

Osmolyte und Osmolytstrategien von  
humanen und murinen hämatopoetischen  
Stamm- und Progenitorzellen

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

vorgelegt von

Stefanie Brookmann

aus Bad Homburg

Oktober 2007

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie in  
Kooperation mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische  
Immunologie der Heinrich-Heine-Universität

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

Referent: PD. Dr. rer. nat. Ulrich Warskulat

Korreferent: Univ.-Prof. Prof. *h.c.* Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2007

---

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
<b>1.1. Hämatopoetische Stammzellen</b>	<b>1</b>
1.1.1. Eigenschaften, Vorkommen und Differenzierung	1
1.1.2. Charakterisierung	3
1.1.3. Klinische und biologische Relevanz	4
1.1.4. Gewinnung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	5
<b>1.2. Osmolytstrategien</b>	<b>7</b>
1.2.1. Regulierung der Zellvolumenhomöostase	7
1.2.2. Kompatible organische Osmolyte	9
1.2.3. Osmoregulation in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	11
<b>1.3. Zielsetzung und Arbeitsprogramm</b>	<b>12</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Materialien</b>	<b>13</b>
2.1.1. Geräte	13
2.1.2. Verbrauchsmaterial	13
2.1.3. Kits	14
2.1.4. Chemikalien, Lösungen und Medien	15
2.1.5. Zelllinien	16
2.1.6. Oligonukleotide	16
2.1.7. Antikörper	17
2.1.8. Versuchstiere	17
<b>2.2. Methoden</b>	<b>18</b>
2.2.1. Isolierung von humanen primären hämatopoetischen Zellen	18
2.2.1.1. <i>Herkunft von CD34 positiven Zellen</i>	18
2.2.1.2. <i>Herkunft von CD3, CD19 und CD14 positiven Zellen</i>	18
2.2.1.3. <i>Gewinnung der mononukleären Zellen</i>	18
2.2.1.4. <i>Immunomagnetische Selektion</i>	18

2.2.2. Zellkultur humaner Zellen	18
2.2.3. Einfluss von Osmolyten auf die Kryokonservierung	19
2.2.4. G-CSF Mobilisation	19
2.2.5. Präparation von murinen Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen	19
2.2.6. Immunomagnetische Selektion von murinen Zellen	20
2.2.6.1. <i>Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup> - Zellen</i>	20
2.2.6.2. <i>CD90 positive Zellen</i>	20
2.2.7. Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie	20
2.2.7.1. <i>Charakterisierung von Oberflächenantigenen</i>	20
2.2.7.2. <i>Vitalitätsmessung</i>	20
2.2.8. RNA Isolation	21
2.2.9. Analyse der osmoregulierten mRNA-Expression von Osmolyttransportern	21
2.2.10. Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR	21
2.2.10.1. <i>Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR     in einem Schritt</i>	21
2.2.10.2. <i>Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR     in zwei Schritten</i>	21
2.2.11. Messung der Aufnahme von kompatiblen organischen Osmolyten	22
2.2.12. Proteinbestimmung nach Bradford	22
2.2.13. [ <sup>3</sup> H]Thymidin-Proliferationsmessung	22
2.2.14. Kolonieassays	23
2.2.15. Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie	23
2.2.16. RNA-Qualitätskontrolle	24
2.2.17. Western-Blot-Analyse	25
2.2.18. T-Zell-Aktivierung	26
2.2.19. Statistik	27
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Osmolytstrategien von humanen hämatopoetischen Zellen</b>	<b>28</b>
3.1.1. Untersuchungen an primären CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und leukämischen Zelllinien (KG-1a, K562 und K422)	28

3.1.1.1. <i>Osmoregulierte mRNA-Expression der Osmolytaufnahmesysteme für Betain, myo-Inositol und Taurin</i>	28
3.1.1.2. <i>Hyperosmotisch induzierte Aufnahme der kompatiblen organischen Osmolyte Betain, myo-Inositol und Taurin</i>	31
3.1.2. Osmolytstrategien in unterschiedlich differenzierten hämatopoetischen Zellen	33
3.1.3. Einfluss der kompatiblen organischen Osmolyte auf die Kryokonservierung	36
3.1.3.1. <i>Untersuchungen an Zelllinien</i>	36
3.1.3.2. <i>Untersuchungen an primären CD34 positiven Zellen</i>	38
<b>3.2. Untersuchung der Taurintransporter (TAUT)-Knockoutmaus</b>	<b>40</b>
3.2.1. Vergleichende Analysen des hämatopoetischen Systems	40
3.2.1.1. <i>Allgemeine Daten</i>	40
3.2.1.2. <i>Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen</i>	42
3.2.1.3. <i>Kolonieassay</i>	44
3.2.2. Mobilisation mit G-CSF	45
3.2.2.1. <i>Elektronische Zellzählung</i>	45
3.2.2.2. <i>Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen</i>	47
3.2.2.3. <i>Kolonieassay</i>	49
3.2.3. Genexpressionsanalysen von murinen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und weiterführende Untersuchungen in murinen T-Zellen	52
3.2.3.1. <i>Genexpressionsanalyse</i>	52
3.2.3.2. <i>Regulierte Gene in T-Zellen</i>	56
3.2.3.3. <i>T-Zell-Aktivierung</i>	58
<b>4. Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Osmolytstrategien in humanen hämatopoetischen primären Zellen und Zelllinien</b>	<b>61</b>

<b>4.2. Auswirkungen einer Taurindefizienz auf das hämatopoetische System im Modell der TAUT-Knockoutmaus</b>	<b>64</b>
<b>4.3. Ausblick und klinische Relevanz</b>	<b>69</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>5.1. Summary</b>	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>87</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Hämatopoetische Stammzellen

### 1.1.1. Eigenschaften, Vorkommen und Differenzierung

Die Aufrechterhaltung unseres hämatopoetischen Systems erfordert die tägliche Produktion von  $10^{12}$  neuen Zellen. Zwischen Milliarden von Knochenmarkszellen findet sich ein kleiner Anteil an pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, die für die Bildung dieser hohen Anzahl an Blutzellen verantwortlich sind (Zimmermann, Martens, 2005; Engelhardt *et al.*, 2002).

Hämatopoetische Stammzellen sind - wie alle somatischen Stammzellen - definiert als undifferenzierte Zellen, die sich zum einen selbst erneuern und zum anderen die Fähigkeit besitzen, differenzierte Zellen zu bilden (Giebel *et al.*, 2006; Ross, Li, 2006; Ho, 2005; Suda *et al.*, 2005). Da sowohl eine unkontrollierte Expansion - wie bei Leukämien - als auch der Verlust von Stammzellen fatal ist, muss das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung reguliert werden (Giebel *et al.*, 2006). Dieses Schicksal der Stammzellen wird maßgeblich durch ihre spezifische Umgebung reguliert, die sogenannte „Stammzellnische“ (Suda *et al.*, 2005). Hämatopoetische Stammzellen wandern im späten embryonalen Stadium von der Leber, dem blutbildenden Organ der frühen embryonalen Phase, ins Knochenmark, das ihnen für den Rest ihres Lebens als „Stammzellnische“ dient. Diese „Nische“ besteht aus unterschiedlichen Zelltypen (Stromazellen, Endothelzellen, Osteoblasten), der extrazellulären Matrix und löslichen Faktoren, hauptsächlich Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Majka *et al.*, 2005).

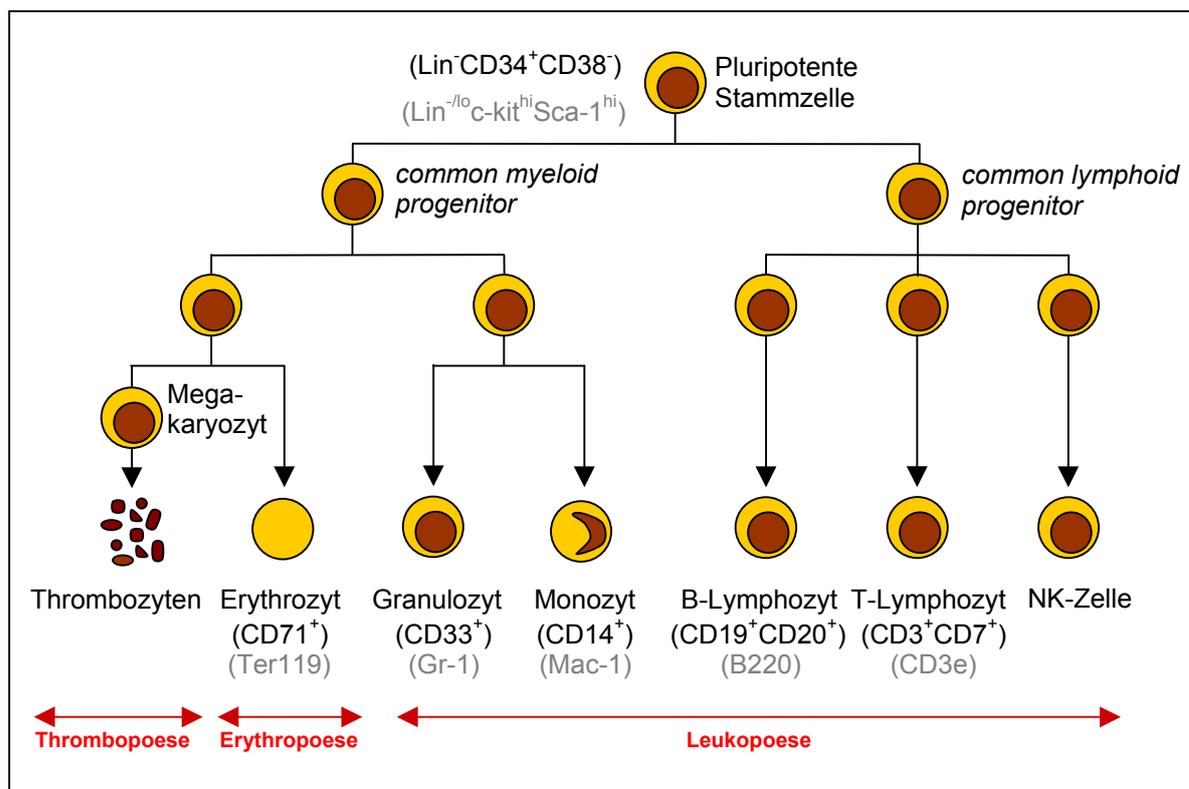
Diese Faktoren und Matrixkomponenten haben einen entscheidenden Einfluss darauf, ob sich die Stammzelle einer symmetrischen Teilung unterzieht, bei der zwei Tochterstammzellen entstehen, oder einer asymmetrischen Teilung, bei der eine Tochterzelle produziert wird, die die Stammzelleigenschaft erhält, und eine andere, die die Differenzierung initiiert (Ho, 2005; Majka *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2004).

Bei der Differenzierung entstehen aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle Progenitorzellen, die mit fortschreitender Entwicklung zur reifen

Blutzelle immer stärker determiniert sind. Diese reiferen, liniendeterminierten Vorläuferzellen zeichnen sich durch die Koexpression von spezifischen, linien-abhängigen Oberflächenmolekülen aus, wie zum Beispiel CD3, CD19 und CD20 (s. Abb. 1) (Civin, Gore, 1993).

Unter den Progenitorzellen befinden sich die *common lymphoid progenitors* (CLP), die sich in alle lymphoiden Zellen differenzieren können, und die *common myeloid progenitors* (CMP), die das Potential haben, sich in alle myeloischen Zellen zu differenzieren (Domen *et al.*, 2006; Manz *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 1997).

Somit kann man zwei Entwicklungslinien in der Hämatopoese, dem Prozess der Blutbildung, unterscheiden: die myeloische und die lymphoide Reihe (Abb.1). Aus Ersterer gehen Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Erythrozyten hervor. Aus letzterer differenzieren sich die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Lymphozyten: T-Zellen und B-Zellen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese.** Angabe einiger relevanter Oberflächenmarker. (.) = humane Oberflächenmarker, (○) = murine Oberflächenmarker, hi = starke Expression (*high*), lo = geringe Expression (*low*)

### 1.1.2. Charakterisierung

Hämatopoetische Stammzellen können zum einen immunphänotypisch, und zum anderen funktionell durch ihre Eigenschaften in Zellkultur und *in vivo* Modellen charakterisiert werden (Steidl *et al.*, 2003).

Immunphänotypisch unterscheiden sich hämatopoetische Stammzellen von anderen Blutzellen einerseits durch ihr Fehlen von linienspezifischen Markern (Lineage negativ; Lin<sup>-</sup>) und andererseits durch das Vorhanden sein von bestimmten Oberflächenantigenen (Wognum *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2002).

Murine hämatopoetische Stammzellen sind als Lineage negative Zellen gekennzeichnet, die die Oberflächenmarker Sca-1 und c-Kit exprimieren [Lin<sup>-</sup> Sca<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> (LSK)] (Lennartsson *et al.*, 2005). Neben den Markern Sca-1 und c-Kit gibt es noch verschiedene andere Marker, mit denen man Subpopulationen der murinen hämatopoetischen Stammzellen definieren kann, zum Beispiel CD27, CD34, CD38 und CD90.1 (Domen *et al.*, 2006).

Beim Menschen findet man die frühe multipotente Stammzelle in der Population der Lineage negativen, CD34 positiven Zellen, die CD38 nur schwach oder gar nicht exprimieren (Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) (Haas, Kronenwett, 2005). Innerhalb dieser Population kann man anhand verschiedener Marker (z.B. CD90, CD117, CD133) wiederum Untergruppen unterteilen (Domen *et al.*, 2006).

Die experimentellen Möglichkeiten, immer reinere Präparationen von hämatopoetischen Stammzellen zu erhalten, haben entscheidend zur funktionellen und biochemischen Charakterisierung dieser Zellen beigetragen. Aufgrund von praktischen Schwierigkeiten und erhöhten Kostenfaktoren, werden diese Zellen jedoch nicht zu therapeutischen Zwecken (s. 1.1.3.) eingesetzt.

Hierzu werden CD34 positive Zellen verwendet: eine sehr heterogene Population von Zellen, die sich zu einem kleinen Anteil aus pluripotenten Stammzellen und einem großen Anteil aus Vorläuferzellen, die sich bereits in eine Linie differenziert haben, zusammensetzt (Menendez *et al.*, 2001). Die CD34 positiven Zellen werden als hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) bezeichnet.

Bei dieser Population handelt es sich im Knochenmark um ca. 1-5% der Zellen (Engelhardt *et al.*, 2002; Menendez *et al.*, 2001), im peripheren Blut machen diese Zellen weniger als 0,05% aus (Menendez *et al.*, 2001).

Funktionell können hämatopoetische Stammzellen in verschiedenen Assays analysiert werden. Als „Gold-Standard“, zur Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen, transplantiert man eine potentielle Kandidatenzelle in ein letal bestrahltes Tiermodell und verfolgt ob diese Zelle das hämatopoetische System rekonstituiert und lebenslang erhält (Domen *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2001).

Nachdem der Oberflächenmarker CD34 entdeckt wurde, zeigten Berenson *et al.* 1988, dass in Pavianen mit letaler Bestrahlung des Knochenmarks durch die Transplantation von CD34 positiven Zellen das hämatopoetische System rekonstituiert wurde. 1991 wurde in Brustkrebspatienten eine angereicherte CD34 positive Population mit einem schnellen Anwachsen des Transplantats und einer Reduktion der Abstoßung des Transplantats in Verbindung gebracht (Gagenahalli *et al.*, 2006).

Neben den Transplantationsmodellen, können hämatopoetische Vorläuferzellen funktionell mittels *in vitro* Assays (Kolonieassays) auf ihre Fähigkeit zum klonogenen Wachstum und zur Differenzierung untersucht werden (Steidl *et al.*, 2003).

### **1.1.3. Klinische und biologische Relevanz**

Aufgrund der Fähigkeit der hämatopoetischen Stammzellen, die Hämatopoese nach myeloablativen (= Knochenmark zerstörenden) Therapien (z.B. Chemotherapie) zu rekonstituieren, werden sie seit Jahren für Stammzelltransplantationen eingesetzt (Giebel *et al.*, 2006; Engelhardt *et al.*, 2002). Die wichtigsten Indikationen für eine Stammzelltransplantation sind hämatologische Neoplasien (Leukämie oder Lymphome) und der Einsatz von Hochdosis-Chemotherapien bei nicht hämatologischen Erkrankungen (maligne Erkrankungen anderer Organe) (Domen *et al.*, 2006). Weitere Indikationen sind ein genetisch determiniertes oder erworbenes Knochenmarksversagen, wie beispielsweise bei aplastischen Anämien, Sichelzellenanämien und Autoimmunerkrankungen (Domen *et al.*, 2006).

Bei der Transplantation unterscheidet man zwischen autologen Transplantationen, das heißt Spender und Empfänger sind identisch, und allogenen Transplantationen, wenn es sich bei Spender und Empfänger um zwei verschiedene Personen handelt. Eine autologe Transplantation erfolgt z.B. nach Hochdosis-Chemotherapien bei Patienten mit Multiplem Myelom, Brustkrebs und

Lungenkrebs. Allogene Transplantationen werden vor allem bei Leukämien eingesetzt.

Die Biologie von hämatopoetischen Stammzellen spielt zudem in der Regenerationsforschung eine große Rolle. In diesem Zusammenhang wurde in einer Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt, dass sich hämatopoetische Stammzellen über ihr blutbildendes Potenzial hinaus in Hepatozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen oder Zellen des Nervensystems differenzieren können (Goolsby *et al.*, 2003; Orlic *et al.*, 2001; Alison *et al.*, 2000).

Des Weiteren werden hämatopoetische Stammzellen in der Krebsforschung intensiv studiert. Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen, die durch eine spezifische t(9;22) chromosomale Translokation charakterisiert ist (Diaz-Blanco *et al.*, 2007). Diese Translokation führt zu einer Expression des BCR-ABL Fusionsgens und einer klonalen Expansion der hämatopoetischen Progenitorzellen.

#### **1.1.4. Gewinnung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen**

Die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen erfolgt aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder dem Nabelschnurblut (Wright-Kanuth, Smith, 2001).

Da die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut begrenzt ist, wird diese Quelle hauptsächlich in der Pädiatrie genutzt (Chao *et al.*, 2004).

Die beiden anderen Quellen werden zur Therapie von Erwachsenen verwendet, wobei es in den letzten Jahren einen Wandel von der Nutzung des Knochenmarks hin zum peripheren Blut gegeben hat (Elfenbein, 2005). Der Hauptgrund für diese medizinische Entwicklung ist die schnellere Rekonstitution des hämatopoetischen Systems bei Verwendung von peripherem Blut verglichen mit der Verwendung von Knochenmark (Elfenbein, 2005; Arai, Klingemann, 2003).

Die erste Knochenmarkstransplantation erfolgte bereits 1939, wenn auch erfolglos. Im Laufe der Jahre wurde die Knochenmarkstransplantation erfolgreich bei Leukämien, Lymphomen, aplastischen Anämien und Myelomen etabliert. 1981 wurde das erste Mal peripheres Blut als hämatopoetische Stammzellquelle eingesetzt (Elfenbein, 2005). Im zirkulierenden Blut ist die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen allerdings sehr gering (< 0,05%) (Menendez *et al.*, 2001). Um die Hämatopoese aufrecht zu erhalten, gibt es ein kontinuierliches

Wandern von hämatopoetischen Stammzellen zwischen dem Knochenmark - ihrer Stammzellnische - und dem peripheren Blut (Katayama *et al.*, 2006). Die physiologische Migration dieser Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut, kann durch Gabe des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) induziert werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Mobilisierung.

Obwohl die Mobilisierung und Transplantation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen routinemäßig angewandt wird, sind die Mechanismen, die diese Zellen veranlassen ihre Nische zu verlassen, noch weitgehend unbekannt (Larsson, Scadden, 2006; Papayannopoulou, 2004). Es wird angenommen, dass G-CSF die Freisetzung spezifischer Proteasen induziert, welche dann zur Degradation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen führen. Insbesondere SDF-1 (*stromal-derived factor 1*) und sein Rezeptor CXCR4 scheinen hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen (Larsson, Scadden, 2006).

Katayama *et al.* (2006) haben gezeigt, dass auch das sympathische Nervensystem einen entscheidenden Einfluss auf die Migration hat. Somit besteht die Möglichkeit, dass das Ziel von G-CSF auch im zentralen Nervensystem liegt.

Um den Erfolg der Mobilisation zu messen, bestimmt man die Konzentration an CD34 positiven Zellen (Haas, Kronenwett, 2005). Bei einer Konzentration von mehr als 20 CD34 positiven Zellen/ $\mu$ l Blut wird eine Leukapherese zur Stammzellgewinnung durchgeführt. Wenn die Zellen nach der Mobilisierung nicht sofort für die Transplantation verwendet werden, müssen sie mit Einfriermedium versetzt, eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

## 1.2. Osmolytstrategien

### 1.2.1. Regulation der Zellvolumenhomöostase

Alle existierenden Lebewesen haben hoch konservierte osmoregulatorische Methoden entwickelt, um extrazellulären osmotischen Unterschieden entgegenzuwirken (Kültz, 2001).

Zellen, die einer anisotonischen Umgebung ausgesetzt werden, reagieren initial mit der Regulierung des Zellvolumens, d.h. sie schrumpfen oder schwellen zunächst einmal (Kültz, 2001). Regulativ auf das osmotische Schwellen, werden gelöste Stoffe und Wasser ausgeschieden, was zu einer Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*; RVD) führt. Hingegen werden bei der Zellschrumpfung Systeme aktiviert, die gelöste Stoffe und Wasser in die Zelle pumpen, der so genannten regulatorischen Volumenzunahme (*regulatory volume increase*; RVI) (Sarkadi, Parker, 1991) (s.Abb.2.).

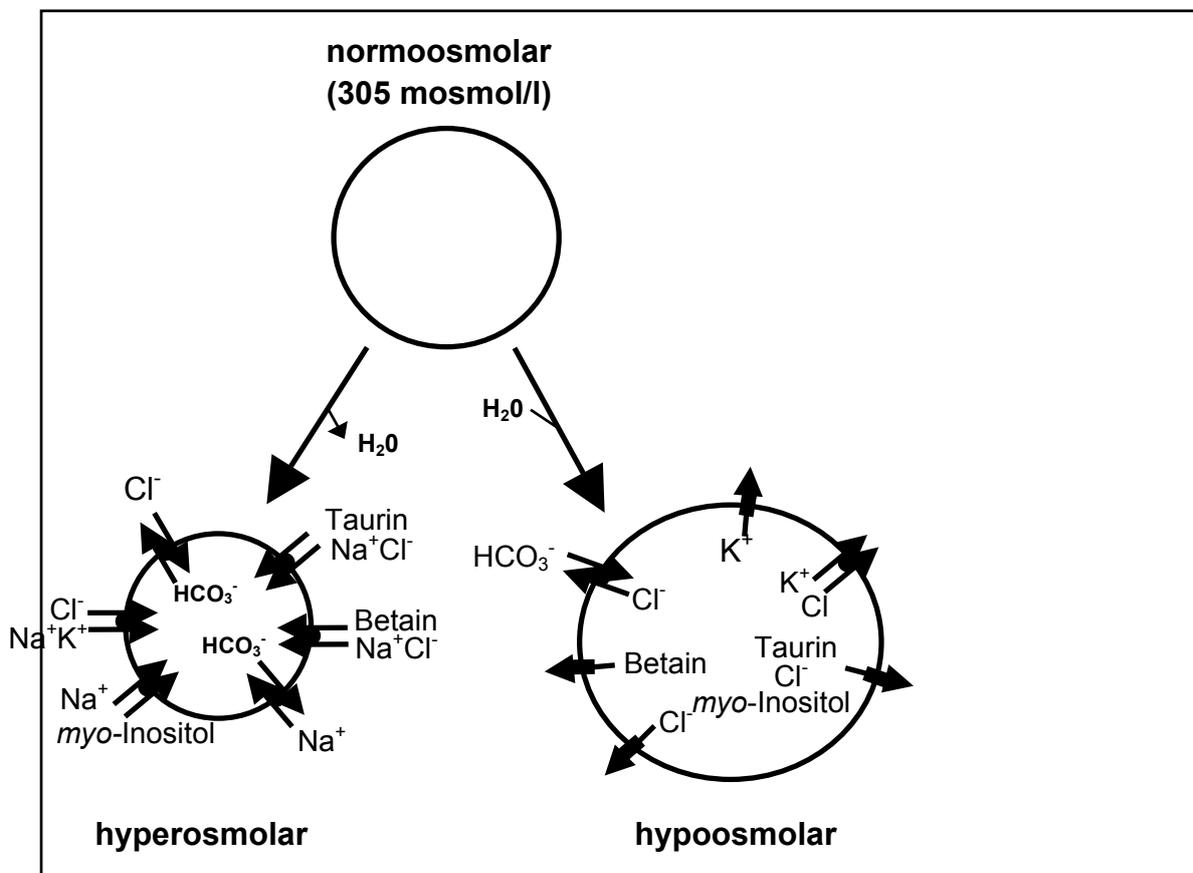


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Regulation des Zellvolumens.

Gefolgt von den initial ionischen Mechanismen, akkumulieren Zellen im gesamten Tier- und Pflanzenreich in hypertonischer Umgebung kompatible organische Osmolyte wie Betain, *myo*-Inositol und Taurin (Kültz, 2001; Miyakawa *et al.*, 1998; Kwon, Handler, 1995). Der Begriff „kompatibel“ beschreibt, dass diese Moleküle – im Gegensatz zu Elektrolyten – auch in hohen Konzentrationen die Funktion der Makromoleküle nicht beeinflussen (Miyakawa *et al.*, 1998; Yancey *et al.*, 1982).

Im Gegenzug zur Akkumulation der Osmolyte wird die intrazelluläre Konzentration der Elektrolyte auf das isotonische Level gesenkt und somit die Zellen vor dem Stress der Hyperosmolarität geschützt (Miyakawa *et al.*, 1998; Yancey *et al.*, 1982).

Die Mechanismen, die zur intrazellulären Anreicherung der Osmolyte führen, sind vielseitig: Synthesesteigerung (Sorbitol), verminderter Abbau (Glycerophosphocholin) sowie gesteigerte Aufnahme mittels induzierbarer Transportsysteme (Betain, Taurin und *myo*-Inositol) (Burg, 1995) werden verwendet. Betain, *myo*-Inositol und Taurin werden über ihre jeweiligen Transporter, den Betain/ $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA)-Transporter (BGT1), den *myo*-Inositoltransporter (SMIT) und den Taurintransporter (TAUT), aufgenommen (Zhang *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1993; Uchida *et al.*, 1992). Die Transkription der Gene der für die Sorbitolproduktion verantwortlichen Aldosereduktase, sowie die der Transporter BGT1, SMIT und TAUT wird durch Hyperosmolarität stimuliert (Miyakawa *et al.*, 1998). Hierfür ist der Transkriptionsfaktor TonEBP (*TonE-binding protein*) verantwortlich, der durch Hyperosmolarität aktiviert wird (Zhang *et al.*, 2003). TonEBP bindet an einen Enhancer genannt TonE (*tonicity responsive element*), wodurch die Transkription gefördert wird (Kwon, Handler, 1995).

Die Akkumulation der kompatiblen organischen Osmolyte ist ein Prozess der über Stunden bis zu Tagen dauern kann, wohingegen die Freisetzung aus der Zelle innerhalb von Minuten mittels unspezifischer Anionenkanäle erfolgt (Burg, 1995).

Die Aufnahme von Osmolyten beeinflusst nicht nur den Hydrationszustand der Zelle, sondern wirkt auch zytoprotektiv und erhöht somit die Toleranz gegenüber Stressfaktoren. Die zytoprotektive Wirkung von kompatiblen organischen Osmolyten ist vielseitig. Sie können intrazelluläre Signalkaskaden, die zelluläre

Stressantwort und als chemische Chaperone die Proteinstabilität modulieren, sowie als Antioxidanz wirken (Schliess *et al.*, 1999; Wettstein, Häussinger, 1997; Liu, Bolen, 1995).

Zellvolumenveränderungen entstehen auch infolge von kumulativer Substrataufnahme, Hormonen und oxidativem Stress. Anisoosmolare extrazelluläre Veränderungen sind außerdem klinisch relevant, da bei Hyper- und Hyponatriämien starke Schwankungen der Osmolarität im Plasma auftreten (220-400 mosmol/l) können (Häussinger, 1996; Häussinger *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Des Weiteren kann anisoosmotische Exposition als ein experimentelles Werkzeug eingesetzt werden, um das Zellvolumen zu verändern (Häussinger, 1996).

### 1.2.2. Kompatible organische Osmolyte

Da kompatible organische Osmolyte selbst in hohen Konzentrationen die Funktion zellulärer Proteine nicht beeinträchtigen dürfen, gibt es nur wenige Stoffklassen, aus denen sich Osmolyte entwickelt haben (Yancey *et al.*, 1982). Dies sind freie neutrale Aminosäuren (z.B. Taurin), Methylamine (z.B. Betain) und Polyalkohole (z.B. *myo*-Inositol).

Kompatible organische Osmolyte haben neben ihrer osmoregulatorischen Fähigkeit noch andere wichtige Funktionen in der Zelle. Das Fehlen von einzelnen kompatiblen organischen Osmolyten oder ihrer Aufnahmesysteme führt in den meisten Fällen zu schweren Schädigungen (Chau *et al.*, 2005; Heller-Stilb *et al.*, 2002; Stratton-Phelps *et al.*, 2002).

**Betain** agiert zusätzlich zu seiner Aufgabe als Osmolyt als Chaperon (Ueland *et al.*, 2005) und dient in vielen biochemischen Prozessen als katabolische Quelle für Methylgruppen (Chamberlin, Strange, 1989). Bei letzterer Funktion ist insbesondere ein Prozess hervorzuheben: die Betain-Homozystein-Methyltransferase-Reaktion, bei der Homozystein zu Methionin umgewandelt wird. Hohe Homozysteinspiegel wiederum korrelieren mit einem erhöhten Risiko an kardiovaskulären Krankheiten (da Costa *et al.*, 2005; Steenge *et al.*, 2003). Betain als Nahrungsergänzungsmittel kann Homozysteinspiegel reduzieren.

**Myo-Inositol** kommt in besonders hohen Konzentrationen im Gehirn und Rückenmark vor. Dies ist darauf zurückzuführen, dass *myo*-Inositol als Vorläufer für das Signaltransduktionsmolekül Phosphatidylinositol dient und wahrscheinlich

relevant für die Neuronenbildung ist. Dementsprechend haben SMIT-Knockoutmäuse eine schwer beeinträchtigte Entwicklung der peripheren Nerven und sterben kurz nach der Geburt aufgrund einer abnormalen Entwicklung von Nerven, die die Atmung kontrollieren (Chau *et al.*, 2005). Neben seiner neuronalen Funktion, dient *myo*-Inositol als Vorläufer für Glykosylphosphatidylinositol, das als Verankerungsrest für viele membrangebundene Proteine verwendet wird, und als Osmolyt (Higgins, Kane, 2003).

Bei **Taurin** handelt es sich in vielen Säugetiergeweben um die in der höchsten Konzentration vorkommende freie Aminosäure (Huxtable, 1992). Taurin kann intrazellulär in einer Konzentration von 10-70 mmol/l, je nach Spezies und Gewebe, angereichert werden (Heller-Stilb *et al.*, 2002; Huxtable, 1992). Extrazelluläre Konzentrationen erreichen beim Menschen nur 20 – 100 µmol/l, in der Maus 600 – 800 µmol/l. Taurin fungiert neben seiner osmoregulatorischen Rolle als Neurotransmitter und Antioxidanz und ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt (Membranstruktur, Kalziumhomöostase, Gallensalzbildung, Ionen-Kanal-Funktion) (Lambert, 2004). Säugetiere gewinnen Taurin zum einen durch die Nahrungsaufnahme, zum anderen stellt es ein Abbauprodukt von Methionin und Zystein dar (Iruloh *et al.*, 2007). Die Eigensynthese nimmt einen relativ geringen Teil ein und ist zusätzlich Spezies abhängig. Katzen beispielsweise reagieren auf zu geringe Taurinzufuhr mit retinaler Degeneration und Kardiomyopathie (Stratton-Phelps *et al.*, 2002). TAUT-Knockoutmäuse entwickeln innerhalb der ersten sechs Wochen nach der Geburt eine retinale Degeneration, haben eine verminderte Fortpflanzungsfähigkeit, eine reduzierte Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur und entwickeln im Alter eine chronische Hepatitis und Leberfibrose (Warskulat *et al.*, 2006; Warskulat *et al.*, 2004; Heller-Stilb *et al.*, 2002). Die Auswirkungen auf Stamm- und Progenitorzellen in diesem Tiermodell sind unbekannt. Erste Hinweise auf eine mögliche Aktivierung von Progenitorzellen, zeigen sich in der Leber der TAUT-Knockoutmäuse. Hier kommt es zu einer erhöhten Proliferation von Leberprogenitorzellen, den Ovalzellen (Warskulat *et al.*, 2006).

### 1.2.3. Osmoregulation in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Über die Osmolytstrategien und das Vorhandensein und die Funktion von kompatiblen organischen Osmolyten und ihrer spezifischen Transportsysteme in HSPC ist wenig bekannt. Bekannt ist, dass menschliche CD34 positive HSPC eine große Toleranz gegenüber Veränderungen der extrazellulären Osmolarität zeigen: Ihr Zellvolumen wird innerhalb eines Osmolaritätsbereichs von 165 bis 1500 mosmol/l linear reziprok reguliert (Gao *et al.*, 1998).

Des Weiteren wurde in humanen Zellen der Betain- und der *myo*-Inositol-Transporter in Monozyten und Makrophagen (Denkert *et al.*, 1998), und der Taurintransporter in Lymphozyten (Iruloh *et al.*, 2007; Fazzino *et al.*, 2006) und Thrombozyten (Iruloh *et al.*, 2007) detektiert.

Dieser Befund, sowie die Tatsache dass TonEBP in der Maus bereits in embryonalen Stammzellen exprimiert und während der gesamten Embryogenese aufrechterhalten wird (Maouyo *et al.*, 2002), lassen darauf schließen, dass auch HSPC über organische Osmolyte und Osmolytstrategien verfügen.

Die Charakterisierung der Osmolytstrategien von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen kann auch von klinischer Relevanz sein.

So stellen beispielsweise bei der Stammzelltransplantation insbesondere die Kryokonservierung und das Auftauen der Zellen zelluläre Stressfaktoren da. Aber auch die Mobilisation selbst löst Stressfaktoren aus. Es wurde gezeigt, dass G-CSF einen Anstieg an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert (Yuan *et al.*, 2004). Dies, sowie der Befund eines protektiven Effekts von kompatiblen organischen Osmolyten auf Ischämien und Reperfusionsschäden an perfundierten Rattenlebern, weisen daraufhin, dass Osmolyte in der Transplantationsmedizin von großem Nutzen sein können (Wettstein, Häussinger, 2000 und 1997).

### 1.3. Zielsetzung und Arbeitsprogramm

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Nutzung von Osmolytstrategien, das heißt kompatible organische Osmolyte und ihre zugehörigen Transportsysteme, in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen. Des Weiteren sollte analysiert werden, inwiefern sich das Osmolytprofil in der hämatopoetischen Differenzierung entwickelt und welche Auswirkungen es auf die Funktion des hämatopoetischen Systems hat.

Folgende Schwerpunkte sollten bearbeitet werden:

- Nachweis und Charakterisierung der Osmolytstrategien in humanen CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und hämatopoetischen Zelllinien durch Messung der Aufnahmezeiten von Betain, *myo*-Inositol und Taurin sowie die Untersuchung der osmoregulierten mRNA-Expression ihrer zugehörigen Transportsysteme [Betain/g-Aminobutyrat (GABA)-Transporter (BGT1), *myo*-Inositoltransporter (SMIT) und Taurintransporter (TAUT)] nach hyperosmotischer Exposition
- Analyse der Aufnahmezeit der kompatiblen organischen Osmolyte während der Differenzierung in die lymphoide und die myeloische Reihe sowie in CD34 positiven Zellen der chronischen myeloischen Leukämie
- Erforschung des Schutzpotentials von kompatiblen organischen Osmolyten vor Stressfaktoren - wie dem Kryokonservieren - bei hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen
- Untersuchung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und der Entwicklung des hämatopoetischen Systems im Taurin defizienten Mausmodell (Taurintransporter-Knockoutmaus)

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

Folgende Geräte wurden zur Durchführung oder Dokumentation der Experimente benutzt.

**Tabelle 1: Auflistung der benutzten Geräte**

Gerät	Firma, Ort
2000 CA Tri-Carb	Perkin Elmer, Boston, USA
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
CURIX 60, Filmentwickler	AGFA, Köln
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Gene Array Scanner G2500A	Agilent Technologies, Waldbronn
Gene Chip® Hybridization Oven 640	Affymetrix, High Wycombe, GB
GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneArray® 2500 Scanner	Affymetrix, High Wycombe, GB
GeneChip® Fluidics Station 400	Affymetrix, High Wycombe, GB
Hybridisierungsöfen	Saur Laborbedarf, Reutlingen
MACS Separationssystem	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Micro Diff II, automatisches Zellzählgerät	Beckman Coulter, Krefeld
Nanodrop®ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
NuPAGE® XCell II™ Blot Module Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Wallac Micro Beta TRILUX	Perkin Elmer, Boston, USA
Zellerntegerät (Filtermate Harvester)	Perkin Elmer, Boston, USA

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterial

Für die Experimente wurden Plastik-Reaktionsgefäße verschiedener Größe von Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Pipettenspitzen unterschiedlicher Volumina von Starlab (Ahrensburg), Zellkulturschalen von Greiner (Frickenhausen) sowie das in Tabelle 2 aufgelistete Verbrauchsmaterial verwendet.

**Tabelle 2: Übersicht des verwendeten Verbrauchsmaterials**

Verbrauchsmaterial	Firma, Ort
96-Well-Unifilter	Perkin Elmer, Boston, USA
Nalgene™ Cryo 1°C Einfrierbox	Nunc, Wiesbaden
Einfrier Röhrchen, Cryo Tubes™	Nunc, Wiesbaden
GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array	Affimetrix, High Wycombe, GB
Kodak BioMax XAR Filme	Kodak, Stuttgart
Mini/Midi Säulen MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Whatman 3MM Chr Blotting Sheets	Schleicher&Schuell, Dassel
NuPage XCell Sure Lock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellsieb 40µm	BD Falcon, Heidelberg
Röhre 5ml, 75x12 mm, PP (FACS-Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3. Kits

**Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Kits**

Kit	Firma, Ort
Anti-Sca-1 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MicroBead Kits (CD3, CD14, CD19, CD34, CD90)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MessageAmp™ II-Biotin <i>Enhanced</i> Single Round aRNA Amplification Kit	Ambion, Austin, GB
QuantiTect Reverse Transcriptions Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit®	Qiagen, Hilden
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
WESTERN LIGHTNING™	Perkin Elmer, Boston, USA

### 2.1.4. Chemikalien, Lösungen und Medien

Sämtliche Chemikalien, Lösungen und Medien entsprachen der höchst zu erwerbenden Reinheit und wurden, wenn nicht in Tabelle 4 aufgelistet, von Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien**

Produkt	Firma, Ort
[ <sup>14</sup> C]Betain (48,1 Ci/mmol)	New England Nuclear Perkin Elmer, Boston, USA
[ <sup>3</sup> H]myo-Inositol (20 mCi/mmol)	MP Biomedicals, Irvine, USA
[ <sup>3</sup> H]Taurin (31 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
[ <sup>3</sup> H]Thymidin (6,7 Ci/mmol)	MP Biomedicals, Irvine, USA
Bio-Rad Protein Assays	Bio-Rad Laboratoires, München
BSA	Roth, Karlsruhe
Fetales Rinderserum	PAA, Pasching
Humanalbumin	Octapharma, Langenfeld
Humanes G-CSF	Sanofi Aventis, Frankfurt
Humanes rekombinantes IL-3	Biosource, Nivelles, BL
Humanes rekombinantes IL-6	Biosource, Nivelles, BL
Lymphozytenseparationsmedium Lymphoprep	Nycomed Pharma, Unterschleißheim
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
MethoCult® Medium	CellSystems, St. Katharinen
Murines rekombinantes IL-12	Biosource, Nivelles, BL
Murines rekombinantes IL-18	Biosource, Nivelles, BL
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
PBS DULBECCO w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ponceau-S-Solution	Serva, Heidelberg
SCF (Stammzellfaktor)	Biosource, Nivelles, BL
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold	Perkin Elmer, Boston, USA
Taurin	MP Biomedicals, Illkirch, F
TRIS	MP Biomedicals, Illkirch, F

### 2.1.5. Zelllinien

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Besonderheit
K-422	Humanes follikuläres Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	NHL charakteristische Tanslokationen t(14 ;18) (q32.1;q21.3) (Dyer <i>et al.</i> , 1990)
K-562	Humane chronische myeloische Leukämie (CML)	Erythroblastische Zelllinie mit Expression des CML typischen Fusionsgens BCR-ABL b3-a2 (Lozzio <i>et al.</i> , 1975)
KG-1a	Humane akute myeloische Leukämie	Expression des Oberflächenmarkers CD34 (Wu <i>et al.</i> , 1996)

### 2.1.6. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert (s.Tab.6). Lediglich für die Messung der mRNA-Spiegel der Gene TNF $\alpha$  und CD69 wurden *QuantiTect® Primer Assays* von Qiagen (Hilden) verwendet.

Tabelle 6: Oligonukleotide die für die DNA-Amplifikation

mRNA-Art	Sense Oligonukleotide	Antisense Oligonukleotide
hBGT-1	AACAGTGCCACCAGCTTTGTG	ACTCGGCCACTTCAGAAATGG
hHPRT	AAGATGGTCAAGGTCGCAAGC	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
hSMIT	TCAACCACATCATTCCCAACG	TGCTGTCTTCAGATTTCCCGT
hTAUT	AAAGCTGTGACAATGATGCCG	CCAGTCCAAGCAAGAGAAGCA
mBGT1	ACTCGTGGAACACAGAGCACTG	AATTCCATGACAGGCGAGGTA
mCD2	CCTGGACGTGAGGATTCTGG	TTGCAAGACCGCACAGGTC
mCD7	TGCCCAAGACGTACACCAGTC	CAGGTGCCCTCTTGTAGAGCA
mErv1	GCGGAAGACATAAGGAAGAGGA	TCCGATTCACCTCATTGTGC
mGmzA	GGAGAGCCACGATGAGGAAC	TTCTTTCACAGCCTCCTTCAGG
mHPRT	CAGCGTCGTGATTAGCGATG	TTCCAAATCCTCGGCATAATG
mIFN- $\gamma$	TGCATTCATGAGTATTGCCAAG	TGGACCACTCGGATGAGCT
mIL-18rap	TTCCTGGACAGTCCGAGCTG	TTCCAAGCTCTACGTCCAGTG
mIL-2	GCAGCTGTTGATGGACCTAC	GAGCATCCTGGGGAGTTTC
mIL-4	AACGAGGTCACAGGAGAAGG	TCTGTGGTGTTCCTTCGTTGC
mSMIT	TGTGCTGACCAAGTCATCGT	AAGCCAGCCATTAGAGTGGA

mTAUT	TAGCCACCCAGGTGCAGAA	CTTCGTGGCCATCTCTTCG
-------	---------------------	---------------------

### 2.1.7. Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma
Maus Anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Monoklonaler Antikörper	Chemicon International, Temecula, USA
ECL™ Anti-Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase konjugiertes F(ab') <sub>2</sub> Fragment (vom Esel)	GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, GB
ECL™ Anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase konjugiertes F(ab') <sub>2</sub> Fragment (vom Schaf)	GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, GB

Der polyklonale Kaninchen *growth factor, augments of liver regeneration (ERV1 homolog, S. cerevisiae)* (Gfer) Antikörper wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. T. Lisowsky (multiBIND, Köln) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.8. Versuchstiere

Heterozygote (*taut+/-*) Mäuse mit einem C57BL/6 x 129/SvJ Hintergrund wurden gekreuzt, um Wildtyp (*taut+/+*) und Homozygote (*taut-/-*) Tiere zu züchten. Genetisch ist bei diesen Tieren das Exon 1 von *taut* (Taurintransporter) deletiert (Heller-Stilb *et al*, 2002).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Isolierung von humanen primären hämatopoetischen Zellen

#### 2.2.1.1 Herkunft von CD34 positiven Zellen

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach geltenden ethischen Richtlinien aus Leukapherisaten von G-CSF mobilisierten Patienten und Spendern gewonnen.

#### 2.2.1.2 Herkunft von CD3, CD19 und CD14 positiven Zellen

Humane T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19) und Monozyten (CD14) wurden aus Leukozytenkonzentraten (*Buffy Coats*) gesunder Spender (Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf) isoliert.

#### 2.2.1.3 Gewinnung der mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von *Lymphoprep* (Lymphozytenseparationsmedium) aufgereinigt. Das Leukapherisat bzw. das Leukozytenkonzentrat wurde 1:1 mit PBS verdünnt, auf 15 ml *Lymphoprep* aufgeschichtet und für 30 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der hierbei entstandene Interphase-Ring, der die mononukleären Zellen enthielt, wurde abgenommen und mit PBS gewaschen.

#### 2.2.1.4 Immunomagnetische Selektion

Die entsprechenden Zellen wurden mit Hilfe des MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) immunomagnetischen Separationssystem nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) positiv selektiert. Das Prinzip beruht auf der Markierung der zu selektierenden Zellen mit einem mAK, der an superparamagnetische Partikel gebunden ist. Die Aufreinigung der Zellen erfolgt über eine Säule in einem magnetischen Feld. Abschließend wurde die Reinheit der isolierten Zellen mittels Durchflußzytometrie (2.2.7.1.) bestimmt.

### 2.2.2. Zellkultur humaner Zellen

Neben den primären Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit mit den Zelllinien KG-1a, K-422 und K-562 (2.1.5) gearbeitet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Rinderserum, 2 mmol/l L-Glutamin, Streptomycin (100 µg/ml) und Penizillin (100 Einheiten/ml) kultiviert. Die Zelllinie K562 wurde statt mit 10% mit 20% FBS inkubiert. Außerdem benötigten CD34 positive Zellen zusätzlich rekombinantes IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) und SCF (50 ng/ml) und

CD90 positive Zellen 50 mmol/l  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Hyperosmolarität der Medien wurde durch Zugabe einer entsprechenden Menge NaCl eingestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in Luft und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

### **2.2.3. Einfluss von Osmolyten auf die Kryokonservierung**

Zur Untersuchung der Rolle der Osmolyte bei der Kryokonservierung wurden die Zellen mit Einfriermedium (70% RPMI-Medium; 20% Humanes Albumin (5%-ige Lösung); 10% DMSO) auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 1ml wurde in Einfrierröhrchen überführt und in mit 2-Propanol gefüllten Einfrierboxen bei -80 °C ü.N. gelagert. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung eingefrorener Zellkulturen wurden die Einfrierröhrchen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension umgehend im vorgewärmten (37°C) Medium resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurden die Zellen für Vitalitätsmessungen (2.2.7.2), Kolonieassays (2.2.14.) oder Proliferationsassays (2.2.13.) eingesetzt.

### **2.2.4. G-CSF Mobilisation**

Für die Mobilisation der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen erhielten die Mäuse über vier Tage eine tägliche subkutane Injektion von 250  $\mu$ g humanem G-CSF pro kg Körpergewicht. Drei Stunden nach der letzten Verabreichung wurden die Mäuse getötet und die Organe entnommen (2.2.5.).

### **2.2.5. Präparation von murinen Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen**

Nach Tötung der Versuchstiere durch Dekapitation wurde das Blut aus dem Herzen entnommen und in heparinisierten Gefäßen gesammelt. Davon wurden 20  $\mu$ l sofort für die Erstellung eines elektronischen Blutbildes mittels eines *Coulter Counters* (Coulter, 1956) eingesetzt. Des Weiteren wurden Milz, Femur und Tibia entfernt. Durch Ausspülen der Knochen mit PBS wurde das Knochenmark gewonnen. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten im Durchflusszytometer (2.2.7.1.) analysiert und für Kolonieassays (2.2.14.) eingesetzt.

## 2.2.6. Immunomagnetische Selektion von murinen Zellen

### 2.2.6.1. *Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup> - Zellen*

Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup> - Zellen aus dem Knochenmark wurden mit Hilfe des MACS immunomagnetischen Separationssystems (2.2.1.4.) in zwei Schritten aufgereinigt. Zuerst wurden die Knochenmarkszellen negativ nach Lineage-Markern sortiert, d.h. alle Lineage positiven Zellen [CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4 und Ter-119] wurden aus dem Zellgemisch depletiert. Anschließend erfolgte in einem zweiten Schritt die Isolation der Sca<sup>+</sup>-Zellen über eine positive Selektion.

### 2.2.6.2. *CD90 positive Zellen*

Murine T-Zellen wurden aus der Milz (2.2.5.) mittels MACS immunomagnetischem Separationssystem (2.2.1.4.) positiv selektiert.

## 2.2.7. Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

Sämtliche Proben wurden im Becton Dickinson *FACScan* gemessen und mittels *CellQuest* Software (Becton Dickinson) analysiert.

### 2.2.7.1. *Charakterisierung von Oberflächenantigenen*

$2 \times 10^5$  Zellen wurden mit Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) konjugierten monoklonalen Antikörpern (mAK) in 100 µl PBS bei 4°C für 20 Minuten gefärbt.

Folgende mAK wurden verwendet i) humane: CD34-FITC (Klon 8G12), CD38-PE (Klon HB7), CD3-FITC (Klon SK7), CD14-PE (Klon MΦP9), CD20-FITC (Klon L27), ii) murine: CD45R/B220-PE (Klon RA3-6B2), CD3e-FITC (Klon 145-2C11), CD90.2 (Thy-1.2)-FITC (Klon 53-2.1), CD117 (c-kit)-FITC (Klon 2B8), Ly-6A/E (Sca-1)-PE (Klon E13-161.7), Ter119-PE (Klon Ter-119), CD11b-PE (Klon M1/70), Ly-6G and Ly-6C (Gr-1)-FITC (Klon RB6-8C5). Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden genauso wie sämtliche mAK von BD Bioscience (Heidelberg) bezogen. Nach der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und gemessen.

### 2.2.7.2. *Vitalitätsmessung*

Hierzu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 µl PBS aufgenommen, mit 10 ng/ml des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid versetzt und sofort gemessen.

### 2.2.8. RNA Isolation

Die Gesamt-RNA wurde mittels *RNeasy Kit*® (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm mit dem *Nanodrop*®ND-1000.

### 2.2.9. Analyse der osmoregulierten mRNA-Expression von Osmolyttransportern

Die zu untersuchenden Zellen wurden für 6, 12 oder 24 Stunden in normo- (305 mosmol/l) oder hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die RNA aufgereinigt (2.2.8.) und die mRNA-Spiegel der Osmolyttransporter BGT-1, SMIT und TAUT gemessen (2.2.10.1.).

### 2.2.10. Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR

Für die Standardisierung der relativen mRNA-Spiegel wurde die endogene Kontrolle Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) (s. 2.1.6) verwendet. Sämtliche benutzten Oligonukleotide sind der Tabelle 6 unter 2.1.6. zu entnehmen.

#### 2.2.10.1 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR in einem Schritt

Die mRNA-Spiegel wurden, mit Ausnahme der in 2.2.10.2. beschriebenen Proben, mit Hilfe des *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits* im *ABI GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (humane Proben) bzw. im *ABI 7500 Real Time PCR System* (murine Proben) bestimmt.

#### 2.2.10.2 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR in zwei Schritten

Die Genexpressionsstudien an den murinen Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>-Zellen sowie den murinen CD90-Zellen wurden ebenfalls mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR ermittelt. Aufgrund der geringen RNA-Menge wurde die mRNA zuerst in einem separaten Schritt in cDNA umgeschrieben. Für die Reverse Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcriptions Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die cDNA mittels *SYBR*® *Green PCR Master Mix* im *ABI 7500 Real Time PCR System* bestimmt.

### 2.2.11. Messung der Aufnahme von kompatiblen organischen Osmolyten

Für die Messung der Aufnahme von kompatiblen organischen Osmolyten wurde die Zellzahl in der Neubauerkammer bestimmt und  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in normo- (305 mosmol/l) oder hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium für 16 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen bei unveränderter Osmolarität unter Zugabe von  $100 \mu\text{mol/l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Betain, [ $^3\text{H}$ ]myo-Inositol oder [ $^3\text{H}$ ]Taurin für 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  gehalten. Die Zellen wurden dann dreimal mit eiskalter Stopplösung [ $300 \text{ mmol/l}$  Mannitol,  $300 \text{ mmol/l}$  NaCl und  $10 \text{ mmol/l}$  Tris/HEPES (pH 7,4)] gewaschen, wobei der erste Überstand zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Radioaktivität (Überstand plus Zellen) gesammelt und eingefroren wurde. Die luftgetrockneten Zellen wurden in  $500 \mu\text{l}$  Lysepuffer [ $0,25 \text{ mol/l}$  NaOH,  $0,05\%$  Natriumdodecylsulfat (SDS)] suspendiert und ebenfalls eingefroren. Zur Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität (und somit der aufgenommenen Osmolyte) wurde eine Proteinbestimmung (2.2.12.) sowie eine Flüssigkeitsszintillationsmessung durchgeführt. Für letztere wurden  $200 \mu\text{l}$  der Probe (Lysat oder Überstand) mit  $4 \text{ ml}$  Szintillationsflüssigkeit versetzt und für mindestens 30 Sekunden gemischt. Die Messung der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm = *counts per minute*) erfolgte im *Packard 2000CA Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer*.

### 2.2.12. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Zellen wurden in  $140 \text{ mmol/l}$  NaCl mit  $20 \text{ mmol/l}$  Tris (pH 7,4),  $20 \text{ mmol/l}$   $\beta$ -Glycerophosphat,  $10 \text{ mmol/l}$  NaF,  $10 \text{ mmol/l}$  Natriumpyrophosphat  $\times 10 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ mmol/l}$  EDTA,  $1 \text{ mmol/l}$  EGTA,  $1 \text{ mmol/l}$  Natriumorthovanadat,  $0,1\%$  Triton X-100 und einer Tablette Proteaseinhibitor (Roche, Penzberg) pro  $50 \text{ ml}$  auf Eis lysiert. Die Lysate wurden bei  $20.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des *Bio-Rad Proteinassays* eingesetzt.

### 2.2.13. [ $^3\text{H}$ ]Thymidin-Proliferationsmessung

Die Proliferation der Zellen wurde über den Einbau an [ $^3\text{H}$ ]markiertem Thymidin gemessen. Dazu wurden die Zellen in einer 96-Well-Zellkulturplatte kultiviert. 18 Stunden vor Kulturende wurde pro Vertiefung  $5 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]Thymidin zugegeben. Im Anschluß daran erfolgte die Überführung der Zellen mit Hilfe des

Zellerntegeräts auf einen *96-Well-Unifilter*. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l Szintillationsflüssigkeit pro Vertiefung wurden die radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) im *1450 MicroBeta TRILUX* Szintillationsspektrometer gemessen.

#### **2.2.14. Kolonieassays**

Um die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der hämatopoetischen Progenitorzellen zu bestimmen, wurden Kolonieassays der Firma *Stemcell Technologies Inc.* (St. Katharinen) eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein semi-solides Medium, das die klonale Expansion von erythroiden (CFU-E), und granulozytären und monozytären (CFU-GM) Kolonien fördert. In dieser Arbeit kamen für humane Zellen das *MethoCult® H4100* und für murine Zellen das *MethoCult® GF M3434* Medium zum Einsatz.

Eine definierte Anzahl von Knochenmarks-, Milz- oder Blutzellen wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zu 1 ml *MethoCult®* Medium gegeben, auf zwei Kulturschalen aufgeteilt und für 7 bzw. 12 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien gezählt.

#### **2.2.15. Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie**

Zur Analyse der Genexpression in Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark von Wildtyp und TAUT-Knockoutmäusen (Heller-Stilb *et al.*, 2002) wurden *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays* von Affymetrix eingesetzt. Mit diesem Chip lässt sich die Expression von 39.000 verschiedenen murinen Gentranskripten untersuchen. Aufgrund der geringen RNA-Mengen wurden pro Chip die isolierten Knochenmarkszellen aus drei Mäusen verwendet. Nach immunomagnetischer Selektion der Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>-Zellen (2.2.6.1.) und anschließender RNA Isolation (2.2.8.) mit dem *RNeasy Mini Kit®* betrug die RNA-Menge zwischen 50 und 100 ng. Nach Überprüfung der RNA Qualität mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* (2.2.16.) wurden 50 ng RNA für die Amplifikation und Biotin-Markierung mittels *MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Single Round aRNA Amplification Kit* eingesetzt. Die Prozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und umfasst die Reverse Transkription für die Erststrangsynthese, die nachfolgende Zweitstrangsynthese, die cDNA Aufreinigung, die *in vitro* Transkription zur Synthese der biotinmarkierten aRNA und der aRNA-

Aufreinigung. Nach der Amplifikation wurde die Qualität der aRNA erneut mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* (2.2.16.) überprüft. Die Menge an aRNA betrug nach der Amplifikation zwischen 10 und 15 µg und wurde komplett für die Fragmentierung eingesetzt.

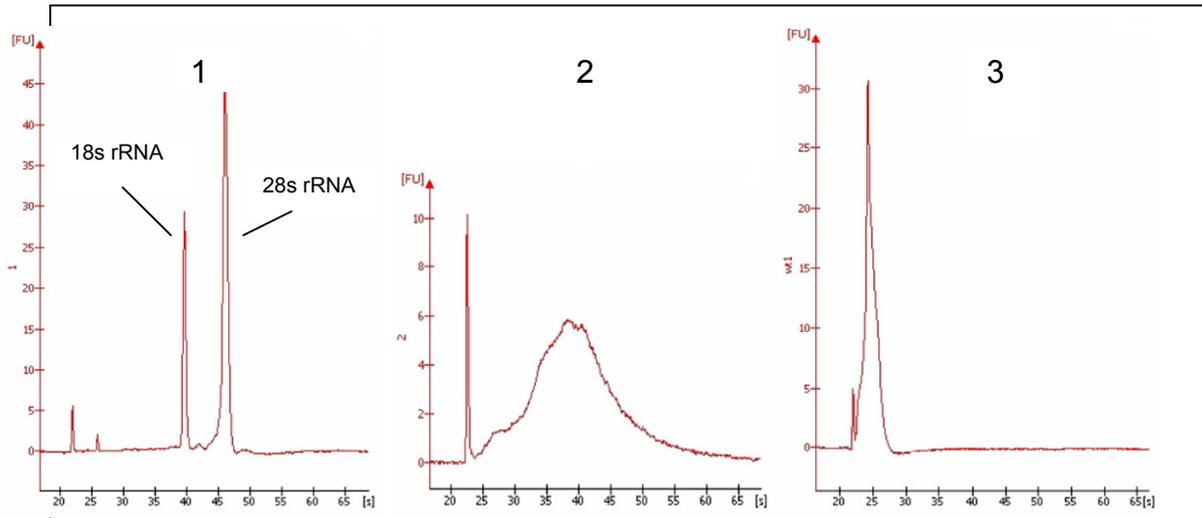
Die Hybridisierung der Chips mit der fragmentierten RNA, sowie das anschließende Waschen, Färben und Scannen der Arrays wurde vom Institut für Onkologische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Diese Arbeiten erfolgten laut Angaben der Hersteller. Für die Hybridisierung wurden die Proben im *Gene Chip® Hybridization Oven 640* inkubiert. Alle Wasch- und Färbeschritte wurden automatisch in der *GeneChip® Fluidics Station 400* durchgeführt. Das Scannen der Arrays erfolgte mittels *GeneArray® 2500 Scanner*.

Die statistische Auswertung der generierten Expressionsdaten wurde dankenswerter Weise von Herrn Michael Roskopf vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Düsseldorf ausgeführt. Für die Analyse der Daten wurde das Paket von statistischen Funktionen der Programmiersprache 'R', das im Bioconductor Projekt (<http://www.bioconductor.org/>) integriert ist, verwendet. Um die Daten der verschiedenen Genchips miteinander vergleichen zu können, wurden diese zuerst mit Hilfe der Methode VSN (*variance stabilization and calibration*) normalisiert. Für die Identifikation der differentiell exprimierten Gene wurde der SAM (*significance analysis of microarrays*) – Algorithmus v2.23 (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>) benutzt. Diesem Algorithmus liegt eine gleitende Skala für die falsch-positiv Rate [FDR (false discovery rate)] der signifikant differentiell exprimierten Gene zu Grunde. Das Signifikanzniveau jedes einzelnen Genes wurde mit Hilfe des q-Wertes (niedrigste FDR bei der ein Gen signifikant ist) angegeben. Des Weiteren wurde ein *Fold Change* der Gene von 1.5 festgesetzt. Die Visualisierung der Daten erfolgte mittels Hierarchischer Clusteranalyse mit der 'hclust' Funktion aus dem Bioconductor Projekt.

### **2.2.16. RNA-Qualitätskontrolle**

Zur Qualitätsbestimmung der RNA für die Chipanalyse (2.2.15.) wurde der *Agilent 2100 Bioanalyzer* benutzt. Diese Arbeiten wurden vom BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) gemäß den Angaben des Herstellers mittels *RNA 6000 Pico LabChip Kit*

(Caliper®Agilent Technologies, Palo Alto, USA) durchgeführt. Das Ergebnis wird als Elektropherogramm dargestellt, aus dem die Größe der RNA abgelesen werden kann (Abb.3.).



**Abbildung 3: Elektropherogramme. (1) RNA-Analyse.** TotalRNA-Probe, bei der die 18s rRNA als kleinerer und die 28s rRNA als größerer Peak zu erkennen ist. **(2) Amplifizierte RNA.** Bei der amplifizierten RNA handelt es sich um eine homogene Verteilung unterschiedlich langer RNA-Fragmente. Die Größe variiert und liegt im Mittel bei etwa 1500 Basen. **(3) Fragmentierte RNA.** Nach der Fragmentierung ist dann nur noch ein schmaler Peak bei einer Größe von 35 bis 200 Basen zu erkennen.

### 2.2.17. Western-Blot-Analyse

Nach der Proteinbestimmung (2.2.12.) wurde die entsprechende Menge Lysat mit *NuPAGE® LDS Sample Buffer* und 100 mmol/l DTT für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf die *NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gele* aufgetragen (40µg/Spur). Zur Auftrennung der Proteingemische wurde das *NuPage XCell Sure Lock™ Mini-Cell* von Invitrogen benutzt. Die Trennung erfolgte bei 200 V für 45 Minuten in MES Laufpuffer (50 mmol/l MES, 50 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, 0,2% SDS, pH 7,3).

Die aufgetrennten Proteine wurden dann 2,5 Stunden bei 24 V Spannung mittels *NuPAGE® XCell II™ Blot Module Kit* auf die Nitrocellulose Membran transferiert. Hierzu wurde der *NuPAGE Blotting Puffer* (25 mmol/l Bicine, 25 mmol/l Bis-Tris, 1 mmol/l EDTA, 20% Methanol, pH 8,3) verwendet.

Die Membran wurde dann für 1 Stunde mit PBST (PBS mit 0,1% Tween 20), welches mit 4% Milchpulver und 0,1% I-Block versetzt war, behandelt und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen Antikörper gegen das

Gfer [*growth factor, augmenter of liver regeneration (ERV1 homolog, S. cerevisiae)*]-Protein in der Konzentration 1:2000 inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen in PBST wurde die Membran mit einem IgG-Peroxidase konjugiertem Antikörper (Esel/Anti-Kaninchen) in einer Konzentration von 1:5000 für eine Stunde inkubiert, erneut in PBST gewaschen und mit einem Chemilumineszenz-Reagenz für 2 Minuten behandelt. Kodak *BioMax XAR* Filme wurden in einer Autoradiographiekassette durch die Chemilumineszenz der Blots belichtet und anschließend im *CURIX 60* (2.1.1.) entwickelt.

Vor einer nachfolgenden Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen den internen Standard Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden die Antikörper von der Membran gelöst. Hierzu wurde die Membran zweimal für 30 Minuten in 200 mmol/l Glyzin mit 0,1% SDS und 0,1% Tween 20 (pH 2,6) inkubiert, mit PBST gewaschen und erneut mit der einstündigen Inkubation in PBST mit 4% Milchpulver und 0,1% I-Block begonnen. Der Peroxidase konjugierte IgG (Schaf/Anti-Maus) wurde in einer Konzentration von 1:7500 eingesetzt.

Alle verwendeten Antikörper sind Tabelle 7 unter 2.1.7. zu entnehmen.

### **2.2.18. T-Zell-Aktivierung**

Nach immunomagnetischer Selektion der CD90-Zellen (2.2.6.) wurde die Zellzahl auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte entweder durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)- (250 ng/ml) und Ionomycin-Zugabe (1 µg/ml) oder durch Zugabe von rekombinantem IL-12 (40 ng/ml) und IL-18 (100 ng/ml). Nach der Aktivierung müssen die T-Zellen sich differenzieren, Zytokine produzieren und proliferieren (Weil, Israël, 2004). Zur Überprüfung der Differenzierung wurden verschiedene Zytokine (IL-2, IL-4, TNF-α, INF-γ) und ein Oberflächenmarker (CD69) mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, wurde die RNA aus den T-Zellen isoliert (2.2.8) und mittels Reverser Transkription und quantitativer Real-time PCR (2.2.10.2.) bestimmt.

Die Proliferation der Zellen wurde mittels Proliferationsassay (2.2.13.) überprüft. Hierzu wurden die Zellen nach der Aktivierung 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

inkubiert, bevor das [<sup>3</sup>H]Thymidin, wie unter 2.2.13. beschrieben, zugegeben wurde.

### **2.2.19. Statistik**

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Mindestens drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test angewendet.  $p < 0.05$  (\*) wurde als signifikant verschieden bewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Osmolytstrategien von humanen hämatopoetischen Zellen

##### 3.1.1. Untersuchungen an primären CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und leukämischen Zelllinien (KG-1a, K562 und K422)

###### 3.1.1.1. Osmoregulierte mRNA-Expression der Osmolytaufnahmesysteme für Betain, myo-Inositol und Taurin

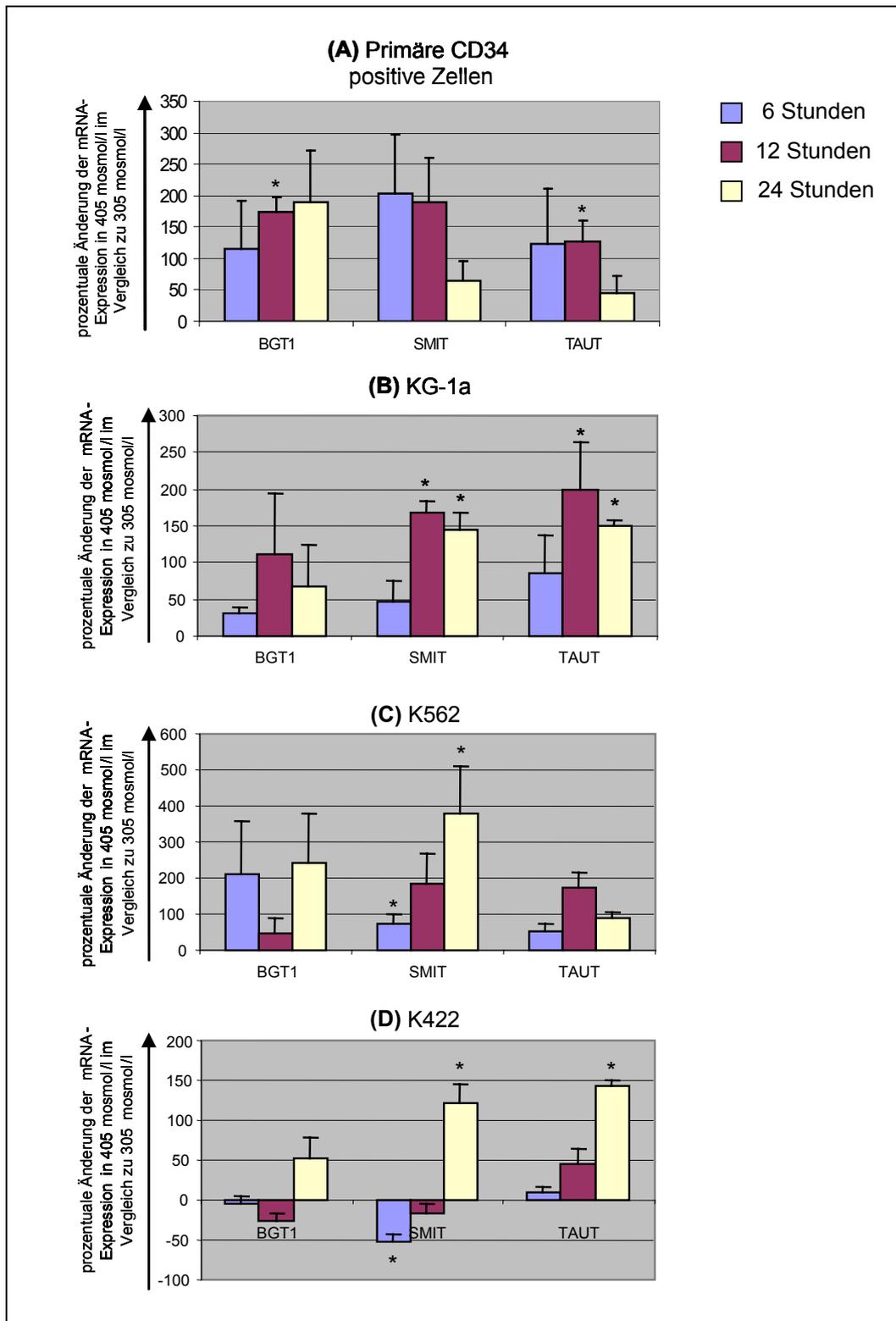
Die Akkumulation der kompatiblen organischen Osmolyte Betain, myo-Inositol und Taurin erfolgt über ihre jeweiligen Transportsysteme: den Betain/ $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA)-Transporter (BGT1), den myo-Inositoltransporter (SMIT) und den Taurintransporter (TAUT) (Zhang *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1993; Uchida *et al.*, 1992). Die Transkription dieser Gene wird durch extrazelluläre Hyperosmolarität stimuliert, führt somit zu einem Anstieg der entsprechenden mRNA-Spiegel und schließlich zu einer erhöhten Expression der Transportsysteme (Miyakawa *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurden primäre humane CD34 positive Zellen, die CD34 positive Zelllinie KG-1a, die lymphatische Zelllinie K422 und die myeloische Zelllinie K562 auf das Vorhandensein von Osmolytstrategien untersucht.

Eine hyperosmolare Exposition führte zu einer Erhöhung der mRNA-Spiegel der Osmolyttransporter BGT1, SMIT und TAUT in allen 4 untersuchten Zellspezies (Abb.4). Die Zelllinie K422 wies hierbei eine Besonderheit auf: bei dieser Zellspezies kam es vor der Erhöhung der BGT1- und SMIT-mRNA-Spiegel zu einer zum Teil signifikanten Verminderung (Abb.4).

Die maximale Induktion der BGT1-, SMIT- und TAUT-mRNA erfolgte bei allen untersuchten Zellspezies 12 – 24 Stunden nach hyperosmolarer Exposition, und die Erhöhung der mRNA-Spiegel betrug zwischen 50% und 390% (Abb.4).

Die auf HPRT-mRNA-Spiegel normalisierten Absolutwerte zeigen nach 12-stündiger Inkubation der Zellen (Tab.8), dass die mRNA-Spiegel der verschiedenen Transportsysteme zwischen den Zelllinien stark differieren. Unter normoosmotischen Bedingungen waren die TAUT-mRNA-Spiegel mit 0,2- bis



**Abbildung 4: mRNA-Spiegel von Transportern kompatibler organischer Osmolyte in humanen hämatopoetischen Zellen nach hyperosmotischer Inkubation.** (A) primäre CD34 positive Zellen, (B) KG-1a, (C) K562 und (D) K422 wurden für 6, 12 und 24 Stunden in normo- (305 mosmol/l) und hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium inkubiert. Anschließend wurden die relativen mRNA-Spiegel für die Osmolyttransporter BGT1, SMIT und TAUT mittels Real-Time RT-PCR wie unter 2.2.10.1. beschrieben ermittelt. Angegeben ist die prozentuale Änderung der Expression der mRNA-Spiegel bei 405 mosmol/l im Verhältnis zur Expression bei 305 mosmol/l. [Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 3-4; \* signifikant verschieden von der normoosmotischen Kontrolle ( $p < 0.05$ )]

**Tabelle 8: Osmoregulierte mRNA-Spiegel von Transportern kompatibler organischer Osmolyte in humanen hämatopoetischen Zellspezies.** Die Zellen wurden für 12 Stunden in normo- (305 mosmol/l) und hyperosmotischem (405 mosmol/l) Medium inkubiert. Anschließend wurden die mRNA-Spiegel für die Osmolyttransporter BGT1, SMIT und TAUT mittels Real-Time RT-PCR ermittelt und auf die HPRT-mRNA-Spiegel normalisiert. [Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 3-4; \* signifikant verschieden von der normoosmotischen Kontrolle ( $p < 0.05$ )]

Osmolyt-transporter+ Osmolarität (mosmol/l)	Zellspezies			
	primäre CD34+	KG1a	K562	K422
<u>mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie</u>				
<b>BGT1</b>				
305	0,228 $\pm$ 0,029	0,014 $\pm$ 0,002	0,005 $\pm$ 0,002	0,040 $\pm$ 0,017
405	0,613 $\pm$ 0,031	0,030 $\pm$ 0,012	0,007 $\pm$ 0,002	0,030 $\pm$ 0,004
<b>SMIT</b>				
305	0,264 $\pm$ 0,027	0,097 $\pm$ 0,015	0,214 $\pm$ 0,037	0,331 $\pm$ 0,030
405	0,728 $\pm$ 0,094	0,260 $\pm$ 0,016	0,613 $\pm$ 0,175	0,272 $\pm$ 0,045
<b>TAUT</b>				
305	0,538 $\pm$ 0,022	0,204 $\pm$ 0,046	0,215 $\pm$ 0,041	0,490 $\pm$ 0,070
405	1,209 $\pm$ 0,142*	0,612 $\pm$ 0,132	0,583 $\pm$ 0,186*	0,709 $\pm$ 0,091

0,5-facher Expression im Vergleich zu HPRT in allen vier Zellspezies die am höchsten exprimierten der untersuchten Osmolyttransporter-mRNA. Unter hyperosmotischen Bedingungen stiegen diese Werte um das 1,5- bis 3-fache an. Lediglich in den K562 Zellen erreichten nach hyperosmotischer Exposition die SMIT-mRNA-Spiegel höhere Werte als die TAUT-mRNA-Spiegel. In den anderen Zelllinien wurde die SMIT-mRNA sowohl bei normo- als auch bei hyperosmotischer Exposition geringer als die TAUT-mRNA exprimiert.

Die BGT1-mRNA war in allen untersuchten Zelllinien mit 0,005 – 0,040 BGT1-mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie die mit Abstand am geringsten exprimierte mRNA, deren Spiegel nach hyperosmotischer Exposition nur wenig anstiegen (Tab.8). Die primären CD34 positiven Zellen exprimierten ähnlich hohe SMIT-mRNA-Spiegel wie die Zelllinien, wiesen jedoch bezüglich ihrer BGT1-mRNA-Spiegel ein anderes Profil auf. Hier wurde die BGT1-mRNA, sowohl unter normo- (0,228 BGT1-mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie) als auch unter hyperosmotischen (0,613 BGT1-mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie) Bedingungen, ähnlich hoch exprimiert wie die SMIT-mRNA (0,264 bzw. 0,728 SMIT-mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie) (Tab.8).

### 3.1.1.2 Hyperosmotisch induzierte Aufnahme der kompatiblen organischen Osmolyte Betain, myo-Inositol und Taurin

Die hyperosmotisch induzierte mRNA-Expression der Osmolyttransporter BGT1, SMIT und TAUT in den hämatopoetischen Zellen deutete daraufhin, dass die zugehörigen kompatiblen Osmolyte zur Aufrechterhaltung der Zellvolumenhomöostase eingesetzt werden.

Um dies näher zu untersuchen, wurden in den 4 Zellspezies nach 16-stündiger normo- (305 mosmol/l) beziehungsweise hyperosmotischer Inkubation (405 mosmol/l) die Aufnahme von 100 µmol/l radioaktiv markiertem Betain, myo-Inositol und Taurin über einen Zeitraum von 2 Stunden gemessen. Es wurde eine Aufnahmezeit von 2 Stunden gewählt, um die Möglichkeit einer Substrat induzierten Herunterregulation der Transporter, wie sie bei anderen Zelltypen beobachtet wurde, zu minimieren (Warskulat *et al.*, 1997).

Die Taurinaufnahme übertraf bereits bei normoosomolarer Exposition mit 9 bis 24 nmol/mg Protein/2 Stunden die Aufnahme von Betain und myo-Inositol um das 4- bis 80-fache (Tab.9). Nach 16-stündiger Inkubation der untersuchten Zellen in hyperosmolarem Medium (405 mosmol/l) erhöhte sich die Taurinaufnahme um 9 bis 23 nmol/mg Protein/2 Stunden, wogegen die Betain-

**Tabelle 9: Aufnahme von kompatiblen organischen Osmolyten in humanen hämatopoetischen Zellspezies.** Die Zellen wurden für 16 Stunden in normo- (305 mosmol/l) und hyperosmotischem Medium (405 mosmol/l) inkubiert und anschließend wurde die Aufnahme von 100 µmol/l [<sup>14</sup>C]Betain, [<sup>3</sup>H]myo-Inositol oder [<sup>3</sup>H]Taurin für 2 Stunden gemessen. [Mittelwerte ± SEM; n = 4-6; \* signifikant verschieden von der normoosmotischen Kontrolle (p<0,05)]

Osmolyte + Osmolarität (mosmol/l)	Zellspezie			
	primäre CD34+	KG1a	K562	K422
<u>Aufnahme (nmol/mg Protein/2 Stunden)</u>				
<b>Betain</b>				
305	2,19±0,21	2,54±1,07	3,44±0,52	0,29±0,03
405	1,82±0,19	2,18±0,70	4,42±0,82	0,52±0,07*
<b>myo -Inositol</b>				
305	1,27±0,16	1,87±0,68	3,13±0,99	0,65±0,09
405	2,31±0,50*	3,63±1,48	5,78±1,89*	0,53±0,03
<b>Taurin</b>				
305	9,00±2,64	10,67±3,89	21,70±4,72	23,65±5,81
405	18,74±5,11*	33,37±15,58	37,03±9,34	39,95±8,70*

und *myo*-Inositolaufnahme höchstens um 2,5 nmol/mg Protein/2 Stunden anstieg. Für *myo*-Inositol wurden bei der Zelllinie K422 und für Betain bei den primären CD34 positiven Zellen und der Zelllinie KG-1a keine signifikanten Änderungen in der Aufnahmerate gemessen (Tab.9).

Auffallend war die Zelllinie K422 die, sowohl unter normo- als auch unter hyperosmotischen Bedingungen, wesentlich weniger Betain und *myo*-Inositol aufnahm als die anderen untersuchten Zellspezies.

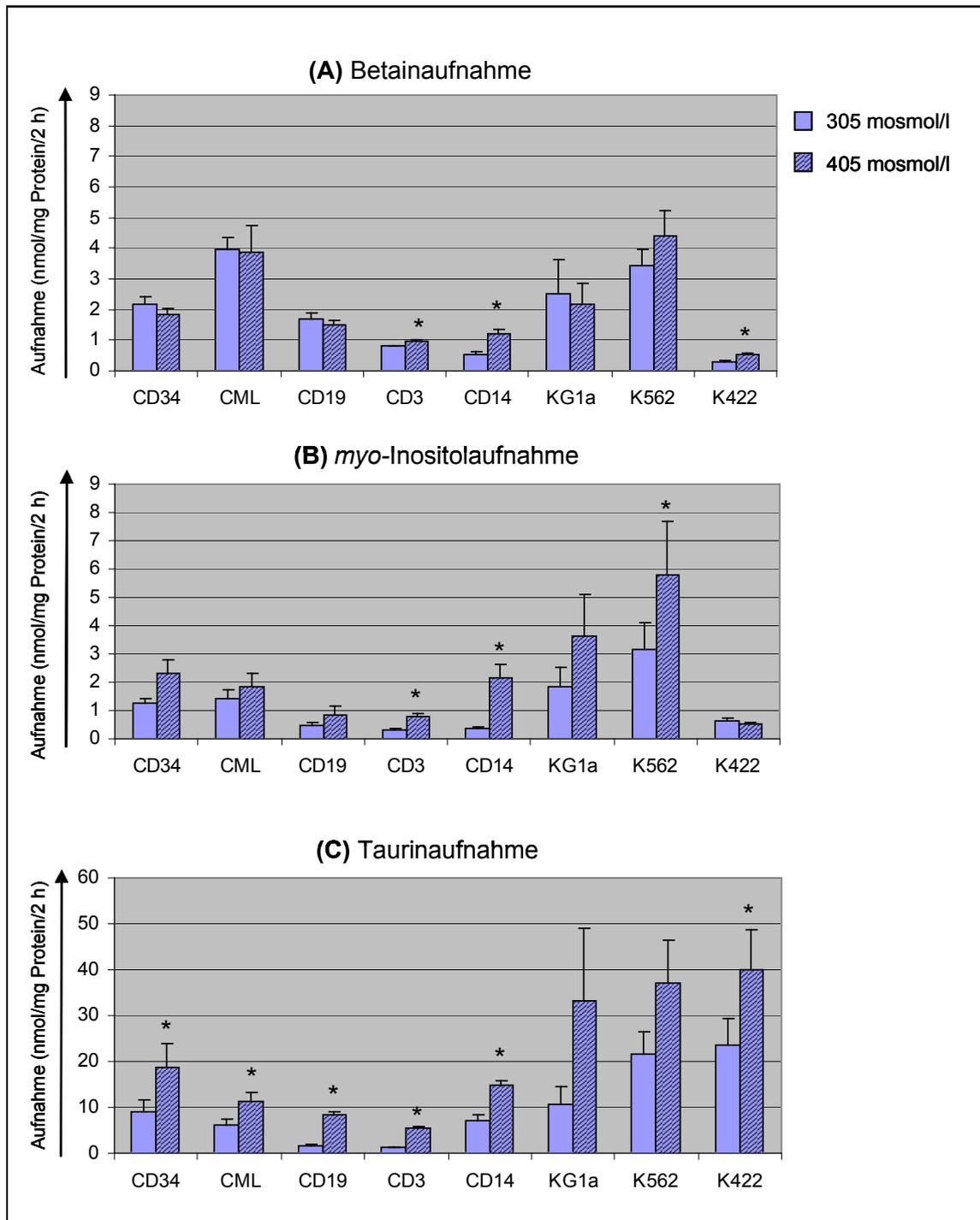
Vergleicht man die hyperosmotisch induzierte Osmolytaufnahme mit der mRNA-Expression ihrer spezifischen Transportsysteme (3.1.1.1.), so assoziieren die Ergebnisse für die TAUT-mRNA-Spiegel. Die TAUT-mRNA-Spiegel waren die am höchsten exprimierten mRNA-Spiegel (Tab.8), und entsprechend lag die Taurinaufnahme mit 9 bis 24 nmol/mg Protein/2 Stunden bereits bei normoosmotischer Exposition deutlich über der Aufnahme von Betain (0,29 bis 3,44 nmol/mg Protein/2 Stunden) und *myo*-Inositol (0,65 bis 3,13 nmol/mg Protein/2 Stunden) (Tab.9). Sowohl die Taurinaufnahme als auch die TAUT-mRNA-Expression wurden bei hyperosmotischer Exposition nochmals um das 1,5- bis 4-fache gesteigert (Tab.8, Tab.9). Diese Daten zeigen, dass Taurin vermutlich in den untersuchten Zellspezies eine Hauptrolle als Osmolyt zukommt. Die Ergebnisse der hyperosmotisch induzierten Osmolytaufnahme von Betain und *myo*-Inositol assoziieren größtenteils mit der mRNA-Expression ihrer spezifischen Transportsysteme BGT1 und SMIT. Die Zelllinie K422 wies beispielsweise nach 16-stündiger hyperosmotischer Inkubation eine leicht verminderte *myo*-Inositolaufnahme auf (Tab.9), entsprechend ihrer zunächst nach 6 bis 12 Stunden herunterregulierten SMIT-mRNA-Spiegel (Abb.4, Tab.8). Allerdings gibt es wenige Ausnahmen bei denen die Ergebnisse nicht konkordant sind. Die Betain- und die *myo*-Inositolaufnahmeraten unterschieden sich nicht signifikant (Tab.9), wohingegen die mRNA-Spiegel von BGT1 und SMIT – insbesondere bei den Zelllinien – deutliche Unterschiede aufwiesen (Tab.8). Des Weiteren wurde bei den CD34 positiven Zellen und der Zelllinie KG-1a eine Steigerung der Expression der BGT1-mRNA festgestellt (Abb.4, Tab.8), die nicht mit einer vermehrten Aufnahme von Betain assoziiert war (Tab.9). Umgekehrt gab es bei der Zelllinie K422 eine gesteigerte Aufnahme an Betain (Tab.9), die nicht mit einer erhöhten BGT1-mRNA-Expression einherging (Abb.4, Tab.8).

### 3.1.2. Osmolytstrategien in unterschiedlich differenzierten humanen hämatopoetischen Zellen

Die Untersuchung der mRNA-Expression der Osmolyttransporter BGT1, SMIT und TAUT, sowie die Aufnahme der entsprechenden kompatiblen organischen Osmolyte unter normo- und hyperosmotischen Bedingungen, zeigen, dass den hämatopoetischen Zellspezies Taurin als vorherrschendes Osmolyt gemein ist. Des Weiteren ist festzustellen, dass jede Zellart ein eigenes „Osmolytprofil“ besitzt. K422, als einzige Zellspezies lymphatischen Ursprungs, scheint im Gegensatz zu den anderen Zellen *myo*-Inositol nicht als Osmolyt zu nutzen. Primäre CD34 positive Zellen und die CD34 positive Zelllinie KG-1a akkumulieren unter hyperosmotischen Bedingungen kein Betain und die myeloische Zelllinie K562, benutzt alle drei untersuchten kompatiblen organischen Osmolyte (Tab.9). Es liegt die Vermutung nahe, dass während der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle in die lymphoide und die myeloische Reihe unterschiedliche „Osmolytprofile“ ausgeprägt werden. Um dies näher zu untersuchen, wurden primäre humane hämatopoetische Zellen der lymphoiden Reihe [T-Zellen (CD3 positiv) und B-Zellen (CD19 positiv)] sowie myeloische Zellen [Monozyten (CD14 positiv)] auf ihre Osmolytaufnahme unter normo- (305 mosmol/l) und hyperosmotischen (405 mosmol/l) Bedingungen untersucht. Zusätzlich wurden CD34 positive Zellen von Patienten mit CML (chronische myeloische Leukämie) untersucht, um Veränderungen im Osmolytprofil bei einer malignen Stammzellerkrankung zu studieren.

Wie bereits bei den primären CD34 positiven HSPC und den hämatopoetischen Zelllinien gesehen, war auch in den reifen hämatopoetischen Zellen nach hyperosmotischer Exposition Taurin das vorherrschende der drei untersuchten organischen kompatiblen Osmolyte (Abb.5). Allerdings waren die Absolutwerte von Taurin mit 5 bis 15 nmol/mg Protein/2 Stunden im Gegensatz zu der Aufnahmerate der primären CD34 positiven Zellen (19 nmol/mg Protein/2 Stunden) geringer.

Unter normoosmotischen Bedingungen nahmen die CD19 positiven und die CD3 positiven Zellen Taurin (1,7 bzw. 0,84 nmol/mg Protein/2 Stunden) sogar in ähnlich geringen Mengen wie Betain (1,5 bzw. 1,2 nmol/mg Protein/2 Stunden) auf (Abb.5).



**Abbildung 5: Aufnahme von kompatiblen organischen Osmolyten in hämatopoetischen Zellspezies. (A) Betain- (B) myo-Inositol- (C) Taurinaufnahme.** Die Zellen wurden für 16 Stunden in normo- (305 mosmol/l) und hyperosmotischem Medium (405 mosmol/l) inkubiert und anschließend die Aufnahmen von 100  $\mu\text{mol/l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Betain, [ $^3\text{H}$ ]myo-Inositol oder [ $^3\text{H}$ ]Taurin über 2 Stunden gemessen. [Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 4-6; \* signifikant verschieden von der normoosmotischen Kontrolle ( $p < 0,05$ )]

Aus Patienten mit CML gewonnene CD34 positive Zellen wiesen im Gegensatz zu den normalen CD34 positiven Zellen unter normoosmotischer Exposition eine signifikante, fast doppelt so hohe Betainaufnahme (2 bzw. 4 nmol/mg Protein/2 Stunden) auf. Diese wurde jedoch, wie bei den gesunden CD34 positiven Zellen, unter hyperosmotischen Bedingungen nicht weiter erhöht (Abb.5).

Diese Ergebnisse beweisen, dass alle untersuchten primären Zellen sowie die Zelllinien Taurin bei der Aufrechterhaltung der Zellvolumenhomöostase bei hyperosmotischem Stress einsetzten. *Myo*-Inositol wurde, wenn auch in geringeren Mengen, ebenfalls von allen untersuchten Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen verstärkt aufgenommen (Abb.5). Einzige Ausnahme bildete die Zelllinie K422, deren *myo*-Inositol-Aufnahme unter hyperosmotischen Bedingungen geringer als unter normoosmotischen war (Abb.5). Vergleicht man diese Ergebnisse jedoch mit den SMIT-mRNA-Spiegeln nach hyperosmotischer Exposition, dann zeigt sich, dass diese erst nach 24 Stunden hochreguliert wurden (Abb.4). Somit liegt die Vermutung nahe, dass *myo*-Inositol zwar als Osmolyt fungiert, allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt als Taurin. Betain ist das einzige der drei untersuchten Osmolyte, das vermutlich nur von der Hälfte der untersuchten Zellspezies (primäre CD3 und CD14 positive Zellen und den Zelllinien K562 und K422) zur Aufrechterhaltung der Zellvolumenhomöostase eingesetzt wird.

Ein den lymphatischen Zellen gemeinsames Osmolytprofil gibt es jedoch nicht. So wurde Betain unter hyperosmotischen Bedingungen von CD3 positiven Zellen verstärkt und von CD19 positiven Zellen geringer als unter normoosmotischen Bedingungen aufgenommen (Abb.5). Viel mehr scheint im Laufe der Differenzierung jede hämatopoetische Zellpopulation ihr eigenes zellindividuelles Osmolytprofil zu entwickeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Taurin bei den untersuchten Zellspezies eine entscheidende Rolle als Osmolyt zu spielen scheint, mengenmäßig gefolgt von dem ebenfalls zur Aufrechterhaltung der Zellvolumenhomöostase eingesetzten *myo*-Inositol. Betain hingegen wird zellindividuell und in eher geringen Mengen verwendet.

### 3.1.3. Einfluss der kompatiblen organischen Osmolyte auf die Kryokonservierung

Bei der Stammzelltransplantation stellen insbesondere die Kryokonservierung und das Auftauen der Zellen zelluläre Stressfaktoren dar. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die kompatiblen organischen Osmolyte Betain, *myo*-Inositol und Taurin einen protektiven Effekt auf die kryokonservierten Zellen ausüben können.

#### 3.1.3.1. Untersuchungen an Zelllinien

In den vorherigen Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass Taurin als kompatibles organisches Osmolyt eine große Rolle in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, sowie in leukämischen Zelllinien zu spielen scheint. Allen drei untersuchten kompatiblen organischen Osmolyten werden protektive Eigenschaften zugeschrieben. Um die Relevanz der organischen Osmolyte für den Schutz bei der Kryokonservierung zu untersuchen, wurde als Marker für die Vitalität der Zellen die Zellproliferation gemessen. Die Messung erfolgte mittels Einbau von [<sup>3</sup>H]-markiertem Thymidin während einer Inkubationszeit von 18 Stunden mit und ohne Osmolyte unter Zusetzung von Stressfaktoren (Einfriermedium und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Die Zelllinie K422 reagierte auf die Zugabe von Taurin bzw. allen drei Osmolyten (BMT) in einer Konzentration von 5 mmol/l zu dem Einfriermedium mit einer um 60% signifikant gesteigerten Proliferationsrate (Tab.10). Die anderen beiden Zelllinien (K562 und KG-1a) zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle.

Wenn die Zellen statt im Einfriermedium mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden, dann führte die Zugabe von Osmolyten zu keinen signifikanten Unterschieden der Proliferationsrate im Vergleich zur Inkubation ohne Osmolyte (Tab.10). Allerdings ließ sich auch hier bei der Zelllinie K422 unter Zugabe von Taurin und BMT eine Tendenz zur gesteigerten Proliferation (22-27%) erkennen. Bei den Zelllinien K562 und KG1a war die Proliferation gleich bleibend, bei letzterer sogar tendenziell verringert.

**Tabelle 10: Proliferation humaner leukämischer Zelllinien nach Zugabe von Einfriermedium und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Abhängigkeit von organischen Osmolyten.** Die Proliferationsrate der Zelllinien unter Stressfaktoren (Einfriermedium bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit und ohne Zugabe von 5 mmol/l kompatibler organischer Osmolyte wurde über den Einbau von [<sup>3</sup>H]-markiertem Thymidin während einer Inkubationszeit von 18 Stunden gemessen. Die alleinige Zugabe von Einfriermedium (EM) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde hierbei gleich 100% gesetzt. (Mittelwerte ± SEM; \* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05); BMT = Betain, *myo*-Inositol und Taurin)

Mediumzusatz	Zelllinie		
	K422	K562	KG1a
	Angaben in %		
	n = 7-8	n = 8-10	n = 5
<b>Einfriermedium (EM)</b>	100	100	100
EM+Betain	100± 6	119± 4	116±11
EM+Myoinositol	96± 6	105± 3	97± 7
EM+Taurin	159±18*	100± 2	100±18
EM+BMT	160±26*	106± 3	101±13
	n = 7-8	n = 9-10	n = 3
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	100	100	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Betain	115±15	104± 3	94± 7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Myoinositol	97±15	105± 4	86± 5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Taurin	127±15	111± 3	82±14
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +BMT	122±20	112± 4	111± 9

### 3.1.3.2. Untersuchungen an primären CD34 positiven Zellen

Direkt nach der Isolation zeigten primäre CD34 positive Zellen unter Zugabe von Taurin, im Vergleich zu den Zellen, denen kein organisches Osmolyt extra verabreicht wurde, eine um 9% signifikant gesteigerte Proliferationsrate (Abb.6A). Auch der Zusatz aller drei Osmolyte (BMT) führte zu einer tendenziell erhöhten Proliferation. Nach dem Einfrieren mit bzw. ohne zusätzliche Osmolyte, einer Inkubationszeit von einer Woche und anschließendem Auftauen wurde diese Steigerung nicht mehr gezeigt. Bei der Zugabe aller drei Osmolyte war sogar eine verminderte Proliferationsrate zu verzeichnen.

Da die Proliferation der primären CD34 positiven Zellen in Kultur wesentlich geringer als die der Zelllinien ist, wurden zusätzlich Kolonieassays durchgeführt, die speziell auf Stamm- und Progenitorzellen ausgerichtet sind. Es handelt sich

hierbei um ein semi-solides Medium, das die klonale Expansion von erythroiden (CFU-E) und granulozytären/monozytären (CFU-GM) Kolonien fördert.

Die Kolonieassays bestätigen die Ergebnisse des Proliferationsassays (Abb.6B).

In Gegenwart von Taurin bzw. BMT stieg zwar die Proliferationsrate der frisch isolierten Zellen an (Abb.6A), jedoch wurde kein entscheidender positiver Effekt nach der Kryokonservierung erzielt (Abb.6A und B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Vitalitätstest mit Propidiumjodid nach dem Auftauen der Zellen durchgeführt. Die Anzahl der toten Zellen in Gegenwart aller drei Osmolyte (BMT), verglichen mit der Kontrolle, war um etwa 30% höher (Abb.6C).

Es liegt die Vermutung nahe, dass der proliferationssteigernde Effekt von Taurin bei der Kryokonservierung durch andere Faktoren ausgeglichen wurde.

<b>(A) Proliferationsbestimmung</b>		<b>(C) Propidiumjodidmessung</b>	
Zusatz	%	Zusatz	Anzahl der toten Zellen (%)
<b>direkt nach der Isolation</b>			
ohne	100	ohne	8,14 ± 0,98
Taurin	109 ± 2*	Taurin	8,17 ± 1,34
BMT	110 ± 5	BMT	10,69 ± 2,15
<b>nach dem Auftauen</b>			
ohne	100		
Taurin	103 ± 3		
BMT	88 ± 14		

<b>(B) Kolonieassay</b>				
Zusatz	Kolonienzahl (%)			Verhältnis CFU-GM/CFU-E
	CFU-E	CFU-GM	Gesamt	
ohne	100	100	100	1,25 ± 0,17
Taurin	110 ± 18	107 ± 10	108 ± 13	1,22 ± 0,10
BMT	98 ± 16	94 ± 9	95 ± 12	1,19 ± 0,07

**Abbildung 6: (A) Proliferationsbestimmung, (B) Propidiumjodidmessung und (C) Kolonieassay von primären humanen CD34 positiven Zellen.** (A) Die Proliferationsrate der CD34 positiven Zellen wurde über den Einbau von [<sup>3</sup>H]-markiertem Thymidin während einer Inkubationszeit von 18 Stunden gemessen. Bei den Zellen, die direkt nach der Isolation (ohne vorherige Kryokonservierung) gemessen wurden, erfolgte vor Zugabe des [<sup>3</sup>H]-markierten Thymidins die Zugabe von 5 mmol/l organischer Osmolyte bzw. zur Kontrolle eine entsprechende Menge an Medium. Die aufgetauten Zellen waren zuvor mit und ohne Zugabe von 5 mmol/l organischer Osmolyte für eine Woche kryokonserviert worden. Die Messung der Proliferationsrate erfolgte hier ohne weitere Zusätze. Die Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. (B) Die Kolonieassays wurden wie unter 2.2.14. beschrieben nach dem Auftauen der Zellen, die mit und ohne Zugabe von 5 mmol/l organischer Osmolyte für eine Woche kryokonserviert waren, durchgeführt. (C) Die Propidiumjodidmessung der primären CD34 positiven Zellen erfolgte unmittelbar nach dem Auftauen der Zellen, die im Einfriermedium mit oder ohne Osmolyte für eine Woche kryokonserviert wurden. (Mittelwerte ± SEM; n = 3; \* signifikant verschieden von der Kontrolle (ohne Zusatz) (p<0,05); BMT = Betain, myo-Inositol und Taurin).

### **3.2. Untersuchung der Taurintransporter (TAUT)-Knockoutmaus**

Die Entdeckung von Taurin als Osmolyt in humanen CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen führte dazu, die Hämatopoese und die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Wildtyp und Taurintransporter (TAUT)-Knockoutmäusen zu charakterisieren.

TAUT-Knockoutmäuse haben einen deletierten Taurintransporter und weisen je nach untersuchtem Gewebe einen Taurinmangel von 70% – 90% auf (Warskulat *et al.*, 2006; Heller-Stilb *et al.*, 2002). TAUT-Knockoutmäuse sind, im Vergleich zum Wildtyp, signifikant kleinere Tiere, die im Alter eine chronische Hepatitis und Leberfibrose entwickeln. Inwiefern sich das Fehlen des Taurintransporters TAUT auf das hämatologische System auswirkt, war bisher weitgehend unbekannt.

Um die Folgen der Taurindefizienz für das hämatologische System näher zu untersuchen, wurden Blut, Knochenmark und Milz der Mäuse analysiert. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem die Hämatopoese nur während der embryonalen Phase in der Milz stattfindet, ist die Milz auch bei der adulten Maus für die Hämatopoese von Bedeutung. Die Hämatopoese findet in der Maus zeitlebens sowohl im Knochenmark als auch in der Milz statt (Faccini *et al.*, 1990).

#### **3.2.1. Vergleichende Analyse des hämatopoetischen Systems**

Für die Untersuchungen wurden 15 Monate alte Mäuse eingesetzt.

##### *3.2.2.1. Allgemeine Daten*

Zur Quantifizierung der korpuskulären Bestandteile des Blutes, sowie zur Untersuchung der prozentualen Verteilung der Leukozyten in den Knochenmarks- und Milzproben, wurde ein automatisches Zellzählgerät (Coulter, 1956) eingesetzt.

Die prozentuale Verteilung der Leukozyten wies, sowohl im Blutbild als auch im Knochenmark und der Milz, zwischen der TAUT-Knockoutmaus und dem

Wildtyp, keine signifikanten Unterschiede auf (Tab.11).

Auffällig im Blutbild waren 11% niedrigere Hämoglobin- und Hämatokritwerte bei den TAUT-Knockoutmäusen gegenüber dem Wildtyp ( $p = 0,065$  bzw.  $p = 0,087$ ) (Tab.11). Der Hämatokritwert beschreibt den Anteil der zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes und ist ein Maß für die Viskosität des Blutes. Ein niedriger Hämatokritwert ist entweder auf eine Überwässerung oder eine verminderte Anzahl der Erythrozyten zurückzuführen. Bei den TAUT-Knockoutmäusen scheint es sich um letzteres zu handeln, da zum einen der Hämoglobinwert um die gleiche Prozentzahl wie der Hämatokritwert reduziert war, und zum anderen in einer bereits vorliegenden Arbeit (Lang *et al.*, 2003) ebenfalls eine 11%-ige Erniedrigung der Erythrozyten beschrieben wurde.

Im Knochenmark der TAUT-Knockoutmäuse zeigte sich eine tendenziell vermehrte Granulozytenbildung im Verhältnis zum Wildtyp (Tab.11).

Die Werte der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut und in der Milz waren bei den Wildtyp-Mäusen und den TAUT-Knockoutmäusen ähnlich (Tab.11).

**Tabelle 11: Blutbild und prozentuale Verteilung der Leukozyten im Knochenmark und der Milz (aus 15 Monate alten Mäusen).** Nach Präparation von Blut, Knochenmark und Milz erfolgte die elektronische Zellzählung wie im Material- und Methodenteil (s. 2.2.5.) beschrieben. (MW = Mittelwert; TAUT-/- = TAUT-Knockoutmäuse)

	Wildtyp MW±SEM	n	TAUT-/- MW±SEM	n	Signifikanz p-Wert
<b>Blut</b>					
Leukozyten (*10 <sup>3</sup> /µl)	6,67 ± 1,15	12	7,15 ± 1,61	15	0,813
Lymphozyten (%)	79,86 ± 2,94	5	79,41 ± 2,29	14	0,907
Monozyten (%)	13,72 ± 2,55	5	16,29 ± 1,65	14	0,423
Granulozyten (%)	6,42 ± 2,06	5	4,3 ± 1,31	14	0,412
Hämoglobin (g/dl)	12,76 ± 0,32	15	11,23 ± 0,72	15	0,065
Hämatokrit (%)	37,33 ± 0,75	15	33,49 ± 1,98	15	0,087
Thrombozyten (*10 <sup>3</sup> /µl)	489,18 ± 65,18	14	418,61 ± 56,31	15	0,420
<b>Knochenmark</b>					
Lymphozyten (%)	92,18 ± 2,28	6	86,63 ± 2,86	8	0,154
Monozyten (%)	6,39 ± 2,34	4	5,54 ± 1,18	8	0,762
Granulozyten (%)	3,96 ± 0,61	4	7,83 ± 1,82	8	0,077
<b>Milz</b>					
Lymphozyten (%)	89,55 ± 2,42	6	86,17 ± 1,81	6	0,292
Monozyten (%)	6,38 ± 1,21	6	7,18 ± 0,81	6	0,598
Granulozyten (%)	4,07 ± 1,26	6	6,73 ± 1,24	6	0,163

### 3.2.2.2. Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen

Um die Anzahl der einzelnen Zellpopulationen im Blut, im Knochenmark und der Milz näher zu untersuchen, wurden Zwei-Farben durchflusszytometrische Analysen mit Antikörpern gegen zellspezifische Oberflächenproteine durchgeführt (Mac-1, Gr-1, B220, CD3e, Ter119, c-Kit, Sca-1). Für die myeloischen Zellen wurden Antikörper (AK) gegen Mac-1 und Gr-1 verwendet. Gr-1 wird nur auf Granulozyten exprimiert, wohingegen Mac-1 auf Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen exprimiert wird. Für die lymphoide Reihe wurden AK gegen B220 für B-Zellen und gegen CD3e für die Identifikation der T-Zellen verwendet. Die erythroiden Zellen wurden mit dem Ter119 Marker, und die Stamm- und Progenitorzellen mit AK gegen c-Kit und Sca-1 bestimmt. Auch bei der durchflusszytometrischen Analyse ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der TAUT-Knockoutmaus feststellen (Tab.12).

Allerdings war im Blut die Anzahl der myeloischen Zellen ( $\text{Mac}^+\text{Gr}^+$ ) in der TAUT-Knockoutmaus im Verhältnis zum Wildtyp erhöht ( $p = 0,059$ ) (Tab.12). Da die Granulozytenzahl ( $\text{Gr}^+\text{Mac}^-$ ) im Wildtyp und in der TAUT-Knockoutmaus gleich war, muss es sich bei der erhöhten Anzahl an myeloischen Zellen um myeloische Progenitorzellen, Monozyten oder Makrophagen handeln. Die gleiche Tendenz zeigte sich in der Milz, auch hier war die Anzahl der myeloischen Zellen ( $\text{Mac}^+\text{Gr}^+$ ) der TAUT-Knockoutmaus gegenüber der im Wildtyp erhöht.

**Tabelle 12: Prozentualer Anteil der unterschiedlichen Oberflächenmarker auf die Gesamtzahl der Blut-, Knochenmark- und Milzzellen (aus 15 Monate alten Mäusen).** Die wie unter 2.2.5. präparierten Zellen wurden mittels Zwei-Farben-Durchflusszytometrie-Analyse in zellspezifischer charakteristischer Kombination [Mac u. Gr-1, B220 u. CD3e; Sca-1 u. c-Kit, Ter119 u. c-Kit; Beschreibung siehe Text (3.2.2.2.)] analysiert. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 6-8; Prog. = Progenitoren, TAUT-/- = TAUT-Knockoutmäuse)

		<b>Wildtyp</b>	<b>TAUT-/-</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Blut</b>		MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	p-Wert
Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Monozyten	<b>18,11</b> $\pm$ 6,15	<b>13,36</b> $\pm$ 3,43	0,519
Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	<b>6,84</b> $\pm$ 4,73	<b>6,81</b> $\pm$ 1,60	0,996
Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloische Zellen	<b>21,51</b> $\pm$ 4,26	<b>33,87</b> $\pm$ 4,00	0,059
B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	<b>17,41</b> $\pm$ 3,46	<b>18,19</b> $\pm$ 4,28	0,890
CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	<b>23,57</b> $\pm$ 4,75	<b>17,15</b> $\pm$ 3,45	0,299
B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	<b>11,93</b> $\pm$ 5,93	<b>16,39</b> $\pm$ 7,91	0,656
Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	<b>42,63</b> $\pm$ 5,33	<b>36,95</b> $\pm$ 4,80	0,447
c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	<b>8,49</b> $\pm$ 4,71	<b>5,68</b> $\pm$ 3,30	0,606
Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup>	Stammzellen	<b>20,95</b> $\pm$ 3,22	<b>26,58</b> $\pm$ 6,56	0,465
c-Kit <sup>+</sup> Ter119 <sup>-</sup>	Progenitoren	<b>3,81</b> $\pm$ 1,11	<b>11,26</b> $\pm$ 4,63	0,172
Ter119 <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	erythroide Zellen	<b>8,73</b> $\pm$ 1,79	<b>8,55</b> $\pm$ 2,58	0,960
c-Kit <sup>+</sup> Ter119 <sup>+</sup>	erythroide Prog.	<b>10,04</b> $\pm$ 2,36	<b>10,77</b> $\pm$ 1,70	0,809
<b>Knochenmark</b>				
Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Monozyten	<b>5,96</b> $\pm$ 1,04	<b>8,72</b> $\pm$ 0,95	0,557
Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	<b>2,44</b> $\pm$ 0,43	<b>3,10</b> $\pm$ 0,61	0,310
Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloische Zellen	<b>65,52</b> $\pm$ 5,34	<b>67,18</b> $\pm$ 1,82	0,675
B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	<b>5,77</b> $\pm$ 1,55	<b>4,96</b> $\pm$ 1,42	0,708
CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	<b>17,49</b> $\pm$ 3,12	<b>25,66</b> $\pm$ 5,77	0,249
B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	<b>37,39</b> $\pm$ 5,42	<b>36,91</b> $\pm$ 7,22	0,959
Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	<b>7,64</b> $\pm$ 1,12	<b>8,71</b> $\pm$ 1,03	0,504
c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	<b>4,60</b> $\pm$ 0,91	<b>5,54</b> $\pm$ 2,02	0,688
Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup>	Stammzellen	<b>2,83</b> $\pm$ 0,57	<b>2,91</b> $\pm$ 0,97	0,947
c-Kit <sup>+</sup> Ter119 <sup>-</sup>	Progenitoren	<b>2,63</b> $\pm$ 1,01	<b>1,41</b> $\pm$ 0,48	0,312
Ter119 <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	erythroide Zellen	<b>15,27</b> $\pm$ 6,61	<b>14,59</b> $\pm$ 3,40	0,599
c-Kit <sup>+</sup> Ter119 <sup>+</sup>	erythroide Prog.	<b>5,46</b> $\pm$ 1,66	<b>3,81</b> $\pm$ 0,98	0,417
<b>Milz</b>				
Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Monozyten	<b>10,73</b> $\pm$ 1,96	<b>9,77</b> $\pm$ 1,40	0,701
Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	<b>5,42</b> $\pm$ 1,32	<b>6,81</b> $\pm$ 1,83	0,551
Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloische Zellen	<b>11,17</b> $\pm$ 4,61	<b>21,47</b> $\pm$ 5,64	0,181
B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	<b>20,28</b> $\pm$ 8,35	<b>18,25</b> $\pm$ 7,84	0,863
CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	<b>17,40</b> $\pm$ 4,44	<b>17,52</b> $\pm$ 2,76	0,982
B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	<b>32,54</b> $\pm$ 11,84	<b>41,71</b> $\pm$ 8,30	0,544
Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	<b>59,17</b> $\pm$ 5,15	<b>48,44</b> $\pm$ 7,38	0,260
c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	<b>2,60</b> $\pm$ 1,15	<b>1,93</b> $\pm$ 0,79	0,643
Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup>	Stammzellen	<b>2,09</b> $\pm$ 1,20	<b>1,02</b> $\pm$ 0,47	0,437
c-Kit <sup>+</sup> Ter119 <sup>-</sup>	Progenitoren	<b>19,52</b> $\pm$ 8,80	<b>14,03</b> $\pm$ 3,94	0,587
Ter119 <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	erythroide Zellen	<b>8,50</b> $\pm$ 4,61	<b>3,76</b> $\pm$ 0,69	0,354
c-Kit <sup>+</sup> Ter119 <sup>+</sup>	erythroide Prog.	<b>1,73</b> $\pm$ 1,02	<b>2,07</b> $\pm$ 0,92	0,809

### 3.2.2.3. Kolonieassay

Um die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der hämatopoetischen Progenitorzellen zu bestimmen, wurden Kolonieassays mit HSPC aus dem Knochenmark durchgeführt. Es handelt sich bei diesem Assay um ein semi-solides Medium, das die klonale Expansion von myeloischen Zellen fördert. Hierbei wird zwischen roten, also erythroiden (CFU-E), und weißen, das heißt granulozytären und monozytären (CFU-GM), Kolonien unterschieden.

Analog zu dem Blutbild, das einen niedrigeren Hämatokrit- und Hämoglobinwert bei TAUT-Knockoutmäusen, verglichen mit dem Wildtyp, aufzeigte, bildeten sich bei den Kolonieassays mit Knochenmarkszellen der TAUT-Knockoutmäuse signifikant weniger CFU-Es als bei den Wildtypen (Tab.13). Die Reduktion war mit 40% deutlich höher als die Reduktion der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte (11%) im Blut (Tab.11).

Des Weiteren ist den Daten aus der Zellzahlanalyse zu entnehmen, dass es im Knochenmark der TAUT-Knockoutmäuse gegenüber dem Wildtyp zu einer gering vermehrten Produktion von Granulozyten kam (Tab.11). Analog dazu bildete sich bei den Kolonieassays der TAUT-Knockoutmäuse eine höhere Anzahl an CFU-GMs (Tab.13).

Die Daten assoziieren mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse, bei denen die Zahl an myeloischen Zellen sowohl im Blut als auch in der Milz in der TAUT-Knockoutmaus höher als im Wildtyp war (Tab.12).

**Tabelle 13: Anzahl der Kolonien von HSPC aus dem Knochenmark im Kolonieassay.** HSPC wurden aus dem Knochenmark der 15 Monate alten Mäuse isoliert (s.2.2.5) und in semi-solidem Medium inkubiert. Nach 7 Tagen wurde die Anzahl der CFU-E Kolonien und der CFU-GM Kolonien ausgezählt. [MW  $\pm$  SEM; n = 6; TAUT-/- = TAUT-Knockoutmäuse; \* signifikant verschieden zum Wildtyp (p<0,05)]

	Wildtyp	TAUT-/-
CFU-E	11,1 $\pm$ 2,87	6,8 $\pm$ 1,34*
CFU-GM	33,8 $\pm$ 2,99	37,1 $\pm$ 1,74
Gesamt	44,9 $\pm$ 5,86	43,9 $\pm$ 6,78

### 3.2.2. Mobilisation mittels G-CSF

Da sich bei den TAUT-Knockoutmäusen im Vergleich zu den Wildtypen eine Tendenz zur vermehrten Produktion von myeloischen Progenitorzellen und reifen Monozyten und Granulozyten erkennen ließ, sowie eine verringerte Anzahl von Erythrozyten, wurde die Entwicklung der Blutzellen unter Stressbedingungen untersucht. Ein geeignetes Modell hierfür ist die Mobilisation mit G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), das die Produktion von Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems sowie CFU-GMs fördert (Stroncek, Anderlini, 2001). Um auszuschließen, dass die Effekte bei TAUT-Knockoutmäusen auf im Alter entstehende Lebererkrankungen zurückzuführen sind, wurden für diesen Versuch junge Mäuse im Alter von 10-14 Wochen ausgewählt.

Die Mäuse wurden entweder wie unter 2.2.4. beschrieben über einen Zeitraum von 4 Tagen mit G-CSF mobilisiert oder als Kontrolle entsprechend mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

#### 3.2.2.1. Elektronische Zellzählung

Die entnommene Blutprobe und die aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen wurden als erstes mittels einer elektronischen Zellzählung analysiert.

Im Gegensatz zu den alten Mäusen zeigten nicht mobilisierte junge TAUT-Knockoutmäuse keine Unterschiede zum Wildtyp in den Hämatokrit- und Hämoglobinwerten (Tab.14). Unterschiede traten erst nach der Mobilisation auf.

Allerdings fand man bei den nicht mobilisierten TAUT-Knockoutmäusen eine tendenziell verminderte Anzahl an Thrombozyten verglichen mit dem Wildtyp. Diese Reduktion wurde nach der Mobilisation signifikant (Tab.14).

Alle mobilisierten Mäuse wiesen im Vergleich zu den nicht mobilisierten Mäusen eine signifikant vergrößerte Milz auf (Tab.14). Diese Splenomegalie ist auf eine vermehrte Produktion von Monozyten und Granulozyten zurückzuführen, was sich auch in einer signifikanten Erhöhung der Monozyten im Blut und der Granulozyten im Knochenmark widerspiegelte (Tab.14). Hingegen wurde der relative Anteil der lymphatischen Zellen nach der Mobilisation, sowohl beim

**Tabelle 14: Übersicht allgemeine Daten, Blutbild und prozentuale Verteilung der Leukozyten im Knochenmark und der Milz (aus 10-14 Wochen alten Mäusen).** Die Mäuse wurden entweder wie unter 2.2.4. beschrieben mobilisiert oder als Kontrolle mit einer entsprechenden Menge an physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Nach der Präparation wurden Milz und Leber gewogen und mit den isolierten Zellen aus Blut und Knochenmark erfolgte die elektronische Zellzählung wie im Material- und Methodenteil (s. 2.2.5.) beschrieben. (n = 8-10; \* mobilisierte Mäuse signifikant verschieden von den nicht mobilisierten Mäusen (p<0,05); mob = mobilisiert, TAUT-/- = TAUT-Knockoutmaus, WT = Wildtyp)

	Wildtyp MW±SEM	Knockout MW±SEM	Signifikanz p-Wert
<b>Kontrolle</b>			
<b>Allgemein</b>			
			WT/TAUT-/-
Leber (g)	1,31 ± 0,04	1,23 ± 0,07	0,321
Milz (mg)	85 ± 3	84 ± 7	0,898
<b>Blut</b>			
Leukozyten (*10 <sup>3</sup> /µl)	7,11 ± 1,69	6,84 ± 1,22	0,898
Lymphozyten (%)	78,25 ± 4,78	84,56 ± 2,5	0,272
Monozyten (%)	8,92 ± 2,29	6,84 ± 0,65	0,476
Granulozyten (%)	13,26 ± 4,67	10,14 ± 2,84	0,619
Hämoglobin (g/dL)	13,85 ± 0,37	13,89 ± 0,17	0,922
Hämatokrit (%)	41,79 ± 1,27	42,00 ± 0,71	0,888
Thrombozyten (*10 <sup>3</sup> /µl)	419,33 ± 46,57	268,45 ± 60,12	0,056
<b>KM</b>			
Lymphozyten (%)	90,28 ± 1,02	88,85 ± 1,09	0,343
Monozyten (%)	4,90 ± 0,8	5,18 ± 0,65	0,789
Granulozyten (%)	5,08 ± 0,5	5,93 ± 0,55	0,262
<b>Mobilisiert</b>			
<b>Allgemein</b>			
Leber (g)	1,38 ± 0,05	1,20 ± 0,05	<b>0,023</b>
Milz (g)	119 ± 4*	115 ± 5*	0,554
<b>Blut</b>			
Leukozyten (*10 <sup>3</sup> /µl)	8,10 ± 1,19	9,09 ± 0,92	0,514
Lymphozyten (%)	54,19 ± 5,00*	52,37 ± 2,84*	0,756
Monozyten (%)	26,06 ± 3,16*	34,72 ± 1,82*	<b>0,035</b>
Granulozyten (%)	19,75 ± 2,58	11,69 ± 2,11	<b>0,027</b>
Hämoglobin (g/dL)	14,23 ± 0,28	13,61 ± 0,19	0,080
Hämatokrit (%)	42,53 ± 0,78	40,56 ± 0,70	0,075
Thrombozyten (*10 <sup>3</sup> /µl)	468,06 ± 46,97	298,47 ± 47,94	<b>0,019</b>
<b>KM</b>			
Lymphozyten (%)	70,31 ± 2,07*	74,60 ± 2,56*	0,197
Monozyten (%)	8,78 ± 1,27*	6,43 ± 1,36	0,213
Granulozyten (%)	20,90 ± 1,56*	19,02 ± 1,66*	0,400

Wildtyp als auch bei den TAUT-Knockoutmäusen, im Knochenmark und im Blut gleichermaßen gesenkt.

Die mobilisierten TAUT-Knockoutmäuse wiesen im Blut, im Gegensatz zu den Wildtypen, neben der bereits erwähnten reduzierten Anzahl an Thrombozyten, eine signifikant gesteigerte Produktion von Monozyten auf, die von einer signifikant verringerten Prozentzahl an Granulozyten begleitet wurde.

### *3.2.2.2. Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen*

Um die Anzahl der einzelnen Zellpopulationen näher zu untersuchen, wurden Analysen mittels Zwei-Farben-Durchflusszytometrie von zellspezifischen Oberflächenproteinen (Beschreibung s.3.2.2.2.) durchgeführt.

Wie bereits bei der elektronischen Zellzählung gesehen, war nach der Mobilisation, sowohl im Wildtyp als auch in der TAUT-Knockoutmaus, die Zahl der myeloischen Zellen in Blut, Milz und Knochenmark signifikant angestiegen (Tab.15). Im Blut und in der Milz wurde dies durch eine erhöhte Anzahl von myeloischen Zellen ( $\text{Mac}^+\text{Gr}^+$ ) und im Knochenmark durch eine gesteigerte Anzahl der  $\text{Mac}^+\text{Gr}^-$ -Zellen angezeigt. Im Blut und in der Milz konnte man zudem eine durch die Mobilisation verursachte teils signifikante Abnahme der frühen Progenitorzellen ( $\text{Sca}^+\text{c-Kit}^-$ ) erkennen. Dies resultierte wahrscheinlich aus einem erhöhten Bedarf an differenzierten Zellen.

Vergleicht man die TAUT-Knockoutmäuse mit den Wildtypen, lässt sich bei den nicht mobilisierten TAUT-Knockoutmäusen im Knochenmark eine signifikante Erhöhung der Granulozyten ( $\text{Gr}^+\text{Mac}^-$ ), sowie in der Milz ein signifikanter Anstieg der frühen Progenitorzellen ( $\text{Sca}^+\text{c-Kit}^-$ ) erkennen.

Bei den mobilisierten Tieren gab es nur einen signifikanten Unterschied: eine erhöhte Anzahl an  $\text{Mac}^+\text{Gr}^-$ -Zellen in der Milz der TAUT-Knockoutmäuse gegenüber dem Wildtyp. Die gleiche Tendenz ließ sich im Blut feststellen und ist analog zu den Analysen der elektronischen Zellzählung (Tab.14), bei denen eine gesteigerte Prozentzahl von Monozyten gefunden wurde.

Tabelle 15: Beschreibung siehe Seite 49.

Blut			Wildtyp	TAUT-/-
<b>Kontrolle</b>	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Makrophagen	10,89 ± 7,36	3,98 ± 1,58
	Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	2,24 ± 1,71	3,31 ± 0,62
	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloide Prog.	11,69 ± 4,60	10,74 ± 1,22
<b>Mobilisiert</b>	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Makrophagen	7,45 ± 1,83	12,03 ± 0,95
	Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	4,57 ± 2,02	2,34 ± 0,90
	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloide Prog.	30,69 ± 5,80	42,46 ± 5,54
<hr/>				
<b>Kontrolle</b>	Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	36,40 ± 5,21	39,51 ± 3,60
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	0,46 ± 0,24	0,33 ± 0,61
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>+</sup>	Stammzellen	0,79 ± 0,97	1,23 ± 0,68
<b>Mobilisiert</b>	Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	25,69 ± 2,97	23,73 ± 3,71
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	4,13 ± 1,77	2,09 ± 1,27
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>+</sup>	Stammzellen	2,07 ± 0,49	1,29 ± 0,62
<hr/>				
<b>Kontrolle</b>	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	14,79 ± 3,38	24,41 ± 5,06
	CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	24,82 ± 7,53	18,70 ± 4,20
	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	9,73 ± 2,72	8,17 ± 2,58
<b>Mobilisiert</b>	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	8,79 ± 2,67	14,97 ± 2,18
	CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	24,57 ± 5,27	23,45 ± 6,97
	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	6,93 ± 1,06	6,03 ± 1,44
<hr/>				
Knochenmark				
<b>Kontrolle</b>	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Makrophagen	3,88 ± 2,34	3,70 ± 1,49
	Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	1,61 ± 0,57	3,74 ± 0,60
	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloide Prog.	49,08 ± 7,16	55,50 ± 5,04
<b>Mobilisiert</b>	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Makrophagen	32,46 ± 6,09	33,23 ± 7,38
	Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	1,95 ± 0,89	1,75 ± 0,51
	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloide Prog.	40,61 ± 6,55	36,71 ± 8,54
<hr/>				
<b>Kontrolle</b>	Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	8,12 ± 0,90	6,88 ± 1,13
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	3,06 ± 1,35	2,88 ± 0,84
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>+</sup>	Stammzellen	1,63 ± 0,84	1,45 ± 0,42
<b>Mobilisiert</b>	Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	8,98 ± 2,26	5,74 ± 1,26
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	5,47 ± 2,23	1,57 ± 0,43
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>+</sup>	Stammzellen	0,62 ± 0,43	2,01 ± 0,86
<hr/>				
<b>Kontrolle</b>	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	9,19 ± 2,29	10,65 ± 2,11
	CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	22,37 ± 9,68	27,34 ± 11,44
	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	6,59 ± 3,38	8,40 ± 3,74
<b>Mobilisiert</b>	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	5,45 ± 1,69	5,57 ± 0,97
	CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	24,69 ± 6,02	18,74 ± 9,04
	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	37,25 ± 19,94	5,76 ± 4,00

Fortsetzung s. nächste Seite

Milz			Wildtyp	TAUT-/-
<b>Kontrolle</b>	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Makrophagen	4,77 ± 1,14	5,80 ± 1,36
	Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	2,80 ± 0,88	5,59 ± 1,23
	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloide Prog.	2,81 ± 0,54	3,69 ± 0,63
<b>Mobilisiert</b>	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	Makrophagen	* 5,81 ± 0,61	* 8,90 ± 0,63
	Gr <sup>+</sup> Mac <sup>-</sup>	Granulozyten	3,10 ± 0,48	3,63 ± 0,84
	Mac <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	myeloide Prog.	13,53 ± 1,71	18,70 ± 1,88
*				
<b>Kontrolle</b>	Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	58,58 ± 3,36	68,98 ± 1,78
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	0,12 ± 0,08	0,70 ± 0,55
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>+</sup>	Stammzellen	1,42 ± 0,57	* 1,21 ± 0,28
<b>Mobilisiert</b>	Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>-</sup>	frühe Progenitoren	55,09 ± 4,84	46,31 ± 1,55
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>-</sup>	späte Progenitoren	1,87 ± 1,02	0,45 ± 0,29
	c-Kit <sup>+</sup> Sca <sup>+</sup>	Stammzellen	2,07 ± 1,23	0,83 ± 0,31
*				
<b>Kontrolle</b>	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	24,83 ± 5,56	28,44 ± 3,03
	CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	25,16 ± 7,39	36,61 ± 3,88
	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	39,56 ± 12,15	22,55 ± 6,30
<b>Mobilisiert</b>	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>-</sup>	B-Zellen	16,86 ± 3,79	22,50 ± 3,40
	CD3e <sup>+</sup> B220 <sup>-</sup>	T-Zellen	35,25 ± 10,39	26,90 ± 2,76
	B220 <sup>+</sup> CD3e <sup>+</sup>	lymphoide Prog.	36,96 ± 14,77	19,82 ± 4,61

**Tabelle 15: Prozentualer Anteil der unterschiedlichen Oberflächenmarker auf die Gesamtanzahl der Blut-, Knochenmark- und Milzzellen (aus 10-14 Wochen alten Mäusen).** Die Mäuse wurden entweder wie unter 2.2.4. beschrieben mobilisiert oder als Kontrolle mit einer entsprechenden Menge an physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Die wie unter 2.2.5. präparierten Zellen wurden mittels Zwei-Farben-Durchflusszytometrie-Analyse in zellspezifischer charakteristischer Kombination [Mac u. Gr-1, Sca-1 u. c-Kit, B220 u. CD3e; Beschreibung siehe Abschnitt 3.2.2.2.] analysiert. (Mittelwerte ± SEM; n = 4-6; \* signifikant verschieden (p<0,05); TAUT-/- = TAUT-Knockoutmaus, Prog. = Progenitoren)

### 3.2.2.3. Kolonieassay

Zur Untersuchung der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der hämatopoetischen Progenitorzellen aus Blut, Knochenmark und Milz wurden Kolonieassays eingesetzt.

Im Knochenmark fanden sich weder bei den nicht mobilisierten noch bei den mobilisierten Mäusen Unterschiede in der Kolonienbildung zwischen dem Wildtyp und der TAUT-Knockoutmaus (Abb.7). Bei beiden war nach der Mobilisation eine geringe Erhöhung der CFU-GMs (1,1- bis 1,5-fach) und eine eher niedrigere Anzahl an CFU-Es zu verzeichnen.

Auch im Blut zeigten sich keine Unterschiede zwischen TAUT-Knockoutmäusen

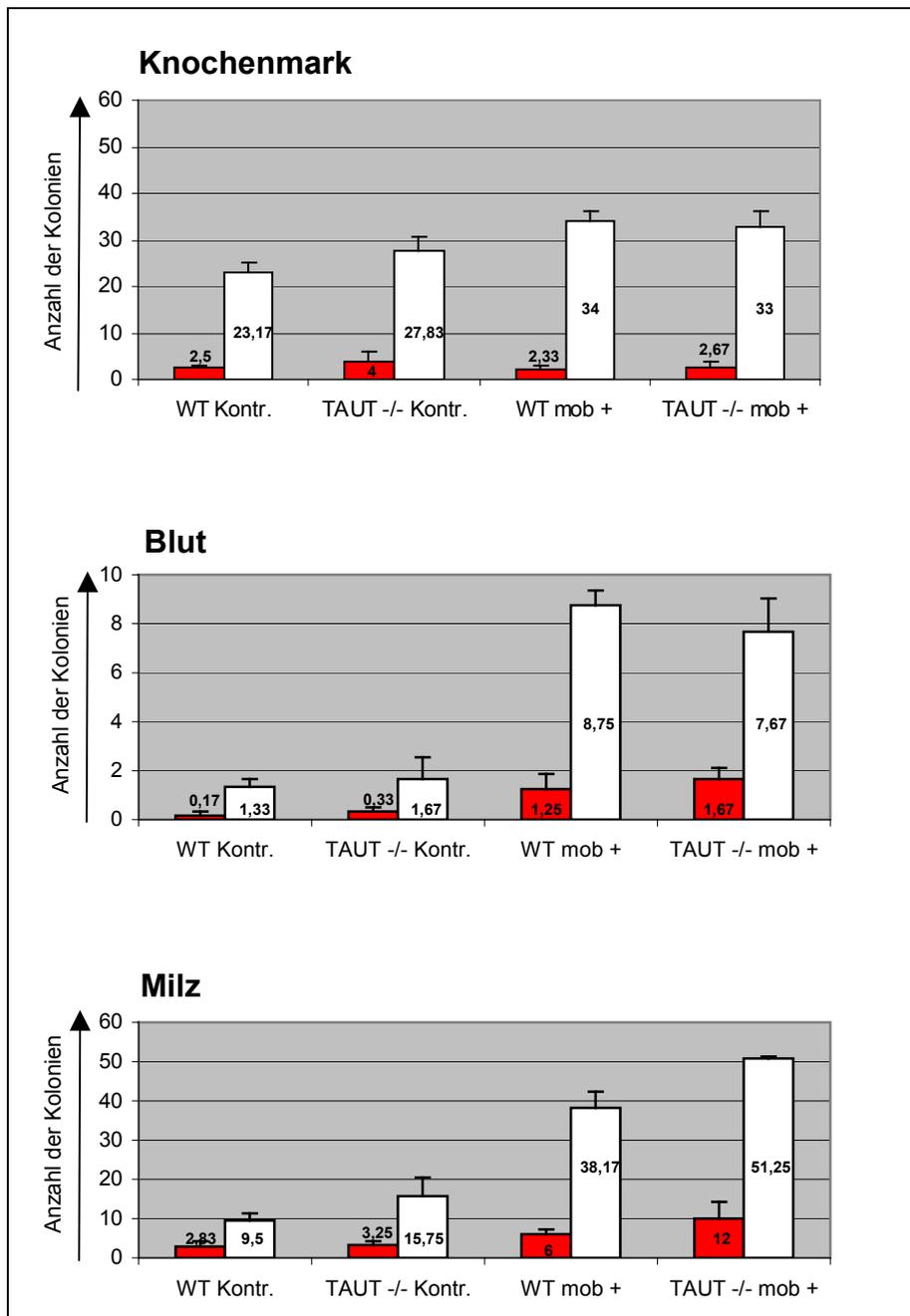
und den Wildtypen. Die Mobilisation führte zu einer vergleichbaren Steigerung der Anzahl von CFU-GMs und CFU-Es im Wildtyp und in der TAUT-Knockoutmaus.

In der Milz hingegen fanden sich bereits in den nicht mobilisierten Mäusen Unterschiede zwischen den Wildtypen und den TAUT-Knockoutmäusen. TAUT-Knockoutmäuse bildeten 1,5-fach so viele CFU-GMs wie die Wildtypen (Abb.7).

Die Mobilisation führte sowohl beim Wildtyp als auch bei der TAUT-Knockoutmaus zu einer erhöhten Anzahl an CFU-GMs (Abb.7). Beim Wildtyp handelte es sich um das 4-fache, bei der TAUT-Knockoutmaus um das 3,2-fache (Abb.7) Die Anzahl der CFU-GMs bei den TAUT-Knockoutmäusen war somit nach der Mobilisation immer noch um das 1,3-fache höher als beim Wildtyp.

Diese Daten assoziieren mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse (Tab.15). Neben der durch die Mobilisation ausgelösten signifikant vermehrten Produktion von myeloischen Zellen in der Milz, sowohl im Wildtyp als auch in den TAUT-Knockoutmäusen, zeigten mobilisierte TAUT-Knockoutmäuse in der Milz eine signifikant höhere Anzahl an Makrophagen (Mac<sup>+</sup>Gr<sup>-</sup>-Zellen) verglichen mit dem Wildtyp.

Die CFU-Es in der Milz waren nach der Mobilisation im Wildtyp um das 2,1-fache und in der Knockoutmaus um das 3,7-fache, gegenüber der Kolonienzahl in den nicht mobilisierten Mäusen, erhöht. Dies führte bei den mobilisierten TAUT-Knockoutmäusen zu einer doppelten Anzahl an CFU-Es verglichen mit dem Wildtyp.



**Abbildung 7: Anzahl der Kolonien in Knochenmark, Blut und Milz (aus 10-14 Wochen alten Mäusen).** Die Mäuse wurden entweder wie unter 2.2.4. beschrieben mobilisiert oder als Kontrolle mit einer entsprechenden Menge an physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Die Zellen wurden aus den Mäusen isoliert (s.2.2.5), in semi-solidem Medium inkubiert (s.2.2.14) und anschließend die Anzahl der CFU-E (rot) Kolonien und der CFU-GM (weiß) Kolonien ausgezählt. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 3; WT = Wildtyp, mob + = mobilisiert, Kontr. = Kontrolle, TAUT-/- = TAUT-Knockoutmäuse)

### 3.2.3. Genexpressionsanalysen von murinen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und weiterführende Untersuchungen in murinen T-Zellen

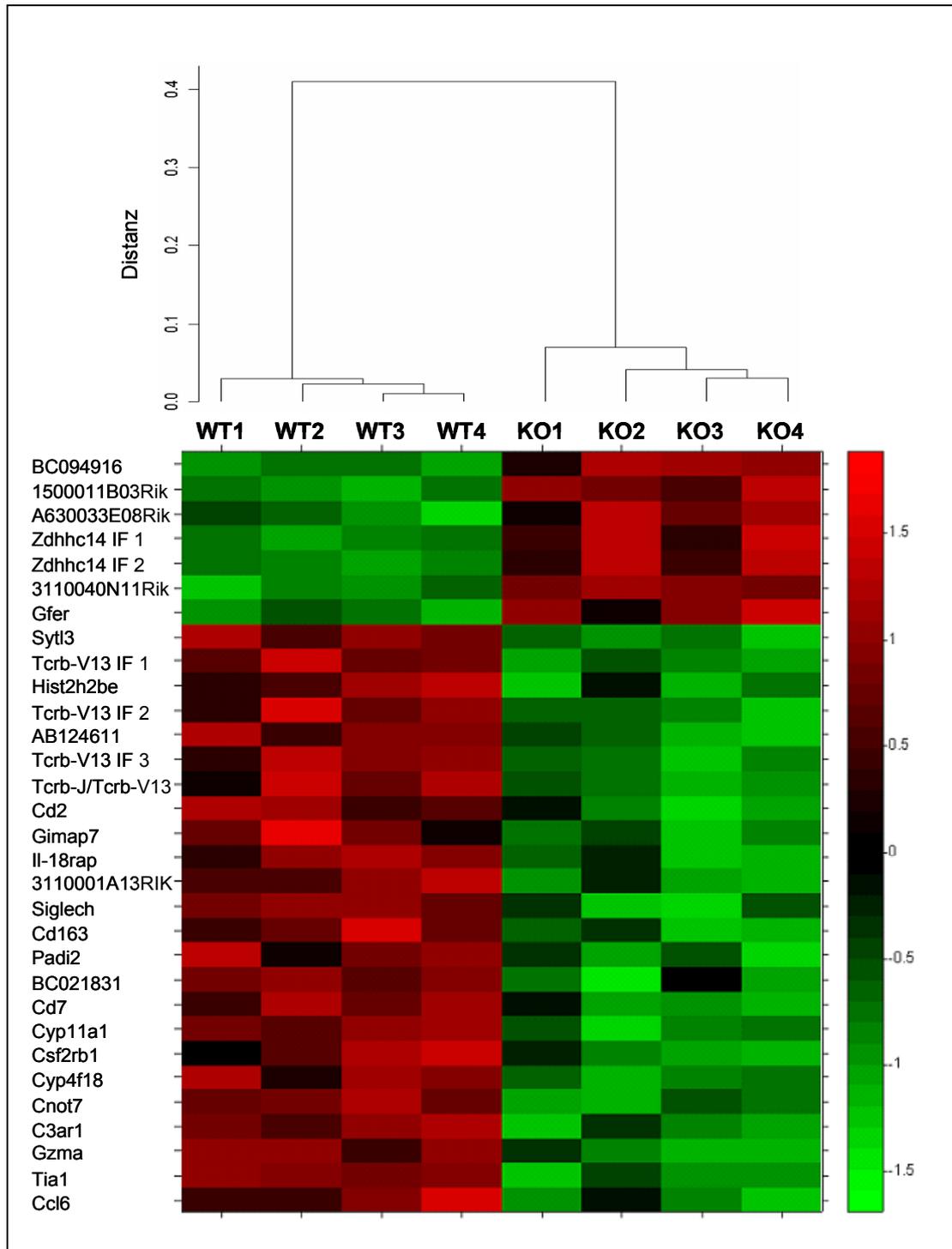
#### 3.2.3.1. Genexpressionsanalyse

Um zu untersuchen, ob die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) aus TAUT-Knockoutmäusen ein unterschiedliches mRNA-Profil im Vergleich zu den HSPC aus den Wildtypen aufweisen, wurden Affymetrix-Genexpressions-Analysen mit diesen Zellen durchgeführt.

CD34 ist bei Mäusen kein stamm- und progenitorzellspezifischer Marker, sondern wird auch auf Eosinophilen und Mastzellen exprimiert (Blanchet *et al.*, 2007; Rådinger *et al.*, 2004; Drew *et al.*, 2002). Murine hämatopoetische Stammzellen sind als Lineage negative Zellen gekennzeichnet, die die Oberflächenmarker Sca-1 und c-Kit exprimieren [ $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{c-Kit}^+$  (LSK)] (Lennartsson *et al.*, 2005). Als hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen wurden daher für die Genchipversuche  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+$ -Zellen ausgewählt. Vorab wurde in den  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+$ -Zellen des Wildtyps einmal exemplarisch die mRNA-Expression von TAUT mittels Real-Time PCR untersucht. Die Expression entsprach einer 0,3-fachen im Vergleich zu HPRT. Dies liegt im Rahmen der TAUT-mRNA-Expression unter normoosmotischen Bedingungen in den untersuchten primären humanen HSPC und den humanen hämatopoetischen Zelllinien (0,2 bis 0,5 TAUT-mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie) (Tab.8).

Für die Genexpressionsanalyse wurde der *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* von Affymetrix eingesetzt. Es handelt sich um einen Gesamt-Genomchip auf dem sich 45000 *Probe Sets* befinden, die die Expression von 39000 Transkripten und ihren Varianten von ca. 34000 gut charakterisierten Genen analysieren (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/index.affx>).

Für die Genexpressionsanalyse wurden, aufgrund der geringen Ausbeute an Knochenmarkszellen pro Maus, für jeden Genchip (n = 4) die isolierten Knochenmarkszellen aus drei Mäusen verwendet. Als signifikant differentiell exprimierte Gentranskripte wurden alle mit einem *Fold Change* (hier: Expression in TAUT-Knockoutmaus / Expression im Wildtyp) von  $\geq 1,5$  und  $\leq 0,67$  und einem Signifikanzniveau von  $q < 0,05$  bezeichnet.



**Abbildung 8: Hierachische Clusteranalyse von differentiell exprimierten Genen in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen ( $\text{Lin}^-\text{Sca}^+$ ) vom Wildtyp und von TAUT-Knockoutmäusen (10-14 Wochen alt).** Die verwendeten Proben sind hierbei horizontal, die differentiell exprimierten Gene vertikal aufgetragen. Zur Darstellung wurden die Expressionswerte mit einer rot-grün-Skala farbkodiert. **Rot** = höherer Expressionswert, **grün** = niedrigerer Expressionswert als der Mittelwert des jeweils betrachteten Gens. Die Ähnlichkeit (Distanz) kann anhand des darüberliegenden Dendrogramms abgelesen werden. WT = Wildtyp, KO = TAUT-Knockout, IF = Isoform.

Beim Vergleich mit dem Wildtyp fanden sich in den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>) der Knockoutmäuse insgesamt 31 differentiell regulierte Gentranskripte, von denen 7 hochreguliert und 24 herunterreguliert waren (Abb. 8, Tab. 16 und 17).

Mit Hilfe der Clusteranalyse (Eisen *et al.*, 1998) werden differentiell regulierte Gene und die verwendeten Proben entsprechend ihres Expressionsmusters in Gruppen eingeteilt. Dadurch entsteht anhand der Ähnlichkeit des Genexpressionsprofils der verwendeten Proben eine Gruppierung. Die Ähnlichkeit (Distanz) kann anhand eines Dendrogramms abgelesen werden. Die Transkripte aus den Wildtypen und die Transkripte aus den TAUT-Knockoutmäusen sind jeweils in einer Gruppe zusammengefasst, die sich eindeutig voneinander abgrenzen (Abb.8).

Um die differentiell regulierten Gene nach den Funktionen ihrer Proteine zu unterteilen, wurden, wenn nicht anders angegeben, die Geninformationen aus dem "Affymetrix Netaffx™ Analysis Center" (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) entnommen.

Vier der sieben hochregulierten Gentranskripte, sind Transkripte die noch nicht charakterisiert sind, bzw. die für hypothetische Proteine kodieren (Tab.16). Das hochregulierte Gentranskript von *Zdhhc14* liegt in zwei verschiedene Varianten vor und das siebte Gentranskript ist *Gfer*.

*Zdhhc14* ist ein Protein mit einer Zink-Ionen-Bindung und Acetyltransferasenaktivität. Weitere Informationen liegen über dieses Protein nicht vor.

Bei *Gfer* (auch *Erv1* oder *ALR* genannt) handelt es sich um eine Sulfhydryl-Oxidase, die in Mitochondrien eine Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression sowie der oxidativen Phosphorylierung spielt und in Verbindung mit der Reifung von zytosolischen Eisen/Schwefel-Proteinen gebracht wird (Lange *et al.*, 2001; Lisowsky *et al.*, 2001). Ursprünglich wurde dieses Protein *ALR* (*augmenter of liver regeneration*) genannt, da es während der Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie akkumuliert wird (Tury *et al.*, 2005). Das *Gfer* Protein ist in diesem Zusammenhang in zweierlei Hinsicht interessant: Zum einen da die TAUT-Knockoutmäuse schwere Leberschädigungen zeigen, zum anderen da in TAUT-Knockoutmäusen die Mitochondrien zum Teil geschädigt sind (Warskulat *et al.*, 2006).

**Tabelle 16: Tabelle der hochregulierten Gentranskripte. (q-Wert < 0,05).**

Offizielles Symbol	Name	Fold Change
BC0949916	cDNA sequence BC094916	2,577
1500011B03Rik	RIKEN cDNA 1500011B03 gene	2,380
A630033E08Rik	RIKEN cDNA A630033E08 gene	2,312
Zdhhc14 Isoform 1	zinc finger, DHHC domain containing 14	2,121
Zdhhc14 Isoform 2	zinc finger, DHHC domain containing 14	1,943
3110040N11Rik	RIKEN cDNA 3110040N11 gene	1,878
Gfer	growth factor, erv1 ( <i>S.cerevisiae</i> )-like (augmenter of liver regeneration)	1,639

**Tabelle 17: Tabelle der runterregulierten Gentranskripte. (q-Wert < 0,05).**

Offizielles Symbol	Name	Fold Change
Syt13	synaptotagmin-like 3	0,659
Tcrb-V13 Isoform 1	T-cell receptor beta, variable 13	0,655
Hist2h2be	histone 2, H2be	0,649
Tcrb-V13 Isoform 2	T-cell receptor beta, variable 13	0,648
AB124611	cDNA sequence AB124611	0,644
Tcrb-V13 Isoform 3	T-cell receptor beta, variable 13	0,644
Tcrb-J/Tcrb-V13	T-cell receptor beta, joining region/T-cell receptor beta, variable 13	0,640
Cd2	CD2 antigen	0,639
Gimap7	GTPase, IMAP family member 7	0,609
Il-18rap	interleukin 18 receptor accessory protein	0,605
3110001A13Rik	RIKEN cDNA 3110001A13 gene	0,600
Siglech	sialic acid binding Ig-like lectin H	0,597
Cd163	CD163 antigen	0,591
Padi2	peptidyl arginine deiminase, type II	0,587
BCO21831	clone IMAGE:3983821, mRNA, partial cds.	0,578
Cd7	CD7 antigen	0,547
Cyp11a1	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	0,533
Csf2rb1	colony stimulating factor 2 receptor, beta 1, low-affinity	0,533
Cyp4f18	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18	0,532
Cnot7	CCR4-NOT transcriptions complex, subunit 7	0,522
C3ar1	complement component 3a receptor 1	0,515
Gzma	granzyme A	0,454
Tia1	cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	0,439
Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	0,430

Von den 24 herunterregulierten Transkripten (Tab.17) sind nur drei nicht charakterisiert. 7 Transkripte kodieren für T-Zell spezifische Proteine: Gzma, CD7, CD2, Tcrb-J/Tcrb-V13 und drei Varianten von Tcrb-V13. Die von diesen Gentranskripten kodierten Proteine haben alle eine gemeinsame Aufgabe: sie sind für die Immunantwort verantwortlich. Diese Aufgabe erfüllen auch die nicht T-Zell spezifischen Genprodukte von Ccl6, einem Chemokin (Ma *et al.*, 2004), und CD163, welches an der Akute-Phase-Antwort beteiligt ist (Kristiansen *et al.*, 2001).

Die restlichen herunterregulierten Gentranskripte sind unterschiedlichen Funktionen und Prozessen zuzuordnen. Das von Padi2 kodierte Protein spielt eine Rolle in der Proteinmodifikation (Raijmakers *et al.*, 2006) und das Sytl3-Protein wird in Zusammenhang mit intrazellulärem Proteintransport gebracht (Fukuda, 2002). Die Genprodukte von Cyp4f18 und Cyp11a1 sind unter anderem Bestandteil der Elektronentransportkette. Weitere herunterregulierte Gentranskripte kodieren für Proteine die an folgenden biologischen Prozessen beteiligt sind: Transkriptionsregulation (Cnot7) (Ogawa *et al.*, 2004), Translationsregulation (Tia1) (Dixon *et al.*, 2003), Chromosomen-Organisation (Hist2h2be), Komplement-Aktivierung (C3ar1), Zytokin-Signalweg [Csf2rb1; Il18rap (Cheung *et al.*, 2005)] bzw. unbekannter Funktion (Gimap7; Siglech).

### 3.2.3.2. *Regulierte Gene in T-Zellen*

Bei der Genexpressionsanalyse zeigte sich, dass ein Drittel der herunterregulierten Gene in HSPC von TAUT-Knockoutmäusen, verglichen mit dem Wildtyp, T-Zell spezifische Gene sind. Im Folgenden wurde untersucht, ob die differentiell regulierten Gene aus den HSPC auch in T-Zellen differentiell exprimiert sind. Exemplarisch wurden die drei am Stärksten herunterregulierten T-Zell spezifischen Gentranskripte (Gzma, CD7 und CD2) sowie Gfer als Beispiel für ein hochreguliertes Gen ausgewählt. Dazu wurden T-Zellen (CD90 positiv) aus der Milz von TAUT-Knockoutmäusen und Wildtypen isoliert und die mRNA-Spiegel mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht.

In Tabelle 18 ist zu erkennen, dass die mRNA-Spiegel von CD2 und Gzma entsprechend der Chipanalyse von HSPC (0,6- und 0,5-fache Expression TAUT-

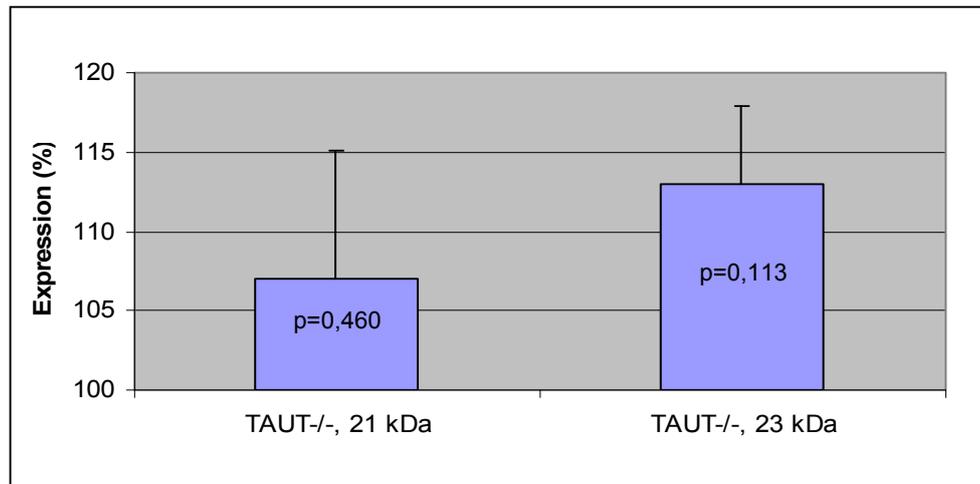
Knockout / Wildtyp) auch auf mRNA-Ebene in T-Zellen (0,7- und 0,9-fache Expression TAUT-Knockout / Wildtyp) herunterreguliert waren. Die CD7-mRNA-Spiegel in T-Zellen waren im Gegensatz zu den mRNA-Spiegeln in HSPC in TAUT-Knockoutmäusen, gegenüber dem Wildtyp, nicht differentiell exprimiert. Die Expression von Gfer in den T-Zellen wurde zusätzlich zur mRNA-Ebene mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinebene untersucht. Es zeigten sich im Western Blot zwei Isoformen von einer Größe von 21 kDa und 23 kDa (Abb. 9). Bei der Quantifizierung ergab sich eine leichte Erhöhung der Expression bei der 23 kDa Isoform (Abb.10).

**Tabelle 18: Vergleich von mRNA-Spiegeln in HSPC (gemessen mittels Genchip-Hybridisierung) und T-Zellen (gemessen mittels Real-Time RT-PCR).** Die T-Zellen wurden wie unter 2.2.6. beschrieben aus den Mäusen (10-14 Wochen alt) isoliert. Anschließend wurden mittels Real-Time RT-PCR die mRNA-Spiegel für CD2, CD7, Gfer und Granzyme A (Gzma) ermittelt und auf HPRT-mRNA-Spiegel normalisiert. Angegeben ist der Quotient der Expression von TAUT-Knockoutmäusen (TAUT<sup>-/-</sup>) zu Wildtypmäusen [Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 6; \* signifikant verschieden vom Wildtyp ( $p < 0,05$ )]. Die Daten der Chipanalyse wurden wie unter 2.2.15. beschrieben ermittelt (Mittelwert; n = 4).

Genname	HSPC	T-Zellen
	Chipanalyse mRNA-Expression TAUT <sup>-/-</sup> / Wildtyp	RT-PCR
CD2	0,639	0,675 $\pm$ 0,156
CD7	0,547	1,071 $\pm$ 0,100
Gfer	1,639	1,371 $\pm$ 0,068*
Gzma	0,454	0,866 $\pm$ 0,080



**Abbildung 9: Proteinexpression von Gfer und GAPDH in T-Zellen aus Wildtyp (WT) und Knockoutmäusen (TAUT<sup>-/-</sup>).** Die T-Zellen wurden wie unter 2.2.6. beschrieben aus den Mäusen (10-14 Wochen alt) isoliert und anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse mit der internen Kontrolle GAPDH (2.2.17.) durchgeführt.



**Abbildung 10: Quantifizierung der Expression des Gfer Proteins.** Die T-Zellen wurden wie unter 2.2.6. beschrieben aus den Mäusen (10-14 Wochen alt) isoliert und anschließend eine Western-Blot-Analyse (2.2.17.) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Analyseprogramm *Scion Image*. (Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 3; Signifikanz: Expression in TAUT-Knockoutmäusen (TAUT-/-) im Verhältnis zum Wildtyp (WT) als p-Wert angegeben)

### 3.2.3.3. T-Zell-Aktivierung

Einige T-Zell spezifische Gentranskripte waren in den HSPC von TAUT-Knockoutmäusen, im Vergleich zum Wildtyp, herunterreguliert und die entsprechende mRNA zum Teil auch in T-Zellen differentiell exprimiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob aktivierte T-Zellen aus TAUT-Knockoutmäusen im Vergleich zu den Wildtypen Unterschiede in der Proliferationsrate oder der mRNA-Expression von Aktivierungsmarkern aufweisen.

Die aus der Milz präparierten T-Zellen (CD90 positiv) wurden *in vitro* entweder mit PMA und Ionomycin oder mit IL-12 und IL-18 aktiviert. Nach der Aktivierung müssen die T-Zellen sich differenzieren, Zytokine produzieren und proliferieren (Weil, Israel, 2004). Anschließend wurden die mRNA-Spiegel verschiedener Zytokine (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) und des für die Aktivierung spezifischen Oberflächenmarkers (CD69) mittels quantitativer Real-time PCR analysiert, sowie ein Proliferationsassay durchgeführt. Als Kontrolle dienten nicht aktivierte T-Zellen, die statt mit den Aktivierungssubstanzen mit einer entsprechenden Menge an Lösungsmittel inkubiert wurden.

In den nicht aktivierten T-Zellen der TAUT-Knockoutmäuse wurde die INF- $\gamma$ -mRNA signifikant niedriger, und die CD69-mRNA signifikant höher, im Vergleich zu den T-Zellen aus dem Wildtyp, exprimiert (Tab.19).

Nach Aktivierung mit IL-12 und IL-18 gab es zwischen den untersuchten mRNA-Spiegeln der T-Zellen aus dem Wildtyp und der TAUT-Knockoutmaus keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell wurde INF- $\gamma$  hier hochreguliert (Tab.19).

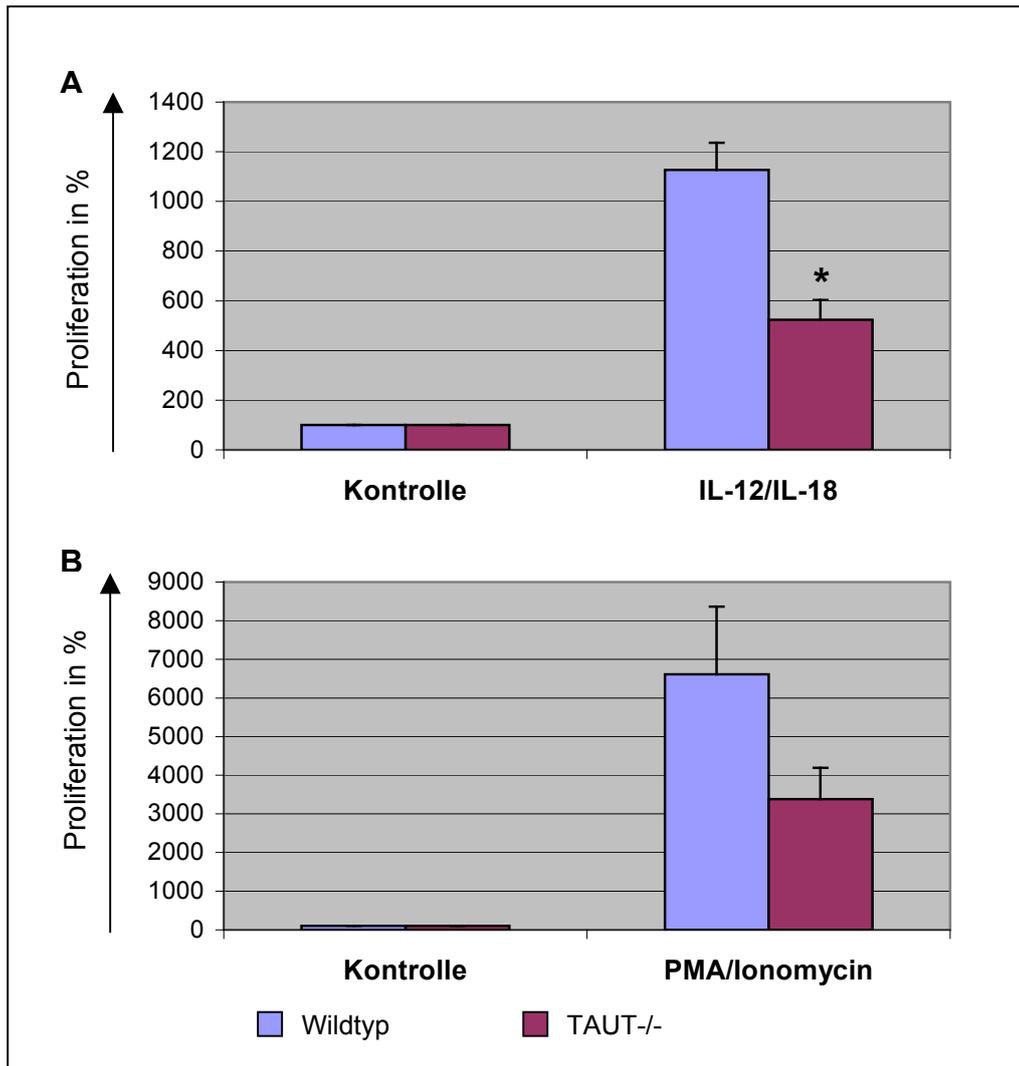
Die Aktivierung mit PMA und Ionomycin führte zu einer signifikant erniedrigten mRNA-Expressionsrate von CD69 und INF- $\gamma$ , und einer signifikant erhöhten Expressionsrate von IL-2 (Tab.19).

Im Proliferationsassay zeigte sich, dass sowohl durch die Aktivierung mit PMA und Ionomycin, als auch durch Aktivierung mit IL-12 und IL-18 in TAUT-Knockoutmäusen, verglichen mit dem Wildtyp, eine etwa um die Hälfte, teils signifikant reduzierte Proliferationsrate erreicht wurde (Abb.11).

Zusammenfassend wurden neben einer erniedrigten Proliferationsrate von aktivierten T-Zellen aus der TAUT-Knockoutmaus, verglichen mit dem Wildtyp, differentiell exprimierte Aktivierungsmarker nachgewiesen.

**Tabelle 19: mRNA-Spiegel von Aktivierungsmarkern nach Aktivierung von T-Zellen aus Wildtyp und TAUT-Knockoutmäusen (10-14 Wochen alt).** T-Zellen (CD90 positiv) wurden aus der Milz der Mäuse wie unter 2.2.6 beschrieben isoliert und für 6 Stunden entweder mit PMA und Ionomycin (PI) oder IL-12 und IL-18 (IL) aktiviert oder zur Kontrolle mit einer entsprechenden Menge an Lösungsmittel (Ko) inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert und mittels Real-Time RT-PCR die mRNA-Spiegel für CD69, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-2 ermittelt und auf HPRT-mRNA-Spiegel normalisiert. [Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 6; \* signifikant verschieden vom Wildtyp ( $p < 0,05$ ); WT = Wildtyp, TAUT-/- = TAUT-Knockout]

	CD69	Gentranskript			
		INF $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-4	IL-2
	mRNA-Kopien/HPRT-mRNA-Kopie				
WT Ko	0,192 $\pm$ 0,061	0,013 $\pm$ 0,003	0,278 $\pm$ 0,148	0,001 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001
WT PI	5,012 $\pm$ 1,044	3,491 $\pm$ 0,586	3,619 $\pm$ 1,013	0,322 $\pm$ 0,259	2,022 $\pm$ 0,456
WT IL	1,522 $\pm$ 0,307	6,687 $\pm$ 0,644	0,866 $\pm$ 0,258	0,004 $\pm$ 0,002	0,001 $\pm$ 0,001
TAUT -/- Ko	0,226 $\pm$ 0,068*	0,006 $\pm$ 0,000*	0,257 $\pm$ 0,124	0,001 $\pm$ 0,000	0,006 $\pm$ 0,004
TAUT -/- PI	4,320 $\pm$ 0,881*	2,373 $\pm$ 0,352*	3,907 $\pm$ 1,069	0,115 $\pm$ 0,073	3,805 $\pm$ 0,935*
TAUT -/- IL	1,557 $\pm$ 0,402	9,351 $\pm$ 1,379	0,830 $\pm$ 0,249	0,000 $\pm$ 0,000	0,002 $\pm$ 0,001



**Abbildung 11: Proliferation von aktivierten T-Zellen aus Wildtyp und TAUT-Knockoutmäusen (10-14 Wochen alt). (A) Aktivierung mit IL-12 und IL-18. (n=8) (B) Aktivierung mit PMA und Ionomycin. (n=4) (A) und (B) T-Zellen (CD90 positiv) wurden aus der Milz der Mäuse wie unter 2.2.6. beschrieben isoliert, mit IL-12 und IL-18 bzw. PMA und Ionomycin für 18 Stunden inkubiert und dann die Proliferationsrate über den Einbau von [<sup>3</sup>H]-markiertem Thymidin während einer weiteren Inkubationszeit von 18 Stunden gemessen. Als Kontrolle dienten T-Zellen, die statt mit den Substanzen für die Aktivierung mit einer entsprechenden Menge an Lösungsmittel behandelt wurden. Für die Auswertung wurde die Proliferationsrate der Kontroll-T-Zellen gleich 100% gesetzt. [TAUT-/- = TAUT-Knockout; \* signifikant verschieden vom Wildtyp (p<0,05)]**

## 4. Diskussion

### 4.1. Osmolytstrategien in humanen hämatopoetischen primären Zellen und Zelllinien

Betain, *myo*-Inositol und Taurin wurden als Osmolyte in humanen Zellen unter anderem im Gehirn, der Niere, der Leber, in Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten identifiziert (Warskulat *et al.*, 2007; Warskulat *et al.*, 2004; Denkert *et al.*, 1998; Häussinger, 1998; Kwon, Handler, 1995). Über die Osmolytstrategien von hämatopoetischen Stammzellen und ihrer Entwicklung und Bedeutung während der Differenzierung gab es bisher keine Informationen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane primäre CD34 positive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, sowie die humanen hämatopoetischen Zelllinien KG-1a, K422 und K562 sich bei der Volumenregulation ebenfalls einer Osmolytstrategie bedienen. Als Beweise hierfür sind die intrazelluläre Akkumulation von organischen Osmolyten wie Betain, *myo*-Inositol oder Taurin (Tab.9) und die hyperosmotisch induzierte mRNA-Expression der korrespondierenden Osmolytimportsysteme BGT1, SMIT und TAUT (Abb.4, Tab.8) anzuführen.

Die mRNA-Expression der Osmolyttransportsysteme SMIT und TAUT assoziiert in allen untersuchten Zellen mit den *myo*-Inositol- und Taurinaufnahmeraten. Die BGT1-mRNA-Expression ist zwar hyperosmotisch induzierbar, deckt sich aber bei den primären CD34 positiven Zellen und den Zelllinien KG-1a und K422 nicht mit den Betainaufnahmeraten. Hierfür sind drei Gründe anzuführen: erstens wird Betain nicht nur von BGT1 in die Zelle importiert, sondern zusätzlich von dem Aminosäuretransportsystem A (Petronini *et al.*, 1994; Kempson, 1998), zweitens besteht die Möglichkeit einer erhöhten *Turn-over*-Rate und drittens ist es nicht ausgeschlossen, dass die Diskrepanz mit einer zeitlichen Differenz von Transkription und Translation zusammenhängt.

Jede Zellspezies hat ihr eigenes Osmolytprofil. In CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und in der CD34 positiven Zelllinie KG-1a fungieren *myo*-Inositol und Taurin als Osmolyte. Die lymphatische Zelllinie K422 setzt nach hyperosmotischer Inkubation Betain und Taurin ein, und

die myeloische Zelllinie K562 bedient sich bei der Aufrechterhaltung der Zellvolumenhomöostase aller drei Osmolyte.

Ein spezifisches lymphatisches und myeloisches Osmolytprofil, das sich während der Differenzierung ausprägt, gibt es jedoch nicht. Dies wurde anhand der Untersuchung von primären lymphatischen und myeloischen Zellen gezeigt. Monozyten (CD14 positiv) zeigen zwar das gleiche Profil wie die myeloische Zelllinie K562, die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten weisen aber ein zueinander und zugleich zu der lymphatischen Zelllinie K422 verschiedenes Osmolytprofil auf (Abb.5).

Es ist also anzunehmen, dass im Laufe der Differenzierung jede hämatopoetische Zellpopulation ihr eigenes zellindividuelles Osmolytprofil entwickelt. Ob alle Zellen innerhalb einer Population gleichgeschaltet sind, oder ob es innerhalb einer Population Zellen mit unterschiedlichen Osmolytspezifitäten gibt, ist nicht bekannt.

Monozyten wurden bereits von Denkert *et al.* (1998) auf die Nutzung der kompatiblen organischen Osmolyte Betain und *myo*-Inositol untersucht. Für beide Osmolyte wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine gesteigerte Aufnahmerate unter hyperosmotischen Bedingungen festgestellt. Die Aufnahmeraten bei Denkert *et al.* (1998) sind allerdings wesentlich höher als in der vorliegenden Arbeit. Möglicherweise beruht dies auf den unterschiedlich verwendeten Isolationsmethoden der Monozyten.

Dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche kompatible organische Osmolyte bevorzugen, und die Expression von Osmolyttransportern sogar als Aktivierungsmarker dienen kann, wurde auch für andere Zelltypen beschrieben. Ruhende hepatische Sternzellen beispielsweise exprimieren die Osmolytimportsysteme SMIT und TAUT, jedoch nicht BGT1 (Peters-Regehr *et al.*, 1999). Während der Transformation zu Myofibroblasten kommt es zu einer *de-novo*-Expression von BGT1 und zu einer gesteigerten *myo*-Inositol und Taurinaufnahme. Interessanterweise sind hepatische Sternzellen erst vor kurzem als Progenitorzellen der Leber beschrieben worden, die viele Merkmale von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aufweisen (Kordes *et al.*, 2007). Vergleicht man das Osmolytprofil von hepatischen Sternzellen und humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, nutzen beide *myo*-Inositol und Taurin, jedoch nicht Betain als Osmolyte.

Die malignen CD34 positiven Zellen von Patienten mit CML bedienen sich der gleichen Osmolyte wie die CD34 positiven Zellen von gesunden Spendern (Abb.5). Auffallend ist jedoch, dass bei den malignen Zellen die Betainaufnahme ungefähr doppelt so hoch ist (Abb.5A). Es ist denkbar, dass sich diese Zellen durch die verstärkte Betainaufnahme einen Selektionsvorteil verschaffen. Erhöhte Osmolytspiegel in Tumorzellen wurden bereits für die Osmolyte *myo*-Inositol und Taurin beschrieben. So sind *myo*-Inositol und Taurin in Gliomen in höheren Konzentrationen als im umgebenden Gewebe vorhanden (Hattingen *et al.*, 2007; Cubillos *et al.*, 2006). Dieser Befund wird einer protektiven oder proliferationsfördernden Wirkung von Taurin und *myo*-Inositol zugeschrieben. In einer weiteren Arbeit wurden in der malignen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 hohe konstitutiv exprimierte BGT-1-mRNA-Spiegel mit dem malignen Phänotyp der Zellen in Verbindung gebracht (Warskulat *et al.*, 1995). Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten leukämischen Zelllinien KG-1a und K562 nehmen alle untersuchten Osmolyte in höheren Mengen als die primären Zellen auf (Abb.5). Möglicherweise ist auch dieser Befund der Malignität dieser Zellen zuzuschreiben.

Bis auf die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten nehmen alle untersuchten Zellen Taurin bereits unter normoosmotischen Bedingungen in 2 bis 22-fachen Mengen verglichen mit *myo*-Inositol und Betain auf (Abb.5C). Es ist möglich, dass Taurin in diesen Zellen nicht nur als Osmolyt, sondern wie bei den Neutrophilen, auch als Antioxidanz wirkt. In Neutrophilen erfüllt Taurin diese Aufgabe, indem es mit der Hypochloridsäure, die mikrobiozid, aber auch gewebsschädigend wirkt, das weniger toxische Taurinchloramin bildet (Klamt, Shacter, 2005).

Neben ihrer Funktion als Osmolyte werden Betain, *myo*-Inositol und Taurin zytoprotektive Wirkungen, wie die Modulation der zellulären Stressantwort, der Proteinstabilität und – wie gerade beschrieben - ihre Wirkung als Antioxidanz, zugeschrieben (Schliess *et al.*, 1999; Wettstein, Häussinger, 1997; Liu, Bolen, 1995).

Die Optimierung der Protokolle für die Kryokonservierung ist ein wichtiger Aspekt in der medizinischen Forschung (Limaye, Kale, 2001). Die Hauptfaktoren für eine Schädigung der Zellen sind die Durchlässigkeit der Membran und die Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Bei Knochenmarkszellen, Nabelschnurblut und fötalen

Leberzellen haben Limaye und Kale (2001) gezeigt, dass die Zugabe von Taurin zum Einfriermedium nach dem Auftauen die Vitalität der Zellen verbessert. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter den verwendeten Versuchsbedingungen bei hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut kein Schutz durch Taurin vor der Kryokonservierung (Abb.6). Taurin hat zwar auf die lymphatische Zelllinie K422 (Tab.10) und die primären hämatopoetischen CD34 positiven Zellen (Abb.6A) eine proliferationssteigernde Wirkung (Tab.10), diese scheint jedoch durch andere Faktoren bei der Kryokonservierung relativiert zu werden. Eine toxische Wirkung von Taurin konnte bisher nicht gezeigt werden. Inwiefern bei der Kryokonservierung andere Faktoren wirken und ob die erhöhte Anzahl an toten Zellen durch Nekrose oder Apoptose hervorgerufen wurde, bleibt unklar.

#### **4.2. Auswirkungen einer Taurindefizienz auf das hämatopoetische System im Modell der TAUT-Knockoutmaus**

Bei der Katze führt Taurindefizienz unter anderem zu Leukopenie, reduzierter Phagozytose und histologischen Veränderungen im Lymphknoten und der Milz (Schuller-Levis *et al.*, 1990). Ein Zusammenhang zwischen Taurin und dem Immunsystem wurde auch von Lubec *et al.* (1996) beschrieben: Taurin stimuliert das Immunsystem auf der Ebene der Lymphozyten, wahrscheinlich durch eine inhibierende Wirkung auf die Bildung von Peroxidationsprodukten.

Über die Auswirkungen einer Taurindefizienz auf das hämatologische System bei Mäusen war bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Taurindefizienz auf das hämatopoetische System anhand der Taurintransporter (TAUT)-Knockoutmaus näher untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen des Osmolytimportsystems TAUT in einem reduzierten Hämoglobin und Hämatokritwert im Blut (Tab.11), sowie einer tendenziell erhöhten Anzahl an myeloischen Zellen in Blut und Milz (Tab.12) resultiert. Des Weiteren wurde mittels Kolonieassays eine signifikant geringere Produktion an erythroiden Kolonien (CFU-Es) und einer tendenziell erhöhten Anzahl an granulozytären/myeloischen Kolonien (CFU-GMs) aus Knochenmarkszellen (Tab.13) festgestellt.

Das Fehlen des Taurintransporters TAUT scheint somit negative Auswirkungen auf die Anzahl der erythroiden Zellen zu haben. Dies bestätigten die Daten aus der Arbeit von Lang *et al.* (2003), in der ebenfalls eine signifikant erniedrigte Zahl von Erythrozyten und der Hämoglobinkonzentration in TAUT-Knockoutmäusen, im Vergleich zum Wildtyp, beschrieben wurden. Es wurde auch gezeigt, dass der Plasmataurinspiegel, sowie der intraerythroide Tauringehalt signifikant niedriger sind (Lang *et al.*, 2003, Heller-Stilb *et al.*, 2002). Die erniedrigte Erythrozytenzahl scheint allerdings nicht mit einer erhöhten Apoptoserate zusammen zu hängen, da die Apoptose in den Erythrozyten der TAUT-Knockoutmäuse gehemmt ist (Lang *et al.*, 2003). Es ist also anzunehmen, dass das Fehlen des Taurintransporters andere Variablen, wie die Entwicklung oder Eigenschaften der Erythrozyten, beeinflusst. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass aus Knochenmarkszellen der TAUT-Knockoutmäuse die erythroiden Kolonien (CFU-Es) signifikant weniger produziert werden (Tab.13), scheint es sich um einen Defekt während der Entwicklung zu handeln.

Interessanterweise wurde in einer Studie mit Patienten, die an einer Eisenmangelanämie litten, die Produktion von Erythrozyten und des Hämoglobinwertes zusätzlich gesteigert, wenn zu der Eisentherapie noch Taurin verabreicht wurde (Sirdah *et al.*, 2002). Die Zugabe von Taurin scheint umgekehrt also einen positiven Einfluss auf die Entwicklung von Erythrozyten zu haben.

Die in TAUT-Knockoutmäusen gefundene erhöhte Anzahl an myeloischen Zellen im Blut und in der Milz (Tab.12), sowie die gesteigerte Bildung von granulozytären/myeloischen Kolonien (CFU-GMs) aus Knochenmarkszellen (Tab.13) ist überraschend, da insbesondere die Neutrophilen, die den Hauptbestandteil der Granulozyten ausmachen, besonders viel Taurin enthalten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Aktivierung von Progenitorzellen. Erste Hinweise auf eine Aktivierung von Progenitorzellen zeigen sich in der Leber der TAUT-Knockoutmäuse. Hier kommt es zu einer erhöhten Proliferation von Leberprogenitorzellen, den so genannten Ovalzellen (Warskulat *et al.*, 2006).

Die erhöhte Produktion von myeloischen Zellen könnte auch mit einem anderen Prozess zusammenhängen. Myeloperoxidasehaltige Zellen produzieren Taurinchloramin (Grisham *et al.*, 1984). Taurinchloramin sowie Taurin inhibieren die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*), einem Transkriptionsfaktor, der für

die Transkription von vielen Zytokinen verantwortlich ist, die für die akute inflammatorische Antwort zuständig sind (Kanayama *et al.*, 2002; Gurujeyalakshim *et al.*, 2000a). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zu einem gesteigerten Einwandern von Neutrophilen und umgekehrt die Inhibierung zu einer erniedrigten Einwanderung von Neutrophilen (Blackwell *et al.*, 1997). Niedrigere Taurinkonzentrationen könnten die Aktivierung von NF- $\kappa$ B begünstigen und somit zu einer erhöhten Neutrophilenzahl führen.

Bei jungen TAUT-Knockoutmäusen zeigt sich die gleiche Tendenz wie bei alten TAUT-Knockoutmäusen: eine vermehrte Produktion von granulozytären/myeloischen Kolonien (CFU-GMs) (Abb.7) gegenüber dem Wildtyp. Eine Reduktion von erythroiden Kolonien (CFU-Es) bei jungen TAUT-Knockoutmäusen, verglichen mit dem Wildtyp, wurde hingegen nicht festgestellt (Abb.7).

Erst nach Gabe des Wachstumsfaktors G-CSF wurde bei den jungen TAUT-Knockoutmäusen gegenüber dem Wildtyp ein reduzierter Hämoglobin- und Hämatokritwert festgestellt (Tab.14). Das heißt, erst im Alter beziehungsweise nach Stress treten die Defizite in der erythroiden Entwicklung auf. Möglicherweise hängt dies mit gesteigertem oxidativem Stress zusammen, der durch die verstärkte Produktion von Neutrophilen gefördert wird.

Die Effekte von G-CSF auf die Mobilisation von den Blut- Milz- und Knochenmarkszellen in den Wildtypen korrelieren mit Daten aus früheren Arbeiten (Bungart *et al.*, 1990; Christ *et al.*, 2001).

Christ *et al.* (2001) beschreibt, dass bei der Maus das „homing“ Organ die Milz ist. Nach der G-CSF Mobilisation sind die Vorläuferzellen in der Milz stark angereichert, aber bleiben im Knochenmark fast unverändert. Bungart *et al.* (1990) schildert zudem, dass nach der Mobilisation die Zahl der erythroiden Kolonien (CFU-Es) im Knochenmark sinkt und in der Milz steigt. Diese Beobachtungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit gemacht (Abb.7).

Interessanterweise wurde zwischen den TAUT-Knockoutmäusen und den Wildtypen eine unterschiedliche „Mobilisationsantwort“ festgestellt. TAUT-Knockoutmäuse mobilisieren verglichen mit dem Wildtyp tendenziell mehr Monozyten statt Granulozyten (Tab.14). Den Hauptbestandteil der Granulozyten machen die Neutrophilen aus. Neutrophile reichern sich in hohen Konzentrationen Taurin im Zytoplasma an, das als Antioxidanz wirkt (Grisham

*et al.*, 1984). Es ist durchaus denkbar, dass auf Grund eines Taurinmangels, eine Steigerung der Produktion von Granulozyten nur begrenzt möglich ist und somit ersatzweise vermehrt Monozyten produziert werden. Dass statt Granulozyten vermehrt Monozyten mobilisiert werden, ist bisher nicht beschrieben worden und könnte klinisch von Bedeutung sein.

Um die Auswirkung einer Taurindefizienz auf frühe hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen mit Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich, wie bei den humanen CD34 positiven Zellen, um eine heterogene Zellpopulation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.

Beim Vergleich mit dem Wildtyp fanden sich in den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>) der Knockoutmäuse insgesamt 31 differentiell regulierte Gentranskripte, von denen 7 hochreguliert und 24 herunterreguliert waren (Abb. 8, Tab. 16 und 17). Die Anzahl der deregulierten Gene ist mit 31, verglichen mit anderen Arbeiten, relativ niedrig (Swiderski *et al.*, 2007; Kedmi *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Des Weiteren wurden keine Gentranskripte gefunden, deren Proteine bekannterweise bei der Osmoregulation eine Rolle spielen. Dieser Befund deutet daraufhin, dass mögliche Kompensationsmechanismen posttranslational vorhanden sind. Das würde auch die recht geringe Anzahl an deregulierten Gentranskripten erklären.

Interessanterweise wurden keine differentiell regulierten myeloischen Gentranskripte nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass sich die Unterschiede in der Anzahl der myeloischen Zellen zwischen TAUT-Knockoutmäusen und den Wildtypen erst später herauskristallisieren.

Auffällig ist die überwiegende Anzahl an Gentranskripten, deren Proteine eine Rolle bei der Immunantwort spielen. Hierbei handelt es sich vorwiegend um T-Zell spezifische Transkripte, und somit ist die T-Zell vermittelte Immunität des adaptiven Systems betroffen.

Die unterschiedliche Expressionsrate hat auf die Anzahl der T-Zellen keine Auswirkung, wie die FACS-Analysen gezeigt haben (Tab.12, Tab.15). Stattdessen lässt sich ein funktionelles Defizit feststellen: die T-Zellen der TAUT-Knockoutmäuse proliferieren nach Stimulation mit PMA und Ionomycin beziehungsweise nach Stimulation mit Interleukin-18 und Interleukin-12 um die Hälfte weniger (Abb.11).

Nishio *et al.* (1990) haben gezeigt, dass die Zugabe von Taurin die Proliferation in murinen T-Zellen steigert. Die Untersuchungen beruhen auf der Beobachtung, dass alte T-Zellen schlechter proliferieren als junge (Negoro, Hara, 1992; Nishio *et al.*, 1990). Die verringerte Proliferationsrate assoziiert in beiden Arbeiten mit einer geringeren intrazellulären freien Kalziumkonzentration, die durch die Zugabe von Taurin gesteigert wird. Ob auch bei den T-Zellen der TAUT-Knockoutmäuse eine geringere Kalziumkonzentration vorliegt, ist unbekannt.

Taurin wird in Neuronen, Hepatozyten und Muskelzellen mit einer gesteigerten Proliferation und/oder Überlebensrate in Zusammenhang gebracht (Warskulat *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 1998). Die Mechanismen, durch die Taurin seine trophische Wirkung erzielt, werden mit einem gesteigerten Kalziumdurchfluss, Modifikationen in der Proteinphosphorylierung und Taurin-Zink-Interaktionen in Verbindung gebracht (Lima *et al.*, 2001). Zu letzterem passt die in HSPC von TAUT-Knockoutmäusen gefundene Hochregulation des Gentranskripts *Zdhhc14*, das für ein bisher nicht näher definiertes Protein mit einer Zink-Ionen-Bindung kodiert.

Möglich ist auch, dass die T-Zellen der TAUT-Knockoutmäuse eine erhöhte Apoptoserate haben. Eine Überexpression von TAUT verringerte eine Cisplatin induzierte Apoptoserate bei renalen Zellen (Han, Chesney, 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Taurin Apoptose vorbeugen kann durch die Inhibierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Stickstoffmonoxid (NO) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) sowie durch die Regulation des Kalziumdurchflusses (Han, Chesney, 2006; Huang *et al.*, 2003; Gurujeyalakshmi *et al.*, 2000b; Seabra *et al.*, 1998).

Ebenfalls von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Hochregulation der Sulphydryloxidase Gfer, sowohl in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen als auch in T-Zellen. Es wurde gezeigt, dass Gfer die mitochondriale Genexpression kontrolliert (Lisowsky *et al.*, 2001). Dies ist in zweierlei Hinsicht interessant: erstens haben TAUT-Knockoutmäuse in der Leber stark geschädigte Mitochondrien (Warskulat *et al.*, 2006), zum anderen sind Mitochondrien wesentlich an der Kalziumhomöostase beteiligt (Hajnoczky *et al.*, 2000).

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit nach der Aktivierung der T-Zellen mit PMA und Ionomycin bzw. IL-12 und IL-18 die mRNA-Spiegel von

Aktivierungsmarkern untersucht. Es wurden zwar Unterschiede in der Expression der Aktivierungsmarker zwischen den T-Zellen aus dem Wildtyp und der TAUT-Knockoutmaus gefunden (Tab.19), allerdings scheinen diese in keinem offensichtlichen Zusammenhang mit der erhöhten Proliferationsrate zu stehen.

### 4.3. Ausblick und klinische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit wurden *myo*-Inositol und Taurin als Osmolyte in humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen identifiziert. Insbesondere Taurin kommt, wegen seiner bereits unter normoosmotischen Bedingungen hohen Aufnahmerate im Vergleich zu *myo*-Inositol eine besondere Bedeutung zu.

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen werden therapeutisch in Stammzelltransplantationen häufig verwendet und das Wissen um das Osmolytprofil dieser Zellen könnte somit klinische Relevanz haben.

Aufgrund der immunmodulatorischen und zytoprotektiven Wirkungen der kompatiblen organischen Osmolyte können Störungen im Osmolyttransport oder der Osmolytverfügbarkeit eine Krankheitsursache darstellen. Welche Auswirkungen beispielsweise das Fehlen des Osmolyttransporters TAUT und die damit verbundene Taurindefizienz hat, wurde bereits in TAUT-Knockoutmäusen in Leber, Muskel, Haut und Gehirn beschrieben (Rockel *et al.*, 2007; Warskulat *et al.*, 2006; Heller-Stilb *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde nun zum ersten Mal gezeigt, dass eine Taurintransportstörung auch Auswirkungen auf das hämatopoetische System hat.

Deregulierte Taurinspiegel wurden auch bei Patienten mit Krankheitsbildern, die das hämatopoetische System betreffen, beschrieben (vom Dahl *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2003).

Verminderte Taurinspiegel findet man beispielsweise im Plasma von Patienten mit Morbus Gaucher, einer Lipidspeicherkrankheit, die hauptsächlich das Monozyten-Makrophagen-System betrifft und durch einen Enzymdefekt der Glukozerebrosid- $\beta$ -Glukosidase verursacht wird (vom Dahl *et al.*, 2000). Nach Verabreichung des intakten Enzyms liegen die Taurinplasmawerte bei diesen Patienten wieder im Normalbereich. Welche Ursachen und Auswirkungen die geringe Taurinkonzentration auf die Makrophagenfunktion hat, ist noch nicht

bekannt. Allerdings finden sich immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass Osmolyte die Immunfunktionen von Makrophagen modulieren. Betain zum Beispiel unterdrückt die Prostaglandin und Cyclooxygenase-2 Induktion (Zhang *et al.*, 1996) der Lebermakrophagen (Kupfferzellen) in der Ratte. Des Weiteren wird Taurin von Lebermakrophagen während der Phagozytose aus der Zelle entlassen (Warskulat *et al.*, 1997).

Bei Hämodialysepatienten wurden erhöhte Taurinspiegel diagnostiziert (Friedrich *et al.*, 2005). Während der Hämodialyse verringern sich dann die Plasmataurinspiegel, wohingegen sich die TAUT-mRNA-Spiegel erhöhen.

Erhöhte Taurinspiegel wurden ebenfalls in Lymphozyten von Patienten mit einer typischen Depression (*Major Depression*) gefunden (Lima *et al.*, 2003). Diese Krankheit weist Dysfunktionen der Immunantwort auf. Nach Therapie mit Antidepressiva normalisierten sich die Taurinspiegel. Auch hier bleibt unklar, welche Ursachen und Auswirkungen die erhöhte Taurinkonzentration auf das Immunsystem hat.

Um die Zusammenhänge von veränderten Taurinspiegeln und den Krankheiten zu verstehen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Interessant wäre weiterhin zu untersuchen, ob Betain und *myo*-Inositol, die in der vorliegenden Arbeit auch als Osmolyte in humanen hämatopoetischen Zellen identifiziert wurden, sich ebenfalls auf das hämatopoetische System auswirken.

Klinisch könnte somit zumindest Taurin auf immunmodulatorischer Ebene eingesetzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Betain, *myo*-Inositol und Taurin sind kompatible organische Osmolyte, die von einer Vielzahl von Zellen in hyperosmotischer Umgebung akkumuliert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Osmolytstrategien von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) sowie ihrer Entwicklung und Bedeutung während der Differenzierung zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass immunomagnetisch isolierte humane primäre CD34 positive HSPC, CD34 positive CML-Zellen, CD19 positive B-Zellen, CD14 positive Monozyten und CD3 positive T-Zellen sowie die humanen hämatopoetischen Zelllinien KG-1a (CD34 positive Zelllinie), K422 (lymphatische Zelllinie) und K562 (myeloische Zelllinie) sich bei der Volumenregulation einer Osmolytstrategie bedienen. Als Beweis hierfür ist die hyperosmotisch induzierte intrazelluläre Akkumulation von organischen Osmolyten wie Betain, *myo*-Inositol oder Taurin anzuführen. Die Daten zeigen, dass bereits HSPC über Osmolytstrategien verfügen, im Laufe der Differenzierung aber jede Zellpopulation ihr eigenes Osmolytprofil entwickelt. Taurin kommt hierbei eine besondere Rolle zu, da es in fast allen untersuchten humanen hämatopoetischen primären Zellen und Zelllinien unter hyperosmotischen Bedingungen mit Abstand zu Betain und *myo*-Inositol in den höchsten Mengen aufgenommen wurde.

Des Weiteren wurde im Modell der Taurintransporter (TAUT) - Knockoutmaus die Relevanz des kompatiblen organischen Osmolyts Taurin für die Entwicklung des hämatopoetischen Systems untersucht. Hierbei wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Anzahl an myeloischen Zellen im Blut und in der Milz festgestellt, sowie in Kolonieassays eine erhöhte Proliferation von myeloischen Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Im Gegenzug dazu fand sich eine verringerte Produktion von erythroiden Progenitorzellen. Diese Unterschiede treten verstärkt im Alter und nach Stress (G-CSF Mobilisation) auf.

Darüberhinaus wurden Affymetrix-Genexpressions-Analysen mit HSPC ( $\text{Lin}^- \text{Sca}^+$ ) aus TAUT-Knockoutmäusen und dem Wildtyp durchgeführt. Verglichen mit dem Wildtyp wurden in TAUT-Knockoutmäusen verminderte mRNA-Spiegel von verschiedenen T-Zell spezifischen Gentranskripten festgestellt. Diese

Herunterregulation geht mit einer verringerten Proliferationsrate von T-Zellen der TAUT-Knockoutmaus einher.

Das Fehlen des Osmolyttransporters TAUT, und somit die Unfähigkeit Taurin in hohen Konzentrationen in der Zelle zu akkumulieren, führt, gegenüber dem Wildtyp, bereits bei HSPC zu Veränderungen im Genexpressionsprofil und der myeloischen Differenzierung. Diese Ausprägungen manifestieren sich mit der Reifung der Zellen sowie mit zunehmendem Alter.

## 5.1. Summary

Betaine, myoinositol and taurine are compatible organic osmolytes which are accumulated by many cells exposed to hyperosmotic medium. Aim of this study was to examine osmolyte strategies in hematopoietic stem and progenitor cells, its development and its importance during differentiation.

In the present work was showed that immunomagnetically isolated human primary CD34-positive hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC), CD34-positive CML-cells, CD19-positive B-cells, CD14-positive monocytes and CD3-positive T-cells as well as the CD34-positive cell line KG-1a, the lymphatic cell line K422 and the myeloide cell line K562 use for cell volume regulation likewise an osmolyte strategy. As evidence is to cite the hyperosmotic induced intracellular accumulation of organic osmolytes like betaine, myoinositol or taurine. These data show that already HSPC possess osmolyte strategies. Furthermore, during differentiation every cell population develops its own osmolyte profile. Taurine plays a major role since its uptake by far exceeds those of betaine and myoinositol in almost all examined human hematopoietic primary cells and cell lines.

Moreover, the relevance of the compatible organic osmolyte taurine for development of the hematopoietic system in the taurintransporter (TAUT) knockout mouse was investigated. Compared to wild-types TAUT knockout mice displayed an increased amount of myeloid cells in blood and spleen. Furthermore colony forming assays revealed an increased proliferation of myeloid cells from bone marrow. In return, a decreased production of erythroide progenitor cells was found. Differences increase in old mice as well as after stress (mobilisation with G-CSF).

Furthermore, affymetrix gene expression analysis with HSPC ( $\text{Lin}^- \text{Sca}^+$ ) of TAUT knockout mice and wild-type were made. Compared to wild-type mRNA-levels of different T-cell specific transcripts in HSPC of TAUT knockout mice were lower. This reduction was accompanied by a decreased proliferation rate of T-cells of the TAUT knockout mice.

Lacking of osmolyte transporter TAUT, and thus lacking of the ability to accumulate high concentrations of taurine in the cell, leads compared to wild-type already in HSPC to differences in gene expression and myeloid development. During maturation of cells and with increasing age they manifestate.

## 6. Literatur

**Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA.** Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.

**Arai S, Klingemann HG.** Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch. Med. Res.* 2003;34:545-553.

**Blackwell TS, Christman JW.** The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997;17:3-9.

**Blanchet MR, Maltby S, Haddon DJ, Merkens H, Zbytniuk L, McNagny KM.** CD34 facilitates the development of allergic asthma. *Blood* 2007;110:2005-2012.

**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.

**Bungart B, Loeffler M, Goris H, Dontje B, Diehl V, Nijhof W.** Differential effects of recombinant human colony stimulating factor (rh G-CSF) on stem cells in marrow, spleen and peripheral blood in mice. *Br. J. Haematol.* 1990;76:174-179.

**Burg MB.** Molecular basis of osmotic regulation. *Am. J. Physiol.* 1995;268:F983-F996.

**Chamberlin ME, Strange K.** Anisotropic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol.* 1989;257:C159-C173.

**Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI.** Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2004;354-371.

**Chau JF, Lee MK, Law JW, Chung SK, Chung SS.** Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. *FASEB J.* 2005;19:1887-1889.

**Cheung H, Chen NJ, Cao Z, Ono N, Ohashi PS, Yeh WC.** Accessory protein-like is essential for IL-18-mediated signalling. *J. Immunol.* 2005;174:5351-5357.

**Christ O, Kronenwett R, Haas R, Zoller M.** Combining G-CSF with a blockade of adhesion strongly improves the reconstitutive capacity of mobilized hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 2001;29:380-390.

**Civin CI, Gore SD.** Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J. Hematother.* 1993;2:137-144.

**Coulter WH.** High speed automatic blood cell counter and cell size analyser. *Proc. Natl. Electr. Conf.* 1956;12:1034-1042.

**Cubillos S, Obregon F, Vargas MF, Salazar LA, Lima L.** Taurine concentration in human gliomas and meningiomas: tumoral, peritumoral, and extratumoral tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006;583:419-422.

**da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM, Zeisel SH.** Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:440-444.

**Denkert C, Warskulat U, Hensel F, Häussinger D.** Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38MAPK in hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;354:172-180.

**Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, Fischer JC, Graef T, Roskopf M, Brors B, Pechtel S, Bork S, Koch A, Baer A, Rohr UP, Kobbe G, von Haeseler A, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R.** Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia* 2007;21:494-504.

**Dixon DA, Balch GC, Kedersha N, Anderson P, Zimmerman GA, Beauchamp RD, Prescott SM.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J. Exp. Med.* 2003;198:475-481.

**Domen J, Wagers A, Weissman IL.** Hematopoietic Stem Cells. In: Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. *Regenerative Medicine.* Department of Health and Human Services 2006; <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report>.

**Drew E, Merkens H, Chelliah S, Doyonnas R, McNagny KM.** CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. *Exp. Hematol.* 2002;30:1211.

**Dyer MJ, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A.** A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood* 1990;75:709-714.

**Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D.** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:14863-14868.

**Elfenbein GJ.** Granulocyte-colony stimulating factor primed bone marrow and granulocyte-colony stimulating factor mobilized peripheral blood stem cells are equivalent for engraftment: which to choose? *Pediatr. Transplant.* 2005;9:37-47.

**Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y.** CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia* 2002;16:1603-1608.

**Faccini JM, Abbott DP, Paulus GJJ.** Mouse Histopathology. A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies. Elsevier, Amsterdam, 1990.

**Fazzino F, Urbina M, Mata S, Lima L.** Taurine transport and transporter localization in peripheral blood lymphocytes of controls and major depression patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006;583:423-426.

**Friedrich B, Alexander D, Aicher WK, Duszenko M, Schaub TP, Passlick-Deetjen J, Waldegger S, Wolf S, Risler T, Lang F.** Influence of standard haemodialysis treatment on transcription of human serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and taurine transporter TAUT in blood leukocytes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005;20:768-774.

**Fuchs E, Tumber T, Guasch G.** Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769-778.

**Fukuda M.** The C2A domain of synaptotagmin-like protein 3 (Slp3) is an atypical calcium-dependent phospholipid-binding machine: comparison with the C2A domain of synaptotagmin I. *Biochem. J.* 2002;366:681-687.

**Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, Luthra PM.** Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev.* 2006;15:305-313.

**Gao DY, Chang Q, Liu C, Farris K, Harvey L, McGann LE, English D, Jansen J, Critser JK.** Fundamental cryobiology of human hematopoietic progenitor cells. I: Osmotic characteristics and volume distribution. *Cryobiology* 1998;36:40-48.

**Giebel B, Zhang T, Beckmann J, Spanholtz J, Wernet P, Ho AD, Punzel M.** Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* 2006;107:2146-2152.

**Goolsby J, Marty MC, Heletz D, Chiappelli J, Tashko G, Yarnell D, Fishman PS, Dhib-Jalbut S, Bever CT Jr, Pessac B, Trisler D.** Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:14926-14931.

**Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL.** Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J. Biol. Chem.* 1984;259:10404-10413.

**Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN.** Suppression of bleomycin-induced nitric oxide production in mice by taurine and niacin. *Nitric Oxide* 2000a;4:399-411.

**Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN.** Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor-kappaB in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000b;293:82-90.

**Haas R, Kronenwett R.** Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle. Grundlagen, Indikationen, therapeutischer Nutzen. Deutscher Ärzte-Verlag Auflage 1, 2005.

**Hajnoczky G, Csordas G, Krishnamurthy R, Szalai G.** Mitochondrial calcium signaling driven by the IP3 receptor. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000;32:15-25.

**Han X, Chesney RW.** Is TauT an anti-apoptotic gene? *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006;583:59-67.

**Hattingen E, Raab P, Franz K, Zanella FE, Lanfermann H, Pilatus U.** Myo-Inositol: a marker of reactive astrogliosis in glial tumors? *NMR Biomed.* 2007; in Druck.

**Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Henning J.** Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994;107:1475-1480.

**Häussinger D.** The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J.* 1996;313:697-710.

**Häussinger D.** Osmoregulation of liver cell function: signalling, osmolytes and cell heterogeneity. *Contrib. Nephrol.* 1998;123:185-204.

**Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D.** Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J.* 2002;16:231-233.

**Higgins BD, Kane MT.** Inositol transport in mouse oocytes and preimplantation embryos: effects of mouse strain, embryo stage, sodium and the hexose transport inhibitor, phloridzin. *Reproduction* 2003;125:111-118.

**Ho AD.** Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 2005;33:1-8.

**Huang XM, Zhu WH, Kang ML.** Study on the effect of doxorubicin on expressions of genes encoding myocardial sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport proteins and the effect of taurine on myocardial protection in rabbits. *J. Zhejiang. Univ. Sci.* 2003;4:114-120.

**Huxtable RJ.** Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 1992;72:101-163.

**Iruloh CG, D'Souza SW, Speake PF, Crocker I, Fergusson W, Baker PN, Sibley CP, Glazier JD.** Taurine transporter in fetal T lymphocytes and platelets: differential expression and functional activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292:C332-C341.

**Jackson KA, Majka SM, Wulf GG, Goodell MA.** Stem cells: a minireview. *J. Cell Biochem.* 2002;38:1-6.

**Kanayama A, Inoue J, Sugita-Konishi Y, Shimizu M, Miyamoto Y.** Oxidation of I $\kappa$ B $\alpha$  at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 2002;277:24049-24056.

**Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS.** Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 2006;124:407-421.

**Kedmi M, Orr-Urtreger A.** Differential brain transcriptome of  $\beta$ 4 nAChR subunit-deficient mice: is it the effect of the null mutation or the background strain? *Physiol. Genomics* 2007;28:213-222.

**Kempson SA.** Differential activation of system A and betaine/GABA transport in MDCK cell membranes by hypertonic stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1372:117-123.

**Klamt F, Shacter E.** Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *J. Biol. Chem.* 2005;280:21346-21352.

**Kondo M, Weissman IL, Akashi K.** Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-672.

**Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D.** CD133<sup>+</sup> hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;352:410-417.

**Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ.** Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377.

**Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK.** Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409:198-201.

**Kültz D.** Cellular osmoregulation: beyond ion transport and cell volume. *Zoology (Jena)* 2001;104:198-208.

**Kwon HM, Handler JS.** Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7:465-471.

**Lambert IH.** Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem. Res.* 2004;29:27-63.

**Lang PA, Warskulat U, Heller-Stilb B, Huang DY, Grenz A, Myssina S, Duszenko M, Lang F, Häussinger D, Vallon V, Wieder T.** Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 2003;13:337-346.

**Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R.** An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* 2001;2:715-720.

**Larsson J, Scadden D.** Nervous activity in a stem cell niche. *Cell* 2006;124:253-255.

**Lee JH, Arcinue E, Ross BD.** Brief report: organic osmolytes in the brain of an infant with hyponatremia. *N. Engl. J. Med.* 1994;331:439-442.

**Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R.** Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005;23:16-43.

**Lima L, Obregon F, Cubillos S, Fazzino F, Jaimes I.** Taurine as a micronutrient in development and regeneration of the central nervous system. *Nutr. Neurosci.* 2001;4:439-443.

- Lima L, Obregon F, Urbina M, Carreira I, Baccichet E, Pena S.** Taurine concentration in human blood peripheral lymphocytes: major depression and treatment with the antidepressant mirtazapine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003;526:297-304.
- Limaye LS, Kale VP.** Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2001;10:709-718.
- Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, Hofhaus G.** Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig. Liver Dis.* 2001;33:173-180.
- Liu Y, Bolen DW.** The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 1995;34:12884-12891.
- Lozzio CB, Lozzio BB.** Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45:321-334.
- Lubec B, Hoeger H, Kremser K, Amann G, Koller DY, Gialamas J.** Decreased tumor incidence and increased survival by one year oral low dose arginine supplementation in the mouse. *Life Sci.* 1996;58:2317-2325.
- Ma B, Zhu Z, Homer RJ, Gerard C, Strieter R, Elias JA.** The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J. Immunol.* 2004;172:1872-1881.
- Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ.** Stem cell biology - a never ending quest for understanding. *Acta Biochim. Pol.* 2005;52:353-358.
- Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL.** Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:11872-11877.
- Maouyo D, Kim JY, Lee SD, Wu Y, Woo SK, Kwon HM.** Mouse TonEBP-NFAT5: expression in early development and alternative splicing. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002;282:F802-F809.
- McIntosh LM, Garrett KL, Megeney L, Rudnicki MA, Anderson JE.** Regeneration and myogenic cell proliferation correlate with taurine levels in dystrophin- and MyoD-deficient muscles. *Anat. Rec.* 1998;252:311-324.
- Menendez P, Del Canizo MC, Orfao A.** Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2001;15:53-61.
- Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM.** Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am. J. Physiol.* 1998;274:F753-F761.

**Negoro S, Hara H.** The effect of taurine on the age-related decline of the immune response in mice: the restorative effect on the T cell proliferative response to costimulation with ionomycin and phorbol myristate acetate. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992;315:229-239.

**Nishio S, Negoro S, Hosokawa T, Hara H, Tanaka T, Deguchi Y, Ling J, Awata N, Azuma J, Aoike A, Kawai K, Kishimoto S.** The effect of taurine on age-related immune decline in mice: the effect of taurine on T cell and B cell proliferative response under costimulation with ionomycin and phorbol myristate acetate. *Mech. Ageing Dev.* 1990;52:125-139.

**Ogawa T, Ito C, Nakamura T, Tamura Y, Yamamoto T, Noda T, Kubota Y, Toshimori K.** Abnormal sperm morphology caused by defects in Sertoli cells of Cnot7 knockout mice. *Arch. Histol. Cytol.* 2004;67:307-314.

**Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.

**Papayannopoulou T.** Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2004;103:1580-1585.

**Peters-Regehr T, Bode JG, Kubitz R, Häussinger D.** Organic osmolyte transport in quiescent and activated rat hepatic stellate cells (Ito cells). *Hepatology* 1999;29:173-180.

**Petronini PG, De Angelis E, Borghetti AF, Wheeler KP.** Osmotically inducible uptake of betaine via amino acid transport system A in SV-3T3 cells. *Biochem. J.* 1994;300:45-50.

**Rådinger M, Johansson AK, Sitkauskienė B, Sjöstrand M, Lotvall J.** Eotaxin-2 regulates newly produced and CD34 airway eosinophils after allergen exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;113:1109-1116.

**Raijmakers R, Vogelzangs J, Raats J, Panzenbeck M, Corby M, Jiang H, Thibodeau M, Haynes N, van Venrooij WJ, Pruijn GJ, Werneburg B.** Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in peptidylarginine deiminase 2 knockout mice. *J. Comp Neurol.* 2006;498:217-226.

**Rockel N, Esser S, Grether-Beck S, Warskulat U, Flögel U, Schwarz A, Schwarz T, Yarosh D, Häussinger D, Krutmann J.** The osmolyte taurine protects against ultraviolet B radiation-induced immunosuppression. *J. Immunol.* 2007;179:3604-3612.

**Ross J, Li L.** Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr. Opin. Hematol.* 2006;13:237-242.

**Sarkadi B, Parker JC.** Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta* 1991;1071:407-427.

**Schliess F, Wiese S, Häussinger D.** Osmotic regulation of the heat shock response in H4IIE rat hepatoma cells. *FASEB J.* 1999;13:1557-1564.

**Schuller-Levis G, Mehta PD, Rudelli R, Sturman J.** Immunologic consequences of taurine deficiency in cats. *J. Leukoc. Biol.* 1990;47:321-331.

**Seabra V, Stachlewitz RF, Thurman RG.** Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF-alpha production by Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* 1998;64:615-621.

**Sirdah MM, El-Agouza IM, Abu Shahla AN.** Possible ameliorative effect of taurine in the treatment of iron-deficiency anaemia in female university students of Gaza, Palestine. *Eur. J. Haematol.* 2002;69:236-242.

**Steenge GR, Verhoef P, Katan MB.** Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J. Nutr.* 2003;133:1291-1295.

**Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R.** Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitam. Horm.* 2003;66:1-28.

**Stratton-Phelps M, Backus RC, Rogers QR, Fascetti AJ.** Dietary rice bran decreases plasma and whole-blood taurine in cats. *J. Nutr.* 2002;132:1745-1747.

**Stroncek D, Anderlini, MD.** Mobilized PBPC concentrates: a maturing blood component. *Transfusion* 2001;41:168-171.

**Suda T, Arai F, Shimmura S.** Regulation of stem cells in the niche. *Cornea* 2005;24:12-17.

**Swiderski R, Nishimura DY, Mullins RF, Olvera MA, Ross JL, Huang J, Stone EM, Sheffield VC.** Gene expression analysis of photoreceptor cell loss in bbs4-knockout mice reveals an early stress gene response and photoreceptor cell damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48:3329-3340.

**Tury A, Mairet-Coello G, Lisowsky T, Griffond B, Fellmann D.** Expression of the sulfhydryl oxidase ALR (Augmenter of Liver Regeneration) in adult rat brain. *Brain Res.* 2005;1048:87-97.

**Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F, Handler JS.** Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89:8230-8234.

**Ueland PM, Holm PI, Hustad S.** Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005;43:1069-1075.

**vom Dahl S, Mönnighoff I, Häussinger D.** Decrease of plasma taurine in Gaucher disease and its sustained correction during enzyme replacement therapy. *Amino Acids* 2000;19:585-592.

**Warskulat U, Wettstein M, Häussinger D.** Betaine is an osmolyte in RAW 264.7 mouse macrophages. *FEBS Letters* 1995;377:47-50.

**Warskulat U, Zhang F, Häussinger D.** Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J. Hepatol.* 1997;26:1340-1347.

- Warskulat U, Flögel U, Jacoby C, Hartwig HG, Thewissen M, Merx MW, Molojavyi A, Heller-Stilb B, Schrader J, Häussinger D.** Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J.* 2004;18:577-579.
- Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, Heller-Stilb B, Mönnighoff I, Buchczyk D, Donner M, Flögel U, Kappert G, Soboll S, Beer S, Pfeffer K, Marschall HU, Gabrielsen M, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Dienes HP, Häussinger D.** Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *FASEB J.* 2006;20:574-576.
- Warskulat U, Brookmann S, Reinen A, Häussinger D.** Ultraviolet B radiation induces cell shrinkage and increases osmolyte transporter mRNA expression and osmolyte uptake in HaCaT keratinocytes. *Biol. Chem.* 2007;388:1345-1352.
- Weil R, Israël A.** T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF- $\kappa$ B in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 2004;16:374-381.
- Wettstein M, Häussinger D.** Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 1997;26:1560-1566.
- Wettstein M, Häussinger D.** Taurine attenuates cold ischemia-reoxygenation injury in rat liver. *Transplantation* 2000;69:2290-2296.
- Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE.** Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* 2003;34:461-475.
- Wright-Kanuth MS, Smith LA.** Hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Lab. Sci.* 2001;14:112-117.
- Wu Z, Markovic B, Chesterman CN, Chong BH.** Characterization of IgG Fc receptors on CD34 antigen-expressing cell lines (KG-1 and KG-1a). *Immunol. Cell Biol.* 1996;74:57-64.
- Xu P, Santos RAS, Bader M, Alenina N.** Alterations in gene expression in the testis of angiotensin-(1-7)-receptor Mas-deficient mice. *Regul. Pept.* 2007;138:51-55.
- Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Kwon HM, Handler JS.** Hypertonicity stimulates transcription of gene for Na(+)-myo-inositol cotransporter in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 1993;264:20-23.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN.** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982;217:1214-1222.
- Yuan X, Cong Y, Hao J, Shan Y, Zhao Z, Wang S, Chen J.** Regulation of LIP level and ROS formation through interaction of H-ferritin with G-CSF receptor. *J. Mol. Biol.* 2004;339:131-144.

**Zhang F, Warskulat U, Wettstein M, Häussinger D.** Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology* 1996;110:1543-1552.

**Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, Brisc I, Burg MB.** Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hyposmotic rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;285:688-693.

**Zimmermann S, Martens UM.** Telomere dynamics in hematopoietic stem cells. *Curr. Mol. Med.* 2005;5:179-185.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ALR	<i>augmenter of liver regeneration</i>
aRNA	amplifizierte RNA
BGT1	Betain/ $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA)-Transporter
BMT	Betain, <i>myo</i> -Inositol und Taurin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
$^{14}\text{C}$	Kohlenstoffisotop mit der Atommasse 14
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFU-E	<i>colony forming unit erythrocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit granulocyte/macrophage</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	fötale Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
g	Maßeinheit der Erdbeschleunigung ( $1\text{ g} \sim 9,81\text{ m/s}^2$ )
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
Gfer	<i>growth factor, augmenter of liver regeneration (ERV1 homolog, S. cerevisiae)</i>
h	Stunde
$^3\text{H}$	Tritium
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure

---

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
INF- $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MES	Morpholinethansulfonsäure
MW	Mittelwert
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SCF	Stammzellefaktor ( <i>stem cell factor</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMIT	<i>myo</i> -Inositoltransporter
TAUT	Taurintransporter
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. rer. nat. U. Warskulat und Herrn PD. Dr. med. R. Kronenwett für die engagierte Betreuung, die zahlreichen Diskussionen und die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Dissertation bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. D. Häussinger und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. Haas danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Univ.- Prof. Prof. *h. c.* Dr. F. Wunderlich danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt auch Herrn M. Rosskopf aus dem Institut für Bioinformatik für die Auswertung der statistischen Daten.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie danken, die durch hilfreiche Diskussionen und gute Laune zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Dipl. Biochem. L. Richter für ihre freundschaftliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Des Weiteren bedanke ich mich besonders bei Herrn Dipl. Biol. H. Fey für viele interessante Gespräche.

Ferner bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Mitarbeitern der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, besonders bei Herrn Dr. nat. Sascha Raschke, Frau Dr. med. E. Diaz-Blanco und Frau Dr. nat. Simone Bork.

Darüber hinaus danke ich meiner Mutter, meinen Freunden - insbesondere Frau Dr. med. M. Janot und Frau Dipl. Sozialarbeiterin U. Kramer - und besonders meinem Freund Herrn Dipl.-Ök. C. Tadros für die Unterstützung während der gesamten Zeit.

Danke!

## **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, den 11.10.2007

Stefanie Brookmann