinase MEK3

(MAP2K3) die p38-Kinase aktivieren, während das Gen RREB1 einen Ras-aktivierten Transkriptionsfaktor kodiert, der die Expression von Zielgenen reguliert.

Somit konnten wir zeigen, dass durch Orexin A Stimulation in CD34⁺ Zellen Gene von Signalmolekülen hochreguliert werden, die eine Rolle im bekannten RAS/MAPK-Signalweg spielen.

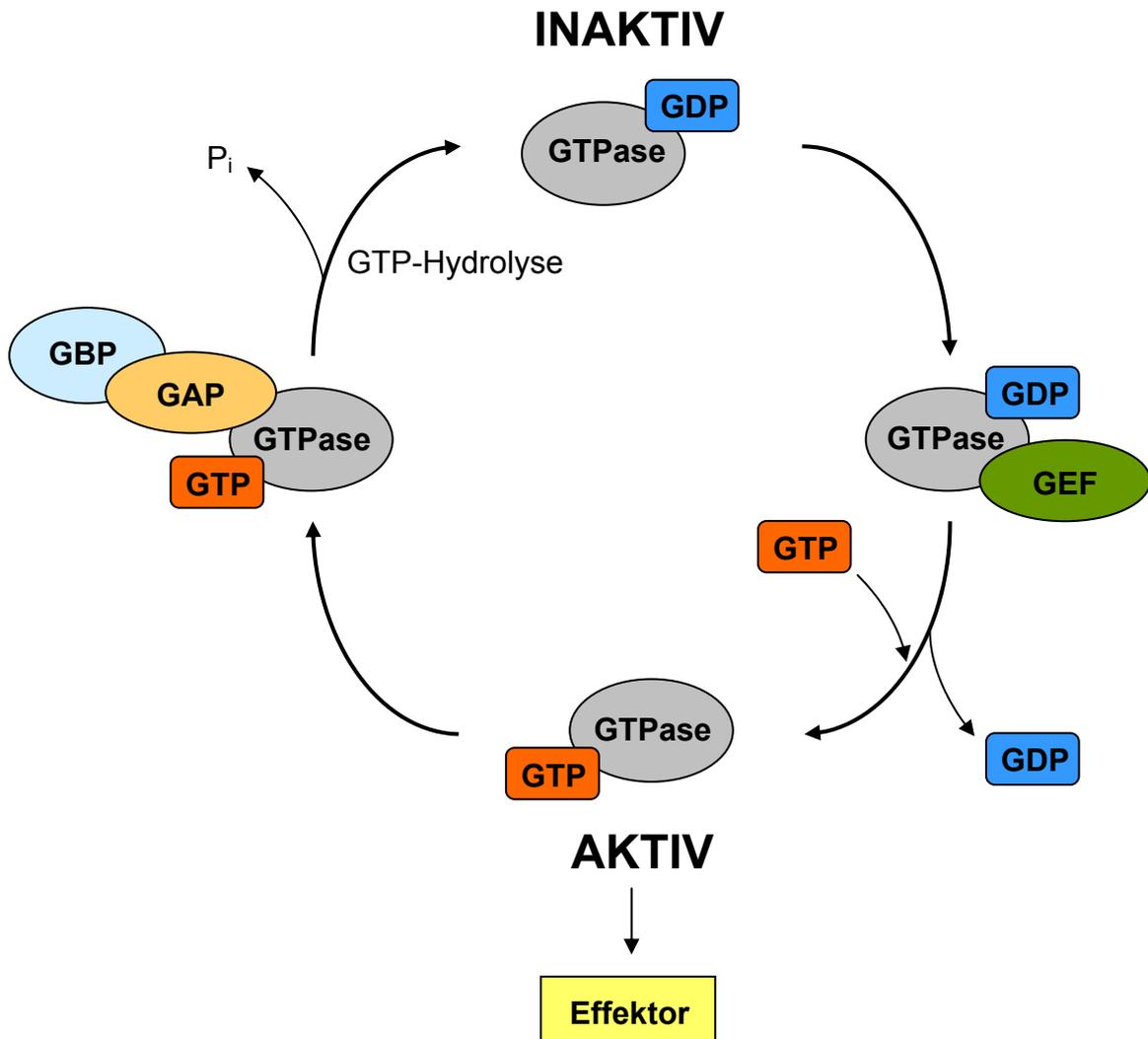


Abbildung 3.16: Schematischer GTPase-Zyklus. GDP-gebunden sind GTPasen inaktiv. Durch Bindung eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors (GEF) wird GDP gegen GTP ausgetauscht und die GTPase aktiviert. In diesem GTP-gebundenen Zustand kann die GTPase dann nachfolgende Effektorproteine aktivieren. Durch Interaktion mit GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) und GAP-bindenden Proteinen (GBP) wird die Hydrolyse von GTP zu GDP induziert und die GTPase inaktiviert.

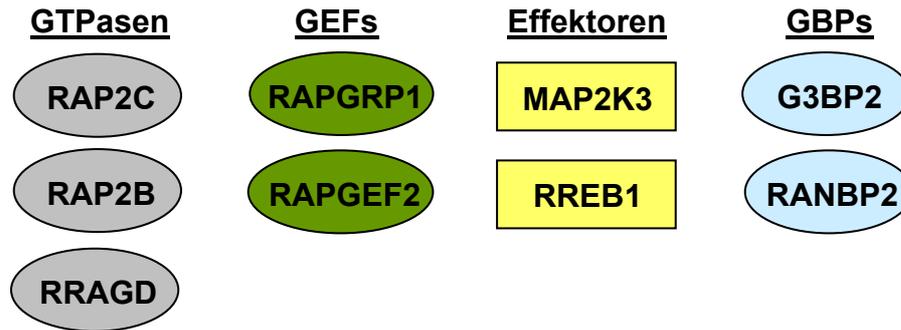


Abbildung 3.17: Einteilung der signifikanten Gene im RAS-Signalweg in die beteiligten Proteinklassen. GEF: Guanin-nukleotid-Austauschfaktoren; GBP: GAP (GTPase-aktivierende Proteine)-bindende Proteine

3.9.9 Weitere differentiell exprimierte Gene

Neben den bisher beschriebenen Genen aus den funktionellen Gruppen waren in den mit Orexin A oder Orexin B stimulierten CD34⁺ Zellen noch eine Reihe von Genen hochreguliert, die an der Transkription und Proteinregulation in der Zelle beteiligt sind. So konnten wir eine gesteigerte Expression von Genen beobachten, die im Splicing-Prozess von pre-mRNA involviert sind oder als Transkriptionsfaktoren fungieren. Da diese Effekte aus der allgemein erhöhten Genexpression in den Orexin-stimulierten Zellen resultieren, wird auf diese Gene im Einzelnen nicht weiter eingegangen. Ebenso beruht die differentielle Expression von Genen des intrazellulären Transports oder der Protein-Ubiquitinierung auf der allgemein erhöhten Genexpression und des in Kapitel 3.9.4 beschriebenen gesteigerten Metabolismus und wird deshalb nicht näher erläutert. Eine Auflistung dieser Gene findet sich in Tabelle 6.1.

3.10 Bestätigung der signifikanten Gene mittels quantitativer „Real-Time“-PCR

Um die Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalyse zu überprüfen, wurden exemplarisch einige signifikante Gene aus den in Kapitel 3.9 benannten funktionellen Gruppen mit Hilfe der quantitativen „Real-Time“-PCR unter Verwendung der TaqMan-Technologie untersucht, für die eine gute Korrelation zu den Ergebnissen von Microarray-Experimenten beschrieben wird (Canales et al., 2006). Von den signifikanten Genen wurden in den Orexin A-Ansätzen die Gene ACSL4, ATP2A2, CXCR4, CCNE2, HOXA9, IMPA1 und JMJD1 und in den Orexin B-Ansätzen die Gene ACSL4, ATP2A2, CEPBA und JUND bezüglich ihrer mRNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Als Referenz-Gen diente in diesem Fall β -Actin (ACTB), da die Expression dieses Genes zwischen der Kontrolle und den Orexin-Ansätzen am geringsten variierte.

In Übereinstimmung mit den Microarray-Daten konnten wir anhand der „Real-Time“-PCR die unterschiedliche Genexpression für die untersuchten Gene nachweisen. Abbildung 3.18 veranschaulicht am Beispiel des Gens ACSL4 die Auswertung der quantitativen PCR. Zunächst wurde für jeden Ansatz der C_T -Wert für das Referenz-Gen ACTB und das zu untersuchende Gen ACSL4 ermittelt. Aus der Differenz dieser C_T -Werte erhielt man den spezifischen ΔC_T -Wert, der ein Maß für die relative Expression der mRNA des zu untersuchenden Gens darstellt. Je kleiner der ΔC_T -Wert ist, desto höher ist die Expression des Gens. Dabei zeigte sich, dass ACSL4 sowohl im Orexin A-Ansatz als auch im Orexin B-Ansatz im Vergleich zur Kontrolle höher exprimiert wurde.

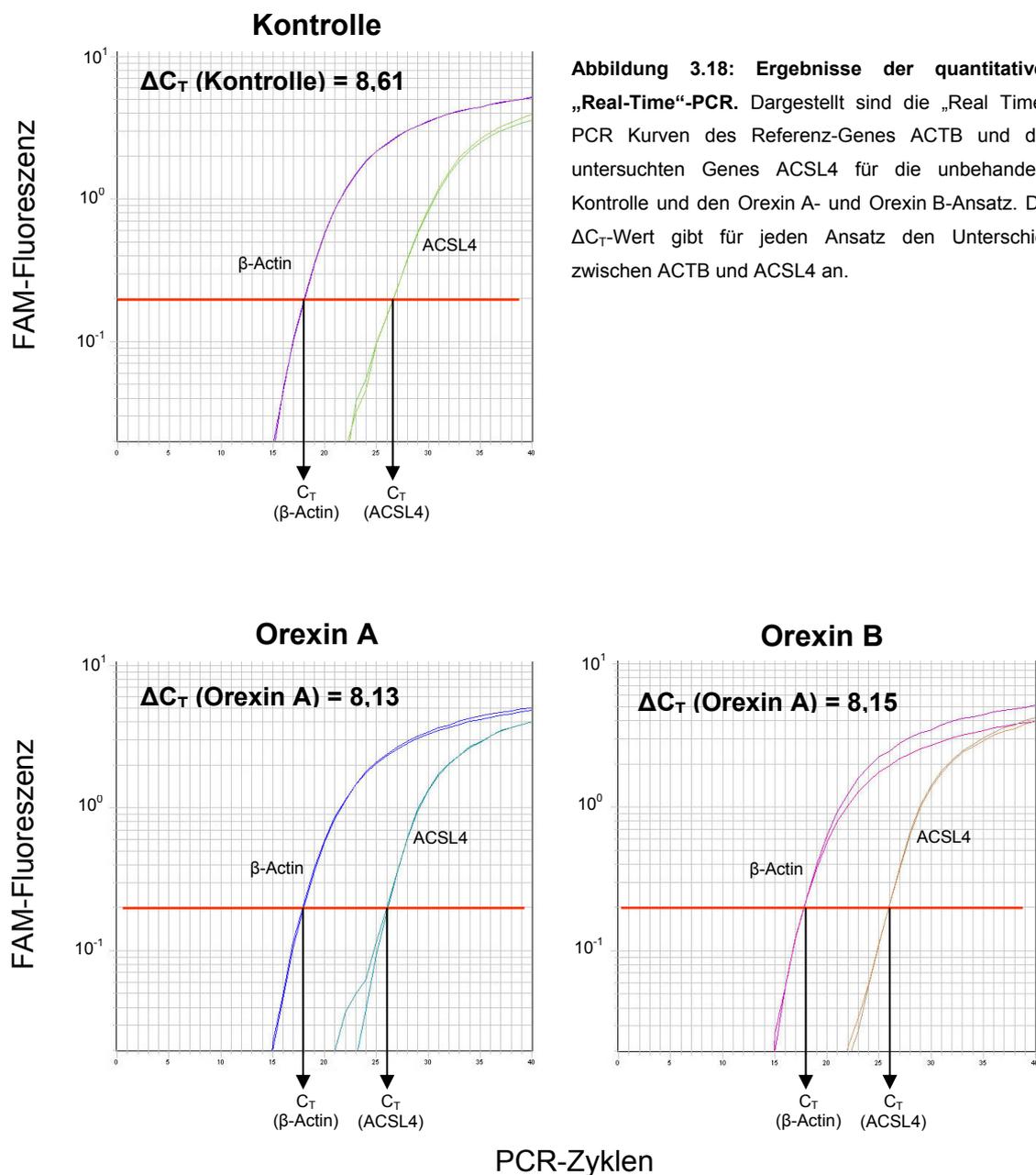


Abbildung 3.18: Ergebnisse der quantitativen „Real-Time“-PCR. Dargestellt sind die „Real Time“-PCR Kurven des Referenz-Gens ACTB und des untersuchten Gens ACSL4 für die unbehandelte Kontrolle und den Orexin A- und Orexin B-Ansatz. Der ΔC_T -Wert gibt für jeden Ansatz den Unterschied zwischen ACTB und ACSL4 an.

Um nachzuweisen, dass bei der quantitativen PCR nur spezifische Genprodukte entstanden sind, wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb.3.19). Dabei ließ sich in jeder Probe eine einzelne DNA-Bande erkennen, was darauf hinweist, dass nur ein spezifisches PCR-Produkt gebildet wurde.

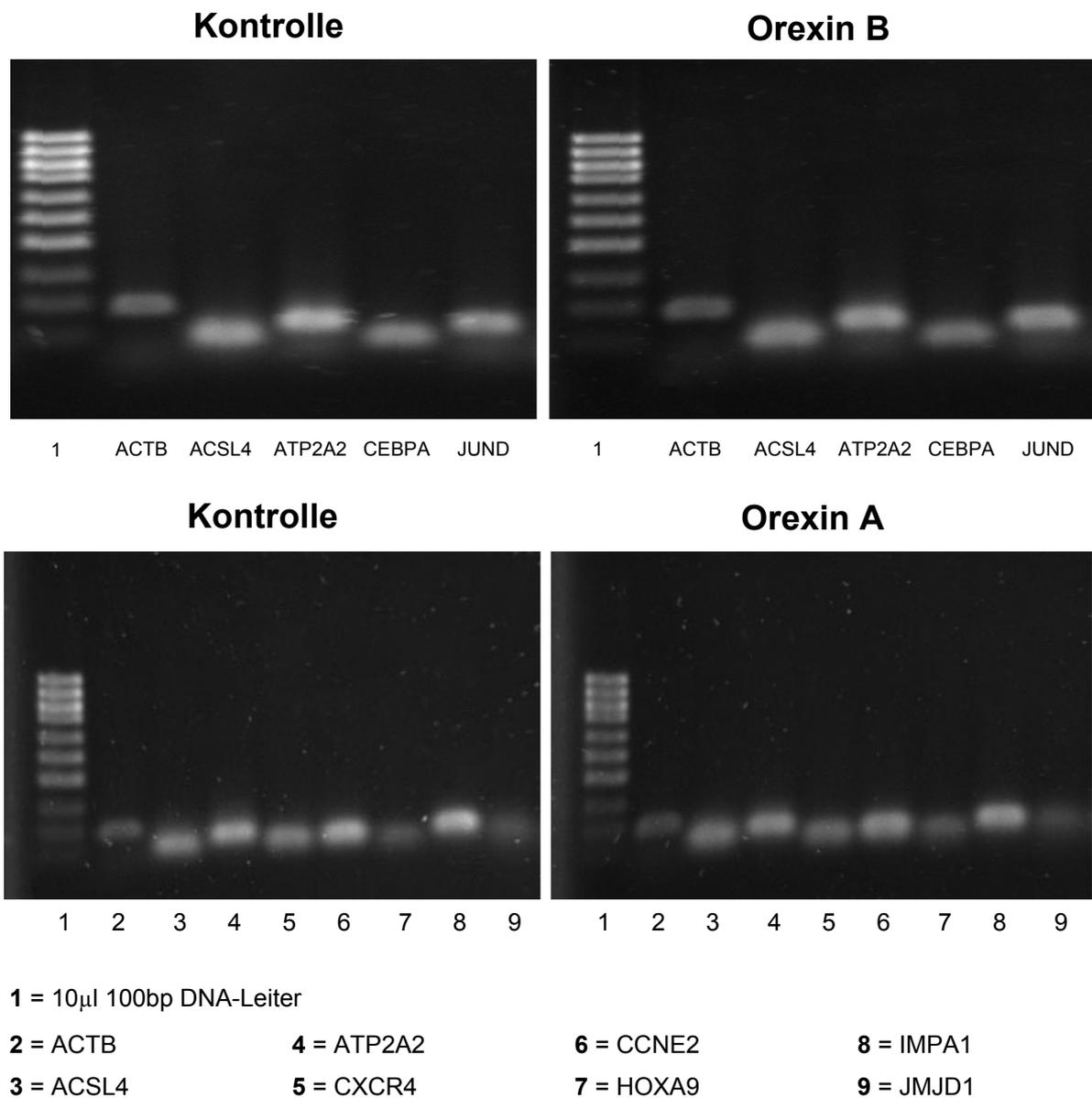


Abbildung 3.19: Elektrophoretische Auftrennung der „Real-Time“-PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel. Jeweils 10µl des PCR-Produktes aus den Orexin A- oder Orexin B-Ansätzen wurden für 1 h bei 120 V aufgetrennt und das Gel anschließend in einem Ethidiumbromidbad für ½ h gefärbt. Ein repräsentatives von 4 durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Zum direkten Vergleich der Ergebnisse aus der quantitativen „Real-Time“-PCR und den Genexpressionsanalysen wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte der quantitativen PCR und die logarithmierten „Fold-Change“ Werte der Microarray-Daten in einem linearen Diagramm nebeneinander dargestellt (Abb.3.20).

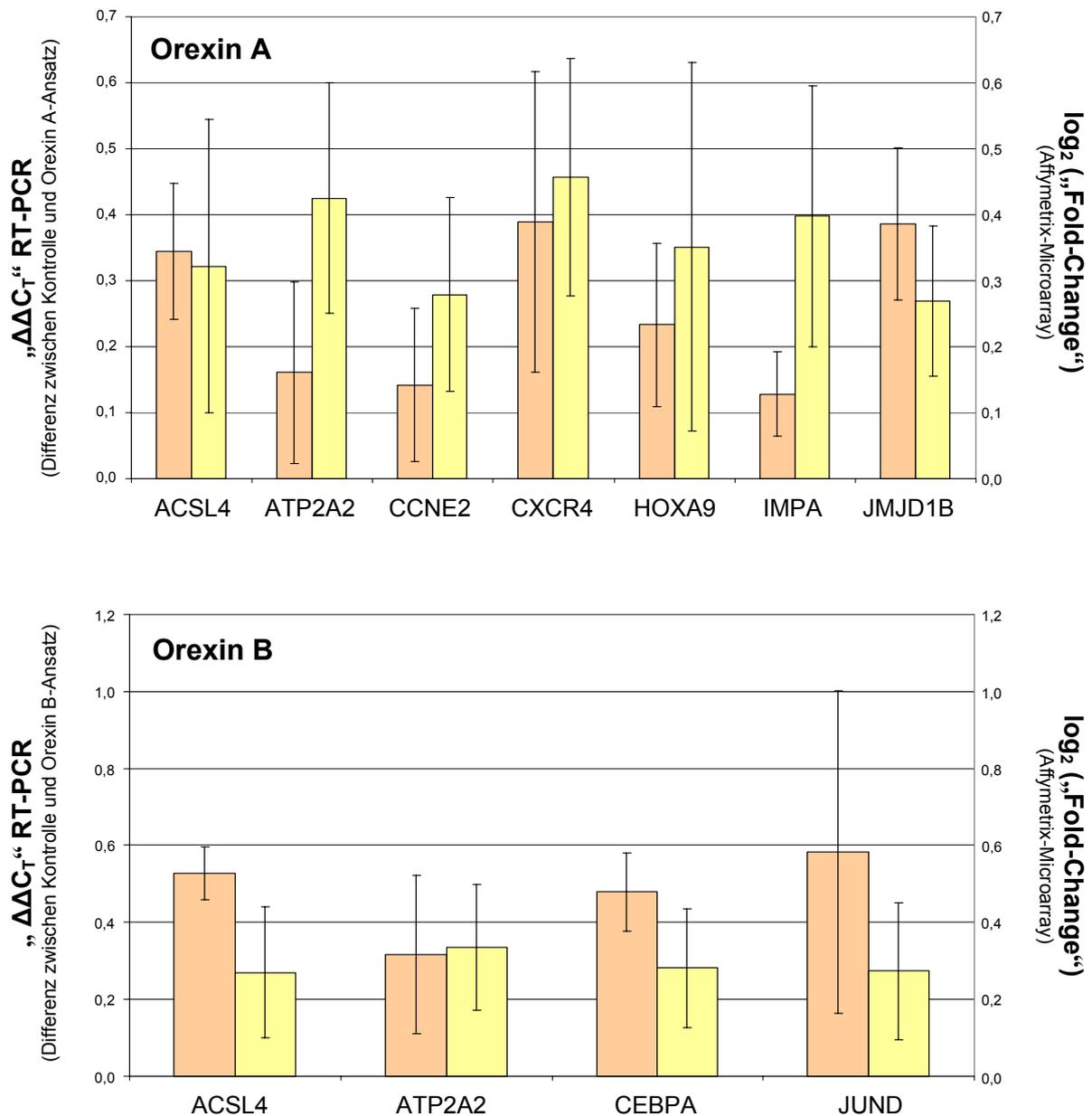


Abbildung 3.20: Vergleich der Ergebnisse aus der quantitativen „Real-Time“- PCR (orange) und den signifikanten Microarray-Daten (gelb) aus den Orexin A- und Orexin B-Ansätzen. Mittelwert und Standardabweichung von 5 Microarray-Experimenten und 4 „Real-Time“-PCR-Experimenten im Doppelansatz sind dargestellt.

Anhand dieser Darstellung zeigt sich deutlich, dass wir die mit den Microarrays ermittelten Genexpressionsdaten aus Orexin-stimulierten Zellen bei alle untersuchten Genen durch die quantitative „Real-Time“-PCR bestätigen konnten. Dabei lässt sich die Beobachtung, dass zwischen den beiden Methoden Abweichungen in der Größenordnung auftreten, durch eine geringere Sensitivität der Microarrays im Vergleich zur „Real Time“-PCR erklären (Canales et al., 2006).

4 Diskussion

Die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 und ihre beiden Liganden Orexin A und Orexin B wurden zum ersten Mal vor knapp 10 Jahren in hypothalamischen Neuronen beschrieben (Sakurai et al., 1998). Seitdem wurde ihre Expression auch in vielen anderen Geweben entdeckt und die systemischen und zellulären Effekte der Rezeptoren in einer Reihe von Zelllinien und Gewebetypen untersucht. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe anhand von Genexpressionsanalysen zeigen, dass auch humane hämatopoetische CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen neben einer Reihe von neurobiologisch relevanten Genen die G-Protein-gekoppelten Orexin-Rezeptoren 1 und 2 exprimieren (Steidl et al., 2004).

Basierend auf der Tatsache, dass schon für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine funktionelle Verbindung mit CD34⁺ Zellen und der Hämatopoese gezeigt wurde, wie zum Beispiel für die Zytokinrezeptoren CXCR4 (Mohle et al., 1998) und CCR3 (Lamkhioued et al., 2003) oder der Leukotrienrezeptor CysLT1 (Bautz et al., 2001; Lynch et al., 1999; Dupuis et al., 1997), stellte sich uns die Frage nach der funktionellen Bedeutung der Orexin-Rezeptoren für CD34⁺ Zellen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit die Funktionalität und die Orexin-Rezeptor-vermittelten Effekte auf hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen zu untersuchen.

4.1 Expression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf CD34⁺ Zellen

Nachdem in Genexpressionanalysen zunächst die Expression der Orexin-Rezeptoren auf RNA-Ebene gezeigt worden war, konnten wir in einem zweiten Schritt anhand von FACS-Analysen auch die Proteinexpression auf humanen CD34⁺ Zellen nachweisen. Dabei konnten wir beobachten, dass 70% der analysierten CD34⁺ Zellen den Orexin-Rezeptor 1 und 63% den Orexin-Rezeptor 2 exprimierten. Zudem zeigte sich eine 1,2fach höhere Expressionsstärke des Orexin-Rezeptors 1 im Vergleich zum Orexin-Rezeptor 2. Die Tatsache, dass diese unterschiedliche Expressionsstärke auch auf RNA-Ebene zu beobachten ist, weist darauf hin, dass die Unterschiede nicht aufgrund einer unterschiedlichen Bindungsaffinität der verwendeten Antikörper zustande kommen, sondern tatsächlich auf einer unterschiedlichen Expressionsstärke beruhen. Anhand einer Zweifarbenimmunfluoreszenz untersuchten wir auch die differenzierungsabhängige Expression der Orexin-Rezeptoren und konnten zeigen, dass die frühen CD34⁺ Stammzellen eine höhere Rezeptorexpression aufweisen als reifere CD34⁺ Zellen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Orexin-Rezeptoren vermutlich eine funktionelle Rolle in der frühen Entwicklung der CD34⁺ Zellen spielen.

4.2 Funktionelle Aspekte

Um die Funktionalität der Orexin-Rezeptoren für die hämatopoetischen CD34⁺ Zellen zu untersuchen, wurden die durch Stimulation der Orexin-Rezeptoren vermittelten Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene im Hinblick auf verschiedene Aspekte untersucht:

1. Mit Blick auf die schon in anderen Zelltypen beschriebene, funktionelle Aktivität der Orexin-Rezeptoren wurden der Effekt einer Orexin-Stimulation auf die intrazelluläre Konzentration der „second messenger“ Moleküle cAMP und Ca²⁺ in CD34⁺ Zellen gemessen.
2. In Anlehnung an eine durch andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (CXCR4 oder CysLT1) vermittelte CD34⁺ Migrationssteigerung wurde der Einfluss der Orexine auf das Migrationsverhalten von CD34⁺ Zellen analysiert.
3. Die Auswirkung der Orexin-Rezeptor-Stimulation auf das hämatopoetische Differenzierungspotenzial von CD34⁺ Zellen wurde in einem klonogenen Wachstumstests untersucht.
4. Durch Orexin-Stimulation signifikant hoch- oder herunterregulierte Gene in CD34⁺ Zellen wurden mit Blick auf mögliche Orexin-vermittelte Signalkaskaden und unter dem Aspekt von schon beschriebenen Orexin-Effekten analysiert.

4.2.1 Reduktion der „second messenger“ Moleküle cAMP und Ca²⁺

Um die funktionelle Aktivität der Orexin-Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen zu untersuchen, wurde zunächst der Effekt der Rezeptorstimulation auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration gemessen. In unseren Ergebnissen konnten wir beobachten, dass sowohl Orexin A als auch Orexin B in den Konzentrationen 1 µM und 0,1 µM die intrazelluläre cAMP-Konzentration reduzieren. Dabei zeigt Orexin A eine konzentrationsabhängige Hemmung, während Orexin B in der geringeren Konzentration den stärkeren Hemmeffekt vermittelt. Unter der Berücksichtigung, dass Orexin A mit gleicher Affinität an beide Rezeptoren bindet, während Orexin B eine 10fach höhere Affinität zum Rezeptor 2 aufweist (Rouet-Benzineb et al., 2004; Kukkonen et al., 2002), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die beiden Orexin-Rezeptoren an verschiedene G-Proteine gekoppelt sind. Wir vermuten, dass der Orexin-Rezeptor 1 seinen Effekt auf die cAMP-Konzentration über ein cAMP-stimulierendes G_s-Protein vermittelt, während der Orexin-Rezeptor 2 an ein cAMP-hemmendes G_i-Protein gekoppelt ist (Abb.4.1).

Diese Vermutung erklärt auch die beobachteten Ergebnisse der cAMP-Reduktion. Bei Stimulation mit 0,1 µM Orexin A werden beide Rezeptoren in gleichem Maße aktiviert. Über den Rezeptor 1 wird eine cAMP-Erhöhung induziert, über den Rezeptor 2 eine cAMP-Hemmung, die über den stimulatorischen Effekt überwiegt. Dies führt im Vergleich zur

Kontrolle zu einer verminderten cAMP-Konzentration. Dosisabhängig wird dieser Effekt bei einer höheren Orexin A-Konzentration von 1 μM verstärkt und dadurch die cAMP-Konzentration stärker vermindert. Bei einer Stimulation mit 0,1 μM Orexin B werden aufgrund der höheren Bindungsaffinität zunächst vor allem die Orexin-Rezeptoren 2 aktiviert und die daran gebundene cAMP-Hemmung vermittelt. Erst bei einer höheren Konzentration von 1 μM werden auch verstärkt die Orexin-Rezeptoren 1 aktiviert, so dass dann die Orexin-Rezeptor-2-vermittelte Hemmung durch die Orexin-Rezeptor-1-induzierte Stimulation abgeschwächt wird. Unterstützt wird diese Vermutung durch die beobachteten Effekte unter Verwendung des Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB-334867, wobei man diese Ergebnisse mit Blick auf den alleinigen Effekt des Antagonisten mit Vorsicht betrachten muss. Geht man jedoch davon aus, dass durch den Einsatz des Antagonisten der stimulatorische Effekt des Orexin-Rezeptors 1 ausgeschaltet wird, verstärkt sich bei kombinierter Inkubation mit dem Antagonisten die Orexin A-vermittelte Hemmung der cAMP-Konzentration. Im Gegensatz dazu wird die durch Orexin B induzierte Reduktion der cAMP-Konzentration durch Kombination mit dem Antagonisten nicht signifikant verändert, da diese Hemmung hauptsächlich über den Rezeptor 2 vermittelt wird, der Antagonist jedoch keinen Einfluss auf den Orexin-Rezeptor 2 besitzt.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wird auch in der Literatur ein unterschiedlicher Effekt der Orexin-Stimulation auf die Adenylatzyklase und die intrazelluläre cAMP-Konzentration beschrieben. So zeigte sich, dass Orexin A und B die cAMP-Konzentration in hypothalamischen Neuronen und Nebennierenrindenzellen erhöhen (Karteris et al., 2005; Malendowicz et al., 1999), während in anderen Untersuchungen an HK293- und AR42J-Zelllinien keine Veränderung der cAMP-Konzentration durch Orexin-Stimulation beobachtet werden konnte (Magga et al., 2006; Harris et al., 2002). Auch in Anlehnung an unsere vermutete G_s - und G_i -Protein-Kopplung der Orexin-Rezeptoren wird in der Literatur eine G_s -Protein-gekoppelte Erhöhung der cAMP-Konzentration über den Orexin-Rezeptor 1 beschrieben (Holmqvist et al., 2005), während für den Orexin-Rezeptor 2 unter anderem eine G_i -Protein-Kopplung gezeigt wird (Martin et al., 2002; Karteris et al., 2001).

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration konnte man sowohl in CHO-Zellen (Ammoun et al., 2006a; Lund et al., 2000; Sakurai et al., 1998), als auch in kultivierten Neuronen der kortikalen und hypothalamischen Region (Muroya et al., 2004; Uramura et al., 2001; van den Pol et al., 2001; van den Pol et al., 1998) als ein Haupteffekt der zellulären Antwort auf eine Orexin-Rezeptor-Stimulation beobachten. In diesem Zusammenhang weisen einige aktuelle Untersuchungen darauf hin, dass diese Calciumerhöhung über verschiedene Signalwege vermittelt wird. So wird vermutet, dass infolge einer Orexin-Stimulation zunächst ein erster Calciumeinstrom in die Zellen über einen „nonstore-operated“

Calciumkanal in der Plasmamembran erfolgt, vermutlich über den TRCP1-Kanal (Larsson et al., 2005; Kukkonen and Akerman, 2001). Für diesen Calciumkanal wurde auch schon eine direkte Interaktion mit dem G-Protein-gekoppelten Glutamat-Rezeptor beschrieben (Kim et al., 2003). Da zudem gezeigt werden konnte, dass die Proteinkinase C (PKC) die Funktion der TRCP-Kanäle hemmen kann (Venkatachalam et al., 2003), wird vermutet, dass der erste Calciumeinstrom nach Orexin-Stimulation über die Aktivierung der PKC reguliert wird (Larsson et al., 2005). Ein zweiter Calciumeinstrom wird dann PKC-unabhängig über den IP₃-vermittelten Signalweg aus intrazellulären Speichern und über „store-operated“ Kanäle (SOCCs) vermittelt (Kukkonen and Akerman, 2001).

Im Gegensatz zur dieser beschriebenen Calciumerhöhung führt eine Orexin-Stimulation in Proopiomelanocortin-enthaltenen und Glucose-sensitive Neuronen im Hypothalamus zu einer reduzierten intrazellulären Calciumkonzentration (Muroya et al., 2004). In Anlehnung an diese Beobachtung konnten auch wir in funktionellen Experimenten zeigen, dass die Stimulation der Orexin-Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen zu einer Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration und der SDF-1 β -vermittelten Calciumerhöhung führt. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen waren auch in unseren Genexpressionsanalysen nach Orexin-Stimulation einige Gene signifikant hochreguliert, die in Verbindung mit einer Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration stehen. Da aber gleichzeitig auch verstärkt Gene exprimiert wurden, die im PLC β - und IP₃-vermittelten Signalweg eine Erhöhung der Calciumkonzentration induzieren, vermuten wir, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration als Antwort auf eine Orexin-Stimulation über verschiedene Signale und G-Proteine reguliert wird. Ähnlich wie bei der cAMP-Konzentration könnten die von uns beobachteten Ergebnisse aus einem Zusammenspiel von calciumerhöhenden und calciumreduzierenden Mechanismen resultieren. Das würde bedeuten, dass durch Stimulation mit Orexinen sowohl eine Calciumerhöhung als auch eine Calciumreduktion vermittelt wird, wobei im zeitlichen Ablauf jeweils einer der beiden Effekte überwiegt.

Anhand dieser Vermutung lässt sich auch der von uns beobachtete Verlauf der intrazellulären Calciumkonzentration nach Orexinzugabe und die Reduktion des SDF-1 β -vermittelten Calciumsignals erklären. So wird als Antwort auf eine Orexin-Stimulation zunächst ein calciumreduzierendes Signal induziert. Mit Blick auf die hochregulierten Gene könnte diese Reduktion durch eine G_i-Protein-gekoppelte Aktivierung von Calciumtransportierenden ATPasen erfolgen, die die Calciumionen in die intrazellulären Speicher und aus der Zelle heraus pumpen oder, in Anlehnung an den schon beschriebenen Signalweg, durch einen „nonstore-operated“ Calciumkanal, der die Calciumionen aus dem Cytosol in den extrazellulären Raum transportiert. Da sowohl durch Orexin A als auch durch Orexin B calciumreduzierende Gene hochreguliert werden, können unsere Ergebnisse nicht

eindeutig die Frage klären, ob dieser erste calciumreduzierende Effekt über den Orexin-Rezeptor 1, den Orexin-Rezeptor 2 oder über beide Rezeptoren vermittelt wird.

Im Anschluss an diese erste Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration, die mit Blick auf die signifikant hochregulierten Gene vermutlich über den PLC β - und IP₃-induzierten Signalweg vermittelt wird. Die Tatsache, dass die differentiell exprimierten Gene in diesem Signalweg nur nach Stimulation mit Orexin A hochreguliert sind, weist darauf hin, dass die Calciumerhöhung vermutlich über ein Orexin-Rezeptor-1-gekoppeltes G_q-Protein erfolgt (Abb.4.1). Dabei wird PIP₂ durch die aktivierte PLC β zu DAG und IP₃ hydrolysiert, welches dann wiederum die IP₃-Rezeptoren (ITPRs) in der Membran des ER aktiviert und die damit verbundenen Calciumfreigabe aus dem intrazellulären Calciumspeicher induziert. Als Antwort auf diesen Calciumeinstrom erhöht sich die cytosolische Calciumkonzentration.

Neben Genen des IP₃-vermittelten Signalweges fanden wir auch Gene für Calciumtransportierende ATPase hochreguliert, über die Calciumionen aus dem Cytosol verstärkt in die intrazellulären Speicher und aus der Zelle heraus transportiert werden. Im experimentellen Verlauf resultiert dieser Prozess in einer erneuten Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration. Da diese calciumreduzierenden Mechanismen als Antwort auf eine anhaltende Orexin-Stimulation längerfristig überwiegen, wird eine anschließende, durch SDF-1 β -vermittelte Calciumerhöhung aufgrund der gleichzeitig aus dem Cytosol heraustransportierten Calciumionen reduziert. Die Beobachtung, dass sich dieser SDF-1 β -induzierte Effekt auch durch Zugabe des Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten nicht signifikant verändern lässt, weist darauf hin, dass die langfristige Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration vermutlich über ein Orexin-Rezeptor-2-gekoppeltes G_i-Protein vermittelt wird.

Diese von uns beobachteten Effekte auf die intrazelluläre cAMP- und Calciumkonzentration zeigen, dass die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in CD34⁺ Zellen an verschiedene und an mehr als ein G-Protein gekoppelt sein können. So vermuten wir, dass der Orexin-Rezeptor 1 über ein G_s-Protein die cAMP-Konzentration und über ein G_q-Protein die Calciumkonzentration in CD34⁺ Zellen erhöht, während der Orexin-Rezeptor 2 über ein G_i-Protein die Reduktion der intrazellulären cAMP- und Calciumkonzentration vermittelt (Abb.4.1). Zusätzlich wäre es denkbar, dass beide Rezeptor über ein G_i-Protein oder aber möglicherweise über „nonstore-operated“ Calciumkanäle zur Reduktion der Calciumkonzentration beitragen. Diese Vermutung muss allerdings noch in weiteren Experimenten untersucht werden.

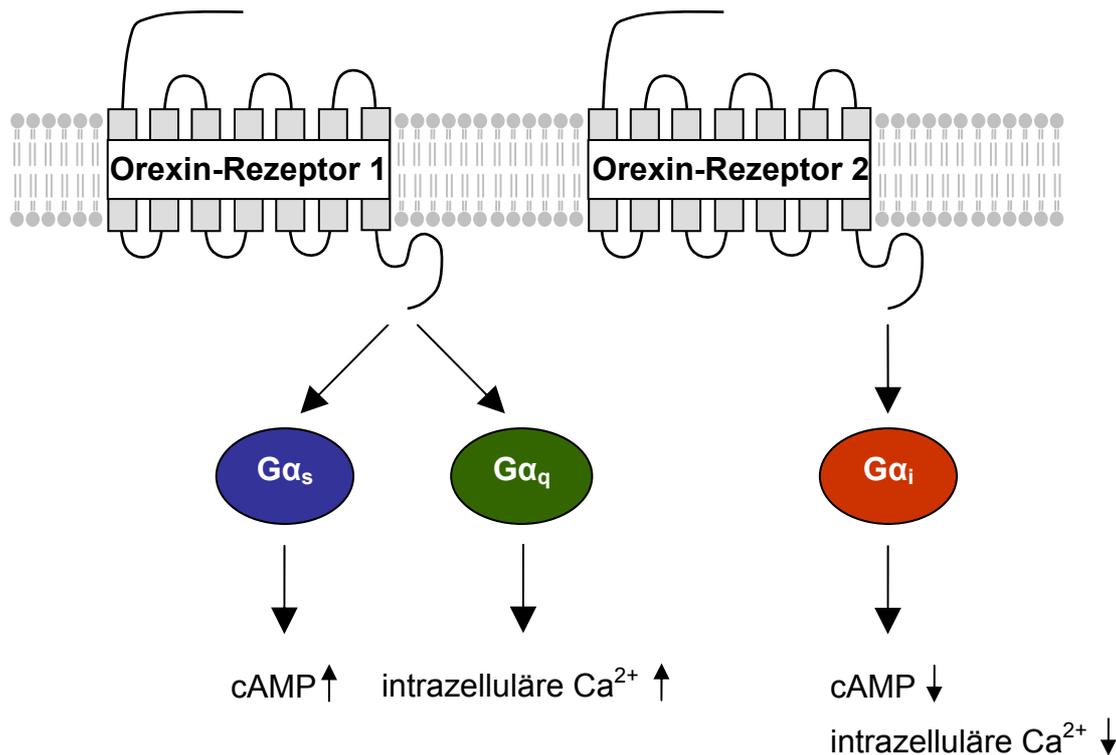


Abbildung 4.1: Hypothetische G-Protein-Kopplung der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in CD34 $^+$ Zellen. Während der Orexin-Rezeptor 1 über ein G $_s$ -Protein die cAMP- und über ein G $_q$ -Protein die Calciumkonzentration in CD34 $^+$ Zellen erhöht, vermittelt der Orexin-Rezeptor 2 über ein G $_i$ -Protein die Reduktion der intrazellulären cAMP- und Calciumkonzentration.

Auch in der Literatur wird unsere Beobachtung bestätigt, dass Orexin-Rezeptoren an verschiedene und an mehr als ein G-Protein gekoppelt sind. So wurde gezeigt, dass der Orexin-Rezeptor 2 in Nebennierenzellen an G $_s$ -, G $_q$ - und G $_i$ -Proteine gekoppelt ist (Randevara et al., 2001; Karteris et al., 2001), während der Orexin-Rezeptor 1 in CHO-Zellen seine Signale über G $_s$ -, G $_q$ - und G $_{i/o}$ -Proteine vermittelt (Holmqvist et al., 2005). Zudem können die Orexin-Rezeptoren in Neuronen alle der vier G-Proteine G $_s$, G $_q$, G $_o$ und G $_i$ aktivieren (Karteris et al., 2005; Hoang et al., 2003). Neben den Orexin-Rezeptoren wird auch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Kopplung an verschiedene G-Proteine beschrieben. So vermittelt der Thrombin-Rezeptor die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sowohl über G $_o$ - als auch über G $_q$ -Proteine (Baffy et al., 1994), während der CRH-Rezeptor 1 im cerebralen Kortex von Ratten die fünf verschiedenen G-Proteine G $_s$, G $_i$, G $_q$, G $_o$ und G $_z$ aktivieren kann (Grammatopoulos et al., 2001). Auch der Dopamin-Rezeptor vermittelt je nach Zelltyp entweder inhibitorische oder stimulatorische Effekte (Banihashemi and Albert, 2002).

4.2.2 Hemmung des klonogenen Wachstums von CD34⁺ Zellen

Dem lebenslangen Nachschub an Blut bildenden Zellen liegt ein Wechselspiel zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zugrunde. Dieser Prozess wird durch spezifische Faktoren wie Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aber auch durch die Interaktion der CD34⁺ Zellen mit zellulären Faktoren und Matrixkomponenten des Knochenmarkstromas reguliert (Fuchs et al., 2004). Auch für einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie eine Rolle bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen spielen. So aktiviert das Chemokin Eotaxin über den CCR3-Rezeptor die eosinophile Differenzierung (Lamkhioued et al., 2003), während die Leukotriene LTB₄ und LTC₄ über den CysLT₁-Rezeptor das Wachstum von myelopoetischen Kolonien induzieren (Dupuis et al., 1997).

Um den Effekt der Orexine auf die Differenzierung von hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen zu untersuchen, stimulierten wir CD34⁺ Zellen mit den Orexinen A und B in einem klonogenen Wachstumstest. Dabei konnten wir zeigen, dass die Orexine in den drei Konzentrationen 1 µM, 0,1 µM oder 0,01 µM sowohl die Bildung von BFU-E- als auch von CFU-GM-Kolonien signifikant reduzieren. Die Tatsache, dass die durch 1 µM Orexin A oder Orexin B vermittelte Hemmung der BFU-E-Kolonien durch kombinierte Stimulation mit dem Antagonisten signifikant aufgehoben werden kann, lässt vermuten, dass diese Reduktion hauptsächlich über den Orexin-Rezeptor 1 vermittelt wird (Abb.4.2). Übereinstimmend mit dieser Vermutung wird auch die durch 0,1 µM Orexin A oder Orexin B induzierte Hemmung der BFU-E-Kolonien durch Zugabe des Antagonisten vermindert. Die Beobachtung, dass dabei die Hemmung nicht vollständig aufgehoben wird, lässt sich möglicherweise durch einen intrinsischen Reduktionseffekt des Antagonisten erklären. So führt schon eine alleinige Zugabe von 0,1 µM des Antagonisten zu einer Kolonie-Hemmung, die in den kombinierten Ansätzen möglicherweise die Aufhebung der Orexin-vermittelten Reduktion überlagert.

Bei Betrachtung der CFU-GM Kolonien zeigt sich in den beiden Konzentrationen 1 µM und 0,1 µM, dass die Bildung durch kombinierte Stimulation mit dem Antagonisten nur geringfügig, aber keinesfalls signifikant vermindert wird. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass der reduzierende Effekt auf die Bildung der CFU-GM Kolonien vermutlich über den Orexin-Rezeptor 2 vermittelt wird.

In Übereinstimmung mit diesen funktionellen Ergebnissen konnten wir auch in unseren Genexpressionsanalysen zeigen, dass nach Orexin-Stimulation Gene wie JMJD1B, YY1 und ARIH2 hochreguliert waren, die die Ausbildung von myeloiden Kolonien hemmen. Die Beobachtung, dass zudem durch Orexin A oder Orexin B Gene hochreguliert werden, die die Differenzierung von myeloiden und lymphoiden Zellen induzieren, zeigt, dass der Einfluss der Orexine auf die Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ein sehr komplexer Prozess ist. Dabei spielt möglicherweise auch die gegenseitige Regulation

der Rezeptor-vermittelten Signale eine Rolle. So wird durch Orexin A der Transkriptionsfaktor CEBPA hochreguliert, während Orexin B die Expression des Transkriptionsfaktors CEBPZ verstärkt, der als negativer Regulator von CEBPA beschrieben wird (Lacasa et al., 2001) und somit die CEBPA-induzierte Differenzierung von Granulozyten hemmen könnte. Insgesamt scheinen die Orexine und ihre Rezeptoren durch ein Netzwerk von Signalen an der Regulation der Differenzierung von $CD34^+$ Zellen beteiligt zu sein. Dabei vermuten wir, dass über den Orexin-Rezeptor 1 zum einen die Differenzierung der BFU-E-Kolonien gehemmt wird, während der Orexin-Rezeptor 2 die Differenzierung der CFU-GM-Kolonien hemmt (Abb.4.2).

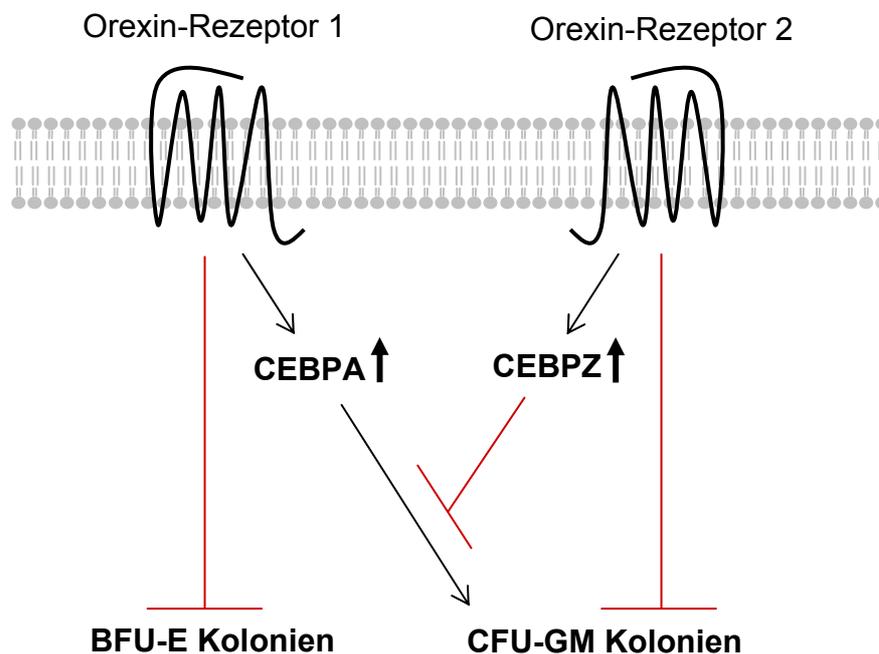


Abbildung 4.2: Hypothese eines rezeptorabhängigen Effekts auf das klonogene Wachstum von $CD34^+$ Zellen durch Orexin-Stimulation.

Neben Genen, die an der Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt sind, fanden wir nach Orexin A-Stimulation auch die drei Gene HOXA9, KIT und MYST3 verstärkt exprimiert, die eine Rolle bei der Erhaltung und Selbsterneuerung von Stammzellen spielen. Die Beobachtung, dass diese Gene nur nach Stimulation mit Orexin A hochreguliert werden, weist darauf hin, dass die Expression dieser Gene vermutlich über den Orexin-Rezeptor 1 vermittelt und so die Selbsterneuerung von Stammzellen unterstützt wird. Mit Blick auf diese Ergebnisse und die von uns beobachtete verstärkte Expression der Orexin-Rezeptoren auf frühen $CD34^+$ Zellen, vermuten wir, dass durch Orexin-Rezeptor-Stimulation die Selbsterneuerung von frühen Stammzellen verstärkt und die Ausdifferenzierung zu determinierteren Vorläuferzellen gehemmt wird. Das würde bedeuten, dass nach Orexin-Stimulation die Anzahl der liniendeterminierten Vorläuferzellen

zugunsten der frühen Stammzellen vermindert ist. Diese Hypothese könnte auch die von uns beobachteten Ergebnisse im klonogenen Wachstumstest erklären. Da bei diesem Test die Bildung der BFU-E- und CFU-GM-Kolonien von der vorhandenen Anzahl der determinierten Vorläuferzellen abhängt und nach Orexin-Stimulation vermutlich diese Zahl reduziert ist, kommt es zu einem verminderten Koloniewachstum.

Auch wenn unserer Ergebnisse somit einen ersten Hinweis darauf geben, dass durch Orexine möglicherweise die Selbsterneuerung von Stammzellen verstärkt und die Differenzierung verhindert wird, muss diese Vermutung in weiteren Untersuchungen näher beleuchtet werden. Dabei wäre die Durchführung von Langzeitkulturen eine gute Möglichkeit, um das Selbsterneuerungspotenzial von Orexin-stimulierten CD34⁺ Zellen zu untersuchen, da in diesen Kulturen die Bildung der hämatopoetischen Kolonien von der Anzahl der frühen Stammzellen abhängt und nicht, wie im einfachen klonogenen Wachstumstest, von der Zahl der determinierteren Vorläuferzellen.

4.2.3 Reduktion der Migration von CD34⁺ Zellen

Die Migration von hämatopoetischen Stammzellen durch das Endothel des Knochenmarks lässt sich als Antwort auf Endzündungsreaktionen, nekrotische Gewebsschäden oder bei schwerer, körperlicher Arbeit beobachten (Abkowitz et al., 2003; Wright et al., 2001). Zudem liegt der Migrationsprozess der Mobilisierung und dem „Homing“ bei einer Stammzelltransplantation zugrunde.

Da die Stimulation einiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie dem Zytokinrezeptor CXCR4 (Mohle et al., 1998), dem Leukotrienrezeptor CysLT1 (Bautz et al., 2001) oder dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor S1P1 (Seitz et al., 2005) zu einer erhöhten Migration von CD34⁺ Zellen führt, untersuchten wir den Effekt von Orexinen auf das Migrationsverhalten von CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen in einer Transwellplatte. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass die Migration nach einer Stimulation mit Orexinen dosisabhängig reduziert wird, wobei die durch Orexin A induzierte Hemmung etwas stärker ausfiel als die Orexin B-vermittelten Effekte. Zudem konnte diese Reduktion unter Verwendung des Antagonisten zwar vermindert, aber nicht signifikant verändert werden. Unter der Berücksichtigung der Rezeptoraffinitäten für die Orexine lassen diese Ergebnisse vermuten, dass beide Orexin-Rezeptoren einen migrationshemmenden Effekt weiterleiten, der Rezeptor-1-vermittelte Effekt aber möglicherweise eine stärkere Gewichtung besitzt. So stimuliert Orexin A beide Rezeptoren in gleichem Maße und führt zu einer stärkeren Reduktion als Orexin B, das hauptsächlich den Rezeptor 2 aktiviert. Diese Vermutung deckt sich mit der Beobachtung, dass nach Orexin-Stimulation zum einen Gene wie NISCH, PNN und PTPN12 hochreguliert werden, die die Zellmigration direkt hemmen, und zum anderen

auch Gene wie MACF1, TNS und VCL, die die Stabilität und Adhäsion der Zelle erhalten und somit einer Migration entgegenwirken. Die Tatsache, dass diese Gene nur durch Orexin A differentiell exprimiert werden, bestätigt die Vermutung, dass der migrationsreduzierende Effekt verstärkt über den Orexin-Rezeptor 1 vermittelt wird.

In Anlehnung an die erhöhte Expression der Rezeptoren auf frühen CD34⁺ Zellen lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass Orexin A und Orexin B auch im Knochenmark die Migration von CD34⁺ Zellen hemmen und dadurch möglicherweise verstärkt die frühen CD34⁺ Zellen im Knochenmark zurückgehalten werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass durch Orexin A auch der CXCR4-Rezeptor hochreguliert wird, der zusammen mit seinem Liganden SDF-1 einen ähnlichen Effekt vermittelt. Von Endothelzellen und vor allem Osteoblasten sezerniertes SDF-1 bindet an den CXCR4-Rezeptor auf CD34⁺ Zellen (Katayama et al., 2006; Semerad et al., 2005; Ponomaryov et al., 2000) und hält diese dadurch im Knochenmark (Kim and Broxmeyer, 1998), während man durch Zugabe des CXCR4-Antagonisten AMD3100 die Bindung zwischen SDF-1 und CXCR4 aufheben und dadurch die Mobilisierung von Stammzellen induzieren kann (Broxmeyer et al., 2005; Flomenberg et al., 2005). Eine mögliche Erklärung in diesem Zusammenhang wäre demnach die Hypothese, dass der migrationshemmende Effekt von Orexin A über eine erhöhte Expression des CXCR4-Rezeptors und das damit verbundene Zurückhalten der CD34⁺ Zellen im Knochenmark vermittelt wird.

4.2.4 RAS/p38-MAPK/HIF1A-induzierter Signalweg

Neben den funktionellen Experimenten wollten wir anhand von Genexpressionsanalysen mögliche Hinweise auf zelluläre Signalwege erhalten, die durch die Orexin-Rezeptoren beeinflusst und aktiviert werden. Dabei zeigte sich, dass die Orexin-Stimulation zur verstärkten Expression von Genen im RAS-gekoppelten und HIF1A-induzierten Signalweg führt. Die Tatsache, dass die für die Signalwege beschriebenen Gene nur nach Stimulation mit Orexin A differentiell exprimiert werden, lässt vermuten, dass diese Signale hauptsächlich über den Orexin-Rezeptor 1 aktiviert werden, während der Rezeptor 2 über UBE2S die Stabilität des Transkriptionsfaktors HIF1A vermittelt (Abb.4.3).

Mit Blick auf die Frage nach einer Verbindung zwischen den Orexin-Rezeptoren, dem RAS-Signalweg, HIF1A-induzierten Genen und hämatopoetischen CD34⁺ Zellen finden sich in der Literatur eine Reihe von Hinweisen, die einen möglichen Signalweg in diesem Zusammenhang erkennen lassen. So beobachtete Zampetaki im Jahre 2005, dass die Aktivierung der p38-MAPK in Muskelzellen über den RAS-Signalweg erfolgen kann (Zampetaki et al., 2005). Zudem wird beschrieben, dass die p38-MAPK Aktivierung in Mausfibroblasten den Transkriptionsfaktor HIF1A induziert (Emerling et al., 2005) und dieser

Effekt über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor KSHV vermittelt werden kann (Sodhi et al., 2000). Zusätzlich zur Aktivierung über den RAS/p38-MAPK-gekoppelten Signalweg wurde für HIF1A auch eine Beteiligung an der Hämatopoese beschrieben (Ramirez-Bergeron et al., 2006; Scortegagna et al., 2003) und gezeigt, dass die Thrombopoetin-Rezeptor-induzierte HIF1A-Aktivierung die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen reguliert (Kirito et al., 2005; Kirito et al., 2004). Mit Blick auf die Orexin-Rezeptoren wurde 2006 in CHO-Zellen gezeigt, dass die p38-MAP-Kinase auch über den Orexin-Rezeptor 1 aktiviert werden kann (Ammoun et al., 2006b).

In Anlehnung an unsere und die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse vermuten wir deshalb, dass in hämatopoetischen CD34⁺ Zellen eine Stimulation des Orexin-Rezeptors 1 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor HIF1A über den RAS/p38-MAPK-Signalweg führt und die HIF1A-induzierten Effektormoleküle dadurch möglicherweise die Entwicklung und Differenzierung der CD34⁺ Zellen beeinflussen können (Abb.4.3).

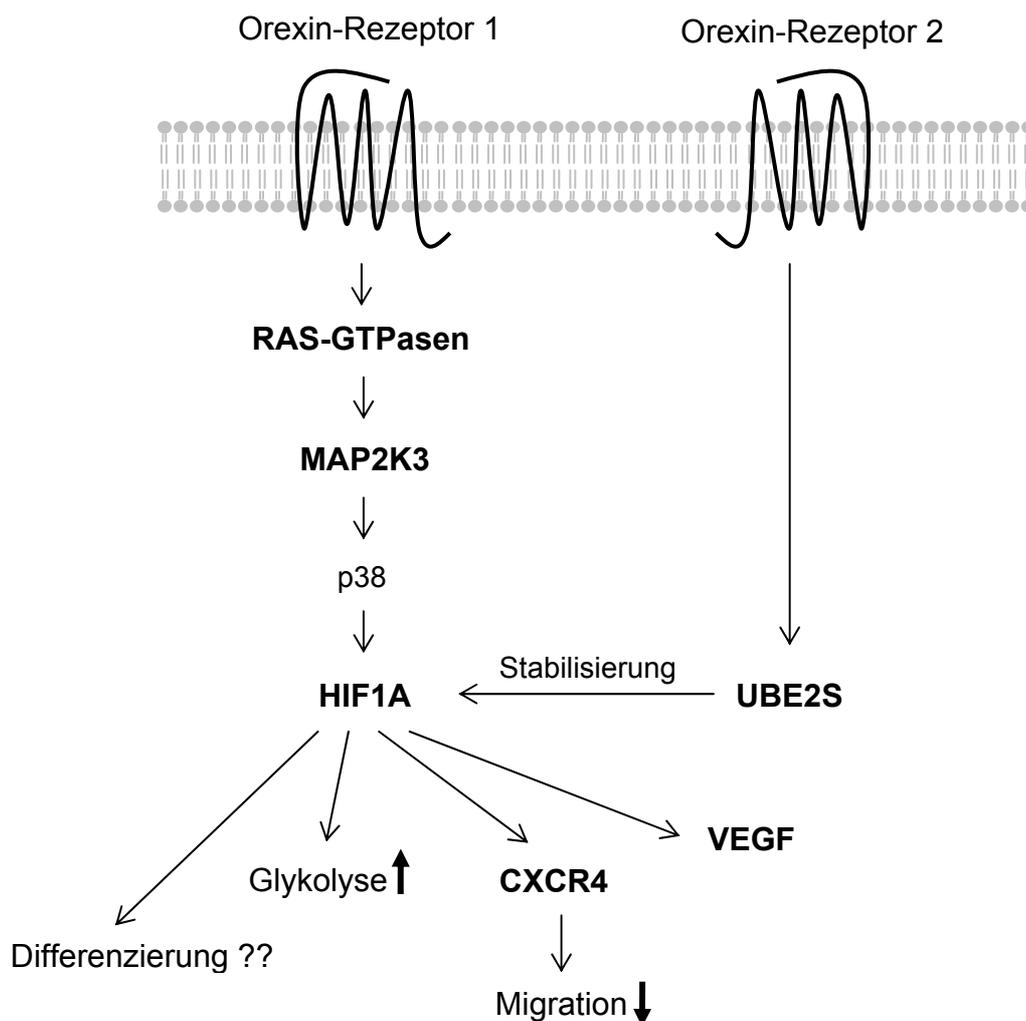


Abbildung 4.3: Hypothese eines RAS/p38-MAPK/HIF1A-induzierten Signalwegs durch Orexin-Rezeptor-Stimulation auf CD34⁺ Zellen. Die in unseren Genexpressionsanalysen signifikant hochregulierten Gene sind fett gedruckt.

Ein Hinweis auf die Bestätigung dieser Vermutung liefert die Übereinstimmung von unseren Ergebnissen mit einem schon beschriebenen HIF1A-induzierten Effekt auf die CXCR4-Expression. So wurde gezeigt, dass CXCR4 ein HIF1A-induziertes Gen ist (Zagzag et al., 2006) und HIF1A die Migration und Adhäsion von Tumorzellen über CXCR4 reguliert (Liu et al., 2006). Im Zusammenhang mit dieser Beobachtung konnten auch wir in unseren Genexpressionsanalysen die Hochregulation von CXCR4 zeigen, was vermuten lässt, dass die Orexin-Rezeptor-1-induzierte Aktivierung von HIF1A in CD34⁺ Zellen eine verstärkte Expression des CXCR4-Rezeptors vermittelt. Diese führt dann im Knochenmark durch eine verstärkte Bindung an SDF-1 zu einer erhöhten Adhäsion und einer reduzierten Migration von CD34⁺ Zellen. Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem orexinergen System und dem HIF1A-gekoppelten Signalweg ist der durch HIF1A induzierte Effekt einer gesteigerten Glykolyse (Blancher and Harris, 1998; Wood et al., 1998). So fanden auch wir durch Orexin-Stimulation Gene verstärkt exprimiert, die in glykolytische Prozesse involviert sind, wie zum Beispiel PFKFB3, PRKAR2B, HK1 und RANBP2. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass durch Orexin-Stimulation in CD34⁺ Zellen eine HIF1A-induzierte Steigerung der Glykolyse und des Energiestoffwechsels vermittelt wird (Abb.4.3).

4.2.5 Apoptose und Proliferation

Da in aktuellen Publikationen gezeigt wird, dass sich durch Stimulation des Orexin-Rezeptors 1 in Neuroblastom- und CHO-Zellen Apoptose induzieren lässt (Voisin et al., 2006; Ammoun et al., 2006b; Rouet-Benzineb et al., 2004), untersuchten wir den Einfluss der Orexin-Stimulation auf die Proliferation und Apoptose von CD34⁺ Zellen unter funktionellen und molekulargenetischen Aspekten. Dabei konnten wir in Zellkulturexperimenten auch 24 h nach Stimulation mit 1 µM oder 0,1 µM Orexin A oder Orexin B keine signifikant veränderte Anzahl an apoptotischen CD34⁺ Zellen detektieren. Zudem führte weder die 5tägige Stimulation mit Orexin A oder Orexin B zu einer Änderung der relativen Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu waren bei der Genexpressionanalyse mit Orexin A oder Orexin B einige Gene differentiell exprimiert, die in Verbindung mit Proliferation und Apoptose beschrieben werden. Da wir aber sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende und apoptosinduzierende Gene identifizieren konnten, vermuten wir, dass das Wechselspiel und die gegenseitige Regulation dieser Signale letztlich der Grund für die nicht vorhandenen funktionellen Effekte bei Proliferation und Apoptose sind.

4.2.6 Orexin-induzierte Effekte in nicht-hämatopoetischen Geweben

Neben der gesteigerten Expression von Genen im RAS- und HIF1A-gekoppelten Signalweg waren in den CD34⁺ Zellen nach Orexin-Rezeptor-Stimulation auch eine Reihe von Genen differentiell exprimiert, für die schon in anderen Geweben eine Beteiligung an Orexin-induzierten Effekte beschrieben wurde. Die Beobachtung, dass wir dabei Gene fanden, die auch in neuronalen und hormonellen Signalkaskaden eine Rolle spielen, passt zur hypothalamischen Expression und Funktion des orexinergeren Systems. So wurden die Orexine und ihre Rezeptoren zum ersten Mal in hypothalamischen Neuronen beschrieben (Sakurai et al., 1998) und seitdem ihre Funktion bei der neuronalen Regulation der Nahrungsaufnahme, des Schlaf-Wach-Rhythmus, der neuroendokrinen Homöostase und der Stress- und Abwehrreaktion in einer Reihe von Arbeiten dargestellt. Des Weiteren wurde erst kürzlich die Expression von Orexinen und ihren Rezeptoren in Adipozyten beschrieben und gezeigt, dass eine Stimulation mit Orexinen zu einer Erhöhung des Adipozyten-Differenzierungsfaktors PPARG2 (Rosen, 2005) führt, was vermuten lässt, dass Orexine eine Rolle bei der Adipogenese spielen (Digby et al., 2006). Gleichermäßen fanden wir durch Orexin-Stimulation in CD34⁺ Zellen Gene hochreguliert, die an der Differenzierung von Adipozyten beteiligt sind, wie zum Beispiel CEBPA, PPARBP und TGFB1 (Rosen, 2005; Zhou et al., 2005). Diese Übereinstimmung zwischen dem beobachteten Genexpressionsmuster und den schon beschriebenen Orexin-induzierten Effekten zeigt, dass die von uns in CD34⁺ Zellen ermittelten, differentiell exprimierten Gene tatsächlich aus der Orexin-Rezeptor-Stimulation resultieren und Orexin-spezifische Signale in CD34⁺ Zellen vermitteln. Mit Blick auf die Funktion der hochregulierten Gene in anderen Geweben könnte man vermuten, dass sich die beschriebenen Effekte möglicherweise auf das hämatopoetische System übertragen lassen. So könnten Gene wie ID2, PPARBP oder SMS, die die Differenzierung von Neuronen, Adipozyten oder Spermatozyten vermitteln, in CD34⁺ Zellen an der Entwicklung und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen beteiligt sein. Ein Hinweis auf diese Vermutung liefert das Beispiel des Transkriptionsfaktors CEBPA, der sowohl bei der Adipogenese (Rosen, 2005; Lacasa et al., 2001) als auch bei der hämatopoetischen Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen (Friedman et al., 2003) eine entscheidende Rolle spielt. Auch der Zytokinrezeptor CXCR4 reguliert sowohl im hämatopoetischen als auch im neuronalen System die Adhäsion und Migration von Stammzellen bzw. Neuronen (Stumm and Holt, 2007; Katayama et al., 2006; Schwarting et al., 2006; Mohle et al., 1998; Kim and Broxmeyer, 1998). Wir vermuten somit, dass die Gene, für die schon in anderen Geweben ein Orexin-spezifischer Effekt beschrieben wurde, in CD34⁺ Zellen ähnliche Effekte vor einem hämatologischen Hintergrund vermitteln, wobei diese Vermutung in weiteren Untersuchungen noch genauer beleuchtet werden muss.

4.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Neben der Frage nach der funktionellen Aktivität der Orexin-Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen konnten wir durch unsere Untersuchungen Hinweise darauf erhalten, an welche Art von G-Protein die Orexin-Rezeptoren in CD34⁺ Zellen möglicherweise gekoppelt sind. Die Tatsache, dass wir im Rahmen der Arbeit noch keine eindeutige Antwort auf die Frage erhalten haben, welche einzelnen Effekte über den Orexin-Rezeptor 1 oder 2 vermittelt werden, lässt sich durch die Komplexität des Orexin-Signalings erklären, das durch eine Reihe von strukturellen und funktionellen Faktoren beeinflusst wird.

Da humane hämatopoetische CD34⁺ Zellen sowohl den Orexin-Rezeptor 1 als auch den Orexin-Rezeptor 2 exprimieren und die Liganden Orexin A und Orexin B jeweils an beide Orexin-Rezeptoren binden, werden bei einer Orexin-Stimulation auch stets beide Rezeptoren aktiviert. Hinzu kommt die Tatsache, dass Orexin B aufgrund seiner verstärkten Affinität für den Rezeptor 2 die Orexin-Rezeptoren in unterschiedlichem Maße aktiviert. Deshalb kann man davon ausgehen, dass der beobachtete funktionelle Effekt nach einer Orexin-Stimulation aus dem Zusammenspiel von beiden Rezeptor-vermittelten Effekten resultiert und dadurch eine Zuordnung eines Effektes zu einem einzelnen Rezeptor nicht möglich ist.

Unter Verwendung eines spezifischen Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten (Smart et al., 2001) wollten wir deshalb den Rezeptor-1-induzierten Signalweg ausschalten und somit einen Hinweis auf den Rezeptor-1-vermittelten Effekt erhalten. Leider zeigte sich in einigen funktionellen Experimenten schon durch den Antagonisten alleine ein signifikanter Effekt. So führte eine Inkubation mit 1 µM oder 0,1 µM des Antagonisten zur Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration. Auch die durch SDF-1β-induzierte Erhöhung der Calciumkonzentration und das klonogene Wachstum der CD34⁺ Zellen wurden durch 10 µM oder 0,1 µM des Antagonisten vermindert. Dass dieser Effekt durch den Antagonisten selber und nicht durch das Lösungsmittel DMSO vermittelt wird, zeigt die Beobachtung, dass das Lösungsmittel im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Veränderung der cAMP- oder Calciumkonzentration oder des klonogenen Wachstums bewirkte. Erklären ließe sich die Antagonisten-induzierte Reduktion zum einen durch eine intrinsische Wirkung des Antagonisten, die unabhängig von den Orexin-Rezeptoren vermittelt wird. Zum anderen wäre es denkbar, dass das im CD34⁺ Zellmedium enthaltene Rinderserum (FBS) Spuren von bovinem Orexin A aufweist, das dann bei Blockade des Orexin-Rezeptor 1 einen Effekt über den Orexin-Rezeptor 2 vermittelt.

Aufgrund dieses komplexen Zusammenspiels aus der Expression beider Orexin-Rezeptoren, der unterschiedliche Liganden-Affinität und der intrinsischen Aktivität des Antagonisten konnten wir im Rahmen unserer bisherigen Arbeit noch keine klare Zuordnung der Effekte zu einem der beiden Orexin-Rezeptoren machen, sondern können in Anlehnung an unsere Ergebnisse und die beschriebene Literatur nur Vermutungen über die Art der G-Protein-

Kopplung und die Orexin-Rezeptor-1- oder -2-vermittelten Effekte anstellen. Mit Blick auf weiterführende Untersuchungen könnte die Frage nach rezeptorspezifischen Effekten möglicherweise anhand von Orexin-Rezeptor-Knockout Mäusen geklärt werden, die jeweils nur einen der beiden Rezeptoren exprimieren. Auch die Verwendung von siRNAs zur Unterdrückung der Orexin-Rezeptor-Expression in CD34⁺ Zellen stellt eine Möglichkeit dar, um die Rezeptor-1- oder -2-vermittelten Effekte eindeutig zuzuordnen.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Nachdem von unserer Arbeitsgruppe die Expression der G-Protein-gekoppelten Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf humanen hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen gezeigt worden war, gelang es uns im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal funktionelle Effekte der Orexine für hämatopoetische CD34⁺ Zellen aufzuzeigen. Dabei konnten wir in einer Reihe von molekularen und zellulären Untersuchungen Orexin-induzierte Effekte beobachten, die einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung der Orexin-Rezeptoren für die CD34⁺ Zellen geben.

Unserer Ergebnisse, dass die Orexin-Rezeptoren von frühen Stammzellen stärker exprimiert werden als von reiferen CD34⁺ Zellen, deutet darauf hin, dass die Rezeptoren vor allem in der frühen Entwicklung von CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen eine funktionelle Rolle spielen und dabei vermutlich an der Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch unsere Beobachtung unterstützt, dass durch Orexin-Rezeptor-Stimulation das klonogene Wachstum von CD34⁺ Zellen gehemmt wird und zudem Gene hochreguliert werden, die an der Selbsterneuerung von Stammzellen beteiligt sind. Des Weiteren vermuten wir, dass die Orexine über ihre Rezeptoren die Stammzellmigration regulieren, indem sie die Migration reduzieren und die CD34⁺ Zellen dadurch verstärkt im Knochenmark verbleiben. Neben diesen systemischen Effekten geben unserer Ergebnisse auch einen Hinweis darauf, dass die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in CD34⁺ Zellen verschiedene und mehr als ein G-Protein aktivieren können. Dabei ist der Orexin-Rezeptor 1 vermutlich an ein G_s-Protein als auch an ein G_q-Protein und der Orexin-Rezeptor 2 an ein G_i-Protein gekoppelt. Zudem scheint der Orexin-Rezeptor 1 seine intrazellulären Signale unter anderem über den RAS/p38-MAPK/HIF1A-induzierten Signalweg zu vermitteln.

Insgesamt konnten wir somit zum ersten Mal einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem orexinergen und hämatopoetischen System zeigen, wobei unsere Ergebnisse die Grundlage für weiterführende Untersuchungen bieten, die diesen Zusammenhang näher beleuchten müssen. So stellt zum Beispiel die Anwendung von Langzeitkulturen eine gute Möglichkeit dar, um das Selbsterneuerungspotenzial von CD34⁺ Zellen nach Orexin-

Stimulation zu untersuchen. Aufbauend auf diese Zellkulturexperimente ergibt sich dann die Frage, inwieweit die Orexine auch in vivo die Differenzierung der CD34⁺ Zellen und die Hämatopoese beeinflussen. Einen Hinweis auf die Antwort könnte dabei die Untersuchung des hämatopoetischen Systems und der Stammzellmigration bei Orexin-Rezeptor- und Orexin-Peptid-Knockout Mäusen geben (Willie et al., 2003; Hara et al., 2001). Neben diesen funktionellen Aspekten geben die von uns ermittelten Genexpressionsdaten Hinweise auf Orexin-induzierte Signalwege. Dabei konnten wir zeigen, dass einer dieser Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF1A führt. Die Tatsache, dass einerseits die Orexine im Rahmen der Stressantwort eine Rolle spielen (Samson et al., 2007; Malendowicz et al., 1999) und andererseits durch oxidativen Stress vor allem HIF1A aktiviert wird (Semenza et al., 1997) und für HIF1A zudem eine Beteiligung an der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen gezeigt wurde (Ramirez-Bergeron et al., 2006; Scortegagna et al., 2003), lässt uns vermuten, dass Orexine möglicherweise im Rahmen einer Stressantwort über den Orexin-Rezeptor 1 den Transkriptionsfaktor HIF1A in CD34⁺ Zellen aktivieren und dadurch die Regulation der Hämatopoese beeinflussen können. Zur Bestätigung dieser Vermutung, müsste man den Signalweg auch auf molekularer Ebene weiter untersuchen. Dabei wäre es zum Beispiel unter Verwendung von siRNAs möglich, spezifische Gene in den Signalwegen auszuschalten und dadurch zu zeigen, dass die involvierten Proteine tatsächlich an der intrazellulären Weiterleitung eines Orexin-Signals beteiligt sind. Weiterhin könnte man anhand von zellbasierten ELISA-Assays den Phosphorylierungsstatus von aktivierten Effektormolekülen wie p38-MAPK unter dem Einfluss der Orexin-Rezeptor-Stimulation analysieren.

Auch die Frage nach der Expression der Orexine im Knochenmark und einer möglichen neuronalen Regulation der Hämatopoese bleibt weiterhin unbeantwortet. So könnten die Orexine einerseits, ähnlich wie der CXCR4-Ligand SDF-1, von Endothelzellen und Osteoblasten im Knochenmarkmilieu exprimiert werden und auf diesem Weg die CD34⁺ Zellen beeinflussen. Dem entgegen steht die Hypothese einer neuronalen Regulation, die durch einige Hinweise aus der Literatur unterstützt wird. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass G-CSF-induzierte Signale über sympathische Nervenenden im Knochenmark die Sekretion von SDF-1 durch Osteoblasten hemmen und dadurch die Stammzellmigration verstärken (Larsson and Scadden, 2006; Katayama et al., 2006). Zudem konnte für das Hormon Leptin gezeigt werden, dass es über den Sympathikus im Knochenmark ausgeschüttet wird und die Knochenbildung beeinflusst (Takeda et al., 2002). In Anlehnung an diese Beobachtungen wäre es denkbar, dass auch die Orexine über sympathische Nervensignale ins Knochenmark gelangen und dann ihre Rezeptoren auf den CD34⁺ Zellen stimulieren. Eine mögliche Bestätigung dieser Hypothese wäre durch die Untersuchung des hämatopoetischen Systems bei narkoleptischen Patienten denkbar, bei denen in 90% der

Fälle die Anzahl der orexinerger Neuronen vermindert ist (Bassetti et al., 2003; Ripley et al., 2001; Nishino et al., 2000). Werden die Orexine tatsächlich von sympathische Neuronen ins Knochenmark sezerniert und beeinflussen auf diesem Weg das hämatopoetische System, würde man vermuten, dass man bei Narkoleptikern aufgrund der verminderten Anzahl an orexinerger Neuronen im Vergleich zu Gesunden eine veränderte Hämatopoese beobachten kann. Dabei wäre es mit Blick auf unsere Ergebnisse aus dem Migrationsassay und dem klonogenen Wachstumstest denkbar, dass Narkoleptiker einen geringeren Anteil an frühen CD34⁺ Zellen und dafür einen höheren Anteil an liniendeterminierten Zellen im Knochenmark aufweisen.

Mit Blick auf die funktionellen Effekten spielt natürlich auch die klinische Relevanz der Orexin-Rezeptor-Expression auf CD34⁺ Zellen eine bedeutende Rolle. Dabei lässt sich in Anlehnung an die Orexin-vermittelte Migrationshemmung möglicherweise ein Bezug zur Stammzellmobilisierung herstellen. Denn falls die Orexine auch in vivo einen hemmenden Effekt auf die Migrationen von CD34⁺ Zellen zeigen, könnte man diesen eventuell durch Zugabe von Orexin-Rezeptor-Antagonisten aufheben und dadurch die Mobilisierung von Stammzellen erhöhen.

Auch bei der Therapie von leukämischen Erkrankungen könnten die Orexine und ihre Rezeptoren von Bedeutung sein. So konnte unserer Arbeitsgruppe vor einiger Zeit zeigen, dass die Orexin-Rezeptoren in leukämischen CD34⁺ Zellen bei der CML im Vergleich zu normalen Zellen hochreguliert sind (Kronenwett et al., 2005). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Rezeptoren eine Rolle bei der malignen Hämatopoese spielen und somit eventuell einen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie darstellen. Ein ähnlicher Effekt wurde von uns auch schon in Zusammenhang mit dem G-Protein-gekoppelten Adenosin-Rezeptor A1 beobachtet. Dabei konnten wir zeigen, dass das klonogene Wachstum von hämatopoetischen CML-Vorläuferzellen unter Verwendung des spezifischen Adenosin-Rezeptor-A1-Antagonisten signifikant stärker gehemmt wird als das Wachstum von gesunden hämatopoetischen Vorläuferzellen. Demnach wäre es auch in Zusammenhang mit den Orexin-Rezeptoren denkbar, dass man zum Beispiel durch den Einsatz von Orexin-Rezeptor-Antagonisten den Einfluss der Orexine auf die maligne Hämatopoese vermindern und dadurch die Therapie der leukämischen Erkrankung unterstützen kann.

Insgesamt müssen also noch eine Reihe von weiteren funktionellen und molekularen Untersuchungen zeigen, welchen genauen Einfluss die Orexine und ihre Rezeptoren auf das hämatopoetische System haben und inwieweit diese Ergebnisse in Zukunft auch eine klinische Relevanz zeigen.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Durch Genexpressionsanalysen entdeckte unsere Arbeitsgruppe, dass humane hämatopoetische CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen eine Reihe von neurobiologisch relevanten Genen exprimieren, darunter auch die G-Protein-gekoppelten Orexin-Rezeptoren 1 und 2 (Steidl et al., 2004). Aufbauend auf diese Beobachtung war es das Ziel dieser Arbeit, die funktionelle Bedeutung der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen zu analysieren.

Methoden: Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in hämatopoetischen Zellen wurden immunomagnetisch angereicherte CD34⁺ Zellen aus peripherem Blut von G-CSF-mobilisierten gesunden Spendern mit den spezifischen Rezeptorliganden Orexin A oder Orexin B alleine oder in Kombination mit dem Orexin-Rezeptor-1-spezifischen Antagonisten SB-334867 stimuliert und anschließend die Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht. Zudem analysierten wir anhand von *Affymetrix*-Microarrays das Expressionsmuster von insgesamt 8.746 Genen in CD34⁺ Zellen nach Orexin-Rezeptor-Stimulation

Ergebnisse/Schlussfolgerung: Anhand von Zweifarbenimmunfluoreszenz konnten wir zunächst die Proteinexpression der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auf humanen CD34⁺ Zellen nachweisen und zeigen, dass die Rezeptoren in frühen unreifen CD34⁺ Zellen stärker exprimiert werden als in reiferen CD34⁺ Zellen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Orexin-Rezeptoren vermutlich eine funktionelle Rolle in der frühen Entwicklung der CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen spielen.

Auf intrazellulärer Ebene konnten wir beobachten, dass eine Stimulation mit Orexin A oder Orexin B in CD34⁺ Zellen zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären „second messenger“ Moleküle cAMP und Calcium führt. Dabei geben unsere Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in CD34⁺ Zellen an verschiedene und mehr als ein G-Protein gekoppelt sind. Wir vermuten, dass der Orexin-Rezeptor 1 seine Effekte über ein G_s-Protein als auch über ein G_q-Protein vermittelt, während der Orexin-Rezeptor 2 ein G_i-Protein aktiviert. Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, dass durch eine Orexin-Stimulation die SDF-1 β -induzierte Migration von CD34⁺ Zellen signifikant reduziert wird, was darauf hinweist, dass die Orexin-Rezeptoren an der Regulation der Stammzellmigration beteiligt sind. Auch das klonogene Wachstum von CD34⁺ Zellen wird durch Orexin A oder Orexin B reduziert, wobei die BFU-E-Kolonien vermutlich über den Orexin-Rezeptor 1 und die CFU-GM Kolonien über den Rezeptor 2 gehemmt werden. Zudem konnten wir zeigen, dass durch Orexin A-Stimulation einige Gene verstärkt exprimiert

werden, die eine Rolle bei der Erhaltung und Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen spielen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Orexine regulierend an der Differenzierung von CD34⁺ Zellen beteiligt sind, wobei möglicherweise die Selbsterneuerung von frühen Stammzellen verstärkt und die Ausdifferenzierung zu determinierteren Vorläuferzellen gehemmt wird.

Im Rahmen unserer Genexpressionsanalysen fanden wir durch Orexin B insgesamt 44 Gene signifikant hochreguliert, während nach Stimulation mit Orexin A insgesamt 156 Gene hochreguliert und 5 Gene herunterreguliert waren. Dabei konnten wir beobachten, dass das Orexin-induzierte Genexpressionsmuster mit den Ergebnissen aus den funktionellen Experimenten übereinstimmte. So zeigten sich neben Genen, die eine Rolle bei der Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoetischen CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen spielen, vor allem Gene verstärkt exprimiert, die an der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt sind oder einen migrationshemmenden Effekt vermitteln. Zudem fanden wir differentiell exprimierte Gene, die an der Orexin-induzierten Regulation von zellulären Prozessen wie dem Glucose- und Lipidmetabolismus oder der oxidativen Stressantwort beteiligt sind. In diesem Zusammenhang weisen unsere Genexpressionsdaten auch darauf hin, dass der Orexin-Rezeptor 1 seine intrazellulären Effekte über eine transkriptionelle Aktivierung des RAS/p38-MAPK/HIF1A-induzierten Signalwegs vermittelt und dadurch möglicherweise an der Regulation der Hämatopoese beteiligt ist.

Insgesamt konnten wir im Rahmen dieser Arbeit erstmals einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem orexinergeren und hämatopoetischen System zeigen. Dabei bieten unsere Ergebnisse die Grundlage für weiterführende Studien, in denen untersucht werden muss, welchen genauen Einfluss die Orexine und ihre Rezeptoren auf das hämatopoetische System haben und inwieweit diese Ergebnisse eine klinische Relevanz zeigen.

5.1 Summary

Introduction: Recently, we could show by gene expression analyses that human hematopoietic CD34⁺ stem and progenitor cells express numerous neurobiological genes, among them the G protein-coupled orexin receptors 1 and 2 (Steidl et al., 2004). With regard to these data the aim of this study was to analyse the functional role of the orexin receptors in hematopoietic CD34⁺ stem and progenitor cells.

Methods: In order to elucidate the functional activity of orexin receptors 1 and 2 in hematopoietic cells we incubated immunomagnetically enriched CD34⁺ cells from peripheral blood of G-CSF-mobilized healthy donors with the specific orexin receptor ligands orexin A or orexin B or in combination with the selective orexin 1 receptor antagonist SB-334867 and examined the functional effects on cellular and molecular level. Furthermore by using *Affymetrix* microarrays we analysed the expression profile of 8793 defined genes in CD34⁺ cells following orexin receptor stimulation

Results/Conclusion: Using 2-colour immunofluorescence we could demonstrate orexin receptor 1 and 2 protein expression and found that expression of these receptors is greater among the more immature CD34⁺ subset in comparison with the lineage determined CD34⁺ subset. These findings indicate that orexin receptors play a functional role in the early development of CD34⁺ stem and progenitor cells.

Following incubation with orexin A or orexin B we could detect a significant decrease of the intracellular second messengers cAMP and calcium in CD34⁺ cells. These results strongly suggest that the orexin receptor 1 and 2 in CD34⁺ cells are coupled to different and more than one G protein. We assume that the orexin receptor 1 mediates its cellular effects by G_s and G_q proteins whereas the receptor 2 can activate G_i proteins. We also found that the migration of CD34⁺ cells induced by SDF-1 β is significantly reduced following stimulation with orexins indicating that orexin receptors are involved in regulation of stem cell migration. Furthermore the clonogenic growth of CD34⁺ cells is significantly impaired in the presence of orexin A or orexin B with BFU-E colonies probably being decreased by the orexin receptor 1 and CFU-GM colonies by the orexin receptor 2. Moreover, we found that stimulation with orexin A resulted in increased expression of genes related to maintenance and self-renewal of hematopoietic stem cells. These data suggest that orexins are involved in the process of differentiation of CD34⁺ cells by presumably increasing self-renewal of early stem cells and suppressing differentiation into determined progenitor cells.

With regard to our gene expression profiles we found 44 genes significantly up-regulated following incubation with orexin B whereas stimulation with orexin A resulted in 156 significantly up-regulated and 5 significantly down-regulated genes. Thereby we could show

that the gene expression pattern induced by orexins was in line with the results of our functional experiments. In addition to genes playing a role in self-renewal and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells we found increased expression of genes that are involved in regulation of intracellular calcium concentration or mediate inhibition of migration. Furthermore we found differentially expressed genes that take part in regulation of cellular processes that are induced by orexins as glucose and lipid metabolism or oxidative stress response. In this regard, our gene expression profiles suggest that the orexin receptor 1 mediates its intracellular effects by transcriptional activation of the RAS/p38-MAPK/HIF1A signalling pathway resulting in a regulation of hematopoiesis by the neuromediator.

Finally, in this study we could show for the first time a functional interrelation of the orexinergic and hematopoietic system. Our data provide a basis for further studies examining the detailed impact of the orexins and their receptors on the hematopoietic system and to which extend these results show clinical relevance.

6 Anhang

6.1 Differentiell exprimierte Gene in alphabetischer Reihenfolge

Symbol	Genname	Fold-Change	
		OxA	OxB
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	1,29	
ACLY	ATP citrate lyase	1,30	
ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	1,25	1,21
ADAM10	a disintegrin and metalloproteinase domain 10	1,20	
AGL	amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (glycogen debranching enzyme, glycogen storage disease type III)	1,29	
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)	1,28	
AP2S1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit		1,21
APPL	adaptor protein containing pH domain, PTB domain and leucine zipper motif 1	1,22	
ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1- like)	1,26	
ARS2	arsenate resistance protein ARS2	1,27	
ASNS	asparagine synthetase	1,21	
ATP1B1	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide		1,34
ATP2A2	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	1,34	1,26
ATP2B4	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	1,29	
ATP2C1	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	1,22	
ATP6V0B	ATPase, H+ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit c"		1,23
ATXN7	ataxin 7		1,22
BANF1	barrier to autointegration factor 1		1,34
BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	1,29	
BRD4	bromodomain containing 4		1,30
BTN3A3 /// BTN3A2	butyrophilin, subfamily 3, member A3 /// butyrophilin, subfamily 3, member A2	1,25	
BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	1,24	
C15orf5	chromosome 15 open reading frame 5 /// chromosome 15 open reading frame 5	1,22	
C1D	nuclear DNA-binding protein /// nuclear DNA-binding protein	1,31	
C1orf9	chromosome 1 open reading frame 9	1,39	
C21orf45	chromosome 21 open reading frame 45		1,20
CAST	calpastatin	1,20	
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	1,27	
CCNE2	cyclin E2	1,21	
CCNT2	cyclin T2	1,22	
CDC2L1	cell division cycle 2-like 1 (PITSLRE proteins)	1,20	
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha		1,22
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein zeta = CHOP	1,28	
CFL1	cofilin 1 (non-muscle) /// cofilin 1 (non-muscle)		1,29
CLTC	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	1,26	
CPNE3	copine III		1,47
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	1,36	

CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	1,27	
CSK	c-src tyrosine kinase	1,29	
CSPG6	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	1,31	
CTSZ	cathepsin Z		1,27
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1,37	
D8S2298E	reproduction 8	1,22	
DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	1,26	
DDX24	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	1,27	
DDX41	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	1,22	
DKC1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	1,21	
DYRK1A	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	1,20	
EGR1	early growth response 1	1,22	
EMP3	epithelial membrane protein 3		1,31
ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	1,21	
EREG	epiregulin	1,22	
ETNK1	ethanolamine kinase 1	1,20	
G3BP2	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	1,21	
GALC	galactosylceramidase (Krabbe disease)	1,22	
GALNT2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	1,24	
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	1,21	
GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	1,24	
GOSR1	golgi SNAP receptor complex member 1 = GOS28		1,20
H2AFV	H2A histone family, member V	1,29	
HBB	hemoglobin, beta		1,21
HDC	histidine decarboxylase	1,24	
HERC1	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	1,24	
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	1,33	
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)		1,34
HIST2H2AA	histone 2, H2aa		1,24
HK1	hexokinase 1	1,24	
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	1,21	
HNRPA0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0		1,29
HOXA9	homeo box A9	1,28	
HSA277841	ELG protein	1,21	
HSPA1A /// HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	0,80	
HYOU1	hypoxia up-regulated 1		1,21
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein		1,26
IDH3B	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta		1,24
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)		1,29
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	1,25	
IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	1,32	
ITPR2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	1,30	
JAK1	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	1,21	
JARID2	Jumonji, AT rich interactive domain 2	1,24	
JMJD1B	jumonji domain containing 1B	1,20	

JUND	jun D proto-oncogene	1,40	1,21
KIF11	kinesin family member 11	1,25	
KIF4A	kinesin family member 4A	1,21	
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	1,31	
KLF10	Kruppel-like factor 10	1,21	
KNTC2	kinetochore associated 2	1,28	
LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	1,20	
LEMD3	LEM domain containing 3	1,20	
LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1		1,22
LY75	lymphocyte antigen 75	1,28	
LZTFL1	leucine zipper transcription factor-like 1	1,23	
M96	likely ortholog of mouse metal response element binding transcription factor 2		1,21
MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1	1,23	
MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	1,22	
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	1,24	
MAP4K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	1,20	
MARCH6	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6		1,39
MCP	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	1,25	
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B	1,28	1,23
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	1,21	
MS4A3	membrane-spanning 4-domains,subfamily A,member 3 (hematopoietic cell-specific)	1,28	
MSN	moesin	1,23	
MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	1,25	
MTX1	metaxin 1		1,25
MYH9	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	1,24	
MYST3	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	1,24	
NAP1L3	nucleosome assembly protein 1-like 3	1,24	
NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	1,29	
NCOR2	nuclear receptor co-repressor 2	1,31	
NISCH	nischarin	1,24	
NKTR	natural killer-tumor recognition sequence		1,21
NUP153	nucleoporin 153kDa	1,28	
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	1,22	
OS-9	amplified in osteosarcoma	1,28	
PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	1,24	
PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator		1,33
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	1,22	
PHB	prohibitin	0,79	
PHKB	phosphorylase kinase, beta	1,21	
PIP5K1B	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	1,31	
PLCB4	phospholipase C, beta 4	1,20	
PNN	pinin, desmosome associated protein	1,37	
POLA	polymerase (DNA directed), alpha	1,24	
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	1,20	
PPP4C	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit		1,23
PRDX1	peroxiredoxin 1	0,81	

PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	1,22	
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	1,34	
PRPF3	PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)	1,22	
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	1,22	
PSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	0,79	
PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	1,20	
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	1,23	
PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	1,23	
PWP1	nuclear phosphoprotein similar to <i>S. cerevisiae</i> PWP1		1,22
RAB2	RAB2, member RAS oncogene family	1,24	
RAB3-GAP150	rab3 GTPase-activating protein, non-catalytic subunit (150kD)	1,25	
RANBP2	RAN binding protein 2	1,23	
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	1,21	
RAP2C	RAP2C, member of RAS oncogene family	1,24	
RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	1,26	
RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	1,29	
REV3L	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast)	1,22	
RRAGD	Ras-related GTP binding D	1,20	
RREB1	ras responsive element binding protein 1	1,23	
SACS	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin)	1,38	
SDFR1	stromal cell derived factor receptor 1	1,31	
SDHB	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	0,82	
SEC24B	SEC24 related gene family, member B (<i>S. cerevisiae</i>)	1,24	
SEC31L1	SEC31-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	1,26	
SFPQ	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	1,21	
SFRS2IP	splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein		1,31
SFRS6	splicing factor, arginine/serine-rich 6	1,22	
SGKL	serum/glucocorticoid regulated kinase-like		1,31
SGPP1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1		1,21
SH2D2A	SH2 domain protein 2A	1,20	
SLC35A3	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3		1,26
SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	1,29	
SLC39A6	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	1,35	
SMC1L1	SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1 (yeast)	1,38	
SMS	spermine synthase	1,22	
SON	SON DNA binding protein	1,25	
SORD	sorbitol dehydrogenase	1,23	
SPAG9	sperm associated antigen 9	1,29	
SQLE	squalene epoxidase	1,25	
SRPR	signal recognition particle receptor ('docking protein')	1,21	
SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1	1,25	
SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2		1,26
STAM	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1	1,23	
SUPT16H	suppressor of Ty 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,27	
TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa		1,22

TAX1BP3	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	1,21	
TCERG1	transcription elongation regulator 1	1,23	
TDG	thymine-DNA glycosylase	1,30	
TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)		1,22
TM7SF3	transmembrane 7 superfamily member 3		1,28
TNS	tensin	1,21	
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	1,21	
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	1,25	
TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	1,24	
TPP1	tripeptidyl peptidase I	1,29	
TRIM44	tripartite motif-containing 44	1,36	
TRIP12	thyroid hormone receptor interactor 12	1,29	
TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3		1,40
TTK	TTK protein kinase	1,25	
UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S		1,24
UBE4A	ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast)	1,21	
UNR	upstream of NRAS		1,22
USP1	ubiquitin specific protease 1	1,28	
USP8	Ubiquitin specific protease 8	1,20	
VCL	vinculin	1,22	
VEGF	vascular endothelial growth factor	1,21	
VPS4B	vacuolar protein sorting 4B (yeast)	1,20	
XPO1	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	1,21	
YT521	splicing factor YT521-B	1,26	
YY1	YY1 transcription factor /// YY1 transcription factor	1,30	
ZNF238	zinc finger protein 238	1,37	
ZNF330	zinc finger protein 330	1,25	
ZNF580	zinc finger protein 580	1,27	

Tabelle 6.1: Signifikant differentiell exprimierten Gene aus den Orexin A (OxA)- und Orexin B (OxB)-Ansätzen der Genexpressionsanalysen. Der ermittelten „Fold-Change“ ist für jedes Gen angegeben.

7 Literaturverzeichnis

- Abkowitz J.L., Robinson A.E., Kale S., Long M.W. and Chen J.** (2003). Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 102, 1249-1253.
- Ader M., Schachner M. and Bartsch U.** (2004). Integration and differentiation of neural stem cells after transplantation into the dysmyelinated central nervous system of adult mice. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1205-1210.
- Aiuti A., Webb I.J., Bleul C., Springer T. and Gutierrez-Ramos J.C.** (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185, 111-120.
- Alahari S.K., Reddig P.J. and Juliano R.L.** (2004). The integrin-binding protein Nischarin regulates cell migration by inhibiting PAK. *EMBO J.* 23, 2777-2788.
- Alison M.R., Poulosom R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J. and Wright N.A.** (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257.
- Alonso L. and Fuchs E.** (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 Suppl 1, 11830-11835.
- Ammoun S., Johansson L., Ekholm M.E., Holmqvist T., Danis A.S., Korhonen L., Sergeeva O.A., Haas H.L., Akerman K.E. and Kukkonen J.P.** (2006a). 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.
- Ammoun S., Lindholm D., Wootz H., Akerman K.E. and Kukkonen J.P.** (2006b). G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 281, 834-842.
- Antonchuk J., Sauvageau G. and Humphries R.K.** (2001). HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp. Hematol.* 29, 1125-1134.
- Asahara T. and Kawamoto A.** (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287, C572-C579.
- Aslanukov A., Bhowmick R., Guraju M., Oswald J., Raz D., Bush R.A., Sieving P.A., Lu X., Bock C.B. and Ferreira P.A.** (2006). RanBP2 modulates Cox11 and hexokinase I activities and haploinsufficiency of RanBP2 causes deficits in glucose metabolism. *PLoS. Genet.* 2, e177.
- Baffy G., Yang L., Raj S., Manning D.R. and Williamson J.R.** (1994). G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 8483-8487.
- Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Piccioli P., Costa A., Florio T. and Schettini G.** (1999). Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J. Neurochem.* 73, 2348-2357.
- Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L., Kofidis T., Weissman I.L. and Robbins R.C.** (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673.
- Banhashemi B. and Albert P.R.** (2002). Dopamine-D2S receptor inhibition of calcium influx, adenylyl cyclase, and mitogen-activated protein kinase in pituitary cells: distinct Galpha and Gbetagamma requirements. *Mol. Endocrinol.* 16, 2393-2404.

- Bartolovic K., Balabanov S., Hartmann U., Komor M., Boehmler A.M., Buhring H.J., Mohle R., Hoelzer D., Kanz L., Hofmann W.K. and Brummendorf T.H.** (2004). Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. *Blood* 103, 523-529.
- Bassetti C., Gugger M., Bischof M., Mathis J., Sturzenegger C., Werth E., Radanov B., Ripley B., Nishino S. and Mignot E.** (2003). The narcoleptic borderland: a multimodal diagnostic approach including cerebrospinal fluid levels of hypocretin-1 (orexin A). *Sleep Med.* 4, 7-12.
- Bautz F., Denzlinger C., Kanz L. and Mohle R.** (2001). Chemotaxis and transendothelial migration of CD34(+) hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood* 97, 3433-3440.
- Bazan E., Alonso F.J., Redondo C., Lopez-Toledano M.A., Alfaro J.M., Reimers D., Herranz A.S., Paino C.L., Serrano A.B., Cobacho N., Caso E. and Lobo M.V.** (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol. Histopathol.* 19, 1261-1275.
- Beigneux A.P., Kosinski C., Gavino B., Horton J.D., Skarnes W.C. and Young S.G.** (2004). ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *J. Biol. Chem.* 279, 9557-9564.
- Bence K.K., Delibegovic M., Xue B., Gorgun C.Z., Hotamisligil G.S., Neel B.G. and Kahn B.B.** (2006). Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* 12, 917-924.
- Benestad H.B., Strom-Gundersen I., Iversen P.O., Haug E. and Nja A.** (1998). No neuronal regulation of murine bone marrow function. *Blood* 91, 1280-1287.
- Bhatt A., Kaverina I., Otey C. and Huttenlocher A.** (2002). Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J. Cell Sci.* 115, 3415-3425.
- Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C. and Vescovi A.L.** (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.
- Bjornsson J.M., Andersson E., Lundstrom P., Larsson N., Xu X., Repetowska E., Humphries R.K. and Karlsson S.** (2001). Proliferation of primitive myeloid progenitors can be reversibly induced by HOXA10. *Blood* 98, 3301-3308.
- Blancher C. and Harris A.L.** (1998). The molecular basis of the hypoxia response pathway: tumour hypoxia as a therapy target. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 187-194.
- Blangy A., Lane H.A., d'Herin P., Harper M., Kress M. and Nigg E.A.** (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.
- Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A., Polak L. and Fuchs E.** (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118, 635-648.
- Bohmer R.M.** (2004). IL-3-dependent early erythropoiesis is stimulated by autocrine transforming growth factor beta. *Stem Cells* 22, 216-224.
- Bokoch G.M.** (1993). Biology of the Rap proteins, members of the ras superfamily of GTP-binding proteins. *Biochem. J.* 289 (Pt 1), 17-24.
- Bonavia R., Bajetto A., Barbero S., Pirani P., Florio T. and Schettini G.** (2003). Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol. Lett.* 139, 181-189.
- Boulton M. and Albon J.** (2004). Stem cells in the eye. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 643-657.
- Boutou E., Matsas R. and Mamalaki A.** (2001). Isolation of a mouse brain cDNA expressed in developing neuroblasts and mature neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86, 153-167.

- Brandt P., Ibrahim E., Bruns G.A. and Neve R.L.** (1992). Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca(2+)-pumping ATPase isoform PMCA2. *Genomics* 14, 484-487.
- Bray P., Carter A., Simons C., Guo V., Puckett C., Kamholz J., Spiegel A. and Nirenberg M.** (1986). Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 8893-8897.
- Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I. and Blau H.M.** (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.
- Brittan M. and Wright N.A.** (2004). Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 53, 899-910.
- Broxmeyer H.E., Orschell C.M., Clapp D.W., Hangoc G., Cooper S., Plett P.A., Liles W.C., Li X., Graham-Evans B., Campbell T.B., Calandra G., Bridger G., Dale D.C. and Srour E.F.** (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* 201, 1307-1318.
- Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe J., Thomas T.O., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M.R. and Hamm H.E.** (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 24, 765-781.
- Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringhurst F.R., Milner L.A., Kronenberg H.M. and Scadden D.T.** (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Calvo W.** (1968). The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am. J. Anat.* 123, 315-328.
- Canales R.D., Luo Y., Willey J.C., Austermler B., Barbacioru C.C., Boysen C., Hunkapiller K., Jensen R.V., Knight C.R., Lee K.Y., Ma Y., Maqsoodi B., Papallo A., Peters E.H., Poulter K., Ruppel P.L., Samaha R.R., Shi L., Yang W., Zhang L. and Goodsaid F.M.** (2006). Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat. Biotechnol.* 24, 1115-1122.
- Cao B., Bruder J., Kovesdi I. and Huard J.** (2004). Muscle stem cells can act as antigen-presenting cells: implication for gene therapy. *Gene Ther.* 11, 1321-1330.
- Chacko D.M., Das A.V., Zhao X., James J., Bhattacharya S. and Ahmad I.** (2003). Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res.* 43, 937-946.
- Chaudhari M., Cornelius J.G., Schatz D., Peck A.B. and Ramiya V.K.** (2001). Pancreatic stem cells: a therapeutic agent that may offer the best approach for curing type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* 2, 195-202.
- Chen H., Ishii A., Wong W.K., Chen L.B. and Lo S.H.** (2000). Molecular characterization of human tensin. *Biochem. J.* 351 Pt 2, 403-411.
- Chen H.H., Baty C.J., Maeda T., Brooks S., Baker L.C., Ueyama T., Gursoy E., Saba S., Salama G., London B. and Stewart A.F.** (2004). Transcription enhancer factor-1-related factor-transgenic mice develop cardiac conduction defects associated with altered connexin phosphorylation. *Circulation* 110, 2980-2987.
- Cho S., Choi Y.J., Kim J.M., Jeong S.T., Kim J.H., Kim S.H. and Ryu S.E.** (2001). Binding and regulation of HIF-1alpha by a subunit of the proteasome complex, PSMA7. *FEBS Lett.* 498, 62-66.
- Christiano A.M.** (2004). Epithelial stem cells: stepping out of their niche. *Cell* 118, 530-532.

- Civin C.I. and Gore S.D.** (1993). Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J. Hematother.* 2, 137-144.
- Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C., Fackler M.J., Schwartz J.F. and Shaper J.H.** (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133, 157-165.
- Clapham D.E.** (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268.
- Cogle C.R., Yachnis A.T., Laywell E.D., Zander D.S., Wingard J.R., Steindler D.A. and Scott E.W.** (2004). Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363, 1432-1437.
- Cohen J., Oren-Young L., Klingmuller U. and Neumann D.** (2004). Protein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of erythropoietin receptor signalling. *Biochem. J.* 377, 517-524.
- Cohen P.T., Philp A. and Vazquez-Martin C.** (2005). Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* 579, 3278-3286.
- Cortazar D., Kunz C., Saito Y., Steinacher R. and Schar P.** (2006). The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst).*
- Cowland J.B., Carter D., Bjerregaard M.D., Johnsen A.H., Borregaard N. and Lollike K.** (2003). Tissue expression of copines and isolation of copines I and III from the cytosol of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 74, 379-388.
- Craig W., Kay R., Cutler R.L. and Lansdorp P.M.** (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177, 1331-1342.
- Dai F., Yu L., He H., Chen Y., Yu J., Yang Y., Xu Y., Ling W. and Zhao S.** (2002). Human serum and glucocorticoid-inducible kinase-like kinase (SGKL) phosphorylates glycogen synthases kinase 3 beta (GSK-3beta) at serine-9 through direct interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1191-1196.
- de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L., Gautvik V.T., Bartlett F.S., Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M. and Sutcliffe J.G.** (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 322-327.
- Dechat T., Gajewski A., Korbei B., Gerlich D., Daigle N., Haraguchi T., Furukawa K., Ellenberg J. and Foisner R.** (2004). LAP2alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J. Cell Sci.* 117, 6117-6128.
- Defer N., Best-Belpomme M. and Hanoune J.** (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 279, F400-F416.
- DeSouza N., Reiken S., Ondrias K., Yang Y.M., Matkovich S. and Marks A.R.** (2002). Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J. Biol. Chem.* 277, 39397-39400.
- Dey N., Howell B.W., De P.K. and Durden D.L.** (2005). CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity. *Exp. Cell Res.* 307, 1-14.
- Digby J.E., Chen J., Tang J.Y., Lehnert H., Matthews R.N. and Randeva H.S.** (2006). Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J. Endocrinol.* 191, 129-136.
- Doherty M.J., Cadefau J., Stalmans W., Bollen M. and Cohen P.T.** (1998). Loss of the hepatic glycogen-binding subunit (GL) of protein phosphatase 1 underlies deficient glycogen synthesis in

- insulin-dependent diabetic rats and in adrenalectomized starved rats. *Biochem. J.* 333 (Pt 2), 253-257.
- Donato J.L., Ko J., Kutok J.L., Cheng T., Shirakawa T., Mao X.Q., Beach D., Scadden D.T., Sayegh M.H. and Adra C.N.** (2002). Human HTm4 is a hematopoietic cell cycle regulator. *J. Clin. Invest* 109, 51-58.
- Dong Q., Shenker A., Way J., Haddad B.R., Lin K., Hughes M.R., McBride O.W., Spiegel A.M. and Battey J.** (1995). Molecular cloning of human G alpha q cDNA and chromosomal localization of the G alpha q gene (GNAQ) and a processed pseudogene. *Genomics* 30, 470-475.
- Dupuis F., Desplat V., Praloran V. and Denizot Y.** (1997). Effects of lipidic mediators on the growth of human myeloid and erythroid marrow progenitors. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 16, 117-125.
- Dy M., Pacilio M., Arnould A., Machavoine F., Mayeux P., Hermine O., Bodger M. and Schneider E.** (1999). Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: relationship with basophilic and/or megakaryocytic differentiation. *Exp. Hematol.* 27, 1295-1305.
- Elshourbagy N.A., Near J.C., Kmetz P.J., Wells T.N., Groot P.H., Saxty B.A., Hughes S.A., Franklin M. and Gloger I.S.** (1992). Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. *Eur. J. Biochem.* 204, 491-499.
- Emerling B.M., Platanius L.C., Black E., Nebreda A.R., Davis R.J. and Chandel N.S.** (2005). Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Mol. Cell Biol.* 25, 4853-4862.
- Empson R.M., Buckby L.E., Kraus M., Bates K.J., Crompton M.R., Gundelfinger E.D. and Beesley P.W.** (2006). The cell adhesion molecule neuroligin-1 inhibits hippocampal long-term potentiation via a mitogen-activated protein kinase p38-dependent reduction in surface expression of GluR1-containing glutamate receptors. *J. Neurochem.* 99, 850-860.
- Enslin H., Raingeaud J. and Davis R.J.** (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* 273, 1741-1748.
- Erkeland S.J., Valkhof M., Heijmans-Antonissen C., Delwel R., Valk P.J., Hermans M.H. and Touw I.P.** (2003). The gene encoding the transcriptional regulator Yin Yang 1 (YY1) is a myeloid transforming gene interfering with neutrophilic differentiation. *Blood* 101, 1111-1117.
- Evellin S., Nolte J., Tysack K., vom D.F., Thiel M., Weernink P.A., Jakobs K.H., Webb E.J., Lomasney J.W. and Schmidt M.** (2002). Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* 277, 16805-16813.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G. and Mavilio F.** (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
- Fina L., Molgaard H.V., Robertson D., Bradley N.J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D.R., Baker M.A. and Greaves M.F.** (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.
- Fishman G.I., Eddy R.L., Shows T.B., Rosenthal L. and Levinwand L.A.** (1991). The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures. *Genomics* 10, 250-256.
- Fisk H.A., Mattison C.P. and Winey M.** (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 14875-14880.

- Flomenberg N., Devine S.M., Dipersio J.F., Liesveld J.L., McCarty J.M., Rowley S.D., Vesole D.H., Badel K. and Calandra G.** (2005). The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867-1874.
- Forget B.G.** (1979). Molecular genetics of human hemoglobin synthesis. *Ann. Intern. Med.* 91, 605-616.
- Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D. and Semenza G.L.** (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 16, 4604-4613.
- Friedman A.D., Keefer J.R., Kummalue T., Liu H., Wang Q.F. and Cleaves R.** (2003). Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Blood Cells Mol. Dis.* 31, 338-341.
- Fuchs E., Tumber T. and Guasch G.** (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778.
- Fujishiro M., Gotoh Y., Katagiri H., Sakoda H., Ogihara T., Anai M., Onishi Y., Ono H., Funaki M., Inukai K., Fukushima Y., Kikuchi M., Oka Y. and Asano T.** (2001). MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression. *J. Biol. Chem.* 276, 19800-19806.
- Fujiwara T., Harigae H., Okitsu Y., Takahashi S., Yokoyama H., Yamada M.F., Ishizawa K., Kameoka J., Kaku M. and Sasaki T.** (2006). Expression analyses and transcriptional regulation of mouse nucleolar spindle-associated protein gene in erythroid cells: essential role of NF-Y. *Br. J. Haematol.* 135, 583-590.
- Geiger B., Tokuyasu K.T., Dutton A.H. and Singer S.J.** (1980). Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 4127-4131.
- Gibson K.M., Sweetman L., Nyhan W.L., Jakobs C., Rating D., Siemes H. and Hanefeld F.** (1983). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism. *Clin. Chim. Acta* 133, 33-42.
- Goolsby J., Marty M.C., Heletz D., Chiappelli J., Tashko G., Yarnell D., Fishman P.S., Dhib-Jalbut S., Bever C.T., Jr., Pessac B. and Trisler D.** (2003). Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 14926-14931.
- Grammatopoulos D.K., Randeve H.S., Levine M.A., Kanellopoulou K.A. and Hillhouse E.W.** (2001). Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J. Neurochem.* 76, 509-519.
- Gupta S., Verfaillie C., Chmielewski D., Kim Y. and Rosenberg M.E.** (2002). A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.* 62, 1285-1290.
- Gurumurthy S. and Rangnekar V.M.** (2004). Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells. *J. Cell Biochem.* 91, 504-512.
- Hagan J.J., Leslie R.A., Patel S., Evans M.L., Wattam T.A., Holmes S., Benham C.D., Taylor S.G., Routledge C., Hemmati P., Munton R.P., Ashmeade T.E., Shah A.S., Hatcher J.P., Hatcher P.D., Jones D.N., Smith M.I., Piper D.C., Hunter A.J., Porter R.A. and Upton N.** (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10911-10916.
- Hakulinen J. and Keski-Oja J.** (2006). ADAM10-mediated release of complement membrane cofactor protein during apoptosis of epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 21369-21376.

- Hall C., Nelson D.M., Ye X., Baker K., DeCaprio J.A., Seeholzer S., Lipinski M. and Adams P.D.** (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol. Cell Biol.* 21, 1854-1865.
- Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M. and Sakurai T.** (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30, 345-354.
- Harlan J.E., Hajduk P.J., Yoon H.S. and Fesik S.W.** (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.
- Harris D.M., Go V.L., Reeve J.R., Jr. and Wu S.V.** (2002). Stimulation of amylase release by Orexin is mediated by Orexin 2 receptor in AR42J cells. *Pancreas* 25, 405-410.
- Harry A., Chen Y., Magnusson R., Iyengar R. and Weng G.** (1997). Differential regulation of adenylyl cyclases by Galphas. *J. Biol. Chem.* 272, 19017-19021.
- Heinz L.X., Platzer B., Reisner P.M., Jorgl A., Taschner S., Gobel F. and Strobl H.** (2006). Differential involvement of PU.1 and Id2 downstream of TGF-beta1 during Langerhans-cell commitment. *Blood* 107, 1445-1453.
- Hematti P., Sloand E.M., Carvallo C.A., Albert M.R., Yee C.L., Fuehrer M.M., Blancato J.K., Kearns W.G., Barrett J.A., Childs R.W., Vogel J.C. and Dunbar C.E.** (2002). Absence of donor-derived keratinocyte stem cells in skin tissues cultured from patients after mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* 30, 943-949.
- Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., Hill D., Strutt B., Thyssen S., Gray D.A. and Bhatia M.** (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.* 21, 763-770.
- Hilbe W., Dirnhofer S., Oberwasserlechner F., Schmid T., Gunsilius E., Hilbe G., Woll E. and Kahler C.M.** (2004). CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J. Clin. Pathol.* 57, 965-969.
- Hoang Q.V., Bajic D., Yanagisawa M., Nakajima S. and Nakajima Y.** (2003). Effects of orexin (hypocretin) on GIRK channels. *J. Neurophysiol.* 90, 693-702.
- Hollinger S. and Hepler J.R.** (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* 54, 527-559.
- Holmqvist T., Johansson L., Ostman M., Ammoun S., Akerman K.E. and Kukkonen J.P.** (2005). OX1 orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 280, 6570-6579.
- Hu Z., Bonifas J.M., Beech J., Bench G., Shigihara T., Ogawa H., Ikeda S., Mauro T. and Epstein E.H., Jr.** (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat. Genet.* 24, 61-65.
- Hu Z., Gomes I., Horrigan S.K., Kravarusic J., Mar B., Arbieva Z., Chyna B., Fulton N., Edassery S., Raza A. and Westbrook C.A.** (2001). A novel nuclear protein, 5qNCA (LOC51780) is a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on chromosome 5 band q31. *Oncogene* 20, 6946-6954.
- Huang S. and Terstappen L.W.** (1994). Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood* 83, 1515-1526.
- Huber W., von Heydebreck A., Sultmann H., Poustka A. and Vingron M.** (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 18 Suppl 1, S96-104.

- Ianus A., Holz G.G., Theise N.D. and Hussain M.A.** (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest* 111, 843-850.
- Iavarone A., Garg P., Lasorella A., Hsu J. and Israel M.A.** (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 8, 1270-1284.
- Ibanez V., Sharma A., Buonamici S., Verma A., Kalakonda S., Wang J., Kadkol S. and Saunthararajah Y.** (2004). AML1-ETO decreases ETO-2 (MTG16) interactions with nuclear receptor corepressor, an effect that impairs granulocyte differentiation. *Cancer Res.* 64, 4547-4554.
- Ishii T., Yamada M., Sato H., Matsue M., Taketani S., Nakayama K., Sugita Y. and Bannai S.** (1993). Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J. Biol. Chem.* 268, 18633-18636.
- Ito T., Suzuki A., Imai E., Okabe M. and Hori M.** (2001). Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 2625-2635.
- Johren O., Neidert S.J., Kummer M., Dendorfer A. and Dominiak P.** (2001). Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142, 3324-3331.
- Joo J.H., Alpatov R., Munguba G.C., Jackson M.R., Hunt M.E. and Sugrue S.P.** (2005). Reduction of Pnn by RNAi induces loss of cell-cell adhesion between human corneal epithelial cells. *Mol. Vis.* 11, 133-142.
- Jung C.R., Hwang K.S., Yoo J., Cho W.K., Kim J.M., Kim W.H. and Im D.S.** (2006). E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nat. Med.* 12, 809-816.
- Kanamori M., Sandy P., Marzinotto S., Benetti R., Kai C., Hayashizaki Y., Schneider C. and Suzuki H.** (2003). The PDZ protein tax-interacting protein-1 inhibits beta-catenin transcriptional activity and growth of colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 38758-38764.
- Karteris E., Chen J. and Randeve H.S.** (2004). Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 1957-1962.
- Karteris E., Machado R.J., Chen J., Zervou S., Hillhouse E.W. and Randeve H.S.** (2005). Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 288, E1089-E1100.
- Karteris E., Randeve H.S., Grammatopoulos D.K., Jaffe R.B. and Hillhouse E.W.** (2001). Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 4512-4519.
- Katayama Y., Battista M., Kao W.M., Hidalgo A., Peired A.J., Thomas S.A. and Frenette P.S.** (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407-421.
- Katsumoto T., Aikawa Y., Iwama A., Ueda S., Ichikawa H., Ochiya T. and Kitabayashi I.** (2006). MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev.* 20, 1321-1330.
- Katz A., Wu D. and Simon M.I.** (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686-689.
- Kawakami K., Nojima H., Ohta T. and Nagano K.** (1986). Molecular cloning and sequence analysis of human Na,K-ATPase beta-subunit. *Nucleic Acids Res.* 14, 2833-2844.
- Kern, W.F. (2002). PDQ Hematology.

- Kim C.H. and Broxmeyer H.E.** (1998). In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 91, 100-110.
- Kim S.J., Kim Y.S., Yuan J.P., Petralia R.S., Worley P.F. and Linden D.J.** (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426, 285-291.
- Kimura T., Boehmler A.M., Seitz G., Kuci S., Wiesner T., Brinkmann V., Kanz L. and Mohle R.** (2004). The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. *Blood* 103, 4478-4486.
- Kirchgessner A.L. and Liu M.** (1999). Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24, 941-951.
- Kirito K., Fox N. and Kaushansky K.** (2004). Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 24, 6751-6762.
- Kirito K., Fox N., Komatsu N. and Kaushansky K.** (2005). Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha. *Blood* 105, 4258-4263.
- Klump H., Schiedlmeier B. and Baum C.** (2005). Control of Self-Renewal and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells: HOXB4 on the Threshold. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044, 6-15.
- Kobari L., Giarratana M.C., Pflumio F., Izac B., Coulombel L. and Douay L.** (2001). CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10, 273-281.
- Kodama A., Karakesisoglou I., Wong E., Vaezi A. and Fuchs E.** (2003). ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* 115, 343-354.
- Korbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E. and Estrov Z.** (2002). Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* 346, 738-746.
- Kozasa T., Jiang X., Hart M.J., Sternweis P.M., Singer W.D., Gilman A.G., Bollag G. and Sternweis P.C.** (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* 280, 2109-2111.
- Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S. and Sharkis S.J.** (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Krishnaraju K., Hoffman B. and Liebermann D.A.** (2001). Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* 97, 1298-1305.
- Kronenwett R., Butterweck U., Steidl U., Kliszewski S., Neumann F., Bork S., Blanco E.D., Roes N., Graf T., Brors B., Eils R., Maercker C., Kobbe G., Gattermann N. and Haas R.** (2005). Distinct molecular phenotype of malignant CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 24, 5313-5324.
- Kronenwett R., Martin S. and Haas R.** (2000). The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 18, 320-330.
- Kuiperij H.B., de Rooij J., Rehmann H., van Triest M., Wittinghofer A., Bos J.L. and Zwartkruis F.J.** (2003). Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2. *Biochim. Biophys. Acta* 1593, 141-149.
- Kukkonen J.P. and Akerman K.E.** (2001). Orexin receptors couple to Ca²⁺ channels different from store-operated Ca²⁺ channels. *Neuroreport* 12, 2017-2020.

- Kukkonen J.P., Holmqvist T., Ammoun S. and Akerman K.E.** (2002). Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283, C1567-C1591.
- Kurasawa Y., Earnshaw W.C., Mochizuki Y., Dohmae N. and Todokoro K.** (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J.* 23, 3237-3248.
- Kuwabara K., Matsumoto M., Ikeda J., Hori O., Ogawa S., Maeda Y., Kitagawa K., Imuta N., Kinoshita T., Stern D.M., Yanagi H. and Kamada T.** (1996). Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J. Biol. Chem.* 271, 5025-5032.
- LaBarge M.A. and Blau H.M.** (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589-601.
- Lacasa D., Garcia Dos S.E. and Giudicelli Y.** (2001). Site-specific control of rat preadipocyte adipose conversion by ovarian status: Possible involvement of CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors. *Endocrine.* 15, 103-110.
- Lam N.T., Lewis J.T., Cheung A.T., Luk C.T., Tse J., Wang J., Bryer-Ash M., Kolls J.K. and Kieffer T.J.** (2004). Leptin increases hepatic insulin sensitivity and protein tyrosine phosphatase 1B expression. *Mol. Endocrinol.* 18, 1333-1345.
- Lamkhioed B., Abdelilah S.G., Hamid Q., Mansour N., Delespesse G. and Renzi P.M.** (2003). The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34+ progenitor cells. *J. Immunol.* 170, 537-547.
- Larsson J. and Scadden D.** (2006). Nervous activity in a stem cell niche. *Cell* 124, 253-255.
- Larsson K.P., Peltonen H.M., Bart G., Louhivuori L.M., Penttonen A., Antikainen M., Kukkonen J.P. and Akerman K.E.** (2005). Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *J. Biol. Chem.* 280, 1771-1781.
- Laufer N., Beck A.R., Cariou S., Richman L., Hofmann K., Reith W., Slingerland J.M. and Amati B.** (1998). Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 17, 2637-2643.
- Lawrence H.J., Christensen J., Fong S., Hu Y.L., Weissman I., Sauvageau G., Humphries R.K. and Largman C.** (2005). Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* 106, 3988-3994.
- Lee C.M., Onesime D., Reddy C.D., Dhanasekaran N. and Reddy E.P.** (2002). JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14189-14194.
- Lee J.W., Choi H.S., Gyuris J., Brent R. and Moore D.D.** (1995). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 9, 243-254.
- Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A. and Hebbel R.P.** (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest* 105, 71-77.
- Liu Y.L., Yu J.M., Song X.R., Wang X.W., Xing L.G. and Gao B.B.** (2006). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1320-1326.
- Logothetis D.E., Kurachi Y., Galper J., Neer E.J. and Clapham D.E.** (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321-326.

- Lopez M., Senaris R., Gallego R., Garcia-Caballero T., Lago F., Seoane L., Casanueva F. and Dieguez C.** (1999). Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology* 140, 5991-5994.
- Lord K.A., Abdollahi A., Hoffman-Liebermann B. and Liebermann D.A.** (1993). Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell Biol.* 13, 841-851.
- Losada A. and Hirano T.** (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19, 1269-1287.
- Lund P.E., Shariatmadari R., Uustare A., Detheux M., Parmentier M., Kukkonen J.P. and Akerman K.E.** (2000). The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 275, 30806-30812.
- Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chateauneuf A., Stocco R., Greig G.M., Kargman S., Hooks S.B., Hosfield E., Williams D.L., Jr., Ford-Hutchinson A.W., Caskey C.T. and Evans J.F.** (1999). Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399, 789-793.
- Lyu M.S., Park D.J., Rhee S.G. and Kozak C.A.** (1996). Genetic mapping of the human and mouse phospholipase C genes. *Mamm. Genome* 7, 501-504.
- Machida S., Spangenburg E.E. and Booth F.W.** (2004). Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages. *Cell Prolif.* 37, 267-277.
- Maestroni G.J.** (1998). Catecholaminergic regulation of hematopoiesis in mice. *Blood* 92, 2971-2973.
- Maestroni G.J.** (2000). Neurohormones and catecholamines as functional components of the bone marrow microenvironment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 29-37.
- Magga J., Bart G., Oker-Blom C., Kukkonen J.P., Akerman K.E. and Nasman J.** (2006). Agonist potency differentiates G protein activation and Ca²⁺ signalling by the orexin receptor type 1. *Biochem. Pharmacol.* 71, 827-836.
- Malendowicz L.K., Tortorella C. and Nussdorfer G.G.** (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, 185-188.
- Mao X., Kikani C.K., Riojas R.A., Langlais P., Wang L., Ramos F.J., Fang Q., Christ-Roberts C.Y., Hong J.Y., Kim R.Y., Liu F. and Dong L.Q.** (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat. Cell Biol.* 8, 516-523.
- Marshman E., Booth C. and Potten C.S.** (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98.
- Marteijn J.A., van Emst L., Erpelinck-Verschueren C.A., Nikoloski G., Menke A., de Witte T., Lowenberg B., Jansen J.H. and van der Reijden B.A.** (2005). The E3 ubiquitin-protein ligase Triad1 inhibits clonogenic growth of primary myeloid progenitor cells. *Blood* 106, 4114-4123.
- Martin G., Fabre V., Siggins G.R. and de Lecea L.** (2002). Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens. *Regul. Pept.* 104, 111-117.
- Maruyama T., Farina A., Dey A., Cheong J., Bermudez V.P., Tamura T., Sciortino S., Shuman J., Hurwitz J. and Ozato K.** (2002). A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase. *Mol. Cell Biol.* 22, 6509-6520.
- Massa M., Rosti V., Ferrario M., Campanelli R., Ramajoli I., Rosso R., De Ferrari G.M., Ferlini M., Goffredo L., Bertoletti A., Klersy C., Pecci A., Moratti R. and Tavazzi L.** (2005). Increased

circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105, 199-206.

Mazo I.B., Gutierrez-Ramos J.C., Frenette P.S., Hynes R.O., Wagner D.D. and von Andrian U.H. (1998). Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 188, 465-474.

Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Gottardo L., Aragona F. and Nussdorfer G.G. (2001). Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 778-782.

McAllister G., Whiting P., Hammond E.A., Knowles M.R., Atack J.R., Bailey F.J., Maigetter R. and Ragan C.I. (1992). cDNA cloning of human and rat brain myo-inositol monophosphatase. Expression and characterization of the human recombinant enzyme. *Biochem. J.* 284 (Pt 3), 749-754.

McAtee L.C., Sutton S.W., Rudolph D.A., Li X., Aluisio L.E., Phuong V.K., Dvorak C.A., Lovenberg T.W., Carruthers N.I. and Jones T.K. (2004). Novel substituted 4-phenyl-[1,3]dioxanes: potent and selective orexin receptor 2 (OX(2)R) antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4225-4229.

Messina E., De Angelis L., Frati G., Morrone S., Chimenti S., Fiordaliso F., Salio M., Battaglia M., Latronico M.V., Coletta M., Vivarelli E., Frati L., Cossu G. and Giacomello A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911-921.

Metcalf D. and Nicola N.A. (1991). Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cells in vitro: effects of combination with colony-stimulating factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6239-6243.

Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D. and Crain B. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1364-1369.

Mishra S., Murphy L.C., Nyomba B.L. and Murphy L.J. (2005). Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol. Med.* 11, 192-197.

Miyan J.A., Broome C.S. and Whetton A.D. (1998). Neural regulation of bone marrow. *Blood* 92, 2971-2973.

Mohle R., Bautz F., Denzlinger C. and Kanz L. (2001). Transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. Role of chemotactic factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938, 26-34.

Mohle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A., Brugger W. and Kanz L. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91, 4523-4530.

Mohle R., Boehmler A.M., Denzlinger C. and Kanz L. (2003). Nonpeptide mediators in the hematopoietic microenvironment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 996, 61-66.

Mons N., Decorte L., Jaffard R. and Cooper D.M. (1998). Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci.* 62, 1647-1652.

Mottet D., Dumont V., Deccache Y., Demazy C., Ninane N., Raes M. and Michiels C. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31277-31285.

Mueller B.U., Pabst T., Osato M., Asou N., Johansen L.M., Minden M.D., Behre G., Hiddemann W., Ito Y. and Tenen D.G. (2002). Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 100, 998-1007.

- Muroya S., Funahashi H., Yamanaka A., Kohno D., Uramura K., Nambu T., Shibahara M., Kuramochi M., Takigawa M., Yanagisawa M., Sakurai T., Shioda S. and Yada T.** (2004). Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1524-1534.
- Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A. and Field L.J.** (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668.
- Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T. and Sasano H.** (2003). Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol. Cell Endocrinol.* 205, 43-50.
- Nakauchi H.** (2004). Isolation and clonal characterization of hematopoietic and liver stem cells. *Cornea* 23, S2-S7.
- Neumann C.A., Krause D.S., Carman C.V., Das S., Dubey D.P., Abraham J.L., Bronson R.T., Fujiwara Y., Orkin S.H. and Van Etten R.A.** (2003). Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424, 561-565.
- Neuringer I.P. and Randell S.H.** (2004). Stem cells and repair of lung injuries. *Respir. Res.* 5, 6.
- Nishino S., Ripley B., Overeem S., Lammers G.J. and Mignot E.** (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355, 39-40.
- Nowak K.W., Mackowiak P., Switonska M.M., Fabis M. and Malendowicz L.K.** (2000). Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci.* 66, 449-454.
- Obach M., Navarro-Sabate A., Caro J., Kong X., Duran J., Gomez M., Perales J.C., Ventura F., Rosa J.L. and Bartrons R.** (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 279, 53562-53570.
- Offermanns S.** (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83, 101-130.
- Oh H., Chi X., Bradfute S.B., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Schwartz R.J., Entman M.L. and Schneider M.D.** (2004). Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015, 182-189.
- Ohishi K., Varnum-Finney B. and Bernstein I.D.** (2002). The notch pathway: modulation of cell fate decisions in hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* 75, 449-459.
- Okamoto R., Yajima T., Yamazaki M., Kanai T., Mukai M., Okamoto S., Ikeda Y., Hibi T., Inazawa J. and Watanabe M.** (2002). Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.* 8, 1011-1017.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A. and Anversa P.** (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A. and Anversa P.** (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10344-10349.
- Otto W.R.** (2002). Lung epithelial stem cells. *J. Pathol.* 197, 527-535.

- Ozawa K., Kondo T., Hori O., Kitao Y., Stern D.M., Eisenmenger W., Ogawa S. and Ohshima T.** (2001). Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J. Clin. Invest* 108, 41-50.
- Paganini S., Guidetti G.F., Catricala S., Trionfini P., Panelli S., Balduini C. and Torti M.** (2006). Identification and biochemical characterization of Rap2C, a new member of the Rap family of small GTP-binding proteins. *Biochimie* 88, 285-295.
- Pan G.J., Chang Z.Y., Scholer H.R. and Pei D.** (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 12, 321-329.
- Parker F., Maurier F., Delumeau I., Duchesne M., Faucher D., Debussche L., Dugue A., Schweighoffer F. and Tocque B.** (1996). A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 16, 2561-2569.
- Peled A., Petit I., Kollet O., Magid M., Ponomaryov T., Byk T., Nagler A., Ben Hur H., Many A., Shultz L., Lider O., Alon R., Zipori D. and Lapidot T.** (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-848.
- Penn M.S., Zhang M., Deglurkar I. and Topol E.J.** (2004). Role of stem cell homing in myocardial regeneration. *Int. J. Cardiol.* 95 Suppl 1, S23-S25.
- Pesce M., Anastassiadis K. and Scholer H.R.** (1999). Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues. Organs* 165, 144-152.
- Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S. and Goff J.P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Petruschke T., Rohrig K. and Hauner H.** (1994). Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 18, 532-536.
- Petzer A.L., Hogge D.E., Landsdorp P.M., Reid D.S. and Eaves C.J.** (1996). Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1470-1474.
- Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G. and Kilduff T.S.** (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996-10015.
- Pierce K.L., Premont R.T. and Lefkowitz R.J.** (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639-650.
- Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W. and Vogelstein B.** (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Ponomaryov T., Peled A., Petit I., Taichman R.S., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Magerus A., Caruz A., Fujii N., Nagler A., Lahav M., Szyper-Kravitz M., Zipori D. and Lapidot T.** (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J. Clin. Invest* 106, 1331-1339.
- Poulsom R., Forbes S.J., Hodivala-Dilke K., Ryan E., Wyles S., Navaratnarajah S., Jeffery R., Hunt T., Alison M., Cook T., Pusey C. and Wright N.A.** (2001). Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J. Pathol.* 195, 229-235.
- Qian J., Chen Z., Lin J., Wang W. and Cen J.** (2005). Decreased expression of CCAAT/enhancer binding protein zeta (C/EBPzeta) in patients with different myeloid diseases. *Leuk. Res.* 29, 1435-1441.

- Quaini F., Urbanek K., Beltrami A.P., Finato N., Beltrami C.A., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A. and Anversa P.** (2002). Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.* 346, 5-15.
- Ramirez-Bergeron D.L., Runge A., Adelman D.M., Gohil M. and Simon M.C.** (2006). HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev. Cell* 11, 81-92.
- Randeva H.S., Karteris E., Grammatopoulos D. and Hillhouse E.W.** (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, 4808-4813.
- Rhee S.G.** (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281-312.
- Ripley B., Fujiki N., Okura M., Mignot E. and Nishino S.** (2001). Hypocretin levels in sporadic and familial cases of canine narcolepsy. *Neurobiol. Dis.* 8, 525-534.
- Roof D.J., Hayes A., Adamian M., Chishti A.H. and Li T.** (1997). Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *J. Cell Biol.* 138, 575-588.
- Rosen E.D.** (2005). The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 31-34.
- Rothbarth K., Spiess E., Juodka B., Yavuzer U., Nehls P., Stammer H. and Werner D.** (1999). Induction of apoptosis by overexpression of the DNA-binding and DNA-PK-activating protein C1D. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 13), 2223-2232.
- Rouet-Benzineb P., Rouyer-Fessard C., Jarry A., Avondo V., Pouzet C., Yanagisawa M., Laboisse C., Laburthe M. and Voisin T.** (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, 45875-45886.
- Russell S.H., Kim M.S., Small C.J., Abbott C.R., Morgan D.G., Taheri S., Murphy K.G., Todd J.F., Ghatei M.A. and Bloom S.R.** (2000). Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J. Neuroendocrinol.* 12, 1213-1218.
- Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J. and Yanagisawa M.** (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.
- Sakurai T., Moriguchi T., Furuya K., Kajiwara N., Nakamura T., Yanagisawa M. and Goto K.** (1999). Structure and function of human prepro-orexin gene. *J. Biol. Chem.* 274, 17771-17776.
- Samson W.K., Bagley S.L., Ferguson A.V. and White M.M.** (2007). Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 292, R382-R387.
- Samson W.K., Gosnell B., Chang J.K., Resch Z.T. and Murphy T.C.** (1999). Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res.* 831, 248-253.
- Sastry S.K., Lyons P.D., Schaller M.D. and Burridge K.** (2002). PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *J. Cell Sci.* 115, 4305-4316.
- Schanzer A., Wachs F.P., Wilhelm D., Acker T., Cooper-Kuhn C., Beck H., Winkler J., Aigner L., Plate K.H. and Kuhn H.G.** (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.* 14, 237-248.
- Schwartz G.A., Henion T.R., Nugent J.D., Caplan B. and Tobet S.** (2006). Stromal cell-derived factor-1 (chemokine C-X-C motif ligand 12) and chemokine C-X-C motif receptor 4 are required

- for migration of gonadotropin-releasing hormone neurons to the forebrain. *J. Neurosci.* 26, 6834-6840.
- Scortegagna M., Morris M.A., Oktay Y., Bennett M. and Garcia J.A.** (2003). The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* 102, 1634-1640.
- Seitz G., Boehmler A.M., Kanz L. and Mohle R.** (2005). The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044, 84-89.
- Sekiguchi T., Hirose E., Nakashima N., Li M. and Nishimoto T.** (2001). Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J. Biol. Chem.* 276, 7246-7257.
- Semenza G.L.** (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983-1991.
- Semenza G.L., Agani F., Booth G., Forsythe J., Iyer N., Jiang B.H., Leung S., Roe R., Wiener C. and Yu A.** (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 51, 553-555.
- Semerad C.L., Christopher M.J., Liu F., Short B., Simmons P.J., Winkler I., Levesque J.P., Chappel J., Ross F.P. and Link D.C.** (2005). G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 106, 3020-3027.
- Shankar S., Mohapatra B. and Suri A.** (1998). Cloning of a novel human testis mRNA specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 561-565.
- Shen H.H., Huang A.M., Hoheisel J. and Tsai S.F.** (2001). Identification and characterization of a SET/NAP protein encoded by a brain-specific gene, MB20. *Genomics* 71, 21-33.
- Shi Y., Tabesh M. and Sugrue S.P.** (2000). Role of cell adhesion-associated protein, pinin (DRS/memA), in corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1337-1345.
- Shirasaka T., Nakazato M., Matsukura S., Takasaki M. and Kannan H.** (1999). Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am. J. Physiol* 277, R1780-R1785.
- Shultz L.D., Lyons B.L., Burzenski L.M., Gott B., Chen X., Chaleff S., Kotb M., Gillies S.D., King M., Mangada J., Greiner D.L. and Handgretinger R.** (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477-6489.
- Smart D., Sabido-David C., Brough S.J., Jewitt F., Johns A., Porter R.A. and Jerman J.C.** (2001). SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1179-1182.
- Sodhi A., Montaner S., Patel V., Zohar M., Bais C., Mesri E.A. and Gutkind J.S.** (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.* 60, 4873-4880.
- Song S., Witek R.P., Lu Y., Choi Y.K., Zheng D., Jorgensen M., Li C., Flotte T.R. and Petersen B.E.** (2004). Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice. *Hepatology* 40, 918-924.
- Stamm C., Westphal B., Kleine H.D., Petzsch M., Kittner C., Klinge H., Schumichen C., Nienaber C.A., Freund M. and Steinhoff G.** (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45-46.
- Steel R., Doherty J.P., Buzzard K., Clemons N., Hawkins C.J. and Anderson R.L.** (2004). Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 279, 51490-51499.

- Steidl U., Bork S., Schaub S., Selbach O., Seres J., Aivado M., Schroeder T., Rohr U.P., Fenk R., Kliszewski S., Maercker C., Neubert P., Bornstein S.R., Haas H.L., Kobbe G., Tenen D.G., Haas R. and Kronenwett R.** (2004). Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood* 104, 81-88.
- Steidl U., Kronenwett R. and Haas R.** (2003a). Differential gene expression underlying the functional distinctions of primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from peripheral blood and bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 996, 89-100.
- Steidl U., Kronenwett R., Martin S. and Haas R.** (2003b). Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitam. Horm.* 66, 1-28.
- Steidl U., Kronenwett R., Rohr U.P., Fenk R., Kliszewski S., Maercker C., Neubert P., Aivado M., Koch J., Modlich O., Bojar H., Gattermann N. and Haas R.** (2002). Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood* 99, 2037-2044.
- Stein M.I., Zhu J. and Emerson S.G.** (2004). Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 32, 1129-1136.
- Stephens L., Smrcka A., Cooke F.T., Jackson T.R., Sternweis P.C. and Hawkins P.T.** (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* 77, 83-93.
- Stone J.C.** (2006). Regulation of Ras in lymphocytes: get a GRP. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 858-861.
- Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., Kostering M., Hernandez A., Sorg R.V., Kogler G. and Wernet P.** (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106, 1913-1918.
- Stumm R. and Hollt V.** (2007). CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 377-382.
- Sun T.T. and Lavker R.M.** (2004). Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 9, 202-207.
- Sutherland H.J., Eaves C.J., Eaves A.C., Dragowska W. and Lansdorp P.M.** (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74, 1563-1570.
- Suzuki N., Nakamura S., Mano H. and Kozasa T.** (2003). Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 733-738.
- Takeda S., Eleftheriou F., Levasseur R., Liu X., Zhao L., Parker K.L., Armstrong D., Ducy P. and Karsenty G.** (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111, 305-317.
- Tang W.J. and Gilman A.G.** (1991). Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 254, 1500-1503.
- Tarnowski M. and Sieron A.L.** (2006). Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med. Sci. Monit.* 12, RA154-RA163.
- Taussig R., Tang W.J., Hepler J.R. and Gilman A.G.** (1994). Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 269, 6093-6100.
- Taylor C.W., Genazzani A.A. and Morris S.A.** (1999). Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 26, 237-251.

- Taylor S.S., Hussein D., Wang Y., Elderkin S. and Morrow C.J.** (2001). Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J. Cell Sci.* 114, 4385-4395.
- Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E. and Scott E.W.** (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
- Terskikh A.V., Easterday M.C., Li L., Hood L., Kornblum H.I., Geschwind D.H. and Weissman I.L.** (2001). From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7934-7939.
- Terstappen L.W., Huang S., Safford M., Lansdorp P.M. and Loken M.R.** (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺. *Blood* 77, 1218-1227.
- Terui K., Takahashi Y., Kitazawa J., Toki T., Yokoyama M. and Ito E.** (2000). Expression of transcription factors during megakaryocytic differentiation of CD34⁺ cells from human cord blood induced by thrombopoietin. *Tohoku J. Exp. Med.* 192, 259-273.
- Theise N.D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M. and Krause D.S.** (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31, 235-240.
- Thiagalingam A., De Bustros A., Borges M., Jasti R., Compton D., Diamond L., Mabry M., Ball D.W., Baylin S.B. and Nelkin B.D.** (1996). RREB-1, a novel zinc finger protein, is involved in the differentiation response to Ras in human medullary thyroid carcinomas. *Mol. Cell Biol.* 16, 5335-5345.
- TILL J.E.** (1961). Radiation effects on the division cycle of mammalian cells in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 95, 911-919.
- Tolias K.F., Rameh L.E., Ishihara H., Shibasaki Y., Chen J., Prestwich G.D., Cantley L.C. and Carpenter C.L.** (1998). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 18040-18046.
- Toyoda M., Kojima M. and Takeuchi T.** (2000). Jumonji is a nuclear protein that participates in the negative regulation of cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 332-336.
- Tse H.F., Kwong Y.L., Chan J.K., Lo G., Ho C.L. and Lau C.P.** (2003). Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-49.
- Tsuneki H., Sugihara Y., Honda R., Wada T., Sasaoka T. and Kimura I.** (2002). Reduction of blood glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 245-252.
- Uramura K., Funahashi H., Muroya S., Shioda S., Takigawa M. and Yada T.** (2001). Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca²⁺ signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport* 12, 1885-1889.
- van den Pol A.N., Gao X.B., Obrietan K., Kilduff T.S. and Belousov A.B.** (1998). Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J. Neurosci.* 18, 7962-7971.
- van den Pol A.N., Patrylo P.R., Ghosh P.K. and Gao X.B.** (2001). Lateral hypothalamus: early developmental expression and response to hypocretin (orexin). *J. Comp Neurol.* 433, 349-363.

- Vangheluwe P., Raeymaekers L., Dode L. and Wuytack F.** (2005). Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium* 38, 291-302.
- Venkatachalam K., Zheng F. and Gill D.L.** (2003). Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 278, 29031-29040.
- Voisin T., Firar A.E., Avondo V. and Laburthe M.** (2006). Orexin-Induced Apoptosis: The Key Role of the Seven Transmembrane Domain Orexin Type 2 (OX2R) Receptor. *Endocrinology*.
- Wagers A.J., Sherwood R.I., Christensen J.L. and Weissman I.L.** (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.
- Wang H., Iakova P., Wilde M., Welm A., Goode T., Roesler W.J. and Timchenko N.A.** (2001a). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol. Cell* 8, 817-828.
- Wang S., Sdrulla A., Johnson J.E., Yokota Y. and Barres B.A.** (2001b). A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. *Neuron* 29, 603-614.
- Wang X., Ikeguchi Y., McCloskey D.E., Nelson P. and Pegg A.E.** (2004). Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse. *J. Biol. Chem.* 279, 51370-51375.
- Watanabe M., Nakamura M., Sato K., Kano M., Simon M.I. and Inoue Y.** (1998). Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase Cbeta in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2016-2025.
- Weilbaecher K., Weissman I., Blume K. and Heimfeld S.** (1991). Culture of phenotypically defined hematopoietic stem cells and other progenitors at limiting dilution on Dexter monolayers. *Blood* 78, 945-952.
- Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Tokita S., Williams S.C., Kisanuki Y.Y., Marcus J.N., Lee C., Elmquist J.K., Kohlmeier K.A., Leonard C.S., Richardson J.A., Hammer R.E. and Yanagisawa M.** (2003). Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 38, 715-730.
- Winkler J.** (2003). [Adult neural stem cells: therapeutic potential in neurology]. *Med. Klin. (Munich)* 98 Suppl 2, 27-31.
- Wojcikiewicz R.J. and Luo S.G.** (1998). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Type I, II, and III receptors are differentially susceptible to phosphorylation and are phosphorylated in intact cells. *J. Biol. Chem.* 273, 5670-5677.
- Wood S.M., Wiesener M.S., Yeates K.M., Okada N., Pugh C.W., Maxwell P.H. and Ratcliffe P.J.** (1998). Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J. Biol. Chem.* 273, 8360-8368.
- Wright D.E., Wagers A.J., Gulati A.P., Johnson F.L. and Weissman I.L.** (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294, 1933-1936.
- Xu N., Bradley L., Ambdukar I. and Gutkind J.S.** (1993). A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6741-6745.
- Yamada M., Ishii N., Asao H., Murata K., Kanazawa C., Sasaki H. and Sugamura K.** (2002). Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol. Cell Biol.* 22, 8648-8658.

- Yamada M., Takeshita T., Miura S., Murata K., Kimura Y., Ishii N., Nose M., Sakagami H., Kondo H., Tashiro F., Miyazaki J.I., Sasaki H. and Sugamura K.** (2001). Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol. Cell Biol.* 21, 3807-3819.
- Yamamoto-Hino M., Sugiyama T., Hikichi K., Mattei M.G., Hasegawa K., Sekine S., Sakurada K., Miyawaki A., Furuichi T., Hasegawa M. and .** (1994). Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Receptors. Channels* 2, 9-22.
- Yanai T., Sugimoto K., Takashita E., Aihara Y., Tsurumaki Y., Tsuji T. and Mori K.J.** (1995). Separate control of the survival, the self-renewal and the differentiation of hemopoietic stem cells. *Cell Struct. Funct.* 20, 117-124.
- Yao Z.X., Qin M.L., Liu J.J., Chen X.S. and Zhou D.S.** (2004). In vitro cultivation of human fetal pancreatic ductal stem cells and their differentiation into insulin-producing cells. *World J. Gastroenterol.* 10, 1452-1456.
- Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P. and Smith A.G.** (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.
- Yokoyama N., Hayashi N., Seki T., Pante N., Ohba T., Nishii K., Kuma K., Hayashida T., Miyata T., Aebi U. and .** (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 376, 184-188.
- Yun Z., Maecker H.L., Johnson R.S. and Giaccia A.J.** (2002). Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell* 2, 331-341.
- Zagzag D., Lukyanov Y., Lan L., Ali M.A., Esencay M., Mendez O., Yee H., Voura E.B. and Newcomb E.W.** (2006). Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 86, 1221-1232.
- Zamir I., Dawson J., Lavinsky R.M., Glass C.K., Rosenfeld M.G. and Lazar M.A.** (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14400-14405.
- Zampetaki A., Zhang Z., Hu Y. and Xu Q.** (2005). Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288, H2946-H2954.
- Zhou S., Lechpammer S., Greenberger J.S. and Glowacki J.** (2005). Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor-beta/Smad3 signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 22688-22696.
- Zhu J. and Emerson S.G.** (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295-3313.

8 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BFU-E	burst forming unit erythrocyte
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFU-GM	colony forming unit granulocyte/macrophage
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLP	lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor)
CMP	myeloide Vorläuferzelle (common myeloid progenitor)
CO ₂	Kohlendioxid
cRNA	komplementäre RNA
DAG	Diacylglycerin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
FACS	F luorescence A ctivated C ell S orting
FAM	6-Carboxyfluorescin
FBS	fötales Rinderserum (F oetal B ovine S erum)
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	Maß für die Zellgröße bei FACS-Analysen (Forward Scatter)
g	Maßeinheit der Erdbeschleunigung (1 g ~ 9,81 m/s ²)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
Gly-A	Glycophorin A
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

GMP	Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle (granulocyte-monocyte progenitor)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung (H anks' B uffered S alt S olution)
HCl	Hypochlorid
HLA-DR	Humanes Leukozyten-Antigen DR
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP3R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
kD	Kilodalton
M	Molar
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle (megakaryocyte-erythrocyte progenitor)
Mg	Milligramm
MHSZ	multipotente hämatopoetische Stammzelle
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNCs	mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OXR1	Orexin-Rezeptor 1
OXR2	Orexin-Rezeptor 2
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (P hosphate B uffered S aline)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDE	Phosphodiesterase

PE	Phycoerythrin
PHSZ	pluripotente hämatopoetische Stammzelle
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase-C- β
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor 1
sec	Sekunde
SSC	Maß für Dichte und Granularität einer Zelle bei FACS-Analysen (Side Scatter)
TPO	Thrombopoetin
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

9 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, 23.Mai 2007

(Simone Bork)

10 Danksagung

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

PD. Dr. med. Ralf Kronenwett danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie durchzuführen, für seine wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit, die unermüdliche Geduld beim Korrekturlesen sowie für die Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Bei Prof. Dr. Dieter Willbold bedanke ich mich ganz herzlich für die naturwissenschaftliche Betreuung und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht auch an Dr. med. Ulrich Steidl, für die Einarbeitung und Betreuung, für seine hilfreichen fachlichen Ratschläge und vor allem für seine immer wieder motivierenden Ideen und aufmunternden Worte.

Michael Rosskopf vom Institut für Bioinformatik gilt mein Dank für die Unterstützung bei der statistischen und bioinformatischen Auswertung der Genexpressionsdaten.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die langjährige hilfsbereite Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit bedanken. Die Arbeit im Labor und ebenso die zahlreichen Kaffeepausen, Grillabende und Weihnachtsfeiern mit euch haben immer viel Spaß gemacht und ich hoffe wir sehen uns noch so ab und zu!

Ein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an Bärbel, Astrid, Sabrina und Elena, für ihr immer offenes Ohr, ihre wissenschaftliche als auch seelische Unterstützung und vor allem für ihre Freundschaft. Mit euch zusammen hatte ich viel Spaß und ich hoffe wir verlieren uns nicht aus den Augen. Bleibt so wie ihr seid!

Mein innigster Dank gilt aber vor allem meiner Familie und Klaus, für ihre liebevolle Unterstützung, ihre unentwegte Motivation und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.