

***Propagierung hämatopoetischer Stamm- und  
Vorläuferzellen mit Hilfe induzierbarer  
T-Zell-Faktoren und Identifizierung  
unbekannter mRNA-Spezies mittels der  
Differential Display Technik***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Ilona Vogt-Humberg  
geboren am 16. Dezember 1971 in Hattingen

2002

Referent: Prof. Dr. T. Scheper  
Korreferent: Prof. Dr. em. K. Schügerl  
Tag der Promotion: 07. Februar 2002

**Was wir wissen, ist ein Tropfen.**

**Was wir nicht wissen – ein Ozean.**

**(Sir Isaac Newton)**

*Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium der  
Dr.-Wilhelm-Kempe-Stiftung  
des  
DRK-Blutspendedienstes NSOB  
gefördert*

## Abstract

Ilona Vogt-Humberg

Propagierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mit Hilfe induzierbarer T-Zell-Faktoren und Identifizierung unbekannter mRNA-Spezies mittels der Differential Display Technik

Aktivierte T-Zellen können durch Sekretion verschiedener Zytokine nicht nur die Ausbildung von Immunreaktionen beeinflussen, sondern auch regulatorisch auf die induzierte Hämatopoese einwirken. Da eine verbesserte *in vitro* Expandierung eine wichtige Voraussetzung für die breitere therapeutische Anwendung von hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut (NSB) und peripherem Blut (PB) darstellt, besteht derzeit ein großes Interesse an noch unbekanntem hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Die hier vorliegende Arbeit soll als Basis für die künftige Identifizierung und Charakterisierung hämatopoetischer Wachstumsfaktoren aus aktivierten T-Zellen dienen. Dazu sollten zunächst Hinweise für die Existenz noch unbekannter hämatopoeserelevanter Faktoren gefunden, und danach ein Verfahren zur Identifizierung unbekannter mRNAs etabliert werden.

Durch Kulturüberstände aktivierter T-Zellen und Reinigungsfraktionen einer IL-2-Produktion (SF0, SF1 und SF3) läßt sich die Proliferation früher, linienunspezifischer CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Vorläuferzellen anregen. Dabei war die Zellvermehrung durch niedrige Zytokinkonzentrationen und antagonistische Effekte zwischen aktivierenden und inhibierenden Zytokinen begrenzt. Entgegen den mit rekombinanten Zytokinen herbeigeführten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, konnten die hier verwendeten Zytokinkombinationen aufgrund ihrer Zusammensetzung und Konzentration Zellen aus PB zu stärkerer Proliferation anregen als Zellen aus NSB. Bei Experimenten mit der Reinigungsfraktion SF3 konnten erstmals Hinweise auf hämatopoesehemmende Effekte des Zytokins RANTES gefunden werden. Die Hypothese, daß die beiden Zytokine LIF und FL die Expression von Rezeptoren für stimulierende und inhibierende Wachstumsfaktoren steigern und so die Proliferation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen nur indirekt beeinflussen, konnte während der Kombinationsexperimente mit der Reinigungsfraktion SF1 mit LIF und/oder FL aufgestellt werden. Unbekannte Faktoren in der Reinigungsfraktion SF1 inhibierten bei zusätzlicher Gabe der Zytokine G-CSF, IL-3 und IL-6 die Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB, während wiederum andere unbekannte Faktoren im Eluat der Concanavalin A (ConA)-Chromatographie von SF0 die Proliferation der Zellen aus NSB stimulierten.

Mittels mRNA-Differential-Display wurden fünf Fragmente noch unbekannter mRNAs identifiziert, deren Expression durch die Aktivierung mit dem Phorbol-ester PMA (4 $\beta$ -Phorbol-12-myristat-13-acetat) und dem Kalziumionophor A23187 induziert wurde. Durch RT-PCR konnten zwei dieser mRNAs erstmals nach 24 h, zwei weitere mRNAs nach 48 h und die fünfte mRNA erstmals nach 72 h Stimulation nachgewiesen werden. Die Synthese von drei der fünf unbekanntem mRNAs konnte auch durch die Aktivierung der T-Zellen mit ConA und PHA-M (Phytohämagglutinin-M) induziert werden. Eine mRNA war nur durch PHA-M, aber nicht durch ConA induzierbar und eine weitere mRNA war weder durch ConA noch durch PHA-M induzierbar. Dadurch wird belegt, daß die beiden zuletzt beschriebenen mRNAs entweder über andere Aktivierungswege oder durch andere T-Zell-Subpopulationen gebildet werden als die drei anderen mRNAs.

**Schlagnworte:** CD34<sup>+</sup>-Zellen; hämatopoetische Wachstumsfaktoren; mRNA Differential Display

## Abstract

Ilona Vogt-Humberg

Propagation of hematopoietic stem and progenitor cells with inducible t-cell factors and identification of unknown mRNA species with the differential display technology

By secreting different cytokines, activated t-cells influence immune reactions as well as they possibly regulate induced hematopoiesis. Since an improved in vitro expansion can provide a basis for a broader therapeutic use of hematopoietic stem cells from umbilical cord or peripheral blood, interest in unknown hematopoietic growth factors will increase. The aim of this investigation is to show the way for the future identification and characterisation of activated t-cell derived hematopoietic growth factors. Therefore, it is necessary to find evidences for the existence of presently unknown hematopoietic factors and to establish a method for the identification of the corresponding mRNAs.

Proliferation of early, lineage-unspecific  $CD34^+CD38^-$ -progenitor cells was stimulated by culture supernatants of activated t-cells and fractions of an IL-2 production (SF0, SF1, and SF3). Within these experiments, proliferation was limited by low cytokine concentrations and antagonistic effects between activating and inhibiting cytokines. Contrary to the results of other research groups that used recombinant cytokines, the ingredients and concentrations of the cytokine combinations used for this investigation induced a higher proliferation of peripheral blood cells than of umbilical cord blood cells. Furthermore, first indications for RANTES as a hematopoietic inhibitor resulted from experiments with the fraction SF3.

Experiments with different combinations of SF1 with LIF and/or FL lead to the supposition that the two cytokines LIF and FL may increase the expression of receptors for stimulating and inhibiting growth factors. According to this supposition, the effects of LIF and FL on the proliferation of  $CD34^+CD38^-$ -cells can be assumed as indirect.

Presently unknown factors within SF1 inhibited the proliferation of  $CD34^+$ - and  $CD34^+CD38^-$ -cells of peripheral blood when combined with the cytokines G-CSF, IL-3 and IL-6. Other unknown factors within the eluate fraction of a Concanavalin A (Con A) chromatography of SF0 stimulated the proliferation of umbilical cord blood but not of peripheral blood cells.

By mRNA differential display, five fragments of unknown mRNAs were found. Their expression was induced by activation with the phorbol ester PMA (4 $\beta$ -phorbol-12-myristate-13-acetate) and the calcium-ionophore A23187. Two of these mRNAs were first detected by a RT-PCR 24 hours after stimulation, while two others after 48 hours and the fifth after 72 hours.

Synthesis of three of these mRNAs was also possible by the activation of t-cells with ConA and PHA-M. One mRNA could only be induced by PHA-M and not by ConA while the last one could not be induced by PHA-M or ConA. This proves that the last two mentioned mRNAs were induced using other activation mechanisms or that they were created by another subpopulation of t-cells.

**Keywords:**  $CD34^+$ -cells; hematopoietic growth factors; mRNA differential display

**INHALTSVERZEICHNIS** 1

---

**ABKÜRZUNGEN** 4

---

**1. EINLEITUNG** 6

---

1.1 Die Hämatopoese 6

1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen und ihre Charakterisierung 6

1.1.2 Einfluß des hämatopoetischen Microenvironments auf die Hämatopoese 9

1.1.2.1 Einfluß stromaler und akzessorischer Zellen und der extrazellulären Matrix auf die Hämatopoese 10

1.1.2.2 Einfluß von Zytokinen auf die Hämatopoese 11

1.1.3 In vitro Expandierung hämatopoetischer Stammzellen: Methoden und Nutzen für die Transplantationsmedizin 14

1.2 T-Lymphozyten 16

1.2.1 Aktivierung von T-Zellen 17

1.2.2. Induzierbare T-Zellfaktoren und ihre Bedeutung für die Hämatopoese 20

1.3 Zielsetzung der Arbeit 23

**2. MATERIAL** 24

---

2.1 Chemikalien 24

2.2 Verbrauchsmaterialien 24

2.3 Geräte 25

2.4 Testkits 25

2.5 Zellmaterial 26

2.5.1 Humanes peripheres Blut 26

2.5.1.1 Lymphozytenreiche Plasmaüberstände 26

2.5.1.2 Buffy Coats 26

2.5.2 Nabelschnurblut 26

2.5.3 Bakterien 27

2.6 T-Zell-Stimulatoren 27

2.7 Antikörper für die Durchflußzytometrie 27

2.8 Wachstumsfaktoren 27

2.9 Reinigungsfraktionen 28

2.10 Enzyme 29

2.11 Oligodesoxynukleotide 29

2.11.1 Primer für das mRNA-Differential-Display 29

2.11.2 Kontrollprimer für die RT-PCR 29

2.11.3 Primer für die RT-PCR 30

2.12 Klonierungsvektor 30

**3. METHODEN** 31

---

3.1 Zelluläre Methoden 31

3.1.1 Gewinnung von Lymphozyten aus lymphozytenreichen Plasmaüberständen 31

3.1.2 Isolierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut oder peripherem Blut 31

3.1.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen 31

3.1.2.2 Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe der Immunaффinitätstechnik 32

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer 33

3.1.4 Aktivierung von Lymphozyten mit unterschiedlichen Stimulatoren 34

3.1.5 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen mittels ELISA 34

3.1.6 Serumfreie Suspensionskultur von CD34 <sup>+</sup> -Zellen	35
3.1.7 Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mittels Durchflußzytometrie	36
3.2 Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Lymphozyten	38
3.2.2 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA	39
3.2.3 Photometrische Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration	39
3.2.4 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese	40
3.2.5 Entfernung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Präparationen	40
3.2.6 mRNA-Differential-Display	41
3.2.7 Darstellung von PCR-Produkten im TBE-Agarosegel	44
3.2.8 Ankonzentration von PCR-Produkten	44
3.2.9 Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen	45
3.2.10 Blunt-end Ligation	45
3.2.11 Transformation rekombinanter Plasmide in kompetente E. coli-Zellen	46
3.2.12 Selektion rekombinanter Klone	46
3.2.13 Plasmid-Mini-Präparationen	47
3.2.14 RT-PCR	48
3.3 Proteinchemische Methoden	48
3.3.1 Affinitätschromatographie mittels ConA	48
3.3.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteingemischen	49
3.3.3 Elektroblothing von Proteinen auf Nitrocellulosemembrane	50
3.3.4 Färbung mit kolloidalem Gold	50
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
4.1 Charakterisierung von Kulturüberständen aktivierter T-Zellen, von Reinigungsfractionen sowie von Fractionen der ConA-Chromatographien mittels ELISA	51
4.2 Isolierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen	53
4.3 Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen unter Zusatz von Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen	56
4.4 Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen unter Zusatz der Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3	59
4.5 Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen unter Zusatz verschiedener rekombinanter Zytokine	61
4.6 Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen unter Zusatz verschiedener Kombinationen rekombinanter Zytokine zur Reinigungsfraction SF1	63
4.7 Chromatographische Aufreinigung von SF0 und SF1	66
4.7.1 ConA-Chromatographie von SF0 und SF1	66
4.7.2 Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen mit den Fractionen der ConA-Chromatographie von SF0	69
4.7.3 Kultivierung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen mit den Fractionen der ConA-Chromatographie von SF1	71
4.8 Identifizierung unbekannter mRNAs	73
4.8.1 Isolierung von RNA und mRNA aus ruhenden und aktivierten Lymphozyten	74
4.8.2 Kontrolle der T-Zellaktivierung	75
4.8.3 mRNA-Differential-Display	77
4.8.4 Kontrolle des mRNA-Differential-Displays	84
4.9 Untersuchungen zur Expression der unbekanntenen mRNA-Moleküle in induzierten Lymphozyten	85
4.9.1 Zeitlicher Verlauf der Expression	85
4.9.2 Nachweis der unbekanntenen mRNA-Moleküle nach Aktivierung mit alternativen T-Zell Stimulatoren	86



Inhaltsverzeichnis	3
--------------------	---

---

<b>5. DISKUSSION</b>	<b>87</b>
----------------------	-----------

<b>6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>101</b>
----------------------------------------	------------

<b>7. LITERATUR</b>	<b>104</b>
---------------------	------------

<b>8. ANHANG</b>	<b>115</b>
------------------	------------

**ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Ammoniumpersulfat
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BFU	<i>burst forming unit</i>
BFU-E	<i>burst forming unit-erythrocytes</i>
BFU-MK	<i>burst forming unit-megakaryocyte</i>
bp	Basenpaare ( <i>base pairs</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Kalzium
CD	Differenzierungsantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA
CFU	koloniebildende Einheit ( <i>colony forming unit</i> )
CFU-Bas	<i>colony forming unit-basophil</i>
CFU-E	<i>colony forming unit-erythroid</i>
CFU-Eo	<i>colony forming unit-eosinophil</i>
CFU-G	<i>colony forming unit-granulocyte</i>
CFU-GEMM	<i>colony forming unit-granulocyte/erythroid/ macrophage/ megakaryocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit-granulocyte/macrophage</i>
CFU-M	<i>colony forming unit-macrophage</i>
CFU-MC	<i>colony forming unit-mast cell</i>
CFU-MK	<i>colony forming unit- megakaryocyte</i>
ConA	Concanavalin A
CPD-Stabilisator	Citrat-Phosphat-Dextrose-Stabilisator
CSF	koloniestimulierender Faktor ( <i>colony stimulating factor</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunoabsorbent assay</i>
Epo	Erythropoietin
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflußzytometer ( <i>fluorescence activated cell sorter</i> )
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	flt3-Ligand
FSC	in der Durchflußzytometrie: Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
GAG	Glykosaminoglykan
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
HSA	Humanes Serumalbumin
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül ( <i>intercellular adhesion molecule</i> )
IFN	Interferon
IgG1	Immunglobulin G1
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium

---

IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kD	kilo Dalton
LFA	<i>leukocyte function antigen</i>
LIF	<i>leukemia inhibitor factor</i>
LTC-IC	<i>long-term culture-initiating cells</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
Mg	Magnesium
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
Mn	Mangan
MNC	Mononukleäre Zellen ( <i>mononuclear cells</i> )
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen ( <i>natural killer cells</i> )
NSB	Nabelschnurblut
OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PHA-M	Phytohämagglutinin-M
PI	Propidiumiodid
PMA	4 $\beta$ -Phorbol-12-myristat-13-acetat
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i> (sodium dodecyl sulfate)
SSC	in der Durchflußzytometrie: Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
Tab.	Tabelle
TB	Trypanblau
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VLA	<i>very late antigen</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Die Hämatopoese

#### *1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen und ihre Charakterisierung*

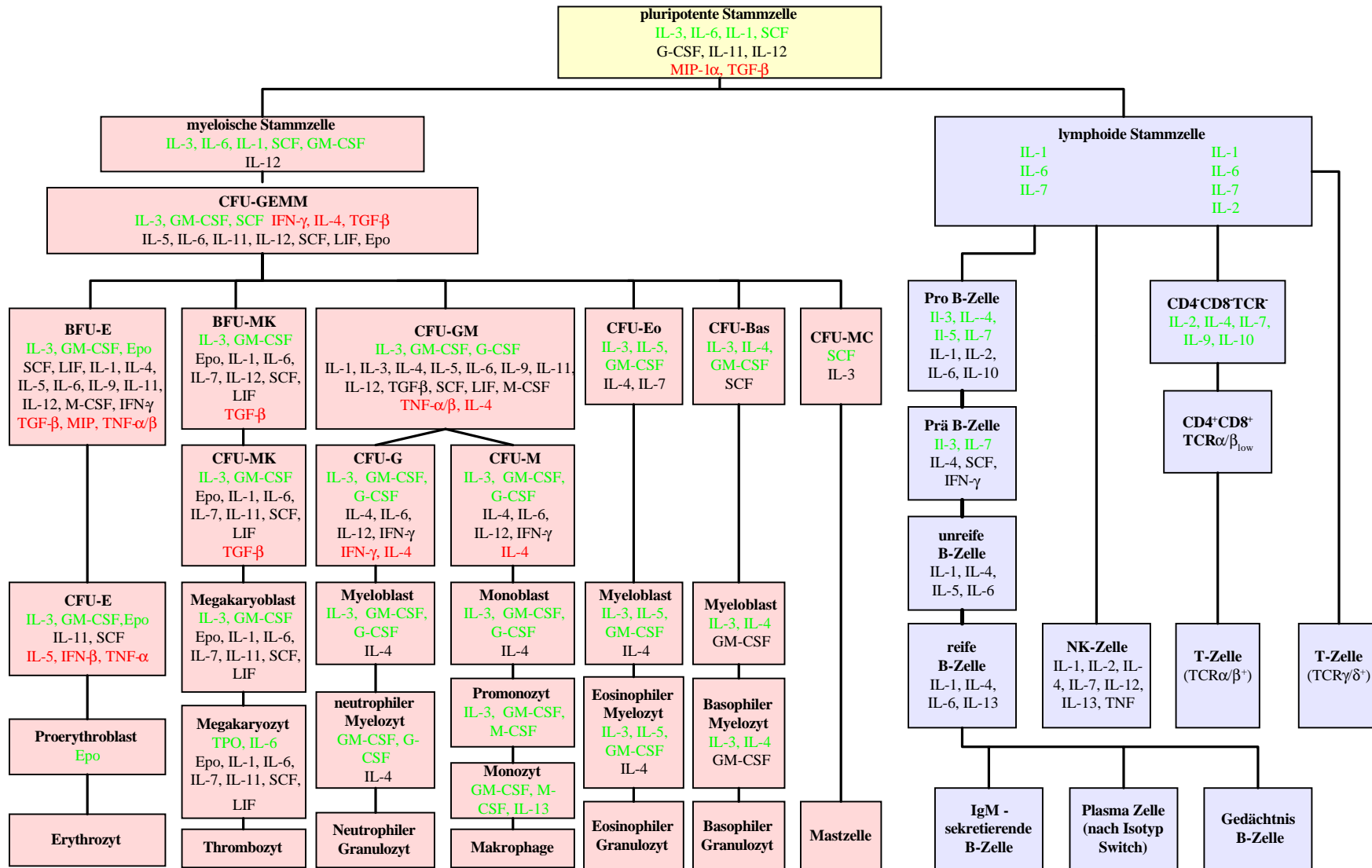
Alle im Blut zirkulierenden Zellen leiten sich aus einem kleinen Pool pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen ab. Diese zeichnen sich durch hohes Selbsterneuerungspotential und umfassende Proliferationskapazität aus. Hämatopoetische Stammzellen werden während der frühen Embryonalentwicklung in den hämatopoetisch aktiven Strukturen des Knochenmarks angelegt und sorgen dann zeitlebens für die Erhaltung der Hämatopoese. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer ausdifferenzierter hämatopoetischer Zellen müssen durch die sogenannte konstitutive oder Steady-State-Hämatopoese täglich ungefähr  $10^9$  kernhaltige Zellen pro kg Körpergewicht neu gebildet werden.

Unter normalen Steady-State-Bedingungen sind nur etwa 10 % der frühen hämatopoetischen Stammzellen mitotisch aktiv. Die übrigen Zellen befinden sich in einer Ruhephase, der sogenannten  $G_0$ -Phase (Lajtha, 1963).

In akuten Streßsituationen, z.B. bei Infektionen oder bei Blutverlust, läßt sich die Bildung neuer Blutzellen durch die induzierte Hämatopoese annähernd exponentiell steigern. Werden bei der konstitutiven Hämatopoese alle Zelltypen neu gebildet, kommt es durch die induzierte Hämatopoese nur zur Neubildung bestimmter, gerade verstärkt benötigter Zelltypen. Bei bakteriellen Infektionen werden beispielsweise vermehrt Granulozyten gebildet (Cannistra und Griffin, 1988).

Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gehen durch Proliferation und Differenzierung myeloische und lymphoide Stammzellen hervor. In weiteren Schritten entstehen aus diesen Zellen sogenannte Vorläuferzellen (Progenitorzellen), die sich dann zu reifen Blutzellen weiterentwickeln (Abb. 1).

Mit jedem dieser Entwicklungsschritte geht ein Teil des Differenzierungs- und Selbsterneuerungspotentials verloren.



**Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese und daran beteiligter Zytokine.**

Grün dargestellte Zytokine wirken aktivierend und rot dargestellte Zytokine inhibierend auf die entsprechenden Entwicklungsstadien (veränderte Darstellung aus: Cope: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia, Horst Ibelgauft's Hypertext Information Universe of cytokines; www.copewithcytokines.de, 1999).

Gemeinsames Differenzierungsmerkmal und derzeit vorrangiger Isolations- und Detektionsparameter für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen ist das CD34-Antigen (Civin et al., 1984; Katz et al., 1985; Andrews et al., 1986). Es handelt sich um ein 115 kD großes Glykophosphoprotein, das auch auf den Oberflächen embryonaler Fibroblasten (Brown et al., 1991) und vaskulärer Endothelzellen (Fina et al., 1990; Beschorner et al., 1985) exprimiert wird.

Die Funktion des CD34-Antigens ist bislang unbekannt. Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Healy (1995) und Krause (1996) lassen die Vermutung zu, daß das CD34-Antigen durch die Bindung L-Selektin-ähnlicher Moleküle auf der Oberfläche stromaler Zellen des Knochenmarks an der Zelladhäsion beteiligt sein könnte. Transformierte murine Thymozyten, die das CD34-Antigen exprimieren, binden an humanes, aber nicht murines Knochenmarkstroma, wogegen normale murine Thymozyten nicht an humanes Knochenmarkstroma binden können.

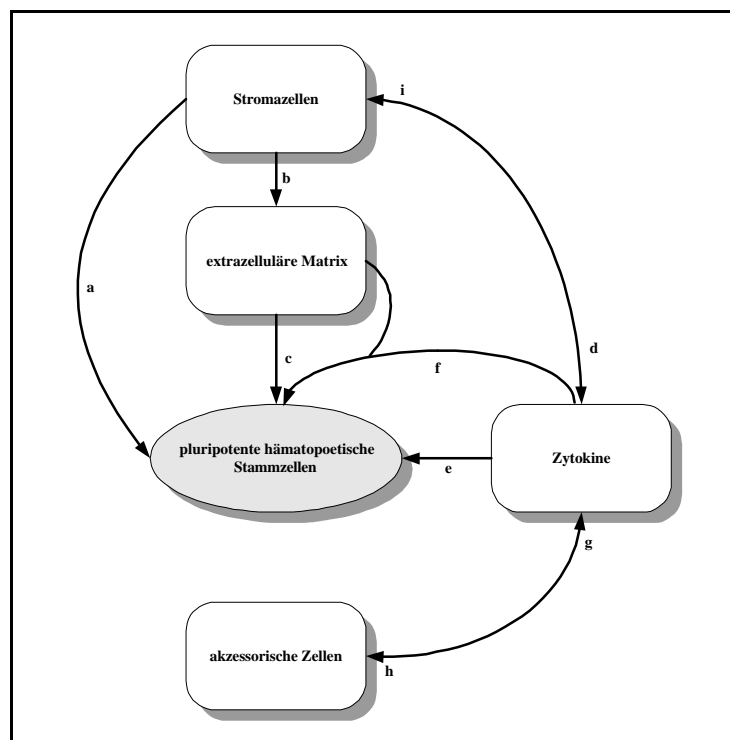
Des weiteren fanden Krause et al. (1996) Hinweise auf eine Hämatopoeseinhibition durch das CD34-Antigen. Zellen der murinen myeloischen Leukämiezelllinie M1 differenzieren nur dann zu Makrophagen aus, wenn die Konzentration endogener CD34-mRNA sinkt. Die konstitutive Expression eines rekombinanten CD34-Proteins verhindert die Ausdifferenzierung der M1-Zellen zu funktionsfähigen Makrophagen (Fackler et al., 1995).

Das Gemisch von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen kann aufgrund der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle näher charakterisiert werden. Als primitivste hämatopoetische Zellen gelten solche Zellen, die neben dem CD34-Antigen auch CD117 und CDw90 exprimieren, aber keine Expression der Antigene CD33, CD38 und HLA-DR aufweisen (Andrews et al., 1998; Craig et al., 1993; Terstappen et al., 1991). Mit zunehmender Differenzierung der Zellen gehen die für primitive hämatopoetische Zellen charakteristischen Marker (z.B. CD117 und CDw90) verloren, während die Zellen beispielsweise neben CD38 und HLA-DR auch linienspezifische Marker zu exprimieren beginnen. Zu diesen linienspezifischen Markern gehören unter anderem CD19 (früher B-Zellmarker), CD7 (früher T-Zellmarker), CD33 (früher Monozytenmarker) oder CD61 (früher Thrombozytenmarker) (aus Informationen der Firma Beckmann Coulter, Hamburg).

### 1.1.2 Einfluß des hämatopoetischen Microenvironments auf die Hämatopoese

Die hämatopoetischen Stammzellen eines erwachsenen Menschen finden sich zu ca. 95 % in den hämatopoetisch aktiven Strukturen des Knochenmarks. Dort sind sie eingebettet in ein Netzwerk aus stromalen und akzessorischen Zellen sowie deren Produkten, der sogenannten extrazellulären Matrix. Zu den stromalen Zellen gehören Fibroblasten, endotheliale Zellen und Adipocyten. T-Zellen und Makrophagen gehören zu den akzessorischen Zellen. Komponenten der extrazellulären Matrix sind Kollagen, Fibronectin, Laminin, Hyaluronsäure, Proteoglykane und verschiedene Glykoproteine.

Diese direkte Umgebung der hämatopoetischen Zellen wird als hämatopoetisches Microenvironment oder Stammzellnische bezeichnet (Owen, 1988) und ist entscheidend an der Steuerung der Hämatopoese beteiligt (Abb. 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung verschiedener Komponenten des hämatopoetischen Microenvironments und ihr Einfluß auf hämatopoetische Stammzellen.**

Stromazellen interagieren mit hämatopoetischen Stammzellen über [a] direkten Zell-Zell-Kontakt oder bilden [b] Proteine der extrazellulären Matrix, die wiederum [c] mit hämatopoetischen Stammzellen interagieren können. Außerdem synthetisieren Stromazellen Zytokine, die als [d] zellassoziierte, bzw. [f] extrazelluläre Matrix-assoziierte Moleküle präsentiert oder [e] sekretiert werden. Akzessorische Zellen können [g] ebenfalls Zytokine sekretieren und werden wie stromale Zellen [h, i] durch die eigenen Zytokine reguliert (nach Mayani et al., 1992).

### *1.1.2.1 Einfluß stromaler und akzessorischer Zellen und der extrazellulären Matrix auf die Hämatopoese*

Zellen des hämatopoetischen Microenvironments beeinflussen die Hämatopoese über verschiedene Mechanismen. Hierzu gehört unter anderem die mechanische Unterstützung der Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch stromale Zellen. Adipozyten akkumulieren beispielsweise bei geringer hämatopoetischer Aktivität Fett-Vakuolen, die sie bei gesteigerter Hämatopoese wieder verlieren. Auf diese Weise stellen Adipozyten nicht nur ein Lipid-Reservoir dar, das für den Metabolismus der hämatopoetischen Zellen während der Proliferation benötigt wird, sondern schaffen durch ihre Verkleinerung zusätzlichen Raum für hämatopoetische Zellen (Tavassoli, 1984).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der direkte Zell-Zell-Kontakt (Abb. 2, a) zwischen stromalen und hämatopoetischen Zellen, welcher über Rezeptoren wie LFA-1 (ICAM-1 und ICAM-2), LFA-3 (LFA-2) und ICAM-1 und ICAM-2 (LFA-1) erfolgt (Hemmler, 1988; Springer, 1990; Long, 1992). Studien haben gezeigt, daß z.B. granulozytäre Zellen bevorzugt mit Fibroblasten und erythroide Zellen bevorzugt mit Makrophagen assoziieren (Weiss, 1976). Aufgrund dieser Erkenntnisse geht man derzeit davon aus, daß hämatopoetische Zellen die Interaktion mit stromalen Zellen für eine optimale Entwicklung benötigen.

Desweiteren produzieren und sekretieren stromale Zellen Makromoleküle, die die extrazelluläre Matrix bilden (Abb. 2, b). Neben dem direkten Zell-Zell-Kontakt mit stromalen Zellen nehmen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen auch Kontakt mit der extrazellulären Matrix auf (Abb. 2, c). So konnten in verschiedenen Studien die Kollagentypen I-VI im hämatopoetischen Microenvironment nachgewiesen (Chichester et al., 1993; Klein et al., 1995) und der Kollagentyp I als adhäsives Substrat für erythroide (BFU-E) und myeloische (CFU-GM) Progenitorzellen identifiziert werden (Königsmann et al., 1992).

Auch Proteoglykane sind an der Bindung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt (Gordon et al., 1988). Sie bestehen aus einem Kernprotein, das kovalent mit Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAG) verbunden ist. Eine Ausnahme stellt die nur aus einem Glykosaminoglykan bestehende Hyaluronsäure dar. Die GAGs sind sehr lange, negativ geladene, unverzweigte Ketten aus verschiedenen sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten, anhand derer die Klassifizierung in Heparansulfat-, Chondroitinsulfat-, Dermatansulfat- und Keratansulfat-Proteoglykane erfolgt. Neben der Hyaluronsäure konnten im hämatopoetischen Microenvironment bisher alle Proteoglykane mit Ausnahme von Keratansulfat-Proteoglykanen entweder membrangebunden oder extrazellulär nachgewiesen werden (Kjellén et al., 1991; Kolset et al., 1990). Stammzellen binden u.a. über Rezeptoren



wie VLA-1 (bindet Laminin und Kollagen), VLA-4 und VLA-5 (binden Fibronectin) oder CD44 (erkennt Hyaluronsäure) an die extrazelluläre Matrix. Gordon und Mitarbeiter (1988) konnten zeigen, daß frühe hämatopoetische Zellen über Heparansulfat an die extrazelluläre Matrix binden.

Die Zellen des hämatopoetischen Microenvironments stellen außerdem die Hauptquelle für hämatopoetisch relevante Zytokine dar (Abb. 2, d und g).

#### *1.1.2.2 Einfluß von Zytokinen auf die Hämatopoese*

Unter dem Begriff Zytokine wird eine Gruppe von Peptiden, Proteinen und Glykoproteinen zusammengefaßt, die von Lymphozyten oder anderen Körperzellen sezerniert werden und auf autokrinem oder parakrinem Weg das Zellwachstum, die Differenzierung oder die Funktion unterschiedlicher Zellpopulationen beeinflussen (Bergmann, 1996). Es werden hämatopoeseaktivierende Zytokine wie GM-CSF, G-CSF, M-CSF oder IL-3 und hämatopoeseinhibierende Zytokine wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  oder IFN- $\gamma$  unterschieden (Torok-Storb, 1988).

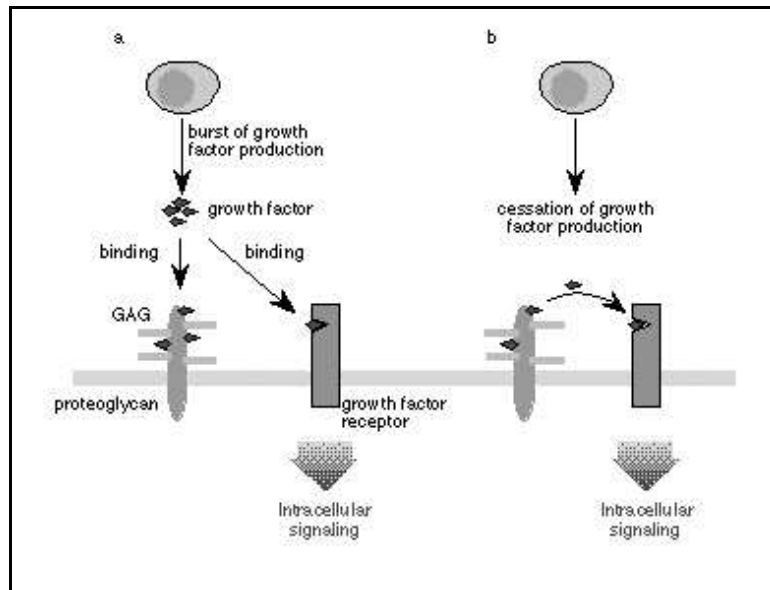
Die meisten Zytokine werden nur nach entsprechender Stimulation synthetisiert und sezerniert. Im hämatopoetischen Microenvironment sind es T-Lymphozyten und Makrophagen, die nach ihrer Aktivierung Zytokine synthetisieren. Man geht davon aus, daß diese Zytokine eine entscheidende Rolle bei der induzierten Hämatopoese spielen. Stromale Zellen hingegen können bestimmte Zytokine konstitutiv synthetisieren. Zu diesen Zytokinen gehören die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren M-CSF, G-CSF, SCF, IL-6 und Erythropoetin, die die konstitutive Hämatopoese aufrecht erhalten. GM-CSF und TGF- $\beta$  werden sogar vorab synthetisiert und in intrazellulären Granula gespeichert, bis sie bei Bedarf daraus freigesetzt werden. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden als membranständige Moleküle synthetisiert (Mayani et al., 1992).

Zytokine wirken in einem komplexen Interaktionsnetzwerk, in dem sich u.a. die Effekte einzelner Zytokine gegenseitig verstärken können. Solche Synergieeffekte sind zum Teil auf gemeinsame Rezeptoren und/oder den gleichen Signaltransduktionsweg zurückzuführen. Beispielsweise binden TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  einerseits und IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  andererseits an gemeinsame Rezeptoren (Vilcek und Le, 1994). Obwohl sich die Rezeptoren von IL-1 und TNF unterscheiden, lösen beide denselben Signaltransduktionsweg aus. Beide bewirken eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und somit auch die Aktivierung derselben Gene (Lowenthal et al., 1989).

Die Zellen des hämatopoetischen Microenvironments produzieren aber nicht nur Zytokine,

sondern werden selbst auch durch sie beeinflusst (Abb. 2, h und i). Zum Beispiel kann IL-1 die Synthese von IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF und chemotaktischen Faktoren induzieren (Vilcek und Le, 1994), wohingegen IL-4 und IL-6 die Bildung von IL-1 und TNF- $\alpha$  durch Monozyten hemmen (Hart et al., 1989). Cashman und Kollegen (1990) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß stromale Zellen direkt benachbarte hämatopoetische Progenitorzellen durch die Sekretion von TGF- $\beta$  in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus halten können. Werden stromale Zellen allerdings durch IL-1 stimuliert, so beginnen sie mit der Synthese und Sekretion stimulatorischer Zytokine wie z.B. GM-CSF. Diese wiederum regen hämatopoetische Progenitorzellen zur Proliferation an (Eaves und Eaves, 1989; Cashman et al., 1990). Das Verhältnis von hämatopoetischen Stimulatoren zu Inhibitoren spielt also eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von hämatopoetischen Progenitorzellen.

Viele Zytokine wirken nicht als freie Moleküle auf hämatopoetische Zellen (Abb. 2, e), sondern entweder zellassoziert oder aber an Komponenten der extrazellulären Matrix (Abb. 2, f) gebunden. Beispielsweise sind von M-CSF und SCF zellassozierte Formen bekannt, die den hämatopoetischen Zellen während des direkten Kontakts mit stromalen Zellen präsentiert werden (Stein et al., 1990; Flanagan und Leder, 1990). GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-3 binden an in der extrazellulären Matrix vorhandene Heparansulfat-Proteoglykane (Roberts et al., 1988; Keating et al., 1988; Gordon et al., 1987) und TGF- $\beta$  an  $\beta$ -Glycan, Biglycan und Decorin. Die der Bindung von Wachstumsfaktoren an Glykosaminoglykane zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bislang unbekannt. Möglicherweise bewirken positiv geladene  $\alpha$ -helicale Protein-Domänen die Bindung an Heparin. Durch die Bindung von Zytokinen an Proteoglykane wird ein schnelles Absinken der Zytokinkonzentration am Ort der Bildung verhindert. Stoppen die entsprechenden Zellen die Sekretion von Wachstumsfaktoren, so können Proteoglykane als eine Art Zytokin-Reservoir dienen (Abb. 3).



**Abb. 3: Proteoglykane der extrazellulären Matrix binden Zytokine und verhindern auf diese Weise ein schnelles Absinken der Zytokinkonzentration.**

(a) Wachstumsfaktoren (Zytokine) binden entweder an die für sie spezifischen Rezeptoren und lösen intrazelluläre Signalwege aus oder binden an Proteoglykane. (b) Findet keine Zytokinsekretion mehr statt, dienen Proteoglykane als Zytokinspeicher und setzen weiterhin Zytokine frei.

GAG = Glykosaminoglykan

(veränderte Darstellung aus: Cope: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia, Horst Ibelgaut's Hypertext Information Universe of cytokines; www.copewithcytokines.de, 1999).

Während der Hämatopoese lassen sich drei Entwicklungsebenen unterscheiden, auf denen Zytokine wirken können (Ogawa, 1993):

**a) Ebene der ruhenden Stammzellen:**

hier wirken z.B. SCF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, LIF, flt3-Ligand (FL) und G-CSF.

**b) Ebene der frühen, noch undeterminierten Vorläuferzellen:**

hier wirken z.B. IL-3, GM-CSF und SCF.

**c) Ebene der späten, bereits reihenspezifischen Vorläuferzellen:**

hier wirken z.B. G-CSF, M-CSF, IL-5 und Epo.

Neben diesen aktivierenden Faktoren sind auch negative Regulatoren der Hämatopoese bekannt. Hierzu gehören Interferone, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ . Interferone und TNF- $\alpha$  inhibieren die Proliferation zellreihenunspecific, wogegen TGF- $\beta$  als Antagonist zu den auf der Ebene der ruhenden Stammzellen wirksamen Zytokinen agiert.

### ***1.1.3 In vitro Expandierung hämatopoetischer Stammzellen: Methoden und Nutzen für die Transplantationsmedizin***

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, insbesondere die Knochenmarkstransplantation, wurde in den vergangenen 30 Jahren mit zunehmendem Erfolg bei Patienten mit akuten und chronischen Leukämien, malignen Lymphomen, aplastischer Anämie, Panmyelopathie (Knochenmarkversagen) und bei angeborenen schweren Immundefekten eingesetzt (Gale und Chamlin, 1987; O'Reilly, 1983)

Hämatopoetische Stammzellen für die Transplantation können entweder aus allogenen (von einem genetisch differentem Spender), syngenen (von einem genetisch identischen Spender) oder aus autologem (vom Patienten selbst) Material gewonnen werden. Als Quellen kommen Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripheres Blut (nach Mobilisierung von Stamm- und Vorläuferzellen) in Frage. Allogenes Material aus Knochenmark oder peripherem Blut steht nur in begrenztem Umfang zur Verfügung, da einerseits die Histokompatibilitätsantigene von Spender und Empfänger kompatibel sein müssen und andererseits ein genereller Mangel an Spendern besteht (Rubinstein et al., 1993). Bei Stamm- und Vorläuferzellen aus autologem Material sind häufig nur wenige Zellen vorhanden, da zuvor durchgeführte Krebstherapien die Zahl der Stamm- und Vorläuferzellen reduziert haben oder das Ausgangsmaterial mit Tumorzellen verunreinigt ist (Brugger et al., 1994; Craig et al., 1994; Rill et al., 1994). Allogenes Material aus Nabelschnurblut kann helfen, deutlich mehr Transplantate zur Verfügung zu stellen. Die Menge an Stammzellen, die aus einer Nabelschnur gewonnen werden kann, reicht allerdings nur für einen ca. 20 kg schweren Patienten aus.

Durch ein in vitro Kultursystem, mit dem sich hämatopoetische Stammzellen vor einer Transplantation vermehren lassen, könnte die Dauer der hämatopoetischen Rekonstitution verkürzt, und T-Zellen und Tumorzellen leichter aus dem Transplantat entfernt werden. Da dann auch eine geringere Zahl an geeigneten Spender-Zellen entnommen werden muß, könnte sowohl die Zahl der Apharesen, die zur Gewinnung der mobilisierten Stamm- und Vorläuferzellen aus peripherem Blut notwendig ist, als auch das benötigte Knochenmarkvolumen reduziert werden. Somit könnten einerseits mehr Patienten autolog transplantiert und andererseits auch Material aus Nabelschnurblut zur Transplantation erwachsener Patienten herangezogen werden. Ziel intensiver Forschungsaktivitäten ist daher die Etablierung von Systemen zur in vitro Expandierung hämatopoetischer Stammzellen.

Eine besonders häufig verwendete Methode zur Expandierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen ist die Kultivierung unter dem Einfluß von Kombinationen hochdosierter Zytokine, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Verschiedene Arbeitsgruppen

(Haylock et al., 1992; Srouf et al., 1993, Coutinho et al., 1990 und Brugger et al., 1993) konnten beispielsweise mit einer Kombination von IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF und SCF innerhalb von 14 Tagen eine 20- bis 60-fache Vermehrung früher Vorläuferzellen aus peripherem Blut erreichen. Andere in diesem Zusammenhang häufig verwendete Zytokine sind FL, Epo, und LIF.

Eine weitere Methode stellt die Expandierung in einer kontinuierlichen Kultur dar. Die erste Expandierung von sehr frühen hämatopoetischen Zellen in einem Bioreaktor wurde von Koller et al. (1993 a) beschrieben. Seine Arbeitsgruppe expandierte LTC-IC's (long-term culture-initiating cells) aus Knochenmark in einem Bioreaktor mit Stromazellen. Unter Verwendung von IL-3, IL-6 und SCF-haltigem Medium konnte die Gesamtzellzahl verzehnfacht und die Zahl der LTC-IC's verdreifacht werden. Später konnte die Zahl der LTC-IC's in einem ähnlichen Bioreaktor durch den Zusatz weiterer Zytokine (z.B. GM-CSF und Epo) sogar verzehnfacht werden (1993 b und 1995). Im Vergleich hierzu konnten Petzer et al. (1996) mit einem serumfreien Kulturmedium, das mit IL-3, IL-6, G-CSF, FL, SCF und NGF (nerve growth factor) versetzt wurde, ohne Stromazellen in 3 bis 5 Wochen eine Vermehrung der LTC-IC's um das 50-fache erreichen.

Die Expandierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen für die klinische Anwendung erfolgt zumeist in gasdurchlässigen Kulturbeuteln oder in Zellkulturflaschen. In gasdurchlässigen Kulturbeuteln konnte beispielsweise die Zahl von LTC-IC's aus Knochenmark durch Verwendung eines IL-1 und IL-3-haltigen Kulturmediums um das 18-fache gesteigert werden (Moore und Hoskins, 1994)

Obwohl Forschungsergebnisse dafür sprechen, daß hämatopoetische Stammzellen in vivo zu einer großen Zahl selbsterneuernder Zellteilungen fähig sind, die auch einen Anstieg der Stammzellzahlen bewirken, konnte dies in vitro noch nicht nachgewiesen werden. Trotz einer Vielzahl unterschiedlicher Kultursysteme, Wachstumsfaktoren und auch Stromazelllinien konnten mit den bislang erfolgreichsten Experimenten die Stammzeleigenschaften nur über einen limitierten Zeitraum erhalten und ein begrenzter Anstieg der Zellzahl belegt werden (McAdams et al., 1996). Als ein wichtiger Grund für das bisherige Scheitern der Kultivierungsexperimente ist vermutlich die Auslösung der Apoptose anzusehen, obwohl Experimente gezeigt haben, daß allein durch das Verhindern der Apoptose keine erfolgreiche Stammzellkultivierung ermöglicht wird. Durch die Blockierung der Apoptose, beispielsweise durch die Überexpression des Proteins Bcl2, konnte in einer frühen hämatopoetischen Vorläuferzelllinie der Maus die Differenzierung der Zellen auch ohne die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden (Fairbairn et al., 1993).

Aufgrund der beschriebenen Probleme bei der Kultivierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen besteht derzeit ein sehr großes Interesse an noch unbekanntem Faktoren, die die Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen verbessern, indem sie sowohl die Apoptose als auch die Differenzierung der Zellen verhindern.

Da aktivierte T-Zellen eine Vielzahl verschiedener Faktoren synthetisieren, die das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen beeinflussen, besteht begründete Hoffnung, noch unbekanntem Faktoren mit den genannten Eigenschaften zu finden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sollen hierfür die Grundlage darstellen.

## 1.2 T-Lymphozyten

Vorläuferzellen von T-Lymphozyten wandern zur Differenzierung aus dem Knochenmark in den Thymus (daher thymusabhängige (T-) Lymphozyten; T-Zellen). T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren, TCR), die Peptidantigene erkennen können. Es werden allerdings keine löslichen Antigene erkannt, sondern nur solche, die durch MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) auf der Oberfläche anderer Zellen gebunden sind. Dieses Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet.

Aufgrund ihrer T-Zell-Rezeptoren lassen sich T-Zellen in zwei Gruppen unterteilen. Die größere Gruppe exprimiert T-Zell-Rezeptoren aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und die kleinere Gruppe T-Zell-Rezeptoren aus je einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Die  $\alpha/\beta$ -T-Zellen können wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden: eine exprimiert das Co-Rezeptormolekül CD4 ( $CD4^+$ -T-Zellen) und die andere CD8 ( $CD8^+$ -T-Zellen). Aktivierte  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen spielen über verschiedene regulatorische Mechanismen und Effektorfunktionen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Immunreaktionen. Beispielsweise können  $CD4^+$ -T-Zellen durch verschiedene Oberflächenproteine (z.B. durch den CD40 Ligand) und sezernierte Zytokine wichtige regulatorische Funktionen übernehmen und werden daher auch als T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) bezeichnet. Aufgrund der Sekretion unterschiedlicher Zytokine werden die  $T_H$ -Zellen wiederum in zwei Untergruppen unterteilt.  $T_H1$ -Zellen sekretieren unter anderem IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  und aktivieren somit die zelluläre Immunantwort.  $T_H2$ -Zellen sekretieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und unterstützen damit die Umwandlung von B-Zellen in antikörperproduzierende Zellen. Die Produktion von IL-3 und GM-CSF ist  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen gemeinsam.

Aktivierte  $CD8^+$ -Zellen können sich zu zytotoxischen T-Zellen (CTLs) entwickeln; diese lysieren Targetzellen, die ein bestimmtes Antigen exprimieren.

CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unterscheiden sich außerdem in ihrer MHC-Restriktion, da CD4<sup>+</sup>-T-Zellen MHC-Klasse II und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen MHC-Klasse I restringiert sind (Sprent et al., 1986 und 1987; Swain, 1983).

Auf den  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren exprimierenden T-Zellen sind zumeist weder CD4- noch CD8-Co-Rezeptormoleküle nachweisbar (Moller, 1991; Allison und Havran, 1991). Ihre Funktion ist bislang unbekannt.

### ***1.2.1 Aktivierung von T-Zellen***

Zur Aktivierung von T-Zellen und der damit verbundenen klonalen Expansion sind zwei Signale notwendig. Das antigenspezifische Signal wird durch die Erkennung körperfremder, an Selbst-MHC-Moleküle gebundener Peptidfragmente ausgelöst. Das kostimulierende Signal stammt von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC's: dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen). Das bekannteste kostimulierende Signal wird durch die Interaktion von CD28-Molekülen auf T-Zellen mit B7-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen ausgelöst (Linsley et al., 1991; Azuma et al., 1992).

Naive, ruhende T-Zellen treten durch das Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen in Gegenwart des erforderlichen kostimulierenden Signals in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus ein (Weiss und Imboden, 1987). Fehlt das kostimulierende Signal, so führt dies zur Anergie der T-Zelle. Die vom CD28-Molekül induzierte Signaltransduktionskette führt unabhängig von der durch den TCR ausgelösten Signaltransduktionskette zur Regulation der IL-2 Genexpression (Fraser et al., 1991).

Die durch Bindung eines Peptid-MHC-Komplexes an den TCR ausgelöste Signaltransduktionskette wird durch einen Proteinkomplex vermittelt, der als CD3 bezeichnet wird. Dieser besteht aus den drei Proteinen CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  und CD3 $\epsilon$ , an deren zytoplasmatische Domänen Tyrosinkinasen assoziiert sind. Der Komplex wird durch die Proteine  $\zeta$  und  $\eta$  (ein alternatives Spleißprodukt des  $\zeta$ -Gens) vervollständigt, die entweder als  $\zeta/\zeta$  (80% der T-Zell-Rezeptoren) oder  $\zeta/\eta$  Dimere vorliegen. Die  $\zeta$ -Kette kann mit Tyrosinkinasen assoziieren und wird selbst tyrosinphosphoryliert (Paul, 1993).

Nach Bindung des spezifischen Peptid-MHC-Komplexes an den TCR kommt es zur Zusammenlagerung des TCR-CD3-Komplexes mit dem passenden Corezeptor (CD4 oder CD8) und dem CD45-Molekül. Dadurch werden die mit den zytoplasmatischen Domänen assoziierten Tyrosinkinasen aktiviert, welche wiederum Enzyme aktivieren, die dann zu einer Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$ 1 führen. Diese katalysiert die Hydrolyse des

Plasmamembran-Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in Inositol 1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol. Inositol 1,4,5-triphosphat erhöht durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle, während Diacylglycerol das Enzym Proteinkinase C aktiviert. Zusätzlich wird ein kalziumspezifischer Ionenkanal in der T-Zell-Membran geöffnet, der das Einströmen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der extrazellulären Flüssigkeit erlaubt.  $\text{Ca}^{2+}$  bildet mit Calmodulin Komplexe, die wiederum verschiedene Kinasen und Phosphatasen (z.B. Calcineurin) aktivieren. Dies führt zur Aktivierung DNA-bindender Proteine wie NF- $\kappa$ B, die ihrerseits die spezifische Gentranskription aktivieren, die dann letztendlich zur Proliferation und Differenzierung führt (Paul, 1993).

In vitro kann die antigeninduzierte Aktivierung von T-Zellen mit Hilfe von Mitogenen simuliert werden. Zwischen der T-Zell-Aktivierung durch Antigene und der durch Mitogene besteht allerdings ein entscheidender Unterschied. Ein Antigen aktiviert nur solche T-Zellklone, die den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren. Dieses Phänomen wird als klonale Selektion bezeichnet und führt dazu, daß in der Regel nur 0,02–0,1 % der T-Zellen durch ein spezielles Antigen aktiviert werden. Mitogene dagegen aktivieren viele Klone mit unterschiedlicher Antigenbindungsspezifität, so daß häufig 30–60 % der T-Zellen aktiviert werden. Aus diesem Grund werden Mitogene auch als polyklonale Aktivatoren bezeichnet (Klein, 1991).

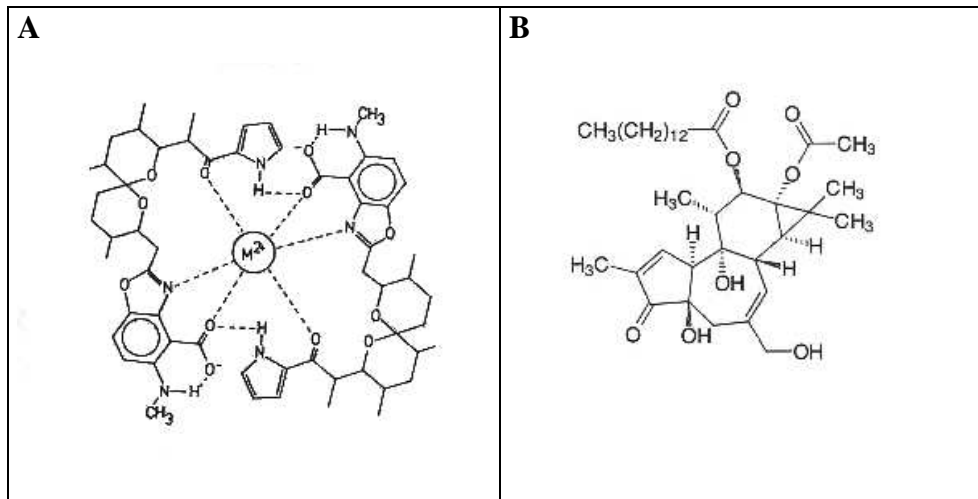
In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte eine in vitro Aktivierung der T-Zellen mittels der Mitogene A23187, PMA, ConA und PHA-M. Im Folgenden werden die genannten Mitogene kurz beschrieben.

A23187 ist ein von *Streptomyces chartreusensis* produziertes Antibiotikum, das als Kalziumionophor wirkt. Jeweils zwei Ionophormoleküle bilden mit einem zweiwertigen Kation, wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  einen Komplex (Abb. 4 A), der biologische Membranen durchqueren kann.

Die Strukturformel des Phorbolesters PMA (4 $\beta$ -Phorbol-12-myristat-13-acetat) ist in Abb. 4 B dargestellt.

PMA und A23187 simulieren die frühen Ereignisse der durch Antigene hervorgerufenen Signaltransduktion, indem PMA an Stelle von Diacylglycerol die Proteinkinase C aktiviert (Hirano et al., 1984) und A23187 das Einströmen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zellen bewirkt (Lichtman et al., 1983). Wie Mohr und Mitarbeiter (1986) in diesem Zusammenhang zeigen konnten, führt die Aktivierung von T-Zellen mit PMA und A23187 verglichen mit anderen Aktivierungsverfahren zu einer besonders starken Zytokinsynthese.





**Abb. 4:** (A) Schematische Darstellung eines A23187-Metallionen-Komplexes; (B) Struktur eines PMA-Moleküls. (Produktinformationen Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden).

ConA (Concanavalin A) und PHA-M (Phytohämagglutinin) gehören zur Proteingruppe der Lektine und binden spezifisch an Kohlenhydratreste. Das aus den Extrakten der Schwertbohne *Canavalia ensiformis* isolierte ConA bindet spezifisch an  $\alpha$ -D-Mannopyranoside und  $\alpha$ -D-Glucopyranoside bzw. an entsprechende Reste in Polysacchariden oder Glykoproteinen. ConA ist ein aus vier identischen Monomeren aufgebautes  $Ca^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -haltiges Metalloprotein. Jedes Monomer besitzt eine Kohlenhydratbindungsstelle und eine Bindungsstelle für  $Ca^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -Ionen, die für die Kohlenhydratanlagerung benötigt werden (Klein, 1991). Das aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* gewonnene PHA bindet spezifisch an N-Acetylgalaktosamin und ist wie ConA ein Tetramer (Klein, 1991). Es besteht allerdings aus zwei verschiedenen Untereinheiten: die L-Untereinheiten agglutinieren Leukozyten, aber keine Erythrozyten und wirken mitogen, wohingegen die R-Untereinheiten Erythrozyten agglutinieren, aber nicht mitogen wirken. Das in den Versuchen zu dieser Arbeit verwendete PHA-M besteht aus  $L_4$ - und  $L_3R$ -Molekülen und wirkt nur auf Leukozyten. Studien mit PHA und ConA deuten darauf hin, daß beide zur Aktivierung von T-Zellen führen, indem sie an Komponenten des TCR-CD3-Komplexes binden (Weiss et al., 1987) und damit die Signaltransduktion auslösen.

### ***1.2.2. Induzierbare T-Zellfaktoren und ihre Bedeutung für die Hämatopoese***

Viele Funktionen aktivierter T-Zellen beruhen auf sezernierten Faktoren, deren Freisetzung durch die spezifische Antigenerkennung angeregt wird. Diese Faktoren lassen sich in Zytotoxine und Zytokine unterteilen. Zytotoxine werden hauptsächlich von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet. Sie befinden sich in sekretorischen Granula, aus denen sie bei Erkennung des spezifischen Antigens freigesetzt werden können. Sie sind nicht spezifisch und können daher auf alle Zellen einwirken. Zu den Zytotoxinen gehören Granzyme und Perforine. Da Zytotoxine nicht hämatopoeserelevant sind, soll in diesem Zusammenhang nicht näher auf sie eingegangen werden.

Zytokine werden hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, aber in geringerem Maße auch von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet. Da ihre Wirksamkeit von spezifischen Rezeptoren auf der Zielzelle abhängig ist, wirken sie, anders als Zytotoxine, nur spezifisch auf den entsprechenden Rezeptor exprimierende Zellen. Zu den von T-Zellen gebildeten Zytokinen gehören: IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  und  $\beta$ , TGF- $\beta$ , LIF, MIP1 $\alpha$  und  $\beta$ , RANTES und Oncostatin M (OSM). Viele dieser Zytokine zeigen auch Wirksamkeit auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Dieser Einfluß soll deshalb im Folgenden kurz beschrieben werden.

**IL-1 $\alpha$  und -1 $\beta$**  unterstützen in Synergie mit IL-3 die Granulopoese und Thrombopoese, in Synergie mit GM-CSF das Wachstum von CFU-M. Außerdem regen sie andere Zellen zur Synthese und Sekretion von GM-CSF, G-CSF, M-CSF und IL-6 an. Des weiteren fördern IL-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  die Proliferation früher Vorläuferzellen (Han und Caen, 1994).

**IL-3** induziert den Eintritt hämatopoetischer Stammzellen in den aktiven Zellzyklus (Spivak et al., 1985). Außerdem stimuliert es neben frühen Vorläuferzellen auch myeloische, erythrozytäre und megakaryozytäre Vorläuferzellen (Hapel et al., 1985; Yang et al., 1986).

**IL-4** fördert in Synergie mit GM-CSF die Bildung dendritischer Zellen und in Synergie mit SCF die Proliferation und Differenzierung früher myeloischer Vorläuferzellen (Rosenzwajg et al., 1998). Außerdem inhibiert IL-4 die Proliferation früher megakaryozytärer Vorläuferzellen (Sonoda et al., 1993).

**IL-5** bewirkt die Proliferation und Differenzierung reiferer eosinophiler Vorläuferzellen (Sanderson, 1992).

**IL-6** regt hämatopoetische Stammzellen zum Eintritt in den aktiven Zellzyklus an (Leary et al., 1988; Kishimoto, 1989). In Synergie mit IL-3 und IL-1 (Bruno und Hoffman, 1989) oder SCF, LIF und IL-3 (Debili et al., 1993) fördert es die Proliferation megakaryozytärer

Vorläuferzellen. Außerdem unterstützt IL-6 die Proliferation und Differenzierung von CFU-GM (Kishimoto, 1989). In Anwesenheit von IL-3, G-CSF, GM-CSF, oder M-CSF verstärkt es die Proliferation von CFU-M und CFU-G (Rennick et al., 1989).

**IL-10** wirkt synergistisch mit Epo auf die Proliferation später erythrozytärer (CFU-E, BFU-E) und megakaryozytärer (CFU-MK) Vorläuferzellen (Wang et al., 1996; Rennick et al., 1994). Außerdem kann es die durch IL-7 induzierte Bildung von prä-B-Zellkolonien (CFU-pre-B) verstärken (Fine et al., 1994) und in Synergie mit IL-3 ein vermehrtes Wachstum von Mastzell-Vorläufern induzieren (Rennick et al., 1994).

**IL-13** kann in Kombination mit GM-CSF die Bildung dendritischer Zellen anregen (Lopez et al., 1997; Rosenzweig et al., 1998). Außerdem konnten Xi und Mitarbeiter (1995) zeigen, daß IL-13 in Synergie mit IL-3 das Wachstum megakaryozytärer Vorläuferzellen stimuliert, aber die Proliferation von CFU-GM und BFU-E inhibiert. In Synergie mit SCF bewirkt IL-13 eine verstärkte Proliferation und Differenzierung früher myeloischer Vorläuferzellen (Jacobsen et al., 1994).

**IL-15** stimuliert alleine oder in Kombination mit SCF die Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen zu NK-Zellen und dendritischen Zellen (Bykovskaia et al., 1999). Die Kombination von IL-15 mit SCF verstärkt die Entstehung von NK-Zellen (Mrozek et al., 1996; Muench et al., 2000).

**IL-17** stimuliert endotheliale Zellen, epitheliale Zellen und Fibroblasten zur Sekretion von z.B. IL-6, IL-8 und G-CSF (Fossiez et al., 1996). Direkte Effekte von IL-17 auf CD34<sup>+</sup>-Zellen sind bislang nicht bekannt.

**GM-CSF** regt vor allem das Wachstum und die Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen (CFU-GM) an (Metcalf et al., 1986 a, b), zeigt aber auch Wirkung auf megakaryozytäre (CFU-MK), erythrozytäre (CFU-E, BFU-E) und gemischte Vorläuferzellen (CFU-GEMM) (Metcalf et al., 1980; Tomonaga et al., 1986; Mazur et al., 1987).

**M-CSF** stimuliert die Proliferation und Differenzierung reiferer, bereits liniendeterminierter Vorläuferzellen (CFU-M) zu Makrophagen (Ralph et al., 1986). GM-CSF verstärkt die Wirkung von M-CSF (Caracciolo et al., 1987).

**TNF- $\alpha$  und - $\beta$**  inhibieren die Proliferation von CFU-GEMM, CFU-GM und BFU-E (Murphy et al., 1988; Skobin et al., 2000). Jacobsen et al. (1992) postulieren, daß TNF- $\alpha$  die Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen inhibiert, indem es die Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren verringert. In Synergie mit GM-CSF induziert TNF- $\alpha$  die Differenzierung zu dendritischen Zellen (Santiago-Schwarz et al., 1992).

**IFN- $\gamma$**  inhibiert die Proliferation von CFU-GM. Nach Murphy et al. (1988) scheint die IFN- $\gamma$

induzierte Inhibition der CFU-GM allerdings eher auf die Induktion der Monozyten-Differenzierung, als auf einen direkt toxischen Effekt zurückzuführen zu sein. Tsuji et al. (1998) konnten zeigen, daß IFN- $\gamma$  die Proliferation später megakaryozytärer Vorläuferzellen anregen kann.

**MIP-1 $\alpha$  und -1 $\beta$**  wirken nur in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. MIP-1 $\alpha$  inhibiert die durch andere Wachstumsfaktoren ausgelöste Proliferation früher myeloischer Vorläuferzellen, wohingegen es die Proliferation späterer Stadien fördert (Broxmeyer et al., 1990, 1993; Mayani et al., 1995). In Kombination mit MIP-1 $\alpha$  ist MIP-1 $\beta$  in der Lage, die inhibitorischen Effekte von MIP-1 $\alpha$  zu blockieren (Broxmeyer et al., 1991 b).

Die Effekte von **OSM** (Oncostatin M) auf die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen sind bislang kaum untersucht. Keller et al. (1996) konnten durch die Inkubation von Knochenmarkzellen mit einer Kombination von OSM und SCF keine koloniestimulierenden Wirkungen nachweisen. Eine Vorinkubation der Knochenmarkzellen mit OSM verhinderte die durch LIF und SCF induzierte Proliferation der Zellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß OSM in Synergie mit IL-3 die Bildung megakaryozytärer Kolonien fördert (Wallace et al., 1995).

Endotheliale Zellen werden durch OSM zur Synthese von GM-CSF und G-CSF angeregt (Brown et al., 1993).

Auch die Wirkung von **RANTES** auf die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen ist bislang kaum untersucht worden. Die Proliferation von CFU-GEMM, CFU-GM und BFU-E wurde durch den Zusatz von RANTES zu GM-CSF und SCF nicht beeinflusst. Synergie-Effekte zwischen RANTES und z.B. MIP-1 $\alpha$  konnten nicht beobachtet werden (Broxmeyer et al., 1993).

**LIF** fördert in Synergie mit IL-3 das Wachstum megakaryozytärer Kolonien (Han und Caen, 1994) und in Synergie mit Epo die Proliferation von BFU-E. In Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren regt LIF ruhende, linienunspezifische Vorläuferzellen zum Verlassen der G<sub>0</sub>-Phase und zur Proliferation an (Leary et al., 1992; Ogawa, 1992 und Shah et al., 1996).

Andere Arbeitsgruppen beschreiben, daß LIF das Überleben früher Vorläuferzellen, aber nicht deren Proliferation fördert (Ratajczak et al., 1997).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

T-Zellen sind wichtige Zellen des Immunsystems, da sie neben Effektorfunktionen, wie der spezifischen Abtötung virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen, vor allem entscheidend an der Koordination des Immunsystems beteiligt sind. Durch Synthese verschiedener Zytokine können aktivierte T-Zellen die Ausbildung von Immunreaktionen beeinflussen und vermutlich regulatorisch auf die induzierte Hämatopoese einwirken.

Derzeit besteht ein großes Interesse an unbekanntem hämatopoeserelevanten Faktoren, weil man sich durch ihren gezielten Einsatz eine bessere *in vitro*-Expandierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen erhofft. Besonders für eine breitere therapeutische Anwendung von hämatopoetischen Stammzellen aus NSB und PB wäre dies eine wichtige Voraussetzung.

Da verschiedene bereits bekannte hämatopoetische Wachstumsfaktoren von aktivierten T-Zellen gebildet werden, besteht die Hoffnung, weitere noch unbekannte Faktoren finden zu können. Die hier vorliegende Arbeit soll als Basis für die künftige Identifizierung und Charakterisierung solcher Faktoren dienen.

Daher ist das Ziel dieser Arbeit:

- (1) Hinweise für die Existenz noch unbekannter hämatopoeserelevanter Faktoren zu finden und**
- (2) ein Verfahren zu etablieren, mit dem unbekannte mRNAs identifiziert werden können.**

Dazu wurden zunächst verschiedene Kulturüberstände aktivierter T-Zellen und drei Reinigungsfractionen einer IL-2-Aufreinigung hinsichtlich ihrer Zytokinzusammensetzung charakterisiert und der Einfluß dieser Faktorenkombinationen auf die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB und NSB untersucht. Durch Kombination humaner T-Zellfaktoren mit verschiedenen rekombinanten Zytokinen bzw. durch chromatographische Aufreinigung der T-Zellfaktorengemische wurde dann nach Hinweisen auf bislang unbekannte Faktoren mit hämatopoetischer Wirkung gesucht.

Mittels mRNA-Differential-Display wurden Fragmente von mRNAs identifiziert, die von aktivierten, aber nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert werden. Diese wurden in Plasmidvektoren kloniert, in *E. coli* XL1-Blue transformiert und schließlich sequenziert. Durch Datenbankvergleich wurden Fragmente von unbekanntem mRNAs identifiziert, die schließlich hinsichtlich ihrer Expression weiter charakterisiert wurden.

## 2. MATERIAL

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck Eurolab (Darmstadt), Serva Electrophoresis (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]dATP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ammoniumpersulfat	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ampicillin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bacto Agar	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Yeast Extrakt	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto-Tryptone	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	C·C·Pro (Neustadt)
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
DNA-Längenstandard XIV	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTP-Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Gel-Mix-6	Life Technologies (Eggenstein)
Glutaminlösung	Life Technologies (Eggenstein)
Humanes Serumalbumin (HSA)	DRK-NSOB (Springe)
Insulin	C·C·Pro (Neustadt)
IPTG	Life Technologies (Eggenstein)
LDL	C·C·Pro (Neustadt)
McCoy's 5A	C·C·Pro (Neustadt)
NaCl-Lösung (0,9 %)	B. Braun (Melsungen)
NuSieve 3:1 Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
PBS	DRK-NSOB (Springe)
Penicillin / Streptomycinsulfat-Lösung	Life Technologies (Eggenstein)
RPMI 1640	C·C·Pro (Neustadt)
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Tetracyclin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Transferrin	C·C·Pro (Neustadt)

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Reaktionsgefäße	Applied Biosystems (Foster City, USA)
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
15 ml Zentrifugenröhrchen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
3M-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
50 ml Zentrifugenröhrchen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Accuspin System-HISTOPAQUE-1077	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
AG-051-X-Resin	BioRad Laboratories (München)
Amberlite AG 501-X8 (D)	BioRad Laboratories (München)
ConA-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Dynabeads oligo (dT) <sub>25</sub>	Dynal (Oslo, Norwegen)
EDTA-Monovetten	Sarstedt (Nümbrecht)

FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fractogel EMD TMAE-650 (S)	Merck Eurolab (Darmstadt)
Gel-Blotting-Papier GB003	Schleicher & Schüll (Dassel)
Gewebekulturplatten (24 Vertiefungen)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Microcon 100	Millipore (Eschborn)
MiniMACS Separation Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Petrischalen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Polaroid Film; Typ 667	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Röntgenfilm Biomax MS1	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Sterilfilter TPI30/3 (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Visking Dialyseschläuche (6 mm und 27 mm Durchmesser)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Zellkulturflaschen (250 ml und 750 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)

### 2.3 Geräte

1-Kanal-Flachbettschreiber	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau)
Biofuge Pico	Heraeus (Hanau)
Chromatographie-Säule XK16/20	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
FACScan	Becton Dickinson (Heidelberg)
Geltrockner	Life Technologies (Eggenstein)
Gene Amp 9600 PCR System	Applied Biosystems (Foster City, USA)
GeneQuant II RNA / DNA Calculator	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Horizon 20·25 Elektrophorese-System	Life Technologies (Eggenstein)
Horizontal Elektrophorese-System; Modell H5	Life Technologies (Eggenstein)
HPLC Anlage	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Inkubator	Heraeus (Hanau)
Kühlgerät MultiTemp II	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Minifuge RF	Heraeus (Hanau)
Peristaltik-Pumpe P-3	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Photometer PCP6121	Eppendorf (Hamburg)
S2 Elektrophorese-System	Life Technologies (Eggenstein)
Single Path Monitor UV-1	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Transferkammer	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

### 2.4 Testkits

CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
ELISAs für verschiedene Zytokine	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Message Clean™ Kit	WAK-Chemie (Bad Soden)
QIAEX II Gel Extraktion Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep-spin Plasmid Kit	Qiagen (Hilden)
RNA PCR Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
RNAimage™ Kit	WAK-Chemie (Bad Soden)
Sure Clone™ Ligation Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

## **2.5 Zellmaterial**

### ***2.5.1 Humanes peripheres Blut***

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete humane periphere Blut (PB) stammte ausschließlich von freiwilligen Blutspendern des DRK Blutspendedienstes NSOB, Institut Springe.

#### ***2.5.1.1 Lymphozytenreiche Plasmaüberstände***

Die lymphozytenreichen Plasmaüberstände wurden in der Abteilung Zellgewinnung des DRK-Blutspendedienstes hergestellt. Je 450-550 ml Vollblut wurden mit 70 ml CPD-Stabilisator (Citrat-Phosphat-Dextrose-Stabilisator als Antikoagulans) vermischt und 12–16 h bei 2–8 °C gelagert. Während der Lagerung sanken die Erythrozyten ab und konnten dann mit Hilfe einer geeigneten Abpreßvorrichtung vom leukozyten- und thrombozytenreichen Plasma abgetrennt werden.

#### ***2.5.1.2 Buffy Coats***

Auch die Buffy Coats wurden in der Abteilung Zellgewinnung des DRK-Blutspendedienstes gewonnen. Es handelt sich hierbei um die leukozytenreiche Schicht, die bei der Zentrifugation von Vollblut zwischen dem Erythrozytensediment und dem Plasmaüberstand entsteht.

Je 450–550 ml Vollblut wurden mit 70 ml CPD-Stabilisator versetzt und 10 min bei 4.100 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das thrombozytenarme Plasma und die Erythrozyten von der leukozyten- und thrombozytenreichen Schicht, dem Buffy Coat, abgetrennt.

### ***2.5.2 Nabelschnurblut***

Das Nabelschnurblut (NSB) wurde von Müttern zur Verfügung gestellt, die ihre Kinder im Krankenhaus Nordstadt (Hannover), im Vinzenzkrankenhaus (Hannover), in der Frauenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover oder im Robert-Koch-Krankenhaus (Gehrden) zur Welt brachten.

Aus der Nabelschnurvene wurden jeweils ca. 10 ml Blut in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.



### 2.5.3 Bakterien

E. coli XL1-Blue: recA1, relA1, endA1, gyrA96, supE44, hsdR17, thi, lac-(F'proAB, lacIqZM15, Tn10), (Tet<sup>R</sup>) (Stratagene, Heidelberg)

### 2.6 T-Zell-Stimulatoren

Zur in vitro Stimulation von T-Zellen wurden die Stimulatoren PMA, A23187, ConA und PHA-M verwendet. PMA und A23187 wurden von der Firma Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden), ConA von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und PHA-M von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

### 2.7 Antikörper für die Durchflußzytometrie

Die für die Durchflußzytometrie verwendeten Antikörper wurden von der Firma Beckmann Coulter (Hamburg) bezogen. Als Negativkontrolle diente die Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub> (FITC) + IgG<sub>2a</sub> (PE).

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Expression auf
CD34	PE, FITC	581	IgG <sub>1</sub>	pluripotenten hämatopoetischen Zellen aktivierten T- und B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Plasmazellen
CD38	PE, FITC	T16	IgG <sub>1</sub>	

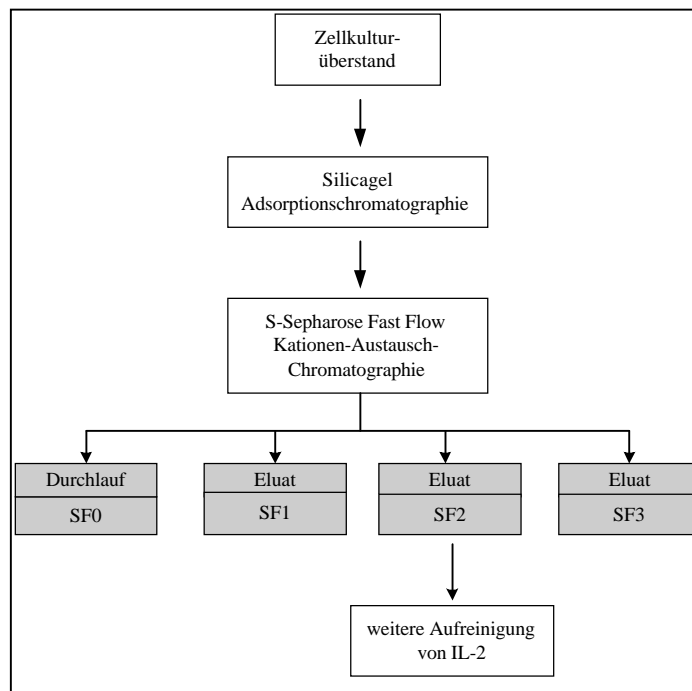
### 2.8 Wachstumsfaktoren

Die rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren wurden von den Firmen TEBU (Frankfurt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Wachstumsfaktor	Größe (kD)	Quelle
flt3-Ligand (FL)	17,5	E. coli
G-CSF	19,0	E. coli
GM-CSF	14,0	E. coli
LIF	19,7	E. coli
SCF	18,4	E. coli
IL-3	15,0	E. coli
IL-6	20,9	E. coli

## 2.9 Reinigungsfractionen

Als Quelle für humane T-Zellfaktoren dienten neben Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen die Randfraktionen einer IL-2-Aufreinigung (nach Mohr et al., 1986). Zur IL-2-Produktion wurden Lymphozyten mit A23187 und PMA stimuliert. Aus den Kulturüberständen wurde dann mittels eines mehrstufigen chromatographischen Aufreinigungsverfahrens IL-2 gewonnen.



**Abb. 5: Schematischer Ablauf der ersten Schritte der IL-2-Aufreinigung aus Kulturüberständen aktivierter T-Zellen.**

Abbildung 5 zeigt schematisch die ersten Schritte der Aufreinigung von IL-2 aus Zellkulturüberständen bis zur S-Sepharose Fast-Flow-Chromatographie. Das nicht an die S-Sepharose-Säule gebundene Material wird im Folgenden als SF0 bezeichnet. Die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen eluierten Fraktionen werden als SF1 (50 mM NaCl), SF2 (350 mM NaCl) und SF3 (1 M NaCl) bezeichnet. In dieser Arbeit wurden nur die Fraktionen SF0, SF1 und SF3 verwendet. Die Fraktion SF2 stand nicht zur Verfügung, da daraus IL-2 aufgereinigt wurde. Die Randfraktionen SF0, SF1 und SF3 wurden bis zur Verwendung bei -30 °C gelagert.

## 2.10 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen Xba I und Eco RI wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), die Ampli Taq DNA-Polymerase, die MULV Reverse Transkriptase sowie der RNase Inhibitor von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

## 2.11 Oligodesoxynukleotide

### 2.11.1 Primer für das mRNA-Differential-Display

Verwendet wurden die Primer aus dem „RNAimage™ Kit 1“ (WAK-Chemie, Bad Soden):

H-T<sub>11</sub>A: 5´-AAGCTTTTTTTTTTTA-3´

#### H-AP:

H-AP1: 5´-AAGCTTGATTGCC-3´

H-AP2: 5´-AAGCTTCGACTGT-3´

H-AP3: 5´-AAGCTTTGGTCAG-3´

H-AP4: 5´-AAGCTTCTCAACG-3´

H-AP5: 5´-AAGCTTAGTAGGC-3´

H-AP6: 5´-AAGCTTGCACCAT-3´

H-AP7: 5´-AAGCTTAACGAGG-3´

H-AP8: 5´-AAGCTTTTACCGC-3´

### 2.11.2 Kontrollprimer für die RT-PCR

Als Positivkontrollen für die RT-PCR-Untersuchungen dienten die IL-2- und  $\beta$ -Actin-Primer-Sets für die RT-PCR (Stratagene, Heidelberg).

#### IL-2 Primer Set:

Sense Primer: 5´-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-3´

Antisense Primer: 5´-GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC-3´

Amplimerlänge: 451bp

**β-Actin Primer Set:**

Sense Primer: 5' -TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'

Antisense Primer: 5' -CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'

Amplimerlänge: 661bp

**2.11.3 Primer für die RT-PCR**

Die Oligonukleotide für die unbekanntenen Fragmente wurden entweder von MWG Biotech (Ebersberg) oder von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) synthetisiert.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>		<b>Position (bp)</b>	<b>Amplimerlänge (bp)</b>
B1F	5' -GCTCAGGGCAGGGAGAG-3'	17mer	210-194	B1F/B1R
B1R	5' -CCAACATTGTACTCTGAA-3'	18mer	2-19	210
B9F	5' -TGGCTGTGCCACGAGGAACT-3'	21mer	452-432	B9F/B9R
B9R	5' -TCTTTGAAAGGAGGGCACTG-3'	20mer	81-100	372
B14F	5' -CAGCCGCCCTTCCAAGAT-3'	17mer	281-265	B14F/B14R
B14R	5' -CAGTTGGCATTGAAACAAGC-3'	20mer	35-54	247
B15F	5' -TGCCATCCTTAGCTTCTTCC-3'	20mer	132-113	B15F/B15R
B15R	5' -TTGGACCATGAAGCCAGAAT-3'	20mer	15-34	118
B18F	5' -GGAGGAATCTGGGCTTCA-3'	18mer	265-248	B18F/B18R
B18R	5' -TTCAAAAGCCAGTCAGTGTT-3'	21mer	49-69	217
B19F	5' -CATGCAGACAGAACTGGTCA-3'	21mer	207-187	B19F/B19R
B19R	5' -ATAGATAAATTTAGGGGA-3'	18mer	1-18	207
B20F	5' -GCTCCTCACATGCCTGA-3'	17mer	239-223	B20F/B20R
B20R	5' -GCACTGGAGGCTGGTGATTA-3'	20mer	15-34	225
B22F	5' -CACAGATTTGAGTTTGCAAGGA-3'	22mer	235-214	B24F/B24R
B22R	5' -CATGGCTGTTTCGTGACATTC-3'	20mer	12-31	224
B23F	5' -TTCACCACAGATTTTCAGTTGTT-3'	23mer	229-207	B25F/B25R
B23R	5' -TGAGGAGTTATACTTTTAATCCAC-3'	24mer	41-64	189

**2.12 Klonierungsvektor**

Als Klonierungsvektor wurde das Plasmid pUC18 verwendet:

pUC18: Derivat von pBR322; lacI, lacZ, MCS, lac promotor, amp; 2686bp;  
(Yanisch-Perron et al., 1985; Pharmacia, Freiburg)

### 3. METHODEN

#### 3.1 Zelluläre Methoden

##### 3.1.1 Gewinnung von Lymphozyten aus lymphozytenreichen Plasmaüberständen

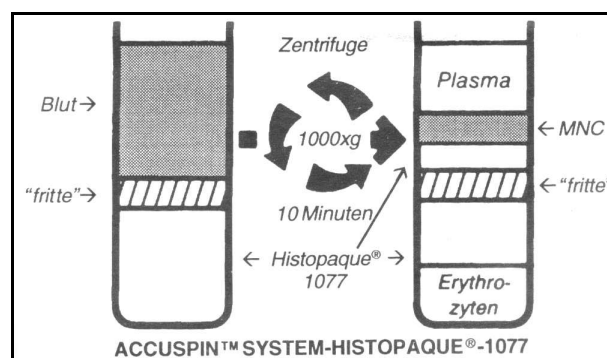
Die Zellen in lymphozytenreichen Plasmaüberständen wurden mittels Zentrifugation (20 min bei 200 x g) pelletiert und zweimal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellzahl wurde mikroskopisch nach Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entweder mit verschiedenen Stimulatoren aktiviert oder direkt zur RNA-Isolierung eingesetzt.

##### 3.1.2 Isolierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut oder peripherem Blut

Die Isolierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen erfolgte in einem zweistufigen Verfahren. Im ersten Schritt wurden zunächst mononukleäre Zellen (MNC) aus NSB und PB mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. In einem zweiten Schritt wurden daraus dann CD34<sup>+</sup>-Zellen (hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen) mit Hilfe der Immunaффinitätstechnik angereichert.

###### 3.1.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Buffy Coats oder NSB wurden 1:4 mit PBS verdünnt, auf Accuspin System-HISTOPAQUE-1077-Röhrchen pipettiert und 20 min bei 1000 x g zentrifugiert (Abb. 6).



**Abb. 6:** Schema der Isolierung mononukleärer Zellen mit Hilfe von Accuspin System-HISTOPAQUE-1077-Röhrchen (Produktinformation Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

Die MNC wurden abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (10 min, 200 x g). Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer (0,5 % BSA und 5 mM EDTA, pH 7,2 in PBS; entgast und sterilfiltriert) resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe der Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### *3.1.2.2 Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe der Immunitätsstechnik*

Zur Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde der CD34-Progenitorzell-Isolationskit der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet. Es handelt sich dabei um ein indirektes Markierungsverfahren, das die positive Selektion von CD34<sup>+</sup>-Zellen erlaubt. Zunächst wird dabei ein haptenkonjugierter primärer monoklonaler Antikörper an die CD34<sup>+</sup>-Zellen gebunden. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen werden indirekt magnetisch markiert, indem an den primären Antikörper ein anti-Hapten Antikörper gebunden wird, an den MACS Micro Beads gebunden sind. Die auf diese Weise magnetisch markierten Zellen werden im magnetischen Feld angereichert. Nach Herstellerangaben können CD34<sup>+</sup>-Zellen mit diesem Verfahren auf 85-98 % Reinheit angereichert werden.

Je 10<sup>8</sup> mononukleäre Zellen wurden in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen, mit 100 µl Reagenz A1 (humanes Immunglobulin zur Blockierung der Fc-Rezeptoren) und 100 µl Reagenz A2 (monoklonaler haptenkonjugierter CD34-Antikörper) versetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und pelletiert (Zentrifugation 10 min, 200 x g). Das Pellet wurde in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert, mit 100 µl Reagenz B (Konjugat aus superparamagnetischen MACS Micro Beads und anti-Hapten Antikörpern) vermischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut mit MACS-Puffer gewaschen und in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert.

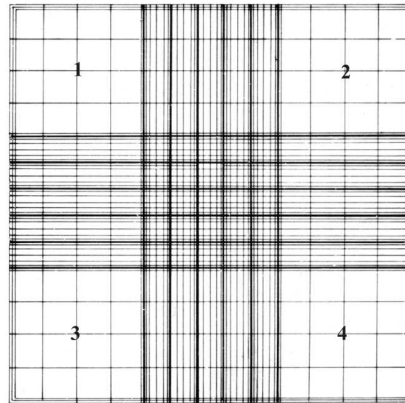
Zur Anreicherung der markierten Zellen wurden je nach Zellmenge MS<sup>+</sup>- bzw. LS<sup>+</sup>-Säulen verwendet. MS<sup>+</sup>-Säulen wurden mit 500 µl und LS<sup>+</sup>-Säulen mit 3 ml MACS-Puffer gespült, bevor die Zellsuspension aufgetragen wurde. Am Magneten haftende Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen (MS<sup>+</sup>-Säulen 3 x mit je 500 µl MACS-Puffer; LS<sup>+</sup>-Säulen 3 x mit je 3 ml MACS-Puffer), bevor die Säulen vom Magneten entfernt und die Zellen mit 1 ml (für MS<sup>+</sup>-Säulen) bzw. 2 ml (für LS<sup>+</sup>-Säulen) MACS-Puffer eluiert wurden.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die eluierten Zellen auf neue, vorgespülte Säulen gegeben. Die am Magneten haftenden Zellen wurden gewaschen und dann mit dem entsprechenden Kulturmedium (genaue Beschreibung des Mediums siehe Abschnitt 3.1.6) eluiert.

Abschließend wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### ***3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer***

Die zu zählenden Zellen wurden 1:2 mit Trypanblau (TB) versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Unter dem Mikroskop ließen sich lebende, farblose Zellen von toten, blau gefärbten Zellen unterscheiden. War ein Auszählen der Zellen aufgrund großer Zellzahlen nicht möglich, wurde das Ausgangsmaterial mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Ausgezählt wurden die vier äußeren Quadrate (Abb. 7).



**Abb. 7: Netzwerkeinteilung einer Neubauerkammer und für die Zellzählung verwendete Quadrate.**

Die Neubauerkammer besteht aus vier äußeren Quadraten ohne und fünf inneren Quadraten mit Netzeinteilung (Abb. 7). Jedes große Quadrat hat eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$ ; dies ergibt bei einer Tiefe von  $0,1 \text{ mm}$  ein Volumen von  $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ .

Die Zellzahl pro ml wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl in 4 Quadraten} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Verdünnungsfaktor (TB)} \cdot 10^4}{4}$$

### ***3.1.4 Aktivierung von Lymphozyten mit unterschiedlichen Stimulatoren***

Zur Stimulation von Lymphozyten wurde ein Basismedium bestehend aus RPMI 1640 mit 100U/l Penicillin, 50mg/l Streptomycinsulfat, 2,7 mM Glutamin und 0,5 g/l Protein aus einer Human-Albumin-Lösung verwendet. Je nach Versuch erfolgte die Zugabe der folgenden Stimulatoren:

- I) PMA: 10 ng/ml und A23187: 100 ng/ml
- II) ConA: 2 µg/ml
- III) PHA-M: 1 µg/ml

Lymphozyten aus lymphozytenreichen Plasmaüberständen wurden mit einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml im beschriebenen Stimulationsmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubator kultiviert.

Die Kultivierung der Zellen wurde nach 6 h (T6), 18 h (T18), 24 h (T24), 48 h (T48), 72 h (T72), 96 h (T96) bzw. 120 h (T120) beendet. Danach wurden die Zellzahlen mit Hilfe der TB-Färbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 200 x g) pelletiert. Die Kulturüberstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert und die Zellsedimente sofort zur RNA-Isolierung verwendet.

### ***3.1.5 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen mittels ELISA***

Die Konzentrationen von IL-1 $\alpha$  und - $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, M-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , OSM, TNF- $\alpha$  und - $\beta$ , RANTES, LIF, und MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$  in den Zellkulturüberständen, den Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3 und dem ConA-Durchlauf bzw. -Eluat von SF0 und SF1 wurde mittels ELISAs der Firma R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) bestimmt.

Die verwendeten ELISAs beruhen auf der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Die Kontrollen und Proben wurden auf Mikrotiterplatten pipettiert, die mit spezifischen, gegen den zu bestimmenden Faktor gerichteten monoklonalen Antikörpern beschichtet waren. Nach Ablauf einer Inkubationszeit, in der die jeweils zu bestimmenden Zytokine an die Antikörper banden, wurden nicht gebundene Faktoren abgewaschen. In einem weiteren Schritt wurde ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter, polyklonaler Zweitantikörper zugesetzt, der an ein anderes Epitop des gebundenen Zytokins band. Nach Entfernen des



überschüssigen Zweitantikörpers durch einen weiteren Waschgang wurde die Substratlösung Tetramethylbenzidin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben. Die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase bewirkte den Umsatz des Substrats zu einem blauen Farbstoff. Durch den Zusatz von Schwefelsäure wurde diese Reaktion gestoppt und ein gelber Farbumschlag erzielt. Mit Hilfe eines Photometers wurde die optische Dichte des umgesetzten Substrates ermittelt, die direkt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe ist.

### ***3.1.6 Serumfreie Suspensionskultur von CD34<sup>+</sup>-Zellen***

Zur Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde ein Basismedium nach Lansdorp und Dragowska (1992) verwendet. Es bestand aus McCoy's 5A mit:

10 mg/l	Insulin (Stocklösung: 1 g/l in IMDM)
200 mg/l	Transferrin (Stocklösung: 20 g/l in IMDM)
10 µmol/l	β-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	Bovines Serumalbumin (Stocklösung: 10 % (w/v) BSA in IMDM; mit Hilfe von 60 g AG-051-X-Resin wurde die Lösung deionisiert [30-60 min], anschließend wurde das Resin mit einem Faltenfilter abfiltriert und die Lösung sterilfiltriert)
100 U/l	Penicillin
50 mg/l	Streptomycinsulfat
40 mg/l	Low-Density Lipoprotein
2,7 mM	Glutamin

Diesem Basismedium wurde durch den Zusatz von Reinigungsfractionen (Abschnitt 2.9), Fractionen von ConA-Chromatographien (Abschnitt 3.3.1) oder Kulturüberständen aus T-Zell-Stimulationsversuchen (Abschnitt 3.1.3) 1 µg Protein/ml Kulturmedium zugesetzt. Rekombinante Wachstumsfaktoren wurden wie folgt eingesetzt:

<u>Zytokinkombination A:</u>	50 ng/ml SCF
	50 ng/ml G-CSF
	10 ng/ml IL-3
	50 U/ml IL-6

Zytokinkombination X: 50 ng/ml G-CSF  
10 ng/ml IL-3  
50 U/ml IL-6

Zytokinkombination L: 25 ng/ml SCF  
25 ng/ml LIF  
100 ng/ml FL

Zytokinkombination M: 25 ng/ml LIF  
100 ng/ml FL

Es wurde eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt und dann in 24-Well-Platten (1 ml pro Well) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium wurde wöchentlich erneuert, die Zellzahl (Vermehrungsfaktor) ermittelt und die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Dazu wurde die gesamte Zellpopulation aus dem Well entnommen, die Zellen gezählt und mit frischem Kulturmedium auf die Ausgangszellzahl umgesetzt. Aliquots der entnommenen Zellpopulation wurden für durchflußzytometrische Analysen (Abschnitt 3.1.7) verwendet.

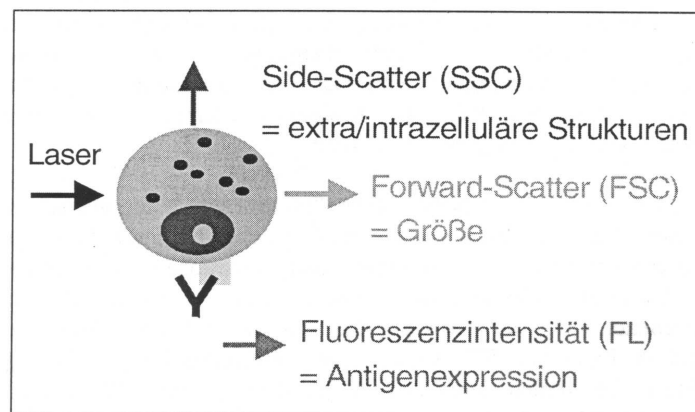
Der Vermehrungsfaktor (Vf) wurde wie folgt berechnet:

$$Vf = \frac{\text{ermittelte Zellzahl}}{\text{Ausgangszellzahl}}$$

### ***3.1.7 Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mittels Durchflußzytometrie***

Die Durchflußzytometrie stellt eine Weiterentwicklung der Immunfluoreszenztechnik dar. An bestimmte Antigene werden fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden. Nach einer hydrodynamischen Fokussierung passieren die Zellen einen Laserstrahl (Argon-Ionen-Laser, 488 nm), der an der Zelle gestreut wird. Die Streuung ist dabei abhängig von der Größe, der Membranstruktur und der Granularität der Zelle. Die Messung des Streulichts in Richtung des einfallenden Laserstrahls (FSC, „forward light scatter“, Vorwärtsstreulicht) gibt Auskunft über die Größe der Zelle: je kleiner die Zelle, um so weniger Licht wird gestreut. Das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht (SSC, „side scatter“,

Seitwärtsstreulicht) ist hauptsächlich von der Granularität der Zelle abhängig. Die Messung der Fluoreszenz-Intensität der durch den Laserstrahl angeregten Fluoreszenzfarbstoffe auf den Zellen macht eine Bestimmung der Antigendichte möglich (Abb. 8). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC; maximale Emission bei 525 nm) und Phycoerythrin (PE; maximale Emission bei 578 nm) verwendet. Zur Unterscheidung lebender und abgestorbener Zellen wurde den Ansätzen Propidiumiodid (PI; maximale Emission bei 611 nm) zugesetzt.



**Abb. 8: Meßparameter (FSC, SSC und Fluoreszenzintensität) der Durchflußzytometrie.**

Pro Testansatz wurden etwa  $1 \times 10^5$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden in FACS-Puffer (5 % FCS in PBS; das FCS wurde vor der Verwendung 1 h bei  $56^\circ\text{C}$  inaktiviert) aufgenommen, zweimal gewaschen (10 min, 200 x g) und anschließend in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. Den Ansätzen wurden die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper (je 10-20  $\mu\text{l}$ ) zugegeben und 20-30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Ansätze durch Zugabe von FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur und 200 x g gewaschen. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Abgestorbene Zellen wurden durch den Zusatz von je 1  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid-Stammlösung (Endkonzentration 0,5 mg/ml) angefärbt und anschließend im Durchflußzytometer gemessen.

Anhand der bei den FACS-Messungen ermittelten antigenpositiven (bzw. antigennegativen) Ereignisse konnte die Zahl der jeweils antigenpositiven (antigennegativen) Zellen in den Kulturen ( $Z_{P/N}$ ) bestimmt werden:

$$Z_{P/N} = \% \text{ Ereignisse (FACS - Messung)} \cdot \text{Zahl der TB - negativen Zellen in der Kultur}$$

Durch die zusätzliche Multiplikation mit dem Vermehrungsfaktor konnte aus diesem Ergebnis die Gesamtzahl der antigenpositiven (antigennegativen) Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum ermittelt werden.

### **3.2 Molekularbiologische Methoden**

Bei allen Arbeiten mit RNA oder mRNA wurde RNase-freies ddH<sub>2</sub>O verwendet. Nach Möglichkeit wurden RNase-freie Einmalartikel benutzt. Alle benötigten Geräte oder Glasmaterialien wurden durch 10 min Inkubation mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung von RNasen befreit. Wahlweise wurde dazu RNaseZAP™ (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

#### ***3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Lymphozyten***

Die Gesamt-RNA von stimulierten und unstimulierten Lymphozyten wurde mit Hilfe von TriReagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) isoliert.

Diese Methode basiert auf einem von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski, 1987) entwickelten Verfahren. Guanidinthiocyanat und Phenol inaktivieren die Nucleasen und denaturieren die DNA- und RNA-assoziierten Proteine. Die Trennung von RNA, DNA und Proteinen erfolgt durch den Zusatz von Chloroform. In der wässrigen Phase befindet sich die RNA, in der organischen Phase die Proteine und in der Interphase die DNA. Die RNA wird durch den Zusatz von Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt.

Die unter 3.1.1 erhaltenen Zellpellets wurden in isotoner Kochsalzlösung gewaschen und durch Zentrifugation (10 min, 200 x g) pelletiert. Auf die trockenen Pellets wurde zur Zellyse pro 5 bis 10x10<sup>6</sup> Zellen 1 ml TriReagent gegeben. Um eine vollständige Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe zu erreichen, wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Probe wurden dann 200 µl Chloroform je ml TriReagent gegeben, die Ansätze gut gemischt und 2-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min, 12.000 x g) wurde die obere wässrige Phase abgenommen, mit 500 µl Isopropanol je ml TriReagent versetzt und 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde schließlich durch erneute Zentrifugation (10 min, 12.000 x g) pelletiert und mit 1 ml 75 % Ethanol je ml TriReagent gewaschen (Zentrifugation 5 min, 7.500 x g). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet 5–10 min bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich wieder in RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde bei -70 °C gelagert.

### ***3.2.2 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA***

Zur Isolierung der mRNA aus Gesamt RNA wurden Dynabeads oligo (dT)<sub>25</sub> (DynaL, Norwegen) verwendet. Es handelt sich hierbei um supermagnetische Kügelchen mit einem Durchmesser von 2,8 µm und einem Kern aus  $\delta\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Eine Polymerhülle schützt die zu bindenden mRNA-Moleküle vor direktem Kontakt mit dem Eisen. Über eine 5'Linker-Gruppe ist eine 25 Nukleotide lange Kette aus Desoxythymidin kovalent an die Polymerhülle gebunden.

Aus 75 µg Gesamt-RNA können mit 200 µl Dynabeads bis zu 2 µg mRNA isoliert werden. Der Lagerungspuffer wurde von den Beads entfernt und diese dann zweimal mit je 100 µl 2x-Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M LiCl; 2 mM EDTA) gewaschen. Die gewaschenen Beads wurden in 100 µl 2x-Bindungspuffer aufgenommen.

75 µg Gesamt-RNA wurden in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und 2 min bei 65 °C inkubiert, um vorhandene Sekundärstrukturen zu zerstören. Die RNA wurde den Beads zugesetzt und die Komponenten gut gemischt. Zur Bindung der mRNA an die Dynabeads wurde die Probe 3–5 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Puffer mit den nicht gebundenen RNA-Spezies entfernt. Die Beads mit der gebundenen mRNA wurden zuerst mit 200 µl Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA) und anschließend mit 200 µl Enzympuffer (z.B. 1x PCR-Puffer) gewaschen, bevor sie in 10-20 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) resuspendiert wurden. Durch 2 min Inkubation bei 65 °C wurde die mRNA von den Beads gelöst und die mRNA-Ausbeute photometrisch bestimmt (Abschnitt 3.2.3).

So verwendete Beads konnten regeneriert und bis zu viermal wiederverwendet werden. Dazu wurden die Beads (Ausgangsvolumen 200 µl) dreimal in je 200 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und jeweils 2 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads viermal mit je 200 µl Lagerungspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 7,0; 20 mM EDTA; 0,1 % (v/v) Tween-20; 0,02 % (w/v) Natriumazid) gewaschen und entweder sofort weiterverwendet, oder aber in Lagerungspuffer bei 4 °C gelagert.

### ***3.2.3 Photometrische Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration***

Zur Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration wurde der GeneQuant II RNA/DNA Calculator der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Bei diesem Photometer handelt es sich um ein Spektralphotometer, mit dem die gleichzeitige Messung

der Proben bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm möglich ist. Die Messungen bei 260 nm und 280 nm dienen der Quantifizierung und Reinheitsüberprüfung, die optische Dichte (OD) bei 320 nm der Hintergrundkompensation. Bei einer Wellenlänge von 230 nm kann die Proteinbestimmung erfolgen.

Für die Messung wurde eine 10 mm-Ultramikroküvette mit einem Mindest-Probenvolumen von 70 µl verwendet.

Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht ca. 50 µg/ml Doppelstrang (ds)-DNA oder 40 µg/ml RNA.

Anhand des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnisses kann die Reinheit der Nukleinsäurepräparation überprüft werden: reine RNA-Präparationen weisen ein OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnis von 2,0 und reine DNA-Präparationen ein Verhältnis von 1,8 auf.

#### ***3.2.4 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese***

Um einen Abbau isolierter RNA durch RNasen ausschließen zu können, wurde die Integrität der RNA mittels denaturierender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Dazu wurde das Horizontal Elektrophorese-System Modell H5 (Life Technologies, Eggenstein) verwendet.

Es wurde ein 1,2 % Agarosegel mit 2 % Formaldehyd und 5 µl 0,01 M Ethidiumbromid-lösung in 1x Laufpuffer (5x Laufpuffer aus 0,1 M MOPS, pH 7,0; 40 mM Na-Acetat; 5 mM EDTA, pH 8,0) hergestellt. Bis zu 30 µg RNA oder 5 µg mRNA (in 4 µl ddH<sub>2</sub>O) wurden mit 15,5 µl Probenpuffer (2 µl 5x Laufpuffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid) vermischt, 15 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Den Proben wurde dann 2 µl Gelladepuffer (50 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau und 0,25 % Xylen-Cyanol) zugesetzt. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte ein fünfminütiger Vorlauf des Gels. Danach wurde die Elektrophorese in 1x Laufpuffer mit 3–4 V/cm durchgeführt. Das im Gel vorhandene Ethidiumbromid konnte an die RNA binden und anschließend unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

#### ***3.2.5 Entfernung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Präparationen***

Da DNA-Reste in einer RNA-Präparation die Ergebnisse einer anschließend durchgeführten RT-PCR verfälschen würden, wurden vorhandene DNA-Kontaminationen mit Hilfe des „Message Clean™ Kits“ (WAK-Chemie, Bad Soden) entfernt.

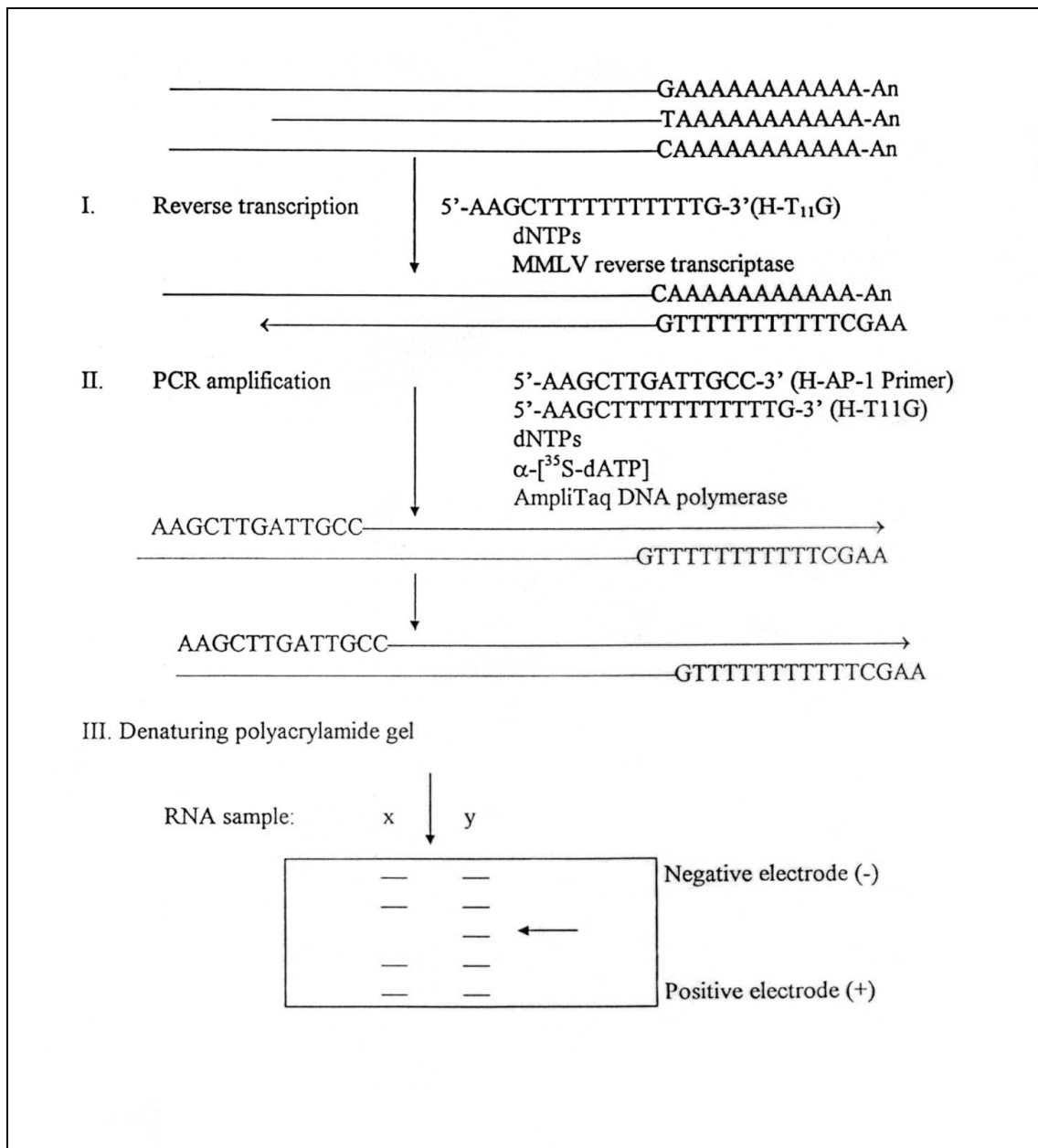
Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurden 10–50 µg Gesamt-RNA in 44 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 5 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl DNase I (10 U) versetzt. Der Ansatz wurde gut vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Proteine wurden durch eine Phenol-Chloroform Extraktion entfernt, indem die jeweilige Probe mit demselben Volumen Phenol-Chloroform (3:1) vermischt wurde. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze 5 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen eisgekühltem 96 % Ethanol vermischt und zur Fällung der RNA für mindestens 1 h bei -70 °C inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 4 °C, 13.000 x g), mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 4 °C, 13.000 x g) und abschließend in 10–20 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### ***3.2.6 mRNA-Differential-Display***

Die Methode des mRNA-Differential-Displays wurde 1992 von Liang und Pardee veröffentlicht und bietet die Möglichkeit, differenziell exprimierte Gene zu identifizieren und später zu klonieren.

Es wurde der „RNAimage™ Kit“ (WAK-Chemie, Bad Soden) verwendet. In einem ersten Schritt wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase und einem oligo-dT Primer die zur mRNA komplementäre cDNA synthetisiert. In einem zweiten Schritt folgt dann die PCR-Amplifizierung der cDNA mit einem randomisierten, degenerierten 10mer Primer und dem oligo dT-Primer aus der reversen Transkriptase-Reaktion. Damit eine empfindliche Detektion der PCR-Produkte möglich ist, wird der Reaktion <sup>33</sup>P-dATP zugesetzt. Die PCR-Produkte werden auf ein DNA-Sequenzierungsgel (6 % denaturierendes Polyacrylamid-Gel) aufgetragen und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 9). Die in die PCR-Produkte eingebaute Radioaktivität wird mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. In diesem Fall kann durch den direkten Vergleich der Bandenmuster von aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen erkannt werden, welche Gene nur von aktivierten, aber nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert werden und umgekehrt.

Ausschließlich bei aktivierten T-Zellen auftretende Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA daraus eluiert und diese dann mit Hilfe eines weiteren PCR-Schrittes vermehrt.



**Abb. 8: Schematischer Ablauf des mRNA-Differential-Displays** (Produktinformationen WAK-Chemie, Bad Soden).

Es wurden Gesamt-RNA-Präparationen von nicht stimulierten Lymphozyten und von Lymphozyten, die für 96 h mit PMA und A23187 stimuliert wurden, verwendet. Für einen 20  $\mu$ l Reaktionsansatz wurden 2  $\mu$ l der DNA-freien RNA-Präparation (0,1  $\mu$ g RNA/ $\mu$ l) mit 9,4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l 5x Reverse Transkriptase-Puffer, 1,6  $\mu$ l dNTP-Mix (250  $\mu$ M) und 2  $\mu$ l H-T<sub>11</sub>A-Primer (2  $\mu$ M) vermischt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt im Thermocycler inkubiert: 5 min bei 65 °C, 60 min bei 37 °C, 5 min bei 75 °C und 5 min bei 4 °C. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurde dem Reaktionsansatz 1  $\mu$ l MMLV Reverse Transkriptase (100 U/ $\mu$ l) zugesetzt. Der Ansatz wurde sorgfältig vermischt und sofort weiter inkubiert. Für



die PCR wurde ein Mix (20  $\mu$ l) aus folgenden Komponenten hergestellt: 9,2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 2,0  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, 1,6  $\mu$ l dNTP-Mix (25  $\mu$ M), 2  $\mu$ l H-AP Primer (2  $\mu$ M), 2  $\mu$ l H-T<sub>11</sub>A (2  $\mu$ M), 2  $\mu$ l des Produkts aus der RT-Reaktion, 1  $\mu$ l  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]dATP (2000 Ci/mmol) und 0,2  $\mu$ l AmpliTaq DNA Polymerase. Die Komponenten wurden gut vermischt und die PCR im Thermocycler wie folgt durchgeführt: 40 Zyklen mit 15 s bei 94 °C, 2 min bei 40 °C und 30 s bei 72 °C. Abschließend wurde 5 min bei 72 °C inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden mittels einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Es wurden der „Gel-Mix 6“ und die Elektrophoreseapparatur „S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus“ der Firma Life Technologies (Eggenstein) verwendet. Dem vorgefertigten „Gel-Mix 6“, der die Reagenzien für ein 6 % denaturierendes Polyacrylamidgel beinhaltet, wurden 450  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfatlösung zugegeben. Zwischen 2 Glasplatten, von denen eine zuvor mit „Gleitsilan“ (Sigmacote; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) behandelt wurde, wurde daraus ein 30x40x0,04 cm großes Gel gegossen. Das Gel polymerisierte innerhalb von 1 h und wurde dann in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Das Gel wurde zunächst während eines 30 minütigen Vorlaufs bei 100 W erwärmt. Von jeder Probe wurden 3,5  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l Ladepuffer versetzt und 2 min auf 80 °C erhitzt. Vor dem Laden der Proben wurden zur Entfernung von Harnstoffresten jeweils 4–6 Probentaschen mit Puffer gespült. Die Elektrophorese wurde dann ca. 3,5 h bei 60 Watt mit konstantem Strom durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer herausgenommen, auf 3M-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) geblottet, mit einer Plastikfolie bedeckt und unter Vakuum in einem Gelrockner (Life Technologies, Eggenstein) bei 80 °C für 1 h getrocknet. Ein Röntgenfilm (Biomax MS1, Sigma-Aldrich) wurde auf das Gel gelegt und über Nacht oder bei Bedarf bis zu 72 h exponiert. Auf dem Autoradiogramm wurden solche Banden markiert, die nur bei den Proben aus aktivierten T-Zellen sichtbar waren. Autoradiogramm und Gel wurden zur Deckung gebracht und die markierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden mit 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O versetzt, zunächst 10 min bei Raumtemperatur und nachfolgend 15 min bei 95 °C inkubiert. Nach 2 min Zentrifugation bei 13.000 x g wurde die im Überstand enthaltene DNA durch den Zusatz von 10  $\mu$ l 3 M Natriumacetat, 5  $\mu$ l Glykogen (10 mg/ml) und 450  $\mu$ l 96% Ethanol gefällt. Nach 30 min Inkubation bei -70 °C wurde die DNA durch Zentrifugation (10 min, 13.000 x g) pelletiert, mit 200  $\mu$ l eiskaltem 85% Ethanol gewaschen und das trockene Pellet anschließend in 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Reamplifikation der Proben wurde ein 40 µl-Mix aus folgenden Komponenten hergestellt: 20,4 µl ddH<sub>2</sub>O, 4,0 µl 10x PCR-Puffer, 3,2 µl dNTP-Mix (250 µM), 4 µl H-AP Primer (2 µM), 4 µl H-T<sub>11</sub>A (2 µM), 4 µl des PCR-Produkts und 0,4 µl AmpliTaq DNA Polymerase. Die Komponenten wurden gut vermischt und die PCR im Thermocycler wie folgt durchgeführt: 40 Zyklen mit 15 s bei 94 °C, 2 min bei 40 °C und 30 s bei 72 °C. Anschließend folgten 5 min Inkubation bei 72 °C.

Die Größe der PCR-Produkte wurde auf einem TBE-Agarosegel überprüft. Anschließend wurden die Amplifikate mit Hilfe des „QIAEX II Gelextraction Kit“ (Qiagen, Hilden; Abschnitt 3.2.9) aus dem Gel eluiert.

### ***3.2.7 Darstellung von PCR-Produkten im TBE-Agarosegel***

Je nach Anzahl der Proben wurde ein TBE-Agarosegel mit 100 ml Volumen („Horizontal Elektrophorese-System Modell H5“; Life Technologies, Eggenstein; 20 Proben) oder mit 300 ml Volumen („Horizon 20-25 Elektrophorese-System“; Life Technologies, Eggenstein; 30 Proben) hergestellt (1,2 % Agarose in 1x TBE-Puffer, 5 µl 0,01 M EtBr).

Soweit nicht anders angegeben wurden 5 µl von jedem PCR-Ansatz mit 1 µl Stoppmix (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Um Menge und Länge der PCR-Fragmente abschätzen zu können, wurden 5-10 µl des DNA-Längenstandards „DNA molecular weight marker XIV“ (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in 1x TBE-Puffer (89,2 mM Tris; 89,0 mM Borsäure; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, pH 8,0) mit einer Spannung von etwa 5 V/cm durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkalierte in die DNA und konnte dann mittels UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

### ***3.2.8 Ankonzentration von PCR-Produkten***

Die PCR-Produkte wurden in „Microcon 100“ (Millipore, Eschborn) überführt und 4 min bei 500 x g zentrifugiert. Durch Umdrehen des Filters und erneute Zentrifugation (1 min, 1.000 x g) ließ sich die zurückgebliebene Flüssigkeit mit den PCR-Produkten eluieren.

Durch diese Ultrafiltration wurde die Lösung auf 5–15 µl eingengt und zugleich von überschüssigen Primermolekülen, nicht eingebauten dNTPs und Pufferkomponenten befreit.

### ***3.2.9 Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen***

Zur Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurde der „QIAEX II Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet.

Dazu wurden die PCR-Produkte zunächst ankonzentriert (Abschnitt 3.2.8) und der gesamte Ansatz auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen (Abschnitt 3.2.7). Unter UV-Licht wurden dann die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und das Gewicht der ausgeschnittenen Gelstücke bestimmt. Je 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer QX1 und je 5 µg DNA, 10 µl "QIAEX II"-Silicagellösung hinzugefügt. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und die Agarose durch 10 min Inkubation im 50 °C warmen Wasserbad geschmolzen. Durch Zentrifugation (30 s, 13.000 x g) wurde das Silicagel mit der gebundenen DNA pelletiert, die Überstände entfernt und das Pellet zuerst in 500 µl Puffer QX1 und danach zweimal in je 500 µl Puffer PE gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer vollständig abgenommen und das Silicagel mit der gebundenen DNA für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Elution der DNA wurden die trockenen Pellets in je 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Silicagel erneut pelletiert (30 s, 13.000 x g). Zur Kontrolle wurden je 2 µl der Eluate im TBE-Agarosegel überprüft.

### ***3.2.10 Blunt-end Ligation***

Zur blunt-end Ligation wurde der „Sure Clone™ Ligation Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet.

Als blunt-end Ligation wird die Verknüpfung zweier DNA-Moleküle mit glatten Enden bezeichnet. Zunächst werden dabei durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität der Klenow-Polymerase einzelsträngige 3'-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte entfernt. Dadurch entstehen blunt-ends, die durch die T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert werden. Anschließend können die DNA-Moleküle durch die T4-DNA-Ligase mit Vektor-DNA (blunt-end und dephosphoryliert) verbunden werden.

In einem ersten Schritt fand eine kombinierte „polish and kinase“-Reaktion statt. Dazu wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz 16 µl der gereinigten PCR-Amplifikate mit 2 µl 10x "Blunting/Kinase"-Puffer, 1 µl Klenow-Fragment und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die Enzyme inaktiviert und Proteine und Nuklease entfernt. Dazu wurde dem Reaktionsansatz 20 µl Phenol-Chloroform (3:1) zugesetzt, dieser gründlich gemischt und für 2 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert. Eine "MicroSpin Column" wurde mit 500 µl Sephacryl

S-200 beladen, der Puffer durch Zentrifugation (30 s, 13.000 x g) entfernt und die DNA-haltige obere Phase der Phenol-Chloroform-Extraktion auf die Säule gegeben. Durch Zentrifugation (30 s, 13.000 x g) wurde die DNA eluiert.

Für die Ligations-Reaktion wurden 7 µl des Produkts aus der "polish and kinase" Reaktion mit 50 ng dephosphoryliertem blunt-end Vektor (pUC18), 10 µl 10x Ligationspuffer, 1 µl 200 mM DTT-Lösung und 1 µl T4-DNA Ligase (8,5 U/µl) vermischt und dann mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h im Thermocycler bei 16 °C inkubiert. Die Ligationsprodukte wurden bis zur Transformation bei -20 °C aufbewahrt.

### ***3.2.11 Transformation rekombinanter Plasmide in kompetente E. coli-Zellen***

Die Transformation rekombinanter Plasmide in kompetente Bakterienzellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983).

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl superkompetente Zellen (Stratagene, Heidelberg) mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min unter wiederholtem Mischen auf Eis inkubiert. Dann wurden 10-20 µl des Ligationsansatzes zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 s bei 42 °C) wurden die Ansätze 2 min auf Eis abgekühlt und mit je 900 µl sterilem SOC-Medium (2 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast-Extrakt, 5 g/l NaCl, 4 g/l Glucose, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub>) versetzt. Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation (30 s bei 13.000 x g) pelletiert wurden. Diese Pellets wurden in 150 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Agarplatten (10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt, 10 g/l NaCl und 15 g/l Bacto-Agar) ausplattiert. Auf die LB-Agarplatten, die zusätzlich Ampicillin (50 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) enthielten, wurden zuvor je Platte 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl 2 % X-Gal (w/v in Dimethylformamid) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### ***3.2.12 Selektion rekombinanter Klone***

Die Selektion rekombinanter Klone erfolgte sowohl über die Antibiotikaresistenz als auch auf biochemischem Weg. Letzterer basiert auf der Verwendung besonderer Vektor/Wirt-Systeme, die nach Rekombination mit Fremd-DNA die Fähigkeit zur Biosynthese von β-Galaktosidase verlieren. Dies kann durch einen Färbetest (blue-white-screen) auf den Agarplatten überprüft

werden (Vieira und Messing, 1982). Dazu werden auf die Platten neben den im Agar enthaltenen Antibiotika die Substanzen IPTG und X-Gal aufgebracht. IPTG wirkt als Induktor des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase und X-Gal dient als Substrat dieses Enzyms. Da durch die enzymatische Spaltung des Substrats ein tiefblauer Farbstoff entsteht, lassen sich nach der Inkubation blaue Bakterienkolonien mit nicht rekombinanten Vektoren von weißen Bakterienkolonien mit rekombinanten Vektoren unterscheiden.

### ***3.2.13 Plasmid-Mini-Präparationen***

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „QIAprep-spin Plasmid Kit“ (Qiagen, Hilden) gewonnen. Bei diesem Verfahren werden die Bakterienzellen in mehreren Schritten aufgebrochen: zunächst wird die äußere Membran durch EDTA destabilisiert, dann die Zellwände mit Hilfe von SDS solubilisiert, die chromosomale DNA mittels alkalischer Hydrolyse (NaOH) abgebaut und die RNA mit RNase A entfernt. Nach Ausfällen der verbliebenen Membranreste erfolgt die Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Ionenaustauschersäule.

Zunächst wurde mit einer weißen Bakterienkolonie eine 5 ml Vorkultur in LB-Medium (10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast-Extrakt, 10 g/l NaCl, 50,0 mg/l Ampicillin, 12,5 mg/l Tetracyclin) angesetzt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln vermehrt, bevor sie durch Zentrifugation (3 min, 13.000 x g) pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in 250  $\mu$ l gekühltem Puffer P1 (mit 100  $\mu$ g/ $\mu$ l RNaseA) resuspendiert. Der durch die Zugabe von 250  $\mu$ l Puffer P2 (Lysepuffer) und 350  $\mu$ l Puffer N3 (Neutralisierungspuffer) entstandene weiße Niederschlag aus chromosomaler DNA, Proteinen und Zelltrümmern wurde durch Zentrifugation (10 min, 13.000 x g) sedimentiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf die "QIAprep-spin"-Säulen gegeben und zentrifugiert (30-60 s, 13.000 x g). Durch Zugabe von 750  $\mu$ l Puffer PE und anschließender Zentrifugation (30-60 s, 13.000 x g) wurde die Plasmid-DNA gewaschen, bevor sie mit 60  $\mu$ l EB-Puffer eluiert wurde. Die Plasmid-DNA-Präparation wurde bei -20 °C gelagert.

Die rekombinanten Plasmide wurden in einem 10  $\mu$ l-Restriktionsansatz überprüft. Dazu wurden 2  $\mu$ l der DNA-Präparation mit 1  $\mu$ l 10x Inkubations-Puffer und jeweils 10 U der Restriktionsendonukleasen Xba I und Eco RI (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) versetzt, 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem TBE-Agarosegel aufgetrennt.

### **3.2.14 RT-PCR**

Für die RT-PCR wurde der „RNA PCR Kit“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet.

In einem ersten Schritt erfolgte die Reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA. Hierzu wurde ein 20 µl-Mix aus den folgenden Komponenten hergestellt: 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 2 µl 10x PCR-Puffer II, 8 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl), 1 µl MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl), 50µM Primer und ≤ 1 µg RNA. Bei Bedarf wurde der Reaktionsansatz mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Der Mix wurde 10 min bei Raumtemperatur, 15 min bei 42 °C, 5 min bei 95 °C und abschließend 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Abschluß der RT-PCR-Reaktion wurde ein 100 µl-Mix für die PCR Amplifikation der cDNA aus den folgenden Komponenten hergestellt: 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 µl 10x PCR-Puffer II, 65,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/µl), je 50 µM der beiden Primer und 20 µl des Produkts aus der RT-Reaktion. Die Komponenten wurden gründlich vermischt und die PCR im Thermocycler wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde 105 s bei 95 °C inkubiert. Dann folgten 40 Zyklen mit 30 s bei 95 °C, 30 s bei 55 °C und 60 s bei 72 °C. Abschließend wurde 7 min bei 72 °C inkubiert.

## **3.3 Proteinchemische Methoden**

### **3.3.1 Affinitätschromatographie mittels ConA**

Zur weiteren Auftrennung der Reinigungsfractionen SF0 und SF1 wurde die Affinitätschromatographie an Concanavalin A (ConA) gewählt. Das Lektin ConA bindet reversibel an die Kernregion von N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten. Es werden sowohl Oligosaccharide vom komplexen, vom mannosereichen oder auch vom Hybridtyp gebunden, sofern die Zuckerketten über zwei nicht-substituierte oder C-2 substituierte α-Mannopyranosylreste in einem Molekül verfügen (Ogata et al., 1975).

Bei der verwendeten ConA-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) handelt es sich um eine kugelförmige Agarosegel-Matrix, an die ConA mittels Cyanbromid-Methode gebunden wurde.

Die Chromatographie-Säule wurde mit 15 ml der ConA-Sepharose-Suspension luftblasenfrei gefüllt, dann mit Bindungspuffer (0,02 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,5 M NaCl) aufgefüllt, an die Peristaltikpumpe angeschlossen und mit mindestens 45 ml Bindungspuffer (dreifaches Säulenvolumen) gespült. Die Probendetektion erfolgte über ein Durchflußphotometer bei

einer Wellenlänge von 280 nm. Nach Einstellen der Basislinie wurde die Säule mit einer Durchflußrate von 1,5 ml/min mit der Probe beladen. Zeigte der Schreiber durch Abweichen von der Basislinie erste Teile der Durchlaufraktion an, wurde mit dem Sammeln begonnen. Bei erneutem Erreichen der Basislinie wurde die Sammlung beendet. Anstelle von Bindungspuffer wurde nun Elutionspuffer (Bindungspuffer plus 0,2 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid) auf die Säule aufgegeben. Die Sammlung der Elutionsfraktion erfolgte nach demselben Prinzip wie bei der Durchlaufraktion. Zur Regeneration der Säule wurde diese zunächst mit mindestens 150 ml Regenerationspuffer 1 (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5; 0,5 M NaCl) und dann mit mindestens 150 ml Regenerationspuffer 2 (0,1 M Natriumacetat, pH 4,5; 0,5 M NaCl) gespült. Anschließend wurde die Säule mit Bindungspuffer äquilibriert und wiederverwendet.

### ***3.3.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteingemischen***

Zur Kontrolle der Chromatographien wurden die Fraktionen in der diskontinuierlichen SDS-PAGE analysiert.

Aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) N,N'-Methylen-bis-Acrylamid wurde eine Acrylamidstammlösung hergestellt. Zu dieser Lösung wurden 10 g des Ionenaustauschers Amberlite AG 501-X8 (D) (Bio Rad Laboratories, München) gegeben und der Ansatz für mindestens 3 h unter Rühren inkubiert. Danach wurde der Ionenaustauscher über einen Faltenfilter abfiltriert. Für ein 15 % Gel mit einer Dicke von 1,5 mm wurden 15 ml der Acrylamidstammlösung, 7,5 ml Trenngelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,8), 7,5 ml ddH<sub>2</sub>O, 150  $\mu$ l 10 % AP und 15  $\mu$ l TEMED vermischt. 25 ml dieser Lösung wurden sofort in die Gelgießkassette gefüllt. Um die Diffusion von polymerisationshemmendem Sauerstoff zu verhindern, wurde das Gel mit 1 ml wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach ca. 30 min war das Gel vollständig polymerisiert und überstehendes Isobutanol konnte abgossen werden. Für die Sammelgellösung wurden 1,3 ml Acrylamidstammlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 6,8), 12,4 ml ddH<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ l 10% AP und 15  $\mu$ l TEMED vermischt. 10 ml der Sammelgellösung wurden auf das auspolymerisierte Trenngel gegeben und ein Probenkamm in das noch flüssige Sammelgel eingesteckt. Nach ca. 20 min war das Sammelgel polymerisiert, der Probenkamm konnte entfernt, das Gel in die Elektrophoreseapparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt und die Probenaschen mit Laufpuffer ausgespült werden. Die Proben selbst wurden jeweils mit dem

gleichen Volumen Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 9 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und in die Probentaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von 80 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mittels kolloidalem Gold sichtbar gemacht.

### ***3.3.3 Elektroblotting von Proteinen auf Nitrocellulosemembrane***

Die Transferkammer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde mit 4 l Transferpuffer (25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 20 % Methanol) gefüllt und dann mit Hilfe eines Umlaufthermostats auf 15 °C gekühlt. Eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) wurde 10 min in Transferpuffer inkubiert und 6 Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt. Auf einem Sandwichhalter wurden zunächst drei der getränkten Filterpapiere übereinander gelegt und darauf dann das Trenngel positioniert. Dann wurde das Trenngel mit der Nitrocellulosemembran und drei weiteren befeuchteten Filterpapieren luftblasenfrei bedeckt und der Sandwichhalter geschlossen. Diese Anordnung wurde so in die Transferkammer eingebracht, daß die Membran an der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite lag. Der Transfer erfolgte dann über Nacht bei einem konstanten Strom von 0,1 A und einer Spannung von 20 V.

### ***3.3.4 Färbung mit kolloidalem Gold***

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen für 1,5-2,5 h bei Raumtemperatur unter Schütteln in einer sogenannten Quenchlösung (PBS, 0,5 % [v/v] TWEEN-20) inkubiert, dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet.

Zur Herstellung der Goldfärbelösung wurden 0,001 % (w/v) Tetrachlorogoldsäure in ddH<sub>2</sub>O aufgeköcht und dann der kochenden Flüssigkeit 10 ml 10 % (w/v) Natriumcitratlösung zugegeben. Nach dem Farbumschlag von gelb nach dunkelrot wurde die Lösung abgekühlt und mit 10 ml 20 % (v/v) TWEEN-20 und 10 ml 20 % (v/v) Citronensäure versetzt.

Die getrocknete Membran wurde für 10–20 h bei Raumtemperatur unter Schütteln in der Goldfärbelösung inkubiert, danach dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut getrocknet.



## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Charakterisierung von Kulturüberständen aktivierter T-Zellen, von Reinigungsfraktionen sowie von Fraktionen der ConA-Chromatographien mittels ELISA

Bevor untersucht werden konnte, inwiefern die von A23187/PMA-stimulierten T-Zellen sezernierten Faktoren die Kultivierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen beeinflussen, mußte die Zusammensetzung der vorhandenen Faktorengemische möglichst genau charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurde die Konzentration verschiedener hämatopoeserelevanter Zytokine mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISAs bestimmt. Auf diesem Weg konnte zwar nicht jede Komponente des Gemisches ermittelt werden, aber für die wichtigsten hämatopoeserelevanten Zytokine war eine Quantifizierung möglich.

Tabelle 1 zeigt die mittels der ELISAs ermittelten Zytokinkonzentrationen. Die angegebenen Zytokinkonzentrationen für die Kulturüberstände sind Mittelwerte aus zwei Stimulationen, die der Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3 sind Mittelwerte von jeweils drei (SF0 und SF1) bzw. zwei (SF3) Fraktionen.

In den Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen konnte mit der Dauer der Aktivierung ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen beobachtet werden. Für die meisten Zytokine wurde die maximale Konzentration nach 96 h erreicht. Bei einigen Zytokinen wie z.B. IL-10, TNF- $\alpha$  oder TNF- $\beta$  sank die Konzentration aber bereits nach 72 h wieder ab. Die angegebenen Zytokinkonzentrationen sind die Mittelwerte aus zwei Aktivierungsexperimenten.

In den Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3 waren die einzelnen Zytokinkonzentrationen deutlich höher als in den Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen, da die Proben während der Aufreinigung auch ankonzentriert wurden. Für jedes Zytokin war eine Anreicherung in einer der drei Fraktionen zu beobachten, jedoch fanden sich in den beiden anderen Fraktionen immer noch Reste des jeweiligen Zytokins. Nach der Kationenaustausch-Chromatographie konnten in der Durchlaufraction SF0 die größten Mengen der Zytokine IL-1 $\alpha$  und - $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , G-CSF, M-CSF und GM-CSF gefunden werden. In der Elutionsfraktion SF1 konnten die größten Mengen IL-13, OSM, TNF- $\alpha$ , LIF und MIP-1 $\beta$ , und in der Fraktion SF3 die größten Mengen IL-4, IL-10, IL-17, TNF- $\beta$  und RANTES nachgewiesen werden. Bei den angegebenen Zytokinkonzentrationen handelt es sich um die Mittelwerte von drei (SF0 und SF1) bzw. zwei (SF3) verschiedenen Reinigungsfraktionen.

	<b>T6</b>	<b>T18</b>	<b>T24</b>	<b>T48</b>	<b>T72</b>	<b>T96</b>	<b>SF0</b>	<b>SF1</b>	<b>SF3</b>	<b>SF0 ConA D</b>	<b>SF0 ConA E</b>	<b>SF1 ConA D</b>	<b>SF1 ConA E</b>
	<b>Zytokinkonzentration (pg/ml)</b>												
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	nb	nb	15	3	34	32	5.900	59	15	4.580	11	8	9
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	nb	nb	261	4	132	113	9.700	1.300	15	8.300	7	1.100	17
<b>IL-3</b>	20	230	340	1.200	3.270	4.330	4.322.200	77.300	2.700	2.155.500	4.222.200	45.330	8.500
<b>IL-4</b>	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	28.800	uN	uN	uN	uN
<b>IL-5</b>	nb	nb	85	14	164	150	23.100	1.900	98	2.100	28.560	238	1.780
<b>IL-6</b>	200	1.420	3.900	15.800	32.300	29.550	3.352.000	694.700	3.880	3.357.980	2.880.000	3.146.700	164.500
<b>IL-10</b>	22	124	408	50	2.500	2.200	5.300	1.780	57.800	16.670	83	18.560	53
<b>IL-13</b>	nb	nb	nb	nb	nb	nb	15.700	15.900	10.720	5.720	19.800	3.960	11.700
<b>IL-15</b>	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN	uN
<b>IL-17</b>	nb	nb	220	110	830	310	43	250	4.070	40	266	33	389
<b>M-CSF</b>	nb	nb	1.100	170	1.930	2.200	3.800	150	44	375	8.375	90	209
<b>GM-CSF</b>	2.930	13.500	22.000	nb	20.450	23.500	5.764.000	7.550	890	5.658.800	2.526.720	2.895	3.106
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	nb	nb	nb	nb	nb	nb	2.012.500	794.400	6.700	166.900	4.268.750	1.625.000	6.737.500
<b>OSM</b>	nb	nb	nb	nb	nb	nb	5.500	13.700	4.200	1.570	8.110	639	27.610
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	880	1.080	1.640	3.520	5.860	2.960	578.280	262.620	50.480	509.590	10.610	126.960	14.740
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	nb	nb	240	55	3.900	3.200	23.400	6.970	244.550	1.646	71.640	398	10.910
<b>RANTES</b>	22.600	38.500	43.350	54.200	40.400	51.000	6.800	350	10.888.800	4.490	40	191	17
<b>LIF</b>	11	uN	19	85	5.560	7.000	uN	2.430	1.640	256	689	756	3.767
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	620	520	6.800	42.250	67.600	81.600	692.200	12.400	14.100	16.090	80	34.045	2.035
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	1.300	4.600	4.600	17.300	32.100	42.000	39.500	206.900	7.800	nb	nb	nb	nb

**Tab. 1: Konzentrationen (in pg/ml) unterschiedlicher Zytokine in den Zellkulturüberständen A23187/PMA-stimulierter T-Zellen, in den Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3 und in den Fraktionen (ConA Durchlauf und ConA Eluat) der ConA Chromatographien von SF0 und SF1.**

nb: nicht bestimmt, uN: unter der Nachweisgrenze

Auch die ConA-Chromatographie von SF0 und SF1 bewirkte eine Auftrennung der Faktorengemische. Während Faktoren wie z.B. IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ , OSM und TNF- $\beta$ , im Eluat angereichert wurden, wurden Faktoren wie z.B. IL-1 $\alpha$  und - $\beta$ , IL-10, RANTES und MIP-1 $\beta$  im Durchlauf abgetrennt. Jedoch konnten die genannten Zytokine auch in der jeweils anderen Fraktion in deutlich geringeren Konzentrationen ebenfalls nachgewiesen werden. Die Zytokine IL-3, IL-6 und GM-CSF ließen sich sowohl im Eluat als auch im Durchlauf in größeren Konzentrationen nachweisen.

Die durch Addition der Zytokinkonzentrationen von ConA-Eluat und ConA-Durchlauf erhaltenen Konzentrationen weichen zum Teil deutlich von den Zytokinkonzentrationen in SF0 und SF1 ab, da es sich bei den für die Reinigungsfractionen SF0 und SF1 angegebenen Zytokinkonzentrationen um Mittelwerte aus drei verschiedenen Fraktionen handelt.

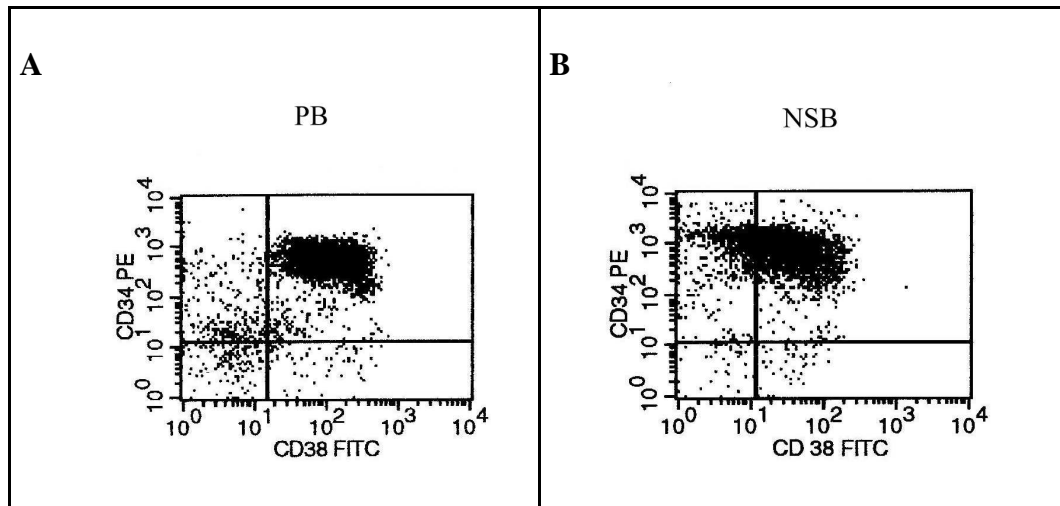
Kulturüberstände, Reinigungsfractionen und Fraktionen der ConA-Chromatographien wurden dem Kulturmedium der CD34<sup>+</sup>-Zellen in unterschiedlichen Mengen zugesetzt. Daher mußten anhand der in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen die letztendlich im Medium vorhandenen Zytokinkonzentrationen berechnet werden. Nähere Angaben dazu finden sich in den Abschnitten, in denen auch die jeweiligen Kultivierungsexperimente beschrieben werden.

#### **4.2 Isolierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen**

Es wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB (Buffy Coats) und NSB angereichert. Dazu wurden zunächst mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen isoliert, aus denen dann in einem zweiten Schritt durch immunmagnetische Zellseparation die CD34<sup>+</sup>-Zellen isoliert wurden (siehe Abschnitt 3.1.2).

Die Anreicherung der CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Resultate einer durchflußzytometrischen Analyse für die Oberflächenmoleküle CD34 und CD38.

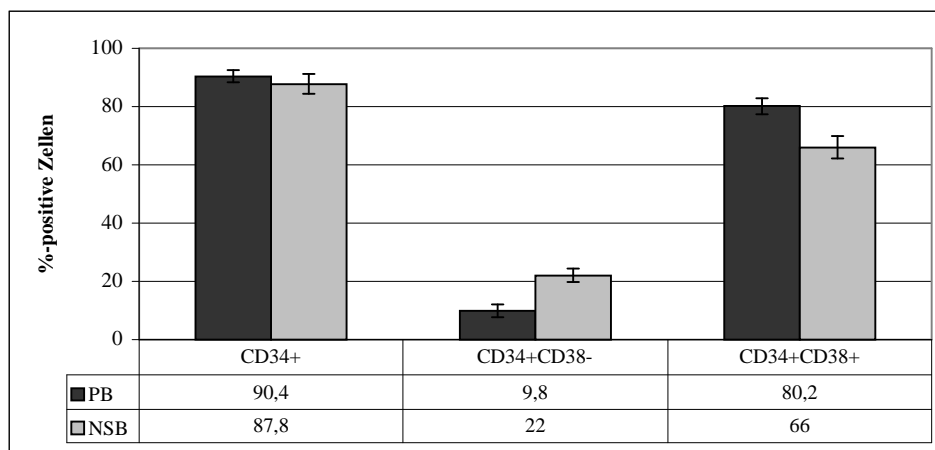
Nach diesen beiden Anreicherungen konnte auf fast allen Zellen das CD34 Antigen nachgewiesen werden (97 % bzw. 98 % der gemessenen Ereignisse). Die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Subpopulation war in der Anreicherung aus NSB mit 22 % gegenüber 5 % der gemessenen Ereignisse deutlich größer als in der aus PB.



**Abb. 9: Expression der Oberflächenmoleküle CD34 und CD38 nach Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus (A) PB und (B) NSB.**

A: 5 % CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, 92 % CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, 2 % CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>, 1 % CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>, insgesamt 97 % CD34<sup>+</sup>  
 B: 22 % CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, 76 % CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, 1 % CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>, 1 % CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>, insgesamt 98 % CD34<sup>+</sup>

In Abbildung 10 ist die CD34- und CD38-Antigenexpression zusammenfassend für alle Anreicherungen dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für den Gesamtanteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen sowie die Anteile an frühen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) und späteren (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) hämatopoetischen Zellen aus 88 NSB- und 52 PB-Präparationen.



**Abb. 10: Gehalt an CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen in den Anreicherungen aus PB und NSB.**

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 52 PB- und 88 NSB-Proben.

Durch immunmagnetische Zellseparation wurde eine mittlere Reinheit der CD34<sup>+</sup>-Zellen von etwa 90 % erreicht. Diese liegt im Bereich der laut Hersteller (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) zu erwartenden 85–98 % Reinheit.

In den Reinigungsfraktionen aus NSB war im Vergleich zu denen aus PB ein größerer Anteil früher hämatopoetischer Zellen vorhanden. Der Anteil an CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen betrug in den NSB-Anreicherungen 22,0 % und in den PB-Anreicherungen 9,8 %. Entsprechend waren in den Anreicherungen aus PB mehr späte hämatopoetische Zellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, 80,2 % gegenüber 66,0 %) enthalten.

Bezogen auf die Gesamtpopulation der CD34<sup>+</sup>-Zellen waren in den Präparationen aus NSB und PB also 25 % bzw. 11 % frühe hämatopoetische Zellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) und 75 % bzw. 89 % spätere hämatopoetische Zellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) vorhanden. Die Experimente anderer Arbeitsgruppen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Bender et al. (1994) konnten beispielsweise ebenfalls 25 % der aus NSB isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen als CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen identifizieren. Sato und Mitarbeiter (1993) konnten in ihren Anreicherungsfraktionen aus PB 18 % der CD34<sup>+</sup>-Zellen als CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> identifizieren.

Die zum Teil geringfügigen Unterschiede in den Populationsgrößen sind vermutlich einerseits auf individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern und andererseits auf jeweils unterschiedliche Isolationsmethoden zurückzuführen, die möglicherweise eine vermehrte Anreicherung der einen oder anderen Subpopulation bewirkten.

Weiterhin wurde deutlich, daß sich NSB und PB auch aufgrund ihres Gehaltes an CD34<sup>+</sup>-Zellen unterschieden. Aus den 52 untersuchten Buffy Coats – diese entsprechen jeweils 500 ml Vollblut – konnten zwischen  $5,4 \times 10^4$  und  $1,2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>-Zellen isoliert werden. Jedoch wurden aus den 88 NSB-Proben, deren einzelne Volumina von 6 bis 40 ml schwankten, je  $1,8 \times 10^4$  bis  $8,3 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>-Zellen isoliert. Mittels immunmagnetischer Zellseparation konnte aus PB und NSB jeweils eine CD34<sup>+</sup>-Zelle pro 11.700 ( $\pm 24.100$ ) bzw. 1.600 ( $\pm 1.800$ ) mononukleäre Zellen isoliert werden. Auch diese Werte decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen. Broxmeyer et al. (1989) konnten beispielsweise aus NSB und PB etwa 1-5 CD34<sup>+</sup>-Zellen pro 1.000 bzw. 20.000 mononukleäre Zellen isolieren.

Anhand des CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>C38<sup>-</sup>-Zellgehalts der Anreicherungsfraktionen (Abb. 10) konnten die Ausgangszellzahlen der Kultivierungsexperimente bestimmt werden. Da die Kultivierungsexperimente mit jeweils  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml gestartet wurden, enthielten die Kulturen aus PB je  $2,3 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>- und je  $2,4 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen/ml (90,4 % bzw. 9,8 %), die Kulturen aus NSB je  $2,2 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>- und je  $5,5 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>C38<sup>-</sup>-Zellen/ml (87,8 % bzw. 22,0 %).

### 4.3 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen unter Zusatz von Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen

Für die Kultivierungsexperimente wurden Kulturüberstände von Lymphozyten verwendet, die für 6 bis 96 h mit dem Kalziumionophor A23187 und dem Phorbolster PMA aktiviert worden waren. Die Kultivierung der aus PB und NSB isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgte in serumfreien Suspensionskulturen unter Zusatz von 1 % (v/v) der entsprechenden Zellkulturüberstände.

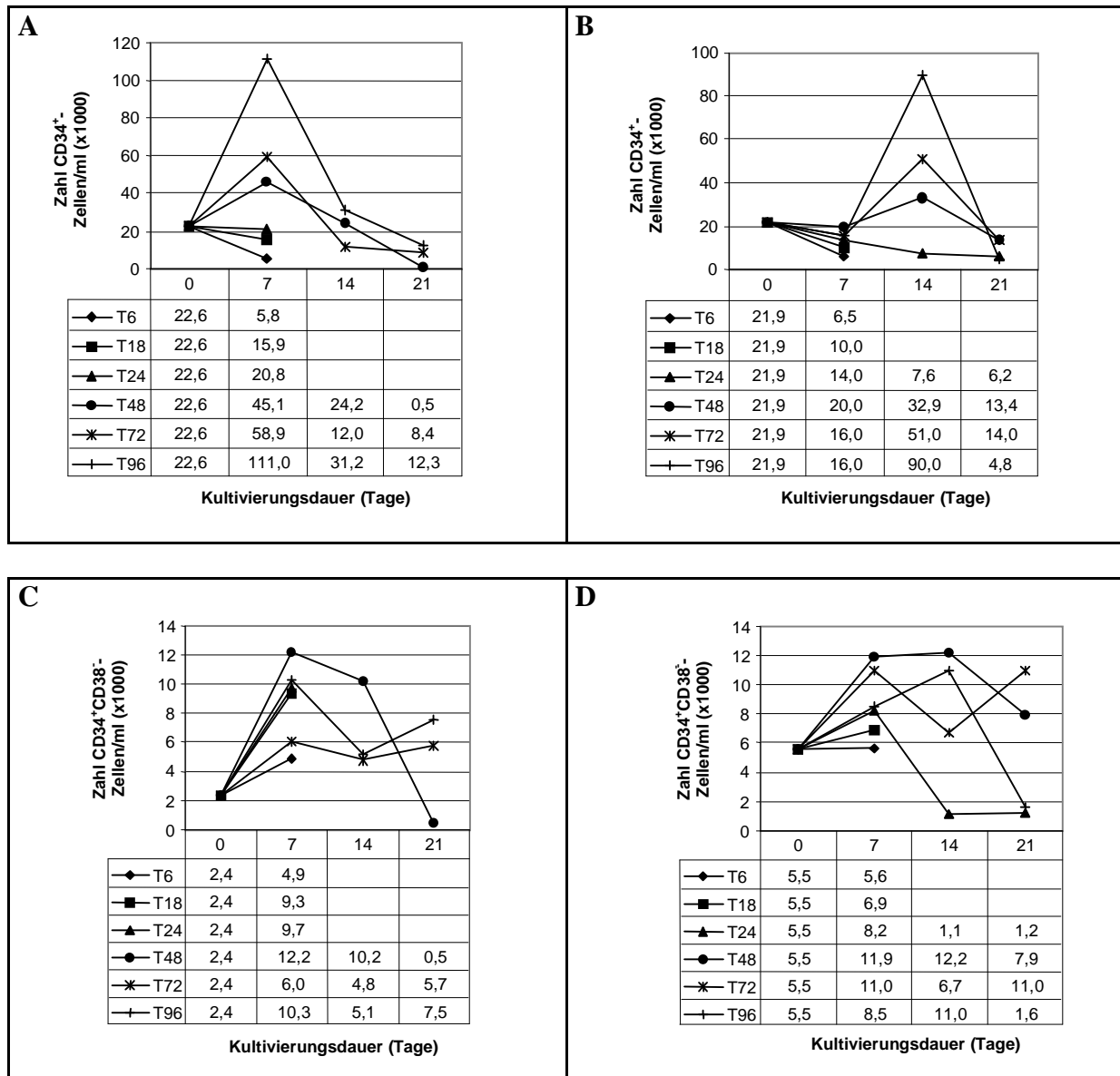
Mittels Kontrollexperimenten wurde vorab ausgeschlossen, daß Komponenten des T-Zell-Stimulationsmediums die Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen beeinflussen konnten. Dazu wurden die CD34<sup>+</sup>-Zellen in einem Kontrollmedium kultiviert, das neben der Zytokinkombination A (50 ng/ml SCF, 50 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml IL-3 und 50 U/ml IL-6) auch 1 % (v/v) des T-Zell-Stimulationsmediums enthielt. Diese Experimente zeigten, daß das T-Zell-Stimulationsmedium die durch die Zytokinkombination A hervorgerufene Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (Abschnitt 4.5) nicht beeinflusste. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wurde verzichtet.

In den Abbildungen 11 A-D ist die Vermehrung von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen unter dem Einfluß der Kulturüberstände aktivierter T-Zellen dargestellt. Ausgehend von der Ausgangszellzahl an Tag 0 (Abschnitt 4.2) ist die wöchentliche Entwicklung der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellzahl abgebildet.

Unter dem Einfluß der Zellkulturüberstände aktivierter T-Zellen war nur eine sehr geringe Vermehrung von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen zu beobachten, wobei die Zellen aus PB mit einer geringfügig stärkeren Proliferation reagierten als die aus NSB. Die jeweils beste Vermehrung wurde durch die Verwendung der Zellkulturüberstände T96, T72 und T48 erreicht. Für CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB wurde die maximale Zellzahl an Tag 7, für die aus NSB an Tag 14 erreicht. Mit T96 konnte eine Vermehrung der Zellen aus PB um den Faktor 5,0 (von  $2,3 \times 10^4$  auf  $1,1 \times 10^5$  Zellen/ml) und der Zellen aus NSB um den Faktor 4,1 (von  $2,2 \times 10^4$  auf  $9,0 \times 10^4$  Zellen/ml) erreicht werden.

Bei der Vermehrung früher CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB und NSB konnten größere Unterschiede beobachtet werden. Zwar waren die erreichten Zellzahlen ungefähr gleich groß, da sich aber in den Isolaten aus PB weniger CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen befanden als in den Isolaten aus NSB, war der Vermehrungsfaktor für die Zellen aus PB deutlich höher. Die beste Vermehrung früher hämatopoetischer Zellen wurde für Zellen aus PB und NSB bei

Verwendung des Kulturüberstands T48 erreicht. Hier kam es zu einer maximalen Vermehrung der Zellen aus PB um den Faktor 5,1 (auf  $1,2 \times 10^4$  Zellen/ml) und aus NSB um den Faktor 2,2 (auf  $1,2 \times 10^4$  Zellen/ml).



**Abb. 11A-D:** Vermehrung von CD34<sup>+</sup>-Zellen (A und B) und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (C und D) aus PB (A und C) und aus NSB (B und D) unter dem Einfluß der Zellkulturüberstände T6, T18, T24, T48, T72 und T96. Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Experimenten.

Bei Verwendung der Zellkulturüberstände T6, T18 und T24 konnte keine Vergrößerung der CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation erreicht werden. Die Subpopulation der frühen hämatopoetischen Zellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen) hingegen konnte geringfügig vergrößert werden. So ergab sich beispielsweise bei Verwendung des Zellkulturüberstands T18 für Zellen aus PB eine

Vermehrung um den Faktor 3,8 (auf  $9,3 \times 10^3$  Zellen/ml) und für Zellen aus NSB eine Vermehrung um den Faktor 1,3 (auf  $6,9 \times 10^3$  Zellen/ml).

Wurde der Kulturüberstand nicht stimulierter T-Zellen verwendet, wobei die T-Zellen für 24 h im Medium ohne Zusatz von PMA und A23187 belassen wurden, so ließen sich bereits nach 7 Tagen keine lebenden hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mehr nachweisen (Daten hier nicht dargestellt).

Die Vermehrungsraten von  $CD34^+$ - und  $CD34^+CD38^-$ -Zellen müssen in Relation zu den im Kulturmedium vorhandenen Zytokinkonzentrationen gesetzt werden. In Tabelle 1 sind die Konzentrationen verschiedener von T-Zellen synthetisierter hämatopoeserelevanter Zytokine in den Zellkulturüberständen zusammengefaßt. Da die Zellkulturüberstände dem Kulturmedium nur 1%ig (v/v) zugegeben wurden, sind die Zytokinkonzentrationen im Medium entsprechend um den Faktor 100 geringer. In Tabelle 3 sind die Konzentrationen der Zytokine angegeben, deren letztendliche Konzentration im Kulturmedium größer als 10 pg/ml ist.

	<b>T6</b>	<b>T18</b>	<b>T24</b>	<b>T48</b>	<b>T72</b>	<b>T96</b>
	<b>Zytokinkonzentration (pg/ml)</b>					
<b>IL-3</b>	<10	<10	<10	12	33	43
<b>IL-6</b>	<10	14	39	158	323	296
<b>IL-10</b>	<10	<10	<10	<10	25	22
<b>M-CSF</b>	n.b.	n.b.	11	<10	19	22
<b>GM-CSF</b>	29	135	220	n.b.	205	235
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<10	11	16	35	59	30
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	n.b.	n.b.	<10	<10	39	32
<b>RANTES</b>	226	385	434	542	404	510
<b>LIF</b>	<10	<10	<10	<10	56	70
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<10	<10	68	423	676	816
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	13	46	46	173	321	420

**Tab. 3: Konzentrationen verschiedener Zytokine im Kulturmedium der  $CD34^+$ -Zellen nach Zusatz von 1 % (v/v) T6, T18, T24, T48, T72 oder T96.**

Aufgeführt sind nur Zytokine mit einer Konzentration größer als 10 pg/ml.

Die Zytokinkonzentrationen im Medium der  $CD34^+$ -Zellen waren nach Zusatz von T6, T18, T24, T48, T72 und T96 sehr gering. Von T6 zu T96 konnte aber ein Anstieg der Zytokinkonzentration beobachtet werden.



Bei Verwendung von T18 ergab sich im Kulturmedium der CD34<sup>+</sup>-Zellen eine maximale Konzentration eines einzelnen Zytokins von 385 pg/ml (RANTES). Weitere Hauptkomponenten stellten MIP-1 $\beta$  (46 pg/ml), IL-6 (14 pg/ml) und GM-CSF (135 pg/ml) dar.

Der Zusatz von T96 führte zu deutlich höheren Zytokinkonzentrationen. Dies betraf Zytokine wie IL-3 (43 pg/ml), IL-6 (296 pg/ml), LIF (70 pg/ml) und GM-CSF (235 pg/ml), die auf frühe, linienunspezifische Vorläuferzellen wirken und Zytokine wie M-CSF (22 pg/ml), die auf spätere, bereits linienspezifische Vorläuferzellen wirken. Aber auch die Konzentrationen inhibitorisch wirkender Zytokine wie z.B. MIP-1 $\alpha$  (816 pg/ml) und TNF- $\alpha$  (30 pg/ml) waren größer.

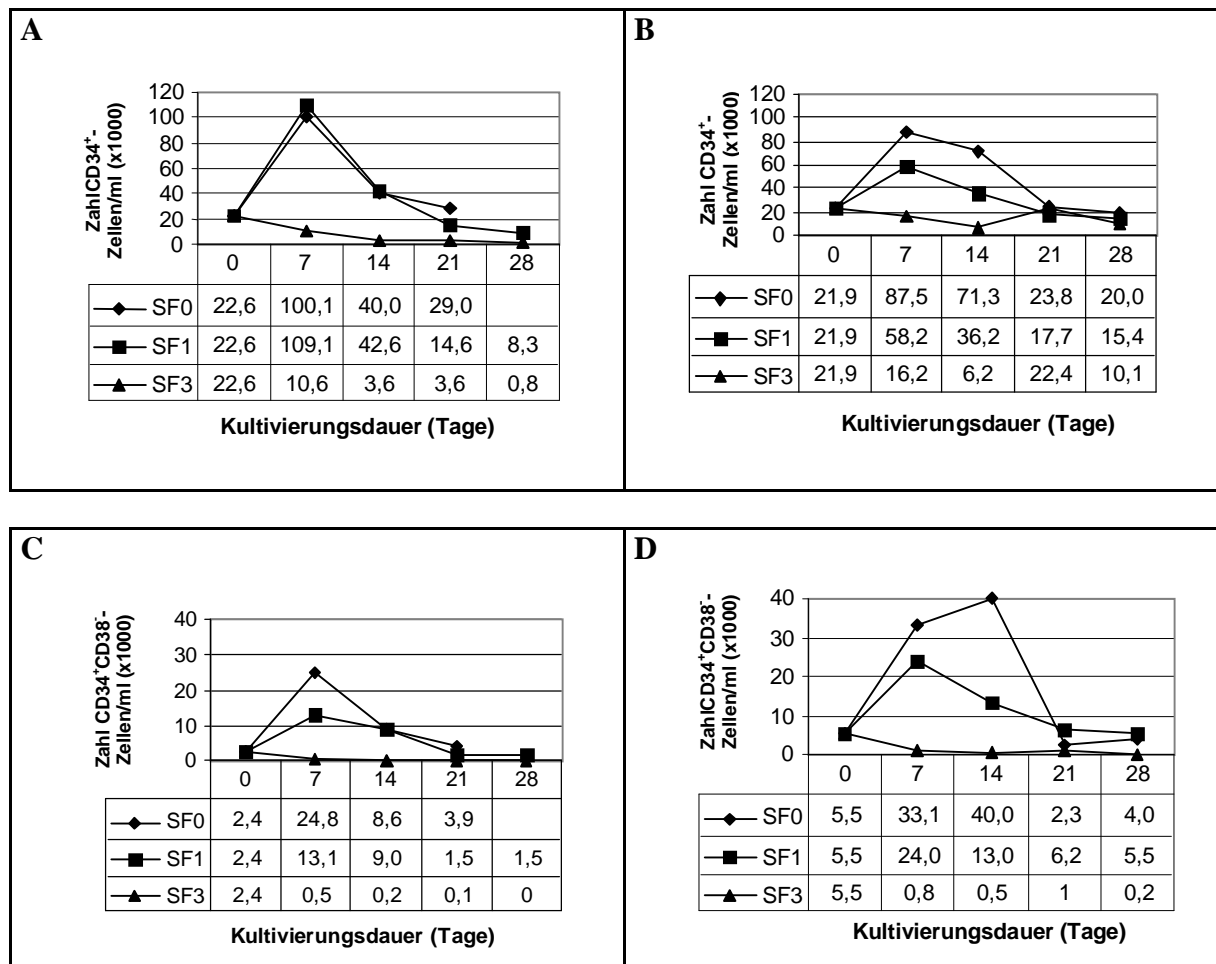
#### **4.4 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen unter Zusatz der Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3**

Bei den Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3 handelt es sich um Randfractionen eines IL-2 Reinigungsganges. Im Zuge der Gewinnung von humanem IL-2 wurden die Zellkulturüberstände aktivierter T-Zellen zunächst über Silicagel ankonzentriert und dann einer Kationenaustausch-Chromatographie an S-Sepharose unterzogen. Bei den hier verwendeten Fractionen handelt es sich um den Durchlauf SF0 und die beiden Eluate SF1 und SF3 dieser Chromatographie. Die Kultivierung der aus PB und NSB isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgte unter Zusatz von 0,2 % (v/v) der jeweiligen Reinigungsfraction zum Medium.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde untersucht, ob die Pufferzusammensetzungen der Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3 die Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen beeinflussen. Dazu wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen in einem Kontrollmedium kultiviert, das neben der Zytokinkombination A (50 ng/ml SCF, 50 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml IL-3 und 50 U/ml IL-6) auch 0,2 % (v/v) der jeweiligen Puffer enthielt. Mit diesen Experimenten konnte belegt werden, daß die in den Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3 enthaltenen Puffer die durch die Zytokinkombination A hervorgerufene Proliferation von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (Abschnitt 4.5) nicht beeinflußten. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wurde verzichtet.

Wie in Abbildung 12 A-D zu erkennen ist, konnte sowohl die Subpopulation der frühen hämatopoetischen Stammzellen, als auch die der CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation am besten mit den Reinigungsfractionen SF0 und SF1 vermehrt werden. Mit SF1 konnte an Tag 7 eine Vergrößerung der CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation um den Faktor 4,8 (PB) bzw. 2,7 (NSB), mit SF0

um den Faktor 4,4 (PB) bzw. 4,0 (NSB) erzielt werden.  $CD34^+CD38^-$ -Zellen konnten mit der Reinigungsfraction SF0 um den Faktor 10,3 (PB) bzw. 7,3 (NSB), mit der Reinigungsfraction SF1 um den Faktor 5,5 (PB) bzw. 4,4 (NSB) vermehrt werden. Unter dem Einfluß der Reinigungsfraction SF3 war kein Anstieg der  $CD34^+$ - oder  $CD34^+CD38^-$ -Zellzahlen zu beobachten.



**Abb. 12A-D:** Vermehrung von  $CD34^+$ -Zellen (A und B) und  $CD34^+CD38^-$ -Zellen (C und D) aus PB (A und C) und aus NSB (B und D) unter dem Einfluß der Reinigungsfractionen SF0, SF1 und SF3.

Dem Kulturmedium wurden jeweils 0,2% (v/v) der entsprechenden Reinigungsfractionen zugesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte von: SF0: 16 NSB, 9 PB; SF1: 30 NSB, 23 PB und SF3: 13 NSB und 8 PB Experimenten.

Da die Vermehrung hämatopoetischer Zellen in Relation zu den vorhandenen Zytokin-konzentrationen gesetzt werden muß, sind in Tabelle 4 die Konzentrationen einiger Zytokine im Kulturmedium aufgeführt. Es wurden nur Zytokine mit einer Konzentration größer als 100 pg/ml berücksichtigt. Die Zytokinkonzentrationen im Kulturmedium wurden rechnerisch

aus den Zytokinkonzentrationen in den Reinigungsfractionen ermittelt (Abschnitt 4.2.1 Tab. 1).

Tabelle 4 zeigt, daß das SF0-haltige Kulturmedium über die größten Konzentrationen von Zytokinen verfügte, die frühe linienunspezifische Vorläuferzellen stimulieren (IL-3, IL-6 und GM-CSF). Auch Zytokine die spätere, bereits linienspezifische Vorläuferzellen stimulieren (z.B. M-CSF und IL-5; beide Zytokine sind in Tabelle 4 aufgrund zu niedriger Konzentration nicht aufgeführt), waren im Medium in äußerst geringen Konzentrationen vorhanden. Hinzu kamen auch größere Konzentrationen inhibitorisch wirkender Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$ ). Die Konzentrationen stimulierend und inhibierend wirkender Zytokine waren im SF1-haltigen Kulturmedium deutlich geringer als im SF0-haltigen Kulturmedium. Im SF3-haltigen Kulturmedium konnten nur sehr geringe Konzentrationen hämatopoesestimulierender Zytokine detektiert werden.

	SF0	SF1	SF3
	Zytokinkonzentration (pg/ml)		
<b>IL-3</b>	8.644	155	<100
<b>IL-6</b>	6.704	1.389	<100
<b>IL-10</b>	<100	<100	116
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	4.025	1.589	<100
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1.157	525	101
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	<100	<100	489
<b>RANTES</b>	<100	<100	21.778
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	1.384	<100	<100
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<100	414	<100
<b>GM-CSF</b>	11.528	<100	<100

**Tab. 4: Konzentrationen verschiedener hämatopoeserelevanter Zytokine im Kulturmedium der CD34<sup>+</sup>-Zellen nach Zusatz von 0,2 % (v/v) SF0, SF1 bzw. SF3.**

Angegeben sind nur Zytokine mit einer Konzentration  $\geq 100$  pg/ml.

#### **4.5 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen unter Zusatz verschiedener rekombinanter Zytokine**

Mittels der in dieser Arbeit beschriebenen Kultivierungsexperimente sollte nach Hinweisen auf bislang unbekannt T-Zellfaktoren mit hämatopoetischer Wirkung gesucht werden. Die in den Abschnitten 4.2 und 4.3 beschriebenen Experimente dienten zunächst der Untersuchung, wie stark hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen durch Gemische von T-Zellfaktoren vermehrt werden konnten und auf welche Subpopulationen die größte Wirkung erzielt werden konnte. Diese Experimente belegten, daß die getesteten Faktorengemische besonders die Proliferation früher linienunspezifischer Vorläuferzellen bewirkten. Daher wurde nachfolgend versucht, ob mittels Kombination verschiedener, auf frühe hämatopoetische Vorläuferzellen

wirkender Zytokine mit der Reinigungsfraction SF1 Hinweise auf unbekannte Faktoren in der Reinigungsfraction SF1 gefunden werden können.

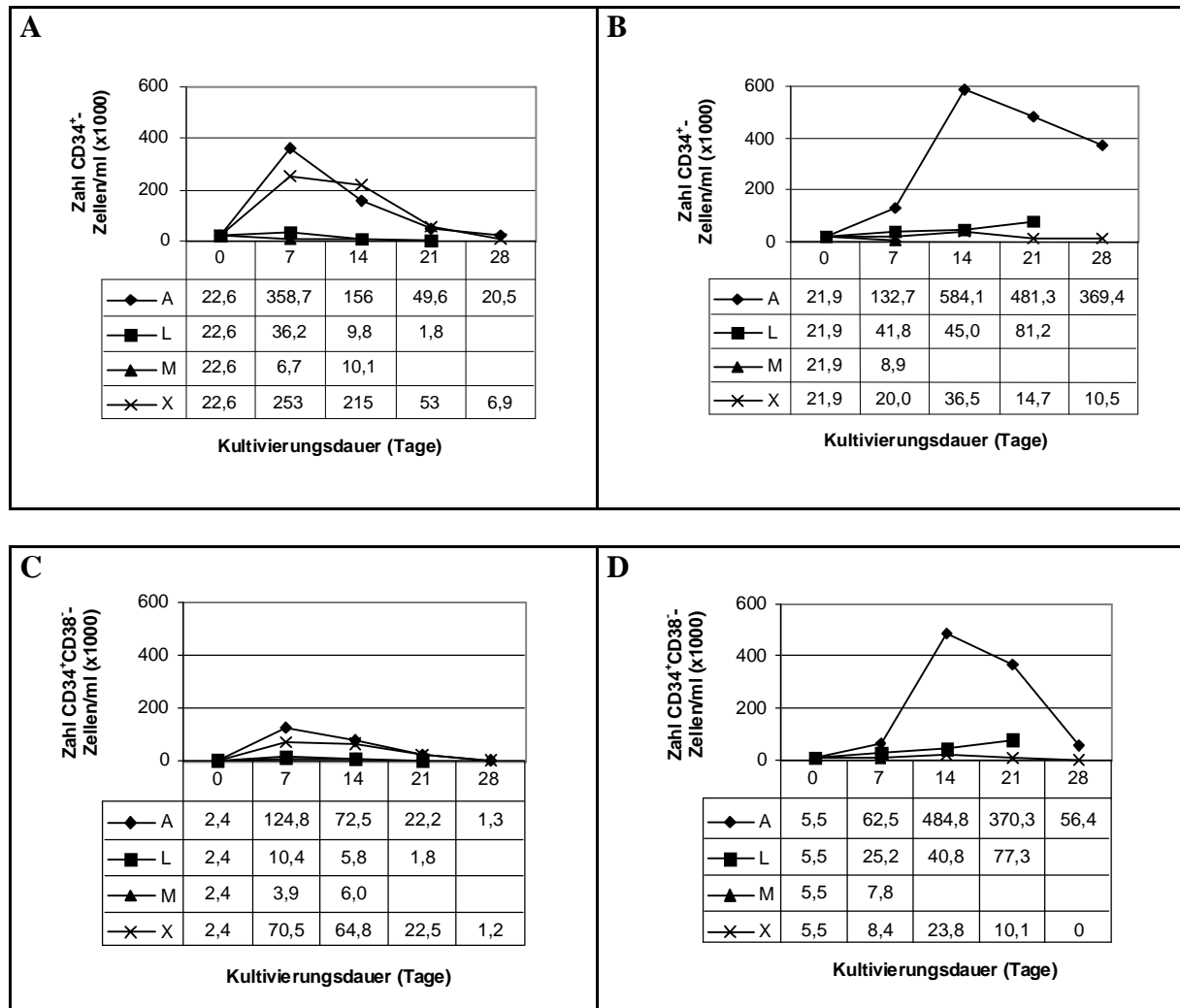
Dazu wurde zunächst in Kontrollexperimenten mit rekombinanten Zytokinen untersucht, welchen Einfluß die vier auf frühe linienunspezifische Vorläuferzellen wirkenden Zytokinkombinationen A, L, M und X auf die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen ausüben. Einige der dabei verwendeten Zytokine werden auch von aktivierten T-Zellen gebildet (IL-3, IL-6, GM-CSF und LIF), andere wiederum nicht (SCF, G-CSF und FL).

Die Abbildungen 13 A-D zeigen, daß die beste Expansion der CD34<sup>+</sup>-Gesamt- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Subpopulation durch die Zytokinkombination A (SCF, G-CSF, IL-3 und IL-6) erreicht wurde, wobei die Zellen aus NSB stärker als die aus PB proliferierten. CD34<sup>+</sup>-Zellen aus NSB vermehrten sich bis zum Tag 14 um den Faktor 26,7 (auf 5,8x10<sup>5</sup> Zellen/ml) und die Subpopulation der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen sogar um den Faktor 88,1 (auf 4,8x10<sup>5</sup> Zellen/ml). Somit beruhte also fast die gesamte Expansion der CD34<sup>+</sup>-Zellen aus NSB auf der Vermehrung von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen. Im Gegensatz dazu waren an der Vergrößerung der CD34<sup>+</sup>-Population aus PB neben den CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen auch andere Subpopulationen beteiligt. CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB konnten sich bis zum Tag 7 um den Faktor 15,9 (auf 3,6x10<sup>5</sup> Zellen/ml) und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen um den Faktor 52 (auf 1,2x10<sup>5</sup> Zellen/ml) vermehren.

Die Zytokinkombination X, die der Zytokinkombination A ohne SCF entspricht, erlaubte nur eine deutlich schwächere Proliferation der Zellen. Wie auch bei der Zytokinkombination A vergrößerte sich die Population der frühen hämatopoetischen Zellen stärker als die der späteren. So konnte für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB ein Vermehrungsfaktor von 29,4 (auf 7,1x10<sup>4</sup> Zellen/ml) und für Zellen aus NSB ein Faktor von 4,3 (auf 2,3x10<sup>4</sup> Zellen/ml) festgestellt werden. Der Einfluß der Zytokinkombination X auf die Vermehrung der Zellen aus PB war folglich größer als auf Zellen aus NSB.

Wurden in den Zytokinkombinationen A oder X das Zytokin G-CSF durch GM-CSF ersetzt, so hatte dies praktisch keinen Einfluß auf die Proliferation der CD34<sup>+</sup>- oder CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (in Abb. 8 sind deshalb nur die Experimente mit G-CSF dargestellt).

Die Vermehrung von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen fiel unter Einfluß der Zytokinkombinationen L (SCF, LIF und FL) und M (LIF und FL) noch schwächer aus. Bei Verwendung der Zytokinkombination M fand keine Vermehrung der CD34<sup>+</sup>-Zellen mehr statt. Dasselbe galt für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB. Die Zahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB konnte noch um den Faktor 2,5 gesteigert werden.



**Abb.13: Vermehrung von CD34<sup>+</sup>-Zellen (A und B) und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (C und D) aus PB (A und C) und aus NSB (B und D) während der Kultivierung mit verschiedenen rekombinanten Zytokinen.**

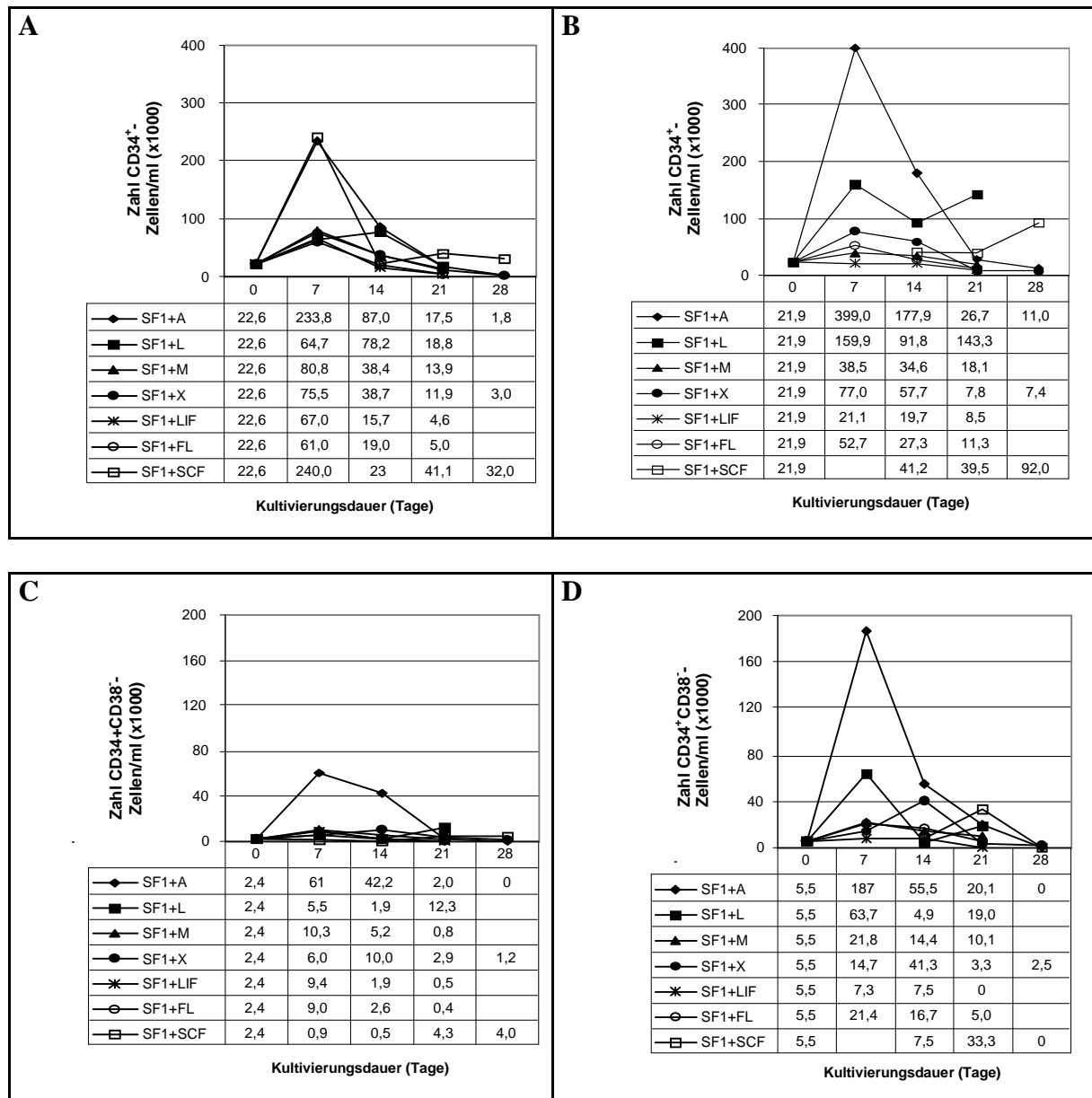
Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von: A: 11 NSB, 7 PB; L: 4 NSB und PB, M: 7 NSB, 3 PB und X: 4 NSB und PB Experimenten.

Bei Verwendung der Zytokinkombination L konnte die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB verdoppelt, die Zahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen vervierfacht werden. Im Vergleich dazu konnte für Zellen aus NSB sogar eine Vermehrung um den Faktor 3,7 (CD34<sup>+</sup>-Zellen) und 14 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen) beobachtet werden.

#### 4.6 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen unter Zusatz verschiedener Kombinationen rekombinanter Zytokine zur Reinigungsfraktion SF1

Mit Hilfe der in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurde untersucht, ob sich durch die Kombination der Reinigungsfraktion SF1 mit verschiedenen auf frühe, linienunspezifische Vorläuferzellen wirkenden Zytokinen Hinweise darauf finden lassen, daß

in der Reinigungsfraction SF1 unbekannte hämatopoeserelevante Faktoren vorhanden sein könnten. Dieser Weg wurde gewählt, da viele Zytokine synergistisch wirken und dadurch möglicherweise die Effekte von unbekanntem Faktoren verstärkt und erkennbar gemacht werden. Die Reinigungsfraction SF1 wurde ausgesucht, da sie die Proliferation von  $CD34^+$ -Zellen förderte, aber niedrigere Konzentrationen inhibierend wirkender Zytokine enthielt als die Reinigungsfraction SF0.



**Abb.14 A-D:** Vermehrung von  $CD34^+$ -Zellen (A und B) und  $CD34^+CD38^-$ -Zellen (C und D) aus PB (A und C) und NSB (B und D) während der Kultivierung mit Kombinationen der Reinigungsfraction SF1 und verschiedenen rekombinanten Zytokinen. Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils 4 Experimenten.

Die Abbildungen 14 A-D belegen, daß durch die Kombination von SF1 mit FL bzw. LIF die Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB und NSB im Vergleich zur Proliferation im SF1-haltigen Medium verringert wurde. Dabei vermehrten sich die Zellen aus PB stärker als die aus NSB. Beispielsweise steigerte sich die Zahl der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB noch um das drei- bis vierfache.

Der Zusatz von SCF zur Reinigungsfraktion SF1 führte zu einer geringfügig verstärkten Proliferation früher hämatopoetischer Zellen aus NSB: während sich CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB unter dem Einfluß der Reinigungsfraktion SF1 um den Faktor 4,4 vermehrten, kam es bei einer Kombination von SF1 und SCF sogar zu einer Vermehrung um den Faktor 6,1. Die Proliferation der Zellen aus PB hingegen wurde durch die Kombination von SF1 und SCF inhibiert. Die Gesamtzahl an CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde in beiden Fällen im Vergleich zum rein SF1-haltigen Kulturmedium etwa verdoppelt.

Bei Verwendung der Zytokinkombination A zusammen mit der Reinigungsfraktion SF1 wurde die Proliferation der CD34<sup>+</sup>-Gesamt- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Subpopulation aus NSB stärker angeregt als die aus PB, wobei die Zytokine den größeren Einfluß auf die Vermehrung der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen ausübten. Bezogen auf die Ausgangszellzahl konnte die Anzahl an CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB um den Faktor 34 (auf  $1,9 \times 10^5$  Zellen/ml) und die aus PB um den Faktor 25,4 (auf  $6,1 \times 10^4$  Zellen/ml) gesteigert werden. Verglichen mit Experimenten unter alleiniger Verwendung der Reinigungsfraktion SF1 konnte die Proliferation der Zellen deutlich vergrößert werden. Die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde um den Faktor 2,1 (PB) bzw. 6,7 (NSB) und die Zahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen um den Faktor 4,6 (PB) bzw. 7,7 (NSB) gesteigert. Im Vergleich zur Zytokinkombination A hingegen wurde die Vermehrung früher Vorläuferzellen um den Faktor 2 bis 3 und die der CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation um den Faktor 1,5 vermindert.

Der gemeinsame Zusatz von Zytokinkombination X und SF1 führte ebenfalls zu einer stärkeren Vermehrung früher Vorläuferzellen, wobei die Effekte auf Zellen aus NSB mit dem Vermehrungsfaktor 7,5 (auf  $4,1 \times 10^4$  Zellen/ml) größer waren, als die auf Zellen aus PB mit dem Vermehrungsfaktor 4,2 (auf  $1,0 \times 10^4$  Zellen/ml). Verglichen mit alleiniger Verwendung der Zytokinkombination X bzw. der Reinigungsfraktion SF1 führte die Kombination beider zu einer insgesamt schwächeren Vermehrung der Zellen aus PB, aber zu einer stärkeren Vermehrung der Zellen aus NSB.

Auch die Kombination der Reinigungsfraktion SF1 mit der Zytokinkombination L wirkte stärker proliferationsfördernd auf Zellen aus NSB als auf Zellen aus PB, wobei besonders die Vermehrung früher Vorläuferzellen angeregt wurde. Die Zahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus

PB wurde um den Faktor 5,1 (auf  $1,2 \times 10^4$  Zellen/ml), die aus NSB um den Faktor 11,6 (auf  $6,4 \times 10^4$  Zellen/ml) gesteigert.

Die Vermehrung der Zellen aus PB wurde im Vergleich zur alleinigen Verwendung von SF1 verringert, im Vergleich zur alleinigen Verwendung der Zytokinkombination L verstärkt. Die Proliferation der Zellen aus NSB konnte im Vergleich zu SF1 gesteigert werden. Gegenüber der Zytokinkombination L konnte eine Verringerung der  $CD34^+CD38^-$ -Zellzahl, aber eine Steigerung der  $CD34^+$ - Gesamtzellzahl beobachtet werden.

Wurde dem Kulturmedium die Zytokinkombination M zusammen mit SF1 zugesetzt, so konnte eine stärkere Vermehrung der Zellen aus PB beobachtet werden. Die größten Effekte konnten hierbei auf frühe Vorläuferzellen ausgeübt werden:  $CD34^+CD38^-$ -Zellen aus PB vermehrten sich um den Faktor 4,3 (auf  $1,0 \times 10^4$  Zellen/ml), die aus NSB um den Faktor 4,0 (auf  $2,2 \times 10^4$  Zellen/ml). Im Vergleich zu alleiniger Verwendung der Zytokinkombination M wurde die Proliferation der Zellen angeregt, während der Vergleich mit der Reinigungsfraction SF1 eine Proliferationsreduktion belegte.

#### **4.7 Chromatographische Aufreinigung von SF0 und SF1**

Mittels chromatographischer Aufreinigung wurde versucht, die Zahl der Faktoren in den einzelnen Fraktionen zu reduzieren und so weitere Anhaltspunkte für die Existenz noch unbekannter hämatopoeserelevanter Faktoren zu finden. Je weniger Faktoren vorhanden sind, um so größer erscheint die Wahrscheinlichkeit, die in der Zellkultur auftretenden Effekte einzelnen Faktoren zuordnen zu können.

Für die chromatographische Aufreinigung wurde neben der Reinigungsfraction SF1 auch die Fraktion SF0 verwendet. Beide wurden einer ConA-Chromatographie unterworfen und die dabei erhaltenen Fraktionen erneut auf ihre Effekte auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen untersucht.

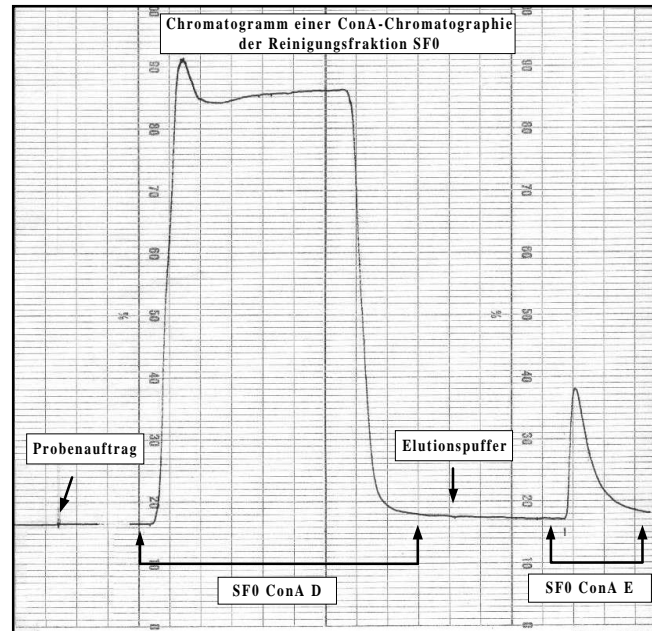
##### ***4.7.1 ConA-Chromatographie von SF0 und SF1***

Aufgrund der Bindungseigenschaften des Lektins ConA läßt sich durch diese Chromatographie eine Trennung von N-glykosylierten und O-glykosylierten bzw. nicht glykosylierten Proteinen erreichen.

Die Chromatogramme der ConA-Chromatographien von SF0 und SF1 (Abb. 15 und 16) zeigen übereinstimmend, daß der größte Teil der Proteine und Peptide nicht an ConA

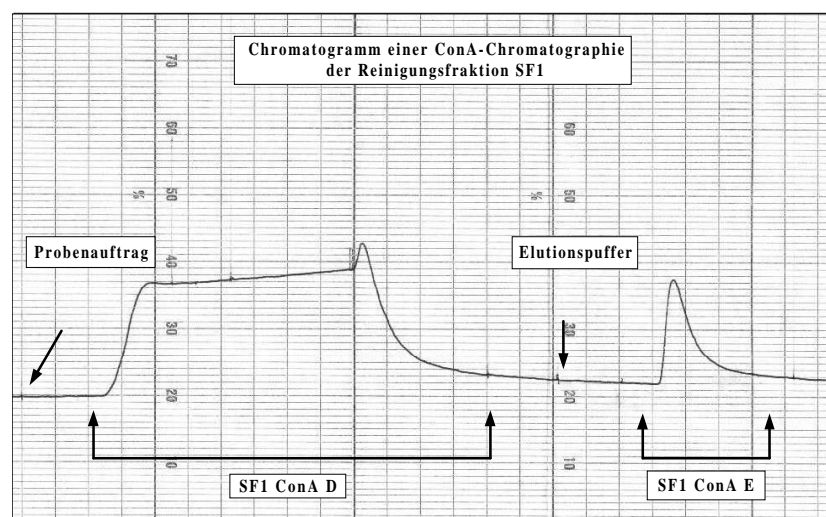


gebunden wurde. Durch Proteinbestimmungen vor und nach den ConA-Chromatographien konnte gezeigt werden, daß sich in den Durchlaufaktionen ca. 70-80 % und in den Eluaten ca. 10 % der aufgetragenen Proteine und Peptide befanden.



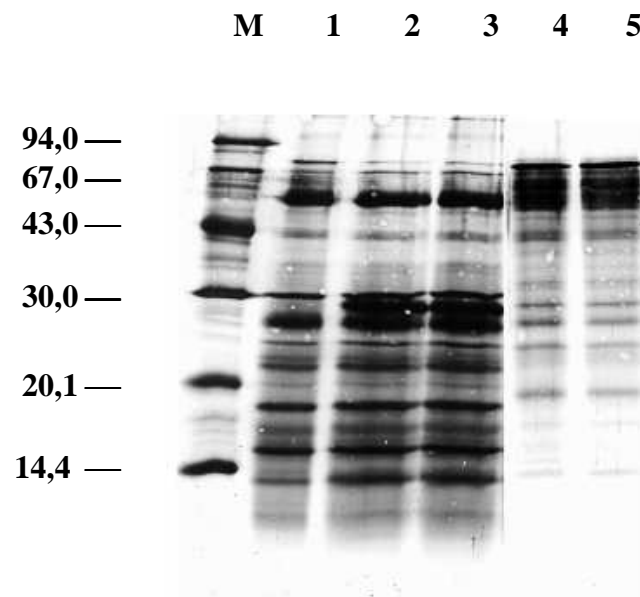
**Abb. 15: Chromatogramm einer ConA-Chromatographie der Reinigungsfraktion SF0.**

100 ml der Reinigungsfraktion SF0 wurden auf eine ConA-Sephrose Säule aufgegeben (1,5 ml/min). Die nicht an die Säule bindenden Komponenten wurden mit Probenpuffer abgespült (Durchlaufaktion 1,5 ml/min, 75 ml). Nach Erreichen der Basislinie erfolgte dann die Elution der gebundenen Proteine und Peptide mit Elutionspuffer (Elutionsfraktion, 1,5 ml/min, 25 ml).

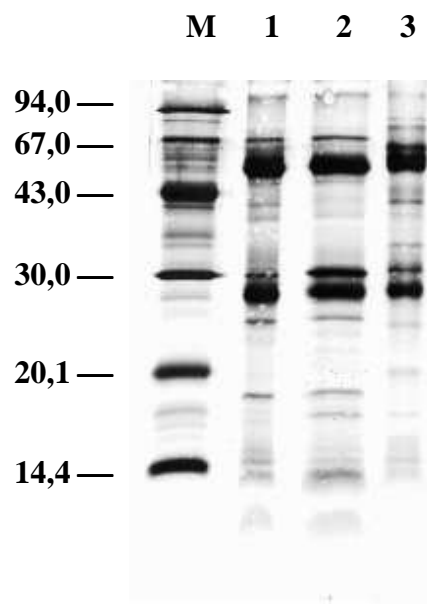


**Abb. 16: Chromatogramm einer ConA-Chromatographie der Reinigungsfraktion SF1.**

100 ml der Reinigungsfraktion SF1 wurden auf eine ConA-Sephrose Säule aufgegeben (1,5 ml/min). Die nicht an die Säule bindenden Komponenten wurden mit Probenpuffer abgespült (Durchlaufaktion 1,5 ml/min, 90 ml). Nach Erreichen der Basislinie erfolgte dann die Elution der gebundenen Proteine und Peptide mit Elutionspuffer (Elutionsfraktion, 1,5 ml/min, 30 ml).



**Abb. 17: Goldblot der Fraktionen von 2 ConA-Chromatographien der Reinigungsfraction SF0.** M: Molekulargewichtsmarker; Spur 1: Ausgangsmaterial SF0; Spuren 2 und 3: ConA Durchlauf; Spuren 4 und 5: ConA Eluat. Pro Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen.



**Abb. 18: Goldblot der Fraktionen einer ConA-Chromatographie der Reinigungsfraction SF1.** M: Molekulargewichtsmarker; Spur 1: Ausgangsmaterial SF1; Spur 2: ConA Durchlauf; Spur 3: ConA Eluat. Pro Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen.

Auch die gelelektrophoretische Auftrennung der Faktorengemische (Abb. 17 und 18) vor und nach der ConA-Chromatographie belegt, daß die meisten Proteine und Peptide nicht an ConA

banden, sich also in der jeweiligen Durchlauffraktion wiederfanden. Eine genauere Betrachtung der Bandenmuster zeigt aber auch, daß viele Banden sowohl in der Durchlauf- als auch in der Eluatfraktion auftraten, wobei jedoch zumeist eine Anreicherung in der einen oder anderen Fraktion zu beobachten war.

#### ***4.7.2 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit den Fraktionen der ConA-Chromatographie von SF0***

Um ausschließen zu können, daß Komponenten des Proben- oder Elutionspuffers der ConA-Chromatographie die Proliferation der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beeinflussen, mußten Kontrollexperimente durchgeführt werden. Da für die ConA-Chromatographie von SF0 und SF1 dieselben Puffer verwendet wurden, war auch nur eine Serie mit Kontrollexperimenten notwendig. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden in einem Kontrollmedium kultiviert, das neben der Zytokinkombination A (50 ng/ml SCF, 50 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml IL-3 und 50 U/ml IL-6) auch 0,4 % (v/v) des Probenpuffers, bzw. 0,6 % (v/v) des Elutionspuffers enthielt. Für die Kontrollexperimente wurden die zugesetzten Proben- und Elutionspuffervolumina denen des ConA-Durchlaufs und -Eluats von SF1 angepaßt, da diese Volumina größer waren als die des ConA-Durchlaufs und -Eluats von SF0. Es zeigte sich, daß weder Proben- noch Elutionspuffer die durch die Zytokinkombination A hervorgerufene Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (Abschnitt 4.5) beeinflusste. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wurde verzichtet.

Zur Untersuchung des Einflusses der Fraktionen der ConA Chromatographie von SF0 auf die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden dem Medium jeweils 1 µg Protein pro ml Medium zugesetzt (ConA-Durchlauf 0,25 % (v/v) und ConA-Eluat (0,50 % (v/v))).

Anhand der Zytokinkonzentrationen im ConA Durchlauf und im ConA Eluat (Abschnitt 4.2.1 Tab. 1) konnten die endgültigen Zytokinkonzentrationen im Kulturmedium berechnet werden.

Wie Tabelle 5 zeigt, waren die Konzentrationen der meisten Zytokine im Kulturmedium mit ConA-Durchlauf niedriger als im Kulturmedium mit ConA-Eluat. Insbesondere das inhibitorisch wirkende IFN- $\gamma$ , aber auch die auf frühe Vorläuferzellen wirkenden Zytokine IL-3 und IL-6 waren im Kulturmedium nach Zusatz des ConA-Durchlaufs deutlich niedriger konzentriert. Im Vergleich zu einem Kulturmedium mit dem Ausgangsmaterial SF0 waren die

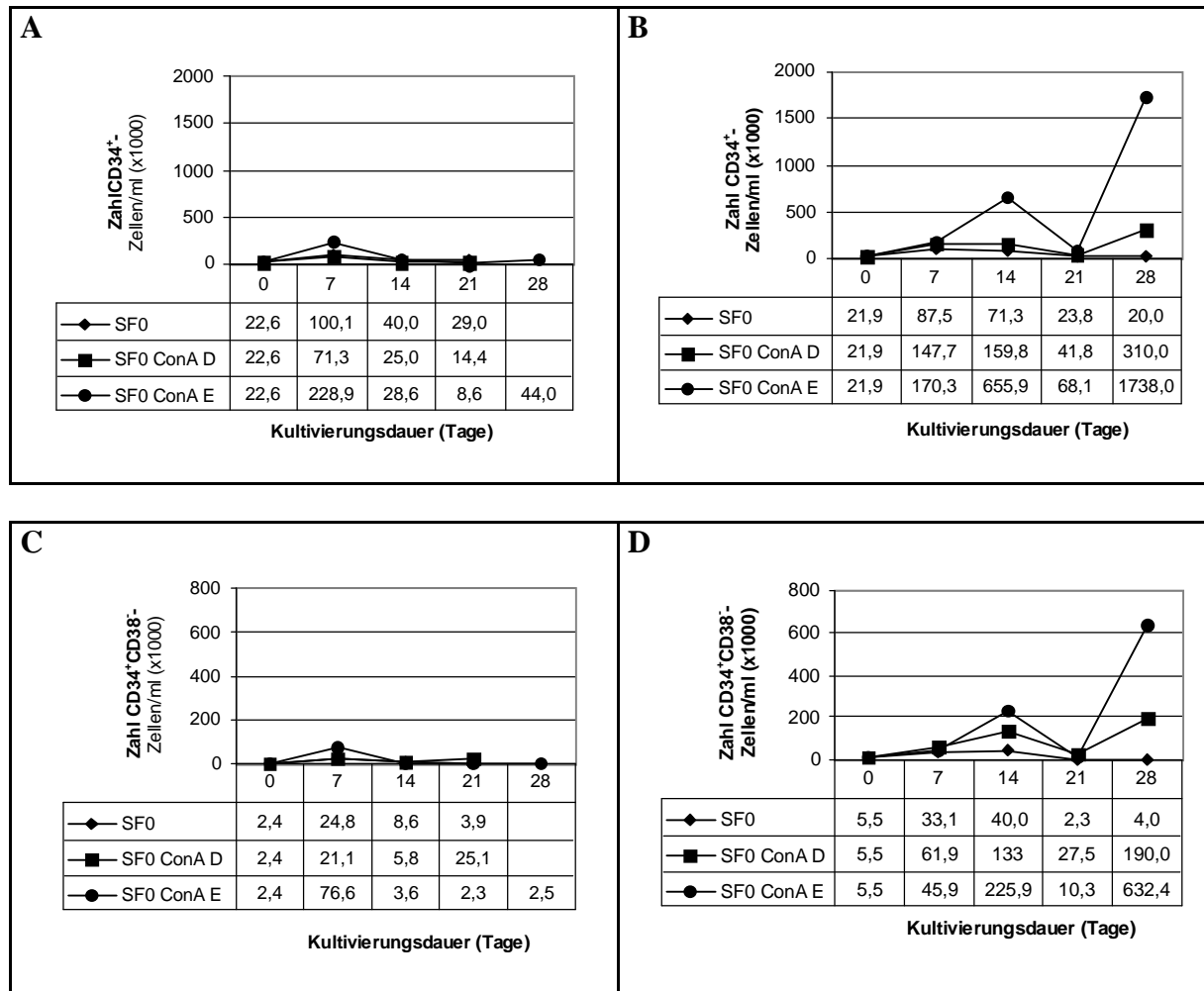
Konzentrationen vieler Zytokine im Medium mit ConA-Durchlauf reduziert (z.B. IL-3, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ ), im Medium mit ConA Eluat hingegen erhöht (z.B. IL-3, IL-6, IFN- $\gamma$ ).

	<b>SF0</b>	<b>SF0 ConA D</b>	<b>SF0 ConA E</b>
	<b>Zytokinkonzentration (pg/ml)</b>		
<b>IL-3</b>	8.644	5.389	21.111
<b>IL-5</b>	<100	<100	143
<b>IL-6</b>	6.704	8.395	14.400
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	4.025	417	21.343
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1.157	1.274	<100
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	<100	<100	358
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	1.384	<100	<100
<b>GM-CSF</b>	11.528	14.147	12.634

**Tab. 5: Zytokinkonzentrationen im Kulturmedium der CD34<sup>+</sup>-Zellen nach Zusatz von 0,25 % (v/v) ConA D bzw. 0,50 % (v/v) ConA E).**

Angegeben sind nur Zytokine mit einer Konzentration  $\geq 100$  pg/ml.

Die Abbildungen 19 A-D belegen, daß Durchlauf und insbesondere Eluat der ConA-Chromatographie die Proliferation von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen besser oder zumindest gleich gut stimulierten wie das Ausgangsmaterial SF0. Außerdem wurde, anders als beim Ausgangsmaterial SF0, die Vermehrung der Zellen aus NSB stärker angeregt als die der Zellen aus PB. Während Zellen aus PB ihre maximale Vermehrung bereits an Tag 7 erreichten, konnte die maximale Vermehrung der Zellen aus NSB erst an Tag 28 beobachtet werden. Durch die Kultivierung mit dem Durchlauf der ConA-Chromatographie konnte eine maximale Vermehrung der Zellen aus PB um den Faktor 3,2 (auf  $7,1 \times 10^4$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>-Zellen bzw. 10,5 (auf  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen und eine Vermehrung der Zellen aus NSB um den Faktor 14,2 (auf  $3,1 \times 10^5$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>-Zellen bzw. 34,5 (auf  $1,9 \times 10^5$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen erreicht werden. Unter Einfluß des ConA-Eluats konnte die Proliferation noch weiter gesteigert werden. Es ergab sich eine Vermehrung der Zellen aus PB um den Faktor 10,1 (auf  $2,3 \times 10^5$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>-Zellen bzw. 31,9 (auf  $7,7 \times 10^4$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen und eine Vermehrung der Zellen aus NSB um den Faktor 79,4 (auf  $1,7 \times 10^6$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>-Zellen bzw. 115 (auf  $6,3 \times 10^5$  Zellen/ml) für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen.



**Abb. 19 A-D:** Vermehrung von CD34<sup>+</sup>-Zellen (A und B) und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (C und D) aus PB (A und C) und aus NSB (B und D) unter dem Einfluß der Reinigungsfraction SF0 und dem daraus gewonnenen ConA-Durchlauf (ConA D) und ConA-Eluat (ConA E).

Dem Kulturmedium wurden 0,2 % (v/v) des Ausgangsmaterials, 0,25 % (v/v) des ConA D bzw. 0,50 % (v/v) des ConA E zugesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte von: PB: SF0: 9, SF0 ConA D und ConA E: 11; NSB: SF0: 16, SF0 ConA D und ConA E: 12 Experimenten.

#### 4.7.3 Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit den Fraktionen der ConA-Chromatographie von SF1

Zur Untersuchung des Einflusses der Fraktionen der ConA Chromatographie von SF1 auf die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde dem Medium jeweils 1µg Protein pro ml Medium zugesetzt (ConA-Durchlauf 0,4 % (v/v) und ConA-Eluat (0,6 % (v/v))). Anhand der Zytokin-konzentrationen im ConA-Durchlauf und im ConA-Eluat von SF1 (Abschnitt 4.2.1 Tab. 1) konnten die tatsächlichen Zytokin-konzentrationen im Kulturmedium berechnet werden.

	SF1	SF1 ConA D	SF1 ConA E
	Zytokinkonzentration (pg/ml)		
<b>IL-3</b>	155	181	<100
<b>IL-6</b>	1.389	12.587	985
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1.589	6.500	40.344
<b>OSM</b>	<100	<100	165
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	525	508	<100
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<100	136	<100

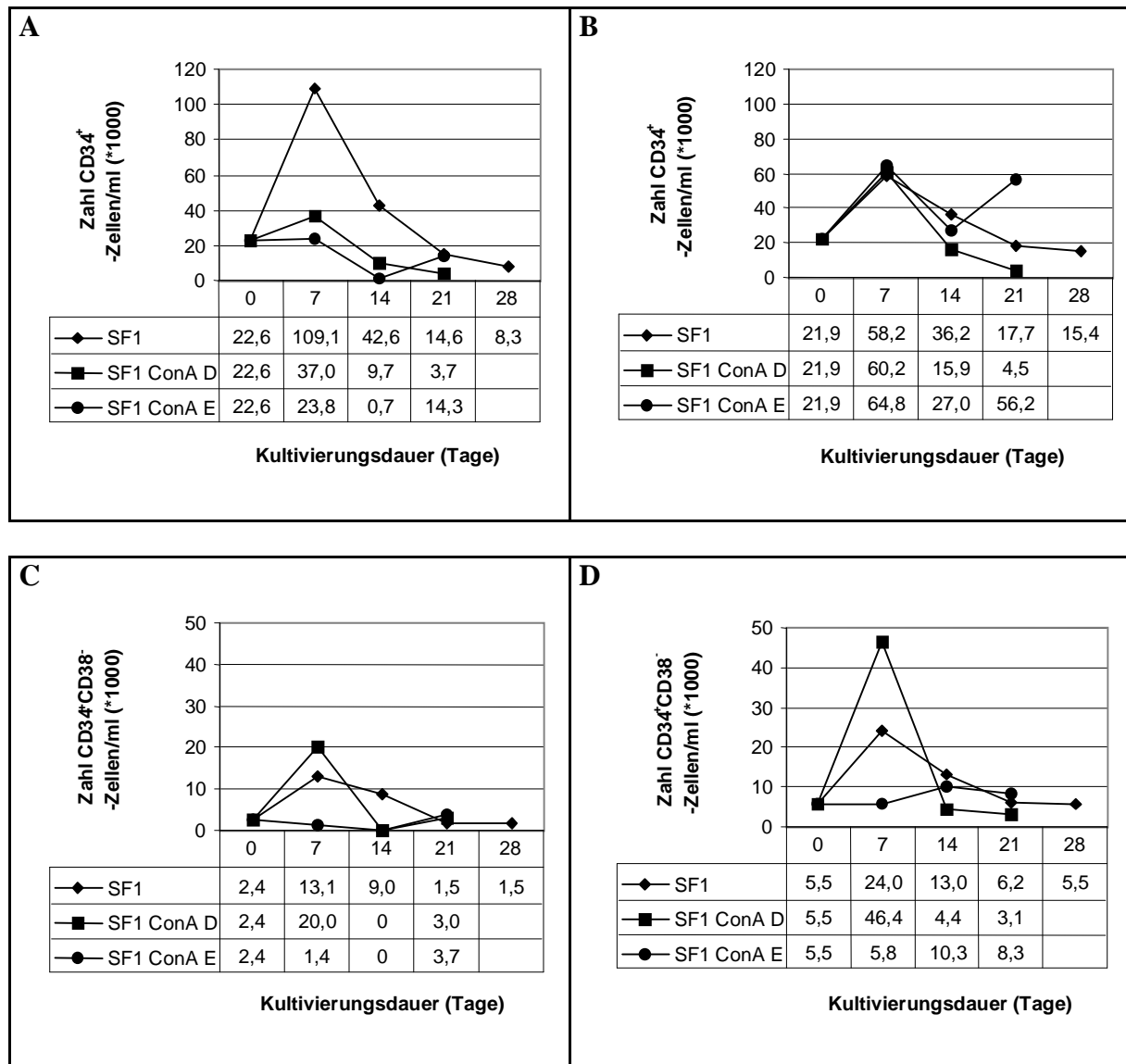
**Tabelle 6: Zytokinkonzentrationen im Kulturmedium der CD34<sup>+</sup>-Zellen nach Zusatz von 0,4 % (v/v) ConA D bzw. 0,6 % (v/v) ConA E.**

Angegeben sind nur Zytokine, deren Konzentration  $\geq 100$  pg/ml ist.

Nach der ConA-Chromatographie von SF1 konnte eine Anreicherung von IL-3, IL-6, TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  in der Durchlaufraction beobachtet werden. Hingegen wurden IFN- $\gamma$  und OSM in der Eluatfraction angereichert.

Die Abbildungen 20 A-D belegen, daß durch die ConA-Chromatographie und die damit verbundene Auftrennung des Proteingemisches keine verbesserte Proliferation der CD34<sup>+</sup>-Zellen erreicht wurde. Vielmehr war bei CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB sogar eine schwächere Vermehrung zu verzeichnen. Wurde bei Verwendung des Ausgangsmaterials SF1 bis zum Tag 7 noch eine Vermehrung um den Faktor 4,8 (auf  $1,1 \times 10^5$  Zellen/ml) erreicht, so konnte mit dem ConA-Durchlauf nur eine Vermehrung um den Faktor 1,6 (auf  $3,7 \times 10^4$  Zellen/ml) und mit dem ConA-Eluat praktisch gar keine Vermehrung mehr erzielt werden.

Im Vergleich zum Ausgangsmaterial konnte die Proliferation der frühen hämatopoetischen Zellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen) durch den ConA-Durchlauf gesteigert werden. Kam es bei Verwendung des Ausgangsmaterials an Tag 7 zu einer Vermehrung um den Faktor 5,5 (Zellen aus PB) bzw. 4,4 (Zellen aus NSB), so konnte die Proliferation durch den ConA-Durchlauf auf den Faktor 8,3 (auf  $2,0 \times 10^4$  Zellen/ml) bzw. 8,5 (auf  $4,6 \times 10^4$  Zellen/ml) gesteigert werden. Durch das ConA-Eluat konnten die Zellen nicht vermehrt werden.



**Abb. 20 A-D:** Vermehrung von CD34<sup>+</sup>-Zellen (A und B) und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (C und D) aus PB (A und C) und aus NSB (B und D) unter dem Einfluß der Reinigungsfraction SF1 und dem daraus gewonnenen ConA-Durchlauf (SF1 ConA D) und ConA-Eluat (SF1 ConA E).

Dem Kulturmedium wurden 0,2 % (v/v) des Ausgangsmaterials, 0,4 % (v/v) des ConA D bzw. 0,6 % des ConA E zugesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte von: 23 PB bzw. 30 NSB Experimenten mit SF1, und jeweils 7 PB bzw. 5 NSB Experimenten mit SF1 ConA D und ConA E.

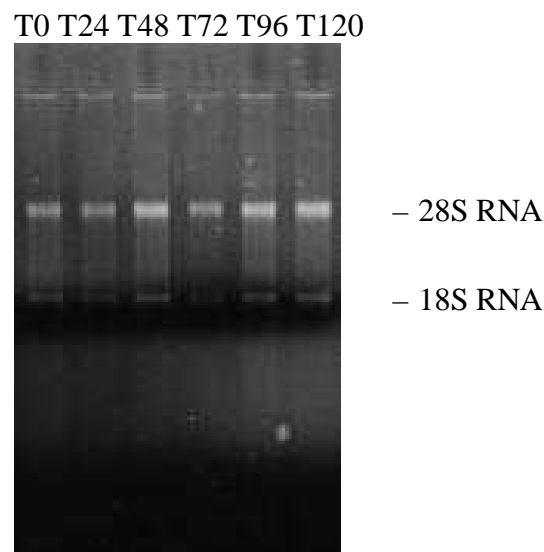
#### 4.8 Identifizierung unbekannter mRNAs

Mit Hilfe des mRNA-Differential-Displays ist die Analyse differenziell exprimierter Gene möglich. In diesem Fall wurde diese Methode dazu verwendet, Fragmente von mRNAs zu finden, die nur von aktivierten (Inkubation mit PMA und A23187 für 96 h), aber nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert werden. Dazu mußten zunächst DNA-freie RNA-Isolate von aktivierten und ruhenden Zellen gewonnen werden.

#### ***4.8.1 Isolierung von RNA und mRNA aus ruhenden und aktivierten Lymphozyten***

Zur Isolierung von RNA und mRNA wurden zunächst unterschiedliche ein- und zweistufige Verfahren getestet, um qualitativ und quantitativ beste Isolate zu erhalten. Bei den einstufigen Verfahren wurde die mRNA direkt aus den Zellen isoliert, wogegen bei den zweistufigen Verfahren zunächst die Gesamt-RNA gewonnen, und erst daraus die mRNA isoliert wurde. Da für die unterschiedlichen Versuche ohnehin Gesamt-RNA und mRNA benötigt wurde, konnte ein etwas zeitaufwendigeres zweistufiges Verfahren zur Isolierung gewählt werden, bei dem zunächst mit Hilfe von TriReagent (Sigma, Deisenhofen) die Gesamt-RNA der Zellen isoliert, und dann mit Dynabeads oligo (dT)<sub>25</sub> (Dynal, Oslo, Norwegen) aus der Gesamt-RNA die mRNA isoliert wurde (Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2).

Die RNA-Isolate wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt um sicherzustellen, daß intakte RNA vorlag, es also zu keinem RNase-Abbau gekommen war. Abbildung 21 zeigt das typische Bild intakter Gesamt-RNA.



**Abb. 21: Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA-Präparationen.**

Auf einem 1,2 % denaturierenden Agarosegel wurden RNA Isolate aus nicht aktivierten (T0) sowie aus 24 h (T24), 48 h (T48), 72 h (T72), 96 h (T96) und 120 h (T120) aktivierten T-Zellen aufgetrennt.

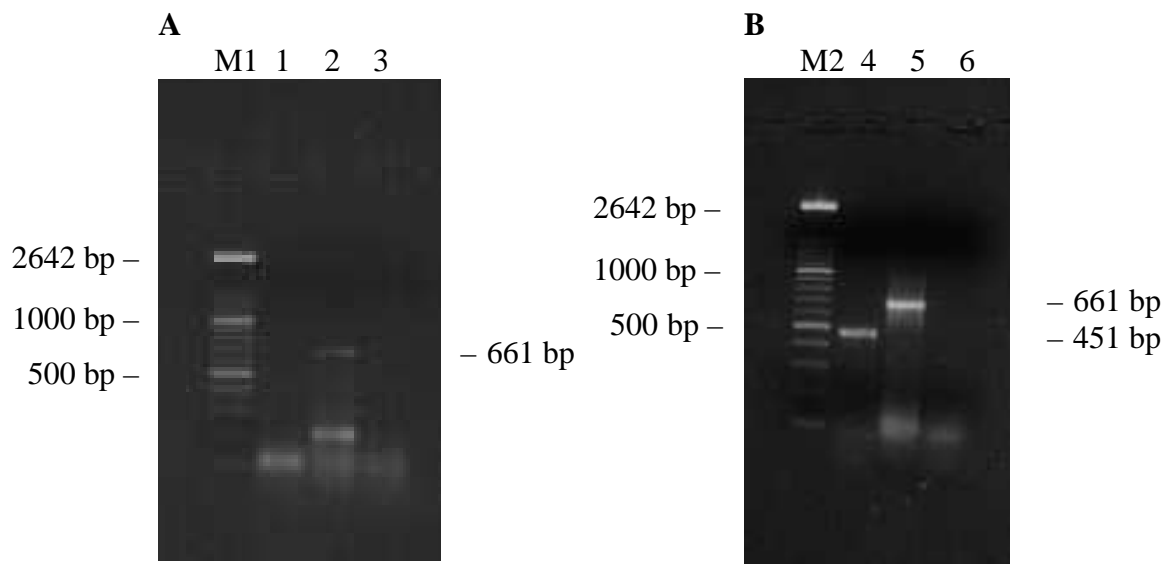
In allen Spuren sind die Banden der 28S und 18S RNA zu erkennen, wobei die Bande der 28S RNA deutlich ausgeprägter als die der 18S RNA ist (das Verhältnis 28S:18S RNA sollte etwa 2:1 sein). Die RNA- und mRNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Gleichzeitig konnten auch anhand des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnisses, das bei „sauberen“ RNA-Präparationen einen Wert von 2,0 aufweist, mögliche DNA- und Proteinverunreinigungen in



der Präparation nachgewiesen werden. Für die Versuche wurden nur solche RNA-Präparationen verwendet, die bei der gelelektrophoretischen Kontrolle das charakteristische Bandenmuster (Abbildung 21) aufwiesen und deren photometrisch bestimmtes  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis einen Wert von 2,0 erreichte.

#### 4.8.2 Kontrolle der T-Zellaktivierung

Neben der Kontrolle ob die Behandlung der Lymphozyten mit A23187 und PMA tatsächlich zu einer Aktivierung der Zellen geführt hatte, mußte eine Voraktivierung der Zellen ausgeschlossen werden können. Da nur die von aktivierten T-Zellen gebildeten mRNA-Moleküle von Interesse waren, war es unter anderem für das mRNA-Differential-Display unerlässlich über ein von nicht aktivierten Lymphozyten stammendes RNA-Isolat zu verfügen. Die Kontrolle der Lymphozytenaktivierung und der Ausschluß einer Voraktivierung erfolgte mittels RT-PCR. Neben der RT-PCR zum Nachweis einer konstitutiv gebildeten mRNA-Spezies ( $\beta$ -Actin) als Positivkontrolle, wurde eine weitere RT-PCR zum Nachweis einer induzierbaren mRNA-Spezies (in diesem Fall IL-2) durchgeführt.



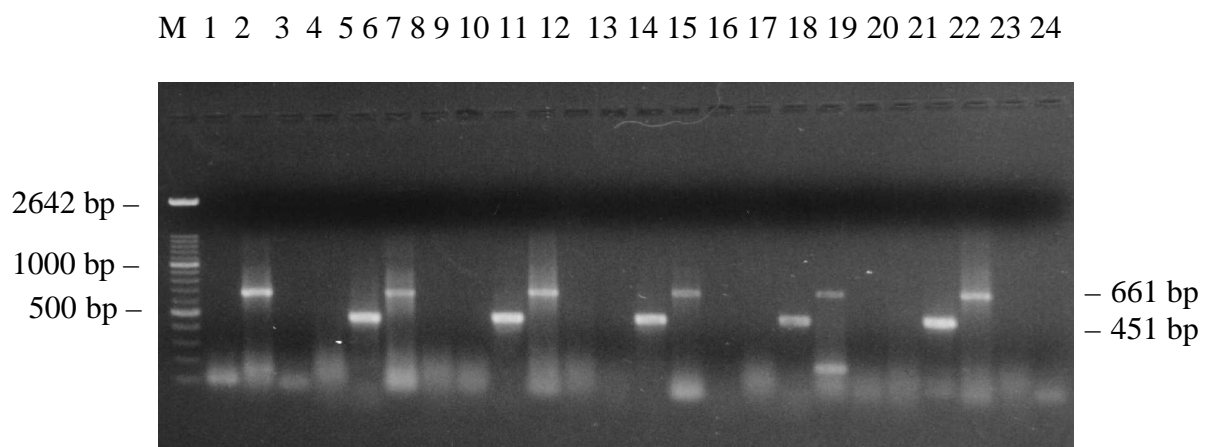
**Abb. 22 A und B: Agarosegelelektrophorese der IL-2 und  $\beta$ -Actin spezifischen RT-PCR-Amplifikate ruhender T-Zellen.**

Die verwendete RNA wurde aus nicht behandelten Lymphozyten zweier Spender (A und B) isoliert. Als Nachweis für eine mögliche Voraktivierung der Zellen diente die IL-2 spezifische RT-PCR (Spuren 1 und 4); als Positivkontrolle wurde unter identischen RT-PCR-Bedingungen jeweils eine  $\beta$ -Actin spezifische RT-PCR durchgeführt (Spuren 2 und 5). Die Negativkontrolle erfolgte ohne RNA Zusatz (Spuren 3 und 6). Spuren M1 und M2: DNA molecular weight marker XIV.

Abbildung 22 A und B zeigen RT-PCR-Ergebnisse von zwei RNA-Präparationen nicht behandelter Lymphozyten. In 22 A ist lediglich bei der Positivkontrolle (Spur 2, Produkt der  $\beta$ -Actin spezifischen PCR) die charakteristische Bande bei 661 bp zu erkennen. Eine IL-2 spezifische Bande ist in Spur 1 nicht vorhanden. In 22 B hingegen sind sowohl bei der  $\beta$ -Actin spezifischen RT-PCR (Spur 5) als auch bei der IL-2 spezifischen RT-PCR (Spur 4; Bande bei 451 bp) die charakteristischen Amplifikate detektierbar.

Die RNA der in Abbildung 22 A untersuchten Lymphozyten läßt auf ruhende Zellen, die in Abbildung 22 B auf voraktivierte Zellen schließen. Solche voraktivierten Zellen, wie sie z.B. bei einer bakteriellen Infektion des Spenders auftreten können, waren für die weiteren Untersuchungen unbrauchbar und wurden daher nicht weiterverwendet.

Die durch Mitogene induzierte in vitro Aktivierung der Zellen wurde auf zwei Wegen überprüft: einerseits wurde die IL-2 mRNA in den Zellen mittels RT-PCR detektiert (Abbildung 23) und andererseits wurde in die Zellkulturüberstände sezerniertes IL-2 mittels ELISA nachgewiesen (Tabelle 7). Während in ruhenden T-Zellen keine IL-2 mRNA



**Abb. 23: Agarosegelelektrophorese der IL-2 und  $\beta$ -Actin spezifischen RT-PCR-Amplifikate ruhender und aktivierter T-Zellen.**

Aus den Zellen wurde nach 0h, 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Aktivierung mit einer Kombination aus PMA und A23187 die RNA isoliert. Durchgeführt wurde neben der Negativkontrolle (Spur 3 [0h], 7 [24h], 11 [48h], 15 [72h], 19 [96h], 23 [120h]) und einer Kontrolle auf DNA-Kontaminationen (Spur 4 [0h], 8 [24h], 12 [48h], 16 [72h], 20 [96h], 24 [120h]) jeweils eine IL-2 (Spur 1 [0h], 5 [24h], 9 [48h], 13 [72h], 17 [96h], 21 [120h]), sowie eine  $\beta$ -Actin spezifische PCR (Spur 2 [0h], 6 [24h], 10 [48h], 14 [72h], 18 [96h], 22 [120h]). Spur M: DNA molecular weight marker XIV.

nachweisbar war, konnten 24h-120h nach der Behandlung mit A23187 und PMA auch IL-2 spezifische RT-PCR-Amplifikate (Bande bei 451bp) nachgewiesen werden (Abbildung 23

Spuren 1, 5, 9, 13, 17, und 21). Zusätzlich konnte bereits nach sechsständiger Aktivierung IL-2 im Kulturmedium detektiert werden (Tabelle 7). Bis zu einer Kultivierungsdauer von 96h war eine Steigerung der IL-2 Konzentration im Kulturmedium zu beobachten.

Da IL-2 nur von aktivierten, nicht aber von ruhenden T-Zellen gebildet wird, weist die durch die Mitogene PMA und A23187 induzierte IL-2 Synthese eine Aktivierung der Zellen nach.

	<b>IL-2 Konzentration (ng/ml)</b>
T0	0
T6	3,3
T18	20,0
T24	28,0
T48	113
T72	444
T96	523
T120	180

**Tab. 7: IL-2 Konzentration in Zellkulturüberständen ruhender (T0) und für 6h (T6), 18h (T18), 24h (T24), 48h (T48), 72h (T72), 96h (T96) und 120h (T120) mit PMA und A23187 aktivierter Zellen.** Angegeben ist die mit Hilfe des IL-2 ELISAs ermittelte Zytokinkonzentration in ng/ml.

#### **4.8.3 mRNA-Differential-Display**

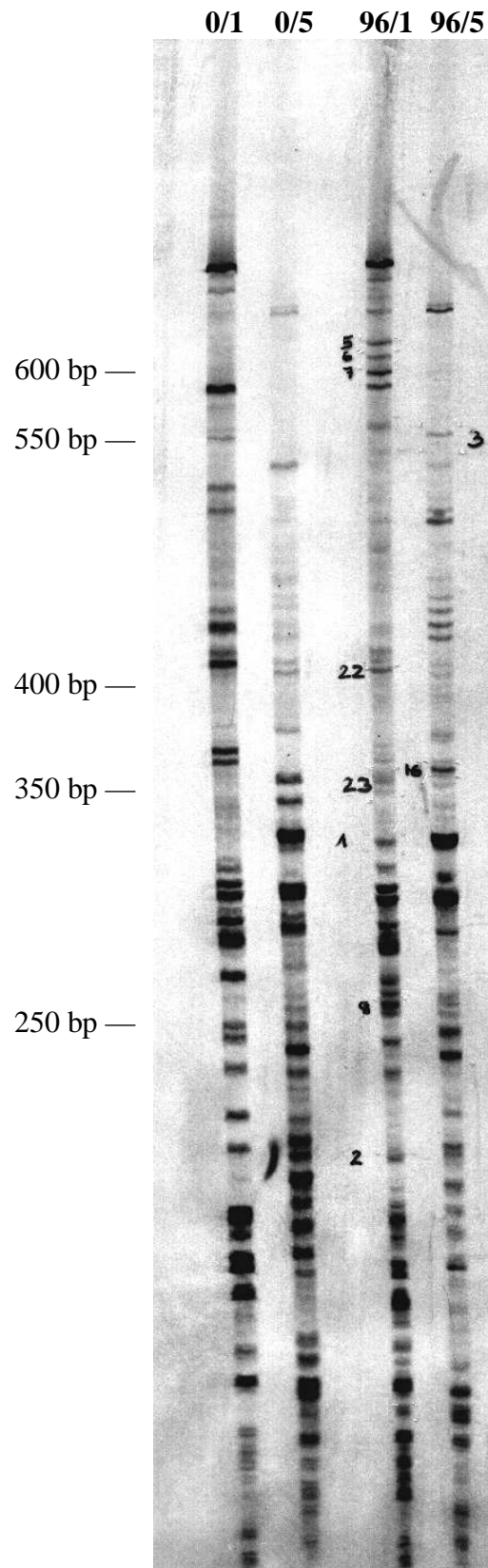
Das von Liang und Pardee entwickelte mRNA-Differential-Display bietet nach Angaben der Entwickler die Möglichkeit durch die Kombination verschiedener oligo dT-Primer mit unterschiedlichen 10mer Primern von allen vorhandenen mRNA-Spezies mindestens ein RT-PCR-Amplifikat und damit mindestens eine Bande auf dem Gel zu erzeugen. Somit sollte es möglich sein, alle zu einem bestimmten Zeitpunkt durch die Aktivierung der T-Zellen induzierten Faktoren mittels des Differential Displays und der nachfolgenden Versuche zu identifizieren.

Da T-Zellen nach ihrer Aktivierung eine Vielzahl verschiedener Proteine synthetisieren, die von ruhenden T-Zellen nicht gebildet werden, war mit dem Auffinden zahlreicher RT-PCR-Amplifikate zu rechnen. Deshalb erschien es sinnvoll zunächst nur ein RNA-Isolat aktivierter Zellen zu verwenden. Aufgrund eigener Ergebnisse sowie verschiedener Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wurde die RNA aus ruhenden Lymphozyten mit RNA aus Lymphozyten verglichen, die für 96 h mit PMA und A23187 aktiviert wurden. Versuche von Sören und Biberfeld (1973) mit PHA-stimulierten Lymphozyten belegten beispielsweise, daß sich der RNA-Gehalt der Lymphozyten in den ersten 4 h nach der Stimulation kaum verändert. 48 h

---

nach Stimulation hingegen hatte sich der RNA-Gehalt verdoppelt, nach 96 h sogar vervierfacht. Außerdem zeigten eigene Ergebnisse (Abschnitt 4.8.2, Tabelle 7) ebenso wie Ergebnisse von Heinze und Mohr (1990) und Ballmeyer (1993), daß zum Zeitpunkt T96 hohe Konzentrationen von IL-2 und anderen Zytokin-mRNAs (IL-5 und IFN- $\gamma$ ) in den Zellen vorliegen. Diese Ergebnisse lassen die Hoffnung zu, daß zum Zeitpunkt T96 auch unbekannte Wachstumsfaktoren nachweisbar sind.

Da bereits Spuren von DNA in den RNA-Präparationen die Ergebnisse des mRNA-Differential-Displays verfälschen würden, wurden möglicherweise vorhandene DNA-Kontaminationen mit Hilfe der DNase I abgebaut. Anschließend wurde die Reverse Transkription und die nachfolgende PCR wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Die dabei erhaltenen RT-PCR-Amplifikate wurden auf einem 6 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Exposition eines Röntgenfilms wurden die Fragmente sichtbar gemacht. Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Differential Displays mit den Primern H-T11A und H-AP1 bzw. H-AP5. Ruhende und für 96 h aktivierte Zellen wiesen bei jeweils gleicher Primerkombination überwiegend identische Banden auf. Einzelne Banden waren jedoch entweder nur in der Probe ruhender Zellen bzw. nur in der Probe aktivierter Zellen zu finden.



**Abb. 24: Autoradiogramm eines mRNA-Differential-Displays.**

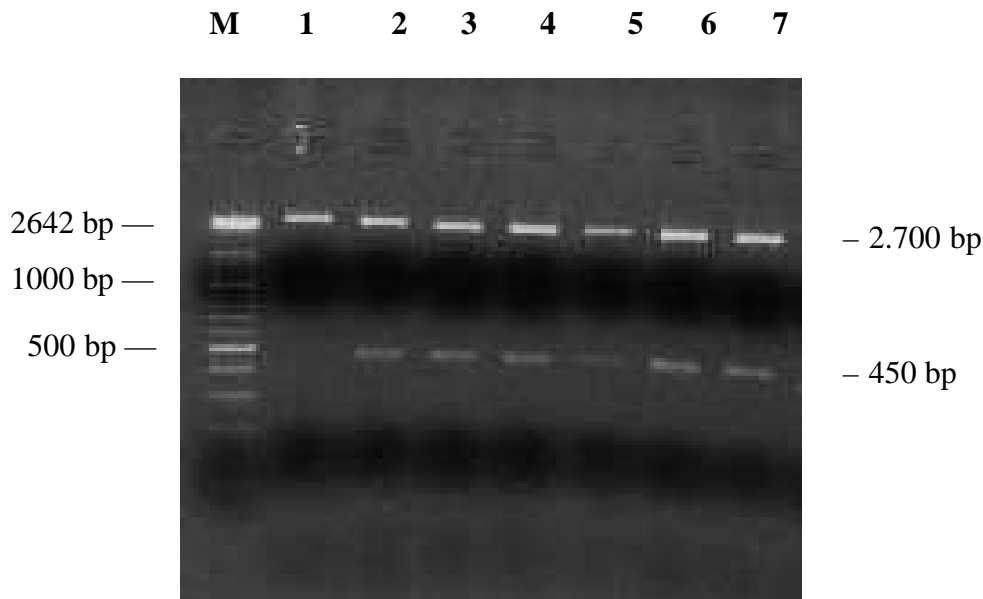
Verwendet wurde die mRNA von ruhenden Zellen und von Zellen, die für 96h mit PMA und A23187 aktiviert wurden. Als Primer wurden H-T11A sowie H-AP1 bzw. H-AP5 verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem 6 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die mit Zahlen markierten Banden könnten von differenziell exprimierten Genen stammen und wurden daher weiterverwendet.

Da nur solche Gene von Interesse waren, die durch die Aktivierung der Zellen exprimiert werden, wurden nur Banden aus dem Gel geschnitten, die ausschließlich bei der Probe aus aktivierten Zellen auftraten. Die in Abbildung 24 mit Ziffern gekennzeichneten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und weiterbearbeitet. Insgesamt wurden 23 Banden für weiterführende Untersuchungen ausgewählt:

	<b>Primerkombination</b>	<b>Länge in bp</b>
<b>Bande 1 (B1)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	300
<b>Bande 2 (B2)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	220
<b>Bande 3 (B3)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP5	550
<b>Bande 4 (B4)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP4	450
<b>Bande 5 (B5)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	600
<b>Bande 6 (B6)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	600
<b>Bande 7 (B7)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	580
<b>Bande 8 (B8)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	250
<b>Bande 9 (B9)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP3	600
<b>Bande 10 (B10)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP3	600
<b>Bande 11 (B11)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP3	350
<b>Bande 12 (B12)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP4	600
<b>Bande 13 (B13)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP7	500
<b>Bande 14 (B14)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP7	400
<b>Bande 15 (B15)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP7	250
<b>Bande 16 (B16)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP5	350
<b>Bande 17 (B17)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP2	380
<b>Bande 18 (B18)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP2	330
<b>Bande 19 (B19)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP4	300
<b>Bande 20 (B20)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP4	300
<b>Bande 21 (B21)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP4	250
<b>Bande 22 (B22)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	400
<b>Bande 23 (B23)</b>	H-T <sub>11</sub> A + H-AP1	350

Diese Fragmente wurden mittels einer zweiten PCR unter Verwendung derselben Primer vermehrt. Die PCR-Fragmente wurden dann „blunt-end“ in den Vektor pUC18 kloniert (Abschnitt 3.2.10). Mittels blue-white screen wurden positive Klone ausgewählt, aus denen dann die rekombinante Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep-spin Plasmid Kits“ aufgereinigt wurde (Abschnitt 3.2.13).

Zur Kontrolle der Klonierung wurden die Klone mit den Restriktionsendonukleasen Xba I und Eco R I geschnitten und im 1,2 % Agarosegel (Abschnitt 3.2.7) analysiert. Abbildung 25 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Klonierung des Fragments B14.



**Abb. 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der pUC18 Klone B14.1-B14.7 nach Restriktionsverdau mit Xba I und Eco R I.**

Spur M: DNA molecular weight marker XIV; Spur 1: B14.1; Spur 2: B14.2; Spur 3: B14.3; Spur 4: B14.4; Spur 5: B14.5; Spur 6: B14.6; Spur 7: B14.7.

In der Gelelektrophorese ließ sich bei allen Klonen die Bande der Vektor-DNA bei ca. 2.700 bp erkennen. Bei den Klonen B14.2- B14.7 war außerdem bei ca. 450 bp die spezifische DNA Bande des PCR-Fragments aus dem Differential Display zu erkennen, die jedoch bei Klon B14.1 fehlte.

Geeignete Klone der verschiedenen Fragmente wurden bei GATC (Konstanz) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit vektorspezifischen Sequenzierungsprimern. Alle 23 klonierten DNA-Fragmente wurden vollständig sequenziert, wobei sich zeigte, daß alle Fragmente von den Sequenzen des oligo dT-Primers und des jeweiligen 10mer Primers flankiert waren.

Die Suche nach Homologien zu bereits bekannten Sequenzen erfolgte in den Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ und PDB mittels BLAST (Altschul et al., 1990). Die Sequenzen der Banden B1 bis B23 sowie die jeweils homologen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. Tabelle 16 gibt einen Überblick über die den einzelnen Fragmenten zugeordneten homologen Sequenzen und den jeweiligen Grad der Übereinstimmung.

<b>Fragment</b>	<b>Homologe Sequenz [Referenz, Datenbanknummer]</b>
B1	keine signifikante Homologie zu einer bekannten Sequenz
B2	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 1.057 bis 1.238 der 3.748 Nukleotide langen humanen cAMP responsive element binding protein-like 2 (CREBL2) mRNA [Wlodarska et al., 1996; Andreasson et al., 1997; Hoornaert et al., 1998; NM001310]
B3 und B4	98 bzw. 99 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 439 bis 844 der 844 Nukleotide langen humanen IL-2 mRNA [Devos et al., 1983; X01586]
B5 und B7	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 923 bis 978 und 1.069 bis 1.563 bzw. 924 bis 1.066 und 1.185 bis 1.568 der 1608 Nukleotide langen humanen death associated protein 3 (DAP3) mRNA [Kissil et al., 1995; NM004632]
B6	98 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 2720 bis 3251 der 6.631 Nukleotide langen humanen oxysterol binding protein-related protein 3 (ORP3) mRNA [Gregorio-King et al., 2000; AY008372]
B8	99 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 107 bis 328 der 2.019 Nukleotide langen t-complex polypeptide 1 mRNA [Kirchhoff und Willison, 1990; X52882]
B9/ B12	99 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 67.032 bis 67.588 des 96.995 bp langen BAC-Klons RP11-394J1 [Worley et al., 1999; AC008149]
B10	99 % Übereinstimmung mit humaner Methionin Synthase mRNA (5-methyl-tetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR) mRNA) [Chen et al., 1997; Banerjee und Matthews, 1990; Li et al., 1996; Ludwig und Matthews, 1997; Matthews et al., 1998; U73338 und NM000254]
B11	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 1.397 bis 1.696 der 1.791 Nukleotide langen humanen nuclear matrix protein 55 (nmt55) mRNA [Traish et al., 1997; U89867]
B13	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 393 bis 827 der 827 Nukleotide langen humanen ribosomal protein L7 (RPL7) mRNA [Hemmerich et al., 1993; NM000971]
B14	99 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 157.812 bis 158.156 des 196.848 bp langen BAC-Klons RP11-449G16 [Sulston und Waterston, 1998; AC007684]
B15	keine signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen
B16	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 2.531 bis 2.826 der 2.826 Nukleotide langen humanen ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 2 (ABCB2) mRNA [XM004227]
B17	99 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 497 bis 796 der 907 Nukleotide langen humanen PNAS-102 mRNA [Yu et al., 2000; AF275798]
B18	keine signifikante Homologie zu einer bekannten Sequenz
B19	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 908 bis 1.167 des 1.442 Nukleotide langen cDNA-Klons ADSE01518 (FLJ20934 fis) [Kawakami et al., 2000; AK024587]
B20	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 99.785 bis 100.049 des 126.586 bp langen Klons RP4-806M20 [Lloyd, 2001; AL132655]
B21	100 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 347 bis 552 der 556 Nukleotide langen humanen ribosomal protein L24 (RPL24) mRNA [Johnson, 1993; NM000986]
B22	97 % Übereinstimmung mit den Nukleotiden 1.189 bis 1.522 der 2.060 Nukleotide langen humanen pre-mRNA splicing factor (SFRS3) mRNA [Liu et al., 1998; AF107405]
B23	keine signifikante Homologie zu einer bekannten Sequenz

**Tab. 8: Mittels Datenbankabgleich zu den Fragmenten B1 bis B23 ermittelte homologe Sequenzen.**



Anhand der Daten aus Tabelle 8 wird deutlich, daß die meisten Fragmente wie erwartet von bereits bekannten mRNA-Spezies stammen und damit für die weiteren Untersuchungen nicht von Interesse sind. Zu diesen Fragmenten gehören B2, B3, B4, B6, B8, B10, B11, B13, B19, B21 und B22.

Auch die Sequenzen der Fragmente B9 (B12), B14 und B20 sind bereits bekannt. Jedoch handelt es sich bei den zu diesen Fragmenten gefundenen homologen Sequenzen um DNA-Sequenzen, die im Rahmen des „human genome projects“ ermittelt wurden. Das Fragment B9 (B12) ist auf Chromosom 12 (12q22 102.7-103.4), Fragment B14 auf Chromosom 2 und Fragment B20 auf Chromosom 20 kodiert. Über die aus diesen Sequenzen gebildeten mRNAs oder Proteine liegen aber noch keine Informationen vor, so daß diese Fragmente weiterhin von Interesse sind.

Den Fragmenten B1, B15, B18 und B23 konnten keine homologen Sequenzen zugeordnet werden. Es handelt sich also um Fragmente unbekannter mRNA-Spezies die im Folgenden weiter untersucht werden.

Die Fragmente B5 und B7 zeigten große Übereinstimmungen mit dem 3'-Terminus der death associated protein 3 mRNA (Kissil et al., 1995; Datenbanknummer NM004632). Jedoch waren in den Fragmenten B5 und B7 Deletionen zu beobachten. Das Fragment B5 setzte sich aus den Nukleotiden 923-974 und 1.066-1.608 und das Fragment B7 aus den Nukleotiden 924-1.061 und 1.180-1.608 der DAP3 mRNA zusammen. Ob es sich bei den Fragmenten B5 und B7 tatsächlich um Teile der DAP3 mRNA oder um Teile von zwei anderen sehr ähnlichen mRNA-Molekülen handelt, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Für das Fragment B17 konnte eine Übereinstimmung von 99 % mit den Nukleotiden 497 bis 796 der humanen PNAS-102 mRNA (Yu et al., 2000; Datenbanknummer AF275798) ermittelt werden. Die auf diesen Bereich folgenden 42 Nukleotide des Fragments B17 stimmen jedoch nicht mehr mit der Sequenz der PNAS-102 mRNA überein. Möglicherweise ist das Fragment B17 kein Teil der PNAS-102 mRNA, sondern stammt von einer ähnlichen mRNA. Da verschiedene andere Fragmente von unbekanntem mRNA-Molekülen vorlagen, wurde auf weitere Untersuchungen der Fragmente B5, B7 und B17 verzichtet.

Wie erwartet waren die Fragmente B3, B4, B13 und B21 mit dem 3'-Ende des jeweils homologen mRNA Moleküls identisch. Im Gegensatz dazu waren die Fragmente B2, B6, B8, B10, B11, B17, B19 und B22 in der Mitte des jeweiligen mRNAs lokalisiert. Statt an den poly A-Schwanz der mRNA band der oligo-dT Primer vermutlich beispielsweise bei

Fragment B8 an die 6 A's in Position 324-329 und bei Fragment B10 an die 9 A's in Position 6.847-6.855.

Bei den Fragmenten, zu denen keine homologen Sequenzen gefunden werden konnten, können Polyadenylierungssignale, wie sie 11 bis 30 Nukleotide vor der Polyadenylierungsstelle am 3'-Ende der mRNA auftreten, Auskunft darüber geben, ob es sich um das 3'-Ende oder eine andere Stelle der mRNA handelt. Häufige humane Polyadenylierungssignale sind die Hexamere AATAAA und AATATA. In den Sequenzen der Fragmente B1, B9 (B12), B14, B15 und B18 konnten keine Polyadenylierungssignale identifiziert werden. Das Fragment B23 hingegen weist das Polyadenylierungssignal AATATA (271-276) und das Fragment B20 das Polyadenylierungssignal AATAAA (311-316) auf.

Für die weiteren Untersuchungen wurden nur die unbekanntenen Fragmente B1, B9 (B12), B14, B15, B18, B20 und B23 verwendet. Hinzu kamen noch die zum Zeitpunkt der Untersuchungen unbekanntenen Fragmente B19 und B22.

#### ***4.8.4 Kontrolle des mRNA-Differential-Displays***

Zur Kontrolle des Differential Displays wurden für alle bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntenen Fragmente PCR-Reaktionen durchgeführt. Auf diesem Wege sollte sichergestellt werden, daß es sich tatsächlich um Fragmente von induzierten mRNA-Molekülen handelt. Dazu wurde mit spezifischen Primern eine kürzere Teilsequenz der jeweiligen Fragmente aus RNA-Präparationen ruhender und für 96 h aktivierter Zellen amplifiziert.

In Tabelle 9 sind die Resultate der unterschiedlichen RT-PCR-Reaktionen dargestellt.

	<b>T0</b>	<b>T96</b>
B1	-	+
B9/B12	-	+
B14	+	+
B15	-	+
B18	-	+
B19	-	+
B20	+	+
B22	-	+
B23	-	+

**Tab. 9: Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse zur Kontrolle des Differential Displays.** Mittels RT-PCR wurde aus RNA-Extrakten von ruhenden und von für 96 h mit PMA und A23187 aktivierten Zellen kürzere Teilstücke der verschiedenen unbekanntenen Fragmente amplifiziert. (+): spezifische Bande vorhanden (-): keine Bande vorhanden

Die zu den Fragmenten B1, B9 (B12), B18, B19, B22 und B23 gehörenden mRNAs konnten tatsächlich nur in aktivierten Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten die zu den Fragmenten B14 und B20 gehörenden mRNAs sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Zellen detektiert werden.

#### 4.9 Untersuchungen zur Expression der unbekannt mRNA-Moleküle in induzierten Lymphozyten

Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte zunächst der zeitliche Verlauf der Expression der unbekannt mRNA-Moleküle geklärt werden. Des weiteren sollte ermittelt werden, ob die Expression der unbekannt mRNA-Spezies auch durch andere T-Zell Stimulatoren wie z.B. PHA-M und ConA induziert werden kann.

##### 4.9.1 Zeitlicher Verlauf der Expression

In der RT-PCR wurde RNA eingesetzt, die entweder aus ruhenden Zellen oder aus unterschiedlich lang mit PMA und A23187 aktivierten Zellen gewonnen wurde. Tabelle 10 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

	T0	T24	T48	T72	T96	T120
B1	-	-	+	+	+	+
B9/12	-	-	-	+	+	+
B15	-	+	+	+	+	+
B18	-	+	+	+	+	+
B19	-	+	+	+	+	+
B22	-	+	+	+	+	+
B23	-	-	+	+	+	+

**Tab. 10: Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Expression der unbekannt mRNA-Moleküle**

Mittels RT-PCR wurden aus RNA-Extrakten von ruhenden und von für 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h mit PMA und A23187 aktivierten Zellen kürzere Teilstücke der verschiedenen unbekannt Fragmente amplifiziert.

(+): spezifische Bande vorhanden (-): keine spezifische Bande vorhanden

Es zeigt sich, daß alle unbekannt mRNA-Moleküle nach 72-120 h Aktivierung mit PMA und A23187 in den Zellen nachweisbar waren. Der Expressionsbeginn der mRNA Moleküle war jeweils unterschiedlich; die B15-, B18-, B19- und B22-mRNA konnten bereits nach 24 h

Aktivierung, die B1- und B23-mRNA nach 48 h und die B9 (B12)-mRNA sogar erst nach 72 h Aktivierung nachgewiesen werden.

#### ***4.9.2 Nachweis der unbekannt mRNA-Moleküle nach Aktivierung mit alternativen T-Zell Stimulatoren***

Mit Hilfe dieser Experimente sollte ermittelt werden, ob sich die Expression der unbekannt mRNA Moleküle auch durch andere T-Zell-Stimulatoren als PMA und A23187 induzieren läßt.

Aus lymphozytenreichen Plasmaüberständen gewonnene Lymphozyten wurden, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, für 96 h mit PHA-M und ConA aktiviert. In der aus den Zellen gewonnenen Gesamt-RNA sollte dann die B1-, B9- (B12-), B18-, B19-, B20-, B22- und B23-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Tabelle 11 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

	<b>ConA</b>	<b>PHA-M</b>
B1	+	+
B9/B12	-	-
B15	+	+
B18	-	+
B19	+	+
B20	+	+
B22	+	+
B23	+	+

**Tab. 11: Nachweis der unbekannt mRNA-Moleküle B1, B9 (B12), B15, B18, B19, B20, B22, B23 in ConA- und PHA-M- stimulierten Zellen mittels RT-PCR.**

Aus isolierten Leukozyten, die für 96 h mit PHA-M bzw. ConA stimuliert wurden, wurde die RNA isoliert und diese dann unter den in Abschnitt 3.2.6 beschriebenen Bedingungen der RT-PCR unterworfen. (+): Bande im Agarosegel vorhanden; (-): keine Bande sichtbar

Mit den zuvor beschriebenen RT-PCR-Reaktionen konnte die B1-, B15-, B19-, B20-, B22- und B23-mRNA in ConA- und PHA-M- stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Die B9- (B12-) mRNA ließ sich weder in ConA- noch in PHA-M-stimulierten Zellen nachweisen, wogegen sich die B18-mRNA nur in PHA-M-stimulierten Zellen, aber nicht in ConA-stimulierten Zellen nachweisen ließ.

## 5. DISKUSSION

Aktivierte T-Zellen sezernieren eine Vielzahl verschiedener Faktoren, die unter anderem auch die Hämatopoese beeinflussen. In vivo sind diese Faktoren vermutlich von entscheidender Bedeutung für die induzierte Hämatopoese, die in akuten Stresssituationen für die Bereitstellung bestimmter, gerade vermehrt benötigter, reifer Blutzellen verantwortlich ist (Torok-Storb, 1988). Um die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen den vorherrschenden Bedingungen anpassen zu können, synthetisieren aktivierte T-Zellen Faktoren mit aktivierender oder inhibierender Wirkung auf bestimmte Entwicklungsstadien der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Einige solcher T-Zellfaktoren sind bereits bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Hinweisen für die Existenz noch unbekannter hämatopoeserelevanter Faktoren gesucht. Dazu wurden zunächst die Kulturüberstände aktivierter T-Zellen und die Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3 hinsichtlich ihrer Zytokinzusammensetzung charakterisiert und der Einfluß dieser Faktorenkombinationen auf die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus PB und NSB untersucht.

Bei der Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus NSB und PB unter dem Einfluß der Zellkulturüberstände aktivierter T-Zellen (Abschnitt 4.3; Abb. 11 A-D) und der Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3 (Abschnitt 4.4; Abb. 12 A-D) konnte eine eher schwache Proliferation der Zellen beobachtet werden. Diese kann auf die für die Kultivierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen geringen Zytokinkonzentrationen (Abschnitt 4.3; Tab. 3 und Abschnitt 4.4; Tab. 4) zurückzuführen sein. Die Konzentrationen der in den Gemischen vorhandenen proliferationsfördernden Zytokine war (außer bei SF3-haltigem Medium) gerade ausreichend groß, um die Zellen über den beobachteten Zeitraum von 7 bis maximal 28 Tagen lebensfähig zu halten. Eine starke Proliferation der Zellen konnte allerdings nicht ausgelöst werden. Da in den Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen und den Reinigungsfraktionen neben proliferationsfördernden auch inhibierend wirkende Zytokine nachgewiesen werden konnten, kann die Proliferation der Zellen nicht nur durch die niedrigen Zytokinkonzentrationen, sondern zusätzlich auch durch antagonistische Effekte zwischen den Zytokinen eingeschränkt worden sein. In diesem Zusammenhang konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, daß IL-3, IL-6 und GM-CSF die Proliferation früher myeloischer Vorläuferzellen (CFU-GM) fördern (Hapel et al., 1985; Yang et al., 1986; Kishimoto, 1989; Metcalf et al., 1986 a, b), während IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Proliferation eben dieser Zellen hemmen (Murphy et al., 1988; Skobin et al., 2000).

Des Weiteren war auffällig, daß deutlich ansteigende Zytokinkonzentrationen, z.B. zwischen T96- und SF0-haltigem Kulturmedium, nicht automatisch zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation führten. So konnte die mit T96 erreichte maximale Anzahl an CD34<sup>+</sup>- bzw. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen unter dem Einfluß von SF0 nur annähernd verdoppelt werden. Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, daß die Faktorengemische aufgrund ihrer Zusammensetzung und der Konzentrationen ihrer Komponenten die CD34<sup>+</sup>- bzw. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen zwar lebensfähig erhalten konnten, die Bedingungen für eine stärkere Vermehrung der Zellen aber noch nicht erreicht wurden.

Ein Vergleich von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen machte deutlich, daß sich die Subpopulation der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen jeweils stärker vermehrte als die CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation. Besonders auffällig waren in diesem Zusammenhang die Kultivierungsexperimente mit T6-, T18-, und T24-haltigen Medien (Abschnitt 4.3; Abb. 11 A-D). In diesen Kulturen sank die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen bereits nach 7 Tagen unter die Ausgangszellzahl ab, während sich die Zahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen verdoppelte bis vervierfachte. In diesen Kulturen stieg der Anteil der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen an der CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation von anfangs 10 % auf 47 bis 84 % an. Die stärkere Vermehrung früher CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Vorläuferzellen stand im Einklang mit größeren Konzentrationen von Zytokinen wie IL-3, IL-6 oder GM-CSF, die proliferationsfördernd auf linienunspezifische Vorläuferzellen wirken.

Lediglich bei Kultivierungsexperimenten mit SF3-haltigem Medium (Abschnitt 4.4; Abb. 12 A-D) war weder eine Vermehrung der CD34<sup>+</sup>- noch der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen zu beobachten. Ähnlich wie im T6-haltigen Kulturmedium lagen auch im SF3-haltigen Kulturmedium die Konzentrationen der meisten der auf ruhende hämatopoetische Stammzellen bzw. frühe Vorläuferzellen wirkenden Zytokine unter 50 pg/ml. Anders als bei Verwendung des SF3-haltigen Kulturmediums konnte jedoch unter Einfluß des T6-haltigen Mediums eine Verdopplung der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellzahl erreicht werden. Der größte mittels ELISA festgestellte Unterschied zwischen diesen beiden Medien betraf deren RANTES-Konzentration. Während RANTES im T6-haltigen Kulturmedium mit einer Konzentration von 226 pg/ml vorlag, war die Konzentration im SF3-haltigen Kulturmedium mit 21.778 pg/ml deutlich höher. Aufgrund geringerer Konzentrationsunterschiede bei den anderen Zytokinen, ist die verminderte Proliferation im SF3-haltigen Kulturmedium möglicherweise auf die höhere RANTES-Konzentration zurückzuführen. Über die Wirkung von RANTES auf die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen ist bislang wenig bekannt. Durch Experimente von Broxmeyer und

Mitarbeitern (1993) konnte gezeigt werden, daß RANTES die von GM-CSF und SCF induzierte Proliferation von CFU-GEMM, CFU-GM und BFU-E nicht beeinflusst. Des Weiteren konnten keine Synergie-Effekte mit MIP-1 $\alpha$  beobachtet werden. Ob RANTES in den Experimenten mit SF3-haltigem Kulturmedium tatsächlich die Proliferation der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen negativ beeinflusste, muß durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB und PB reagierten mit unterschiedlich starker Proliferation auf die Kulturüberstände aktivierter T-Zellen und die Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3. Diese Unterschiede betrafen vor allem die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Subpopulation: die Zellen aus PB reagierten mit einer stärkeren Proliferation als Zellen aus NSB. Auch andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, daß CD34<sup>+</sup>-Zellen aus NSB und aus PB mit unterschiedlich starker Proliferation auf verschiedene Zytokinkombinationen reagieren. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wurden aber z.B. durch van Epps et al. (1994) und Wu et al. (1999) nur Experimente beschrieben, die zu einer stärkeren Proliferation von Zellen aus NSB führten. Die größere Proliferationskapazität der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Subpopulation aus NSB wurde darauf zurückgeführt, daß sich diese Zellen in einem früheren Entwicklungsstadium (ähnlich wie Zellen der fötalen Leber) befinden als vergleichbare Zellen aus PB oder auch aus Knochenmark. Sie können daher zu einem signifikant höheren Prozentsatz proliferieren und dabei pro Zelle mehr Tochterzellen generieren (Hao et al., 1995; Broxmeyer et al., 1991 und 1992). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen hingegen, daß CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB nicht generell stärker proliferieren als Zellen aus PB. Die durch den Zusatz von Zellkulturüberständen aktivierter T-Zellen und den Reinigungsfraktionen SF0, SF1 und SF3 erhaltenen Zytokinkombinationen fördern durch ihre Zusammensetzung und möglicherweise auch durch ihre Konzentrationen die Proliferation der Zellen aus PB stärker als die der Zellen aus NSB.

Durch Kombination verschiedener Zytokine mit der Reinigungsfraktion SF1 (Abschnitt 4.6; Abb. 14 A-D) wurde nach Hinweisen auf unbekannte Faktoren in der Reinigungsfraktion SF1 gesucht. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden Kontrollexperimente mit rekombinanten Zytokinen (Abschnitt 4.5; Abb. 15 A-D) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß durch die Kombination von LIF und FL (Zytokinkombination M) an Tag 7 eine Verdopplung der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellzahl aus PB erreicht werden konnte, während die Zahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB annähernd konstant blieb. Die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen verringerte sich

sowohl in den Kulturen aus PB als auch in denen aus NSB. Dies läßt den Schluß zu, daß LIF und FL nur auf frühe hämatopoetische Zellen wirken und in dieser Kombination eher die Lebensfähigkeit dieser Zellen erhalten als deren Proliferation anzuregen. Diese Einschätzung wird gestützt durch Ergebnisse von Ogawa (1993), Borge et al. (1997) und Ratajczak et al. (1997). Auch ihre Versuche mit LIF und FL zeigten, daß die frühen hämatopoetischen Zellen zwar lebensfähig erhalten, aber keine Proliferation ausgelöst werden konnte. Ein anderes Bild ergibt sich wenn FL und LIF mit anderen Wachstumsfaktoren kombiniert werden. In diesem Fall beschreiben Leary et al. (1992), Ogawa (1992) und Shah et al. (1996), daß FL und LIF dazu führen, daß ruhende linienunspezifische Vorläuferzellen die G<sub>0</sub>-Phase verlassen und zu proliferieren beginnen.

Wurde der Kombination von LIF und FL das Zytokin SCF zugefügt (Zytokinkombination L), so konnte die bereits von Leary et al. (1992), Ogawa (1992) und Shah et al. (1996) beschriebene Proliferation der Zellen beobachtet werden. Neben einer deutlich stärkeren Vermehrung der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen ermöglichte der Zusatz von SCF auch die Erhaltung der Lebensfähigkeit der späteren hämatopoetischen Vorläuferzellen. Entsprechend konnte die Gesamtzahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen leicht gesteigert werden. SCF bewirkte in diesen Versuchen eine Zunahme der Proliferation um den Faktor 2,7-9,9. Laut Metcalf (1993) kann zwar SCF alleine nicht die Proliferation von CD34<sup>+</sup>-Zellen induzieren, aber deren Überleben in Kultur sichern. Erst in Synergie mit anderen Wachstumsfaktoren ist SCF ein potenter Stimulator für die Zellproliferation (Galli et al., 1994). Jacobsen et al. (1995) konnten mit der Kombination von SCF und FL aus einer Kultur mit frühen hämatopoetischen Zellen der Maus eine große Zahl myeloischer Zellen generieren. Auch die Zytokinkombination L bewirkte eine starke Differenzierung der Zellen, die sich in einer steigenden Zahl von CD34<sup>-</sup>-Zellen manifestierte. Da in den durchgeführten Experimenten das Augenmerk auf den CD34<sup>+</sup>-Zellen lag, ist die Population der CD34<sup>-</sup>-Zellen in den Abbildungen 15 A-D nicht berücksichtigt. Die in dieser Arbeit registrierte Vermehrung von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen konnte jedoch von Jacobsen et al. (1995) nicht beobachtet werden.

Eine starke Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen wurde unter dem Einfluß der Zytokinkombination A, bestehend aus SCF, G-CSF (oder GM-CSF), IL-3 und IL-6, erreicht. Wie erwartet, wurde besonders die Vermehrung früher Vorläuferzellen gesteigert, da die verwendeten Wachstumsfaktoren auf ruhende Stammzellen bzw. frühe linienunspezifische Vorläuferzellen wirken (Ogawa, 1993). In Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Ergebnissen konnte die Arbeitsgruppe um Gehling (1997) ebenfalls feststellen, daß



die Kombination aus SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF über besonders gute proliferationsfördernde Eigenschaften verfügt.

Bei Verwendung der Zytokinkombination X (diese entspricht der Zytokinkombination A ohne SCF) konnte im Vergleich zur Zytokinkombination A eine deutlich schlechtere Vermehrung der CD34<sup>+</sup>- und insbesondere der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen beobachtet werden. Die Proliferation der CD34<sup>+</sup> bzw. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen war bei Verwendung der Zytokinkombination A um den Faktor 1,4-20,4 größer als bei Verwendung der Zytokinkombination X. Auch andere Arbeitsgruppen (Zusammenfassung bei Galli et al., 1994) beschreiben ähnlich starke Effekte von SCF in Kombination mit anderen Zytokinen.

Während die Zytokinkombinationen X und M, ähnlich wie die Zellkulturüberstände aktivierter T-Zellen (T6 bis T96) und die Reinigungsfractionen SF0 und SF1, stärker auf CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB wirkten, bewirkten die Zytokinkombinationen A und L eine stärkere Proliferation der Zellen aus NSB. Da sich die Zytokinkombinationen A und X bzw. M und L nur durch den Zusatz von SCF unterscheiden, muß dieser Effekt auf SCF zurückzuführen sein. Derselbe Effekt konnte auch durch eine Kombination der Reinigungsfraction SF1 mit SCF erzielt werden. Die größere Empfindlichkeit der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB könnte darauf beruhen, daß mehr Zellen den SCF-Rezeptor (CD117, c-kit) exprimieren, oder aber die c-kit Expression auf den einzelnen Zellen stärker ist. Durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, daß CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB und Knochenmark eine starke Expression von c-kit aufweisen (Laver et al., 1995; Weiss et al., 1991; Olweus et al., 1996), die Expression aber mit zunehmender Differenzierung der Zellen schwächer wird (Lyman und Jacobson, 1998). Über die Expression von c-kit auf CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB ist nichts bekannt. Da sich die Zellen aus PB, wie bereits erwähnt, in einem späteren Entwicklungsstadium befinden als vergleichbare Zellen in NSB (Hao et al., 1995; Broxmeyer et al., 1991 und 1992), könnte sich die c-kit Expression durchaus unterscheiden. Durch immunmagnetische Separation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus PB und NSB und anschließender durchflußzytometrischer Bestimmung des Anteils der c-kit<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamtpopulation, sowie der Antigendichte von c-kit auf der Zelloberfläche, kann in Zukunft versucht werden, diese Theorie zu belegen.

Der Zusatz von FL und LIF (einzeln bzw. in Kombination [Zytokinkombination M]) zu einem SF1-haltigen Kulturmedium (Abschnitt 4.6; Abb. 14 A-D) verringerte im Vergleich zu rein SF1-haltigem Medium die Proliferation von CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB und PB. Aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wäre eigentlich zu erwarten gewesen,

daß LIF und FL einen Anstieg der Zellzahlen bewirken. Beide Zytokine sollen in Kombination mit anderen Faktoren dazu führen, daß ruhende, linienunspezifische Vorläuferzellen die G<sub>0</sub>-Phase verlassen und proliferieren (Leary et al., 1992; Ogawa, 1992 und Shah et al., 1996). Eine mögliche Ursache für die hier beobachteten Effekte könnte die Wirkungsweise von LIF und FL auf CD34<sup>+</sup>-Zellen darstellen. Derzeit wird diskutiert, ob die Wirkung verschiedener hämatopoetischer Wachstumsfaktoren u.a. darauf zurückzuführen sein könnte, daß diese Faktoren eine Expressionssteigerung verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren hervorrufen (Metcalf, 1993). Solche Faktoren würden einen indirekten Einfluß auf die Proliferation von CD34<sup>+</sup>-Zellen ausüben, indem die Zellen empfindlicher auf andere Wachstumsfaktoren reagieren. Die in diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß LIF und FL solche indirekt wirksamen Zytokine sein könnten. Beide könnten die Expression von Rezeptoren für stimulierende und inhibierende Wachstumsfaktoren induziert haben. Die Wirkung der in der Reinigungsfraction SF1 vorhandenen inhibitorisch wirkenden Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ ) könnte auf diese Weise soweit verstärkt worden sein, daß die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen unter Zusatz von LIF und FL sogar gehemmt wurde. Da die Arbeitsgruppen um Leary, Ogawa und Shah nur mit proliferationsfördernden Zytokinen experimentierten, konnte eine mögliche durch LIF und FL hervorgerufene verstärkte Expression von Rezeptoren für inhibierend wirkende Wachstumsfaktoren nicht gefunden werden. Eine durch FL und LIF hervorgerufene gleichzeitige Expressionssteigerung von Rezeptoren für inhibierende und stimulierende Wachstumsfaktoren könnte in vivo bei der Hämatopoeseregulation von Bedeutung sein.

Daß die Kombination von LIF und FL (Zytokinkombination M) eher die Lebensfähigkeit früher hämatopoetischer Zellen erhielt, als deren Proliferation anzuregen, unterstützt die Vermutung über die Wirkungsweise von LIF und FL. Die direkten Einflüsse von LIF und FL genügten, um die Zellen lebensfähig zu halten. Da aber keine weiteren proliferationsfördernden Zytokine im Medium vorhanden waren, konnten diese Zellen nicht stärker proliferieren.

Im Gegensatz zu LIF und FL konnte der Zusatz von SCF die durch SF1 hervorgerufene Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen steigern. Die Wirkung von SCF scheint also durch einen anderen Mechanismus vermittelt zu werden als die von LIF und FL. Leary und Mitarbeiter (1992) postulieren, daß SCF synergistisch mit anderen aktivierend wirkenden Zytokinen die Proliferation früher Vorläuferzellen direkt positiv beeinflusst.

Der Zusatz von LIF, FL und SCF (Zytokinkombination L) zur Reinigungsfraction SF1 konnte im Vergleich zur Wirkung der Reinigungsfraction SF1 die Vermehrung der CD34<sup>+</sup>- und besonders der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB steigern. Die proliferationsfördernde Wirkung von SCF war folglich größer als die durch LIF und FL ausgelösten inhibierenden Einflüsse. Im Gegensatz dazu überwogen bei den Zellen aus PB die inhibierenden Einflüsse von FL und LIF, was zu einer generellen Inhibition der Proliferation führte. Ausgelöst wurden diese gegensätzlichen Ergebnisse möglicherweise durch die bereits postulierte unterschiedliche Expression von c-kit, die die Zellen aus PB weniger empfindlich auf SCF reagieren ließ.

Die durch SF1 vermittelte Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB und PB wurde durch die gleichzeitige Gabe der Zytokinkombination A gesteigert, wobei die Effekte auf die Zellen aus NSB größer waren als auf die Zellen aus PB. Hervorgerufen wurde diese Proliferationssteigerung vermutlich durch größere Zytokinkonzentrationen.

Die durch die Kombination von SF1 und Zytokinkombination A erreichte Proliferation der CD34<sup>+</sup>-Zellen war geringer als bei alleiniger Verwendung der Zytokinkombination A. Dies ist wahrscheinlich auf inhibitorisch wirkende Zytokine zurückzuführen, die in der Reinigungsfraction SF1 vorhanden sind.

Im Gegensatz hierzu konnte z.B. die gleichzeitige Gabe der Reinigungsfraction SF1 und der Zytokinkombination M die Proliferation der CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB und PB stärker stimulieren als es die alleinige Gabe der Zytokinkombination M vermochte. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß unter dem Einfluß der Zytokinkombination M lediglich eine schwache Vermehrung der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen (um den Faktor 2,5 für Zellen aus PB bzw. 1,4 für Zellen aus NSB) erreicht werden konnte, während unter dem Einfluß der Zytokinkombination A eine weitaus stärkere Vermehrung sowohl der CD34<sup>+</sup>- als auch CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen stattfand (um den Faktor 15,9-52,0 für Zellen aus PB bzw. 26,7-88,1 für Zellen aus NSB). Da die Reinigungsfraction SF1 sowohl proliferationsfördernde Komponenten, wie IL-3, IL-6 oder GM-CSF, als auch inhibierende Komponenten, wie MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  enthält, kann SF1 in Kombination mit einem stark proliferationsfördernden Zytokingemisch dessen Wirksamkeit reduzieren, aber in Kombination mit einem nur sehr schwach proliferationsfördernden Zytokingemisch dessen Wirksamkeit verbessern.

Während die Reinigungsfraction SF1 und die Zytokinkombination X einzeln jeweils eine stärkere Vermehrung der Zellen aus PB induzierten, führte die Kombination beider zu einer stärkeren Vermehrung der Zellen aus NSB. Die Vermehrung der Zellen aus PB war unter dem

Einfluß der Kombination von SF1 und der Zytokinkombination X sogar schwächer als unter Einfluß der einzelnen Komponenten. Dieser Effekt muß auf Komponenten in der Reinigungsfraction SF1 zurückzuführen sein, da die in der Zytokinkombination X enthaltenen Zytokine ausschließlich proliferationsfördernd wirken: IL-3 und G-CSF (GM-CSF) verfügen über direkt koloniestimulierende Aktivität, während IL-6 nur indirekt, d.h. in diesem Fall in Synergie mit koloniestimulierenden Faktoren wirksam ist (Brach und Herrmann, 1991). Da dies nur bei Zellen aus PB, aber nicht bei Zellen aus NSB auftrat, wirkten die Faktoren vermutlich nur auf die späteren Entwicklungsstadien der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen, die wiederum vermehrt in PB auftreten. Welche Faktoren für diesen Effekt verantwortlich waren, konnte nicht abschließend geklärt werden. Auch konnten in der Literatur keine Hinweise auf ein inhibierend wirkendes Zytokin gefunden werden, das bei ansteigender Konzentration aktivierender Zytokine (IL-3, IL-6, G-CSF oder GM-CSF) verstärkte Effekte auf CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen ausübt. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die beobachteten Effekte zumindest zum Teil auf den Einflüssen eines noch unbekanntes Wachstumsfaktors beruhen.

Um weitere Hinweise auf unbekannte Faktoren mit hämatopoetischer Wirkung zu erlangen, wurden die Reinigungsfractionen SF0 und SF1 durch eine ConA-Chromatographie weiter aufgetrennt und die entstehenden Fraktionen erneut auf ihre Wirkung auf CD34<sup>+</sup>-Zellen untersucht.

Durch die ConA-Chromatographie konnte eine partielle Auftrennung der in den Reinigungsfractionen SF0 und SF1 vorhandenen Faktorengemische erreicht werden (Abschnitt 4.7.1). Etwa 70-80 % der Proteine und Peptide banden nicht an Concanavalin A und sammelten sich dementsprechend in der Durchlaufraction. Es sollte sich also ausschließlich um Faktoren ohne N-Glykosylierung handeln. Die nachfolgend durchgeführte elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen (Abschnitt 4.7.1; Abb. 17 und 18) und die ELISAs (Abschnitt 4.1; Tab. 1) zeigten, daß durch die ConA-Chromatographie eine Anreicherung der verschiedenen Zytokine in jeweils einer der beiden Fraktionen erreicht wurde. In der entsprechend anderen Fraktion konnten aber stets auch mehr oder weniger große Konzentrationen dieser Zytokine detektiert werden. Beispielsweise reicherte sich TNF- $\alpha$ , ein nicht glykosyliertes Protein (Paul 1993), wie erwartet im ConA-Durchlauf (SF0 ConA D: 509,6 ng/ml) an. Mit einer fünfzigfach niedrigeren Konzentration konnte es allerdings auch in der Eluatraction nachgewiesen werden. Mit der ConA-Chromatographie wurde also nur eine Anreicherung, aber keine saubere Auftrennung der Faktoren erreicht.

Eine mögliche Ursache könnten unspezifische Wechselwirkungen der Faktoren mit der Matrix sein, die das jeweilige Protein oder Peptid an der Matrix festhalten.

Andererseits konnten aber auch Faktoren, die eigentlich an ConA binden sollten, im Durchlauf nachgewiesen werden. So wurde z.B. bei der ConA-Chromatographie von SF0 das N-glykosylierte Protein IL-3 (Clark-Lewis et al., 1986) im Eluat angereichert (ca. 4,2 µg/ml). Trotzdem konnten in der Durchlaufraktion noch ca. 2,2 µg/ml IL-3 detektiert werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist die variable Glykosylierung von IL-3. Mohr und Knüver-Hopf (1990) konnten in ihren Arbeiten beobachten, daß der Grad der N-Glykosylierung von IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  variierte. Kurz nach Aktivierung der Zellen wurden nur vollständig glykosylierte Formen der Zytokine sezerniert. Nach 48-96 h wurden aber auch weniger bis gar nicht glykosylierte Formen sezerniert. Somit lagen die Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- $\gamma$  vermutlich als heterogene Mischungen vor, die durch die ConA-Chromatographie entsprechend des Glykosylierungsgrades aufgetrennt wurden und daher sowohl im Durchlauf als auch im Eluat nachweisbar waren.

Im ConA-Eluat von SF1 konnten nur geringe Mengen von Zytokinen detektiert werden, welche die Vermehrung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen stimulieren (Abschnitt 4.1; Tab. 1 und Abschnitt 4.7.3; Tab. 6). Sowohl die Konzentration der auf frühe Vorläuferzellen wirkenden Zytokine IL-3, GM-CSF und LIF, als auch die Konzentration des auf spätere Vorläuferzellen wirkenden IL-5 lagen unter 100 pg/ml. Im Vergleich dazu waren relativ große Mengen inhibitorisch wirkender Zytokine (besonders IFN- $\gamma$ : 40 ng/ml) vorhanden. Entsprechend konnten auch kaum proliferationsfördernde Eigenschaften auf die CD34<sup>+</sup>-Gesamtpopulation oder die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Subpopulation nachgewiesen werden. Der ConA-Durchlauf von SF1 konnte im Vergleich zum Ausgangsmaterial besonders die Proliferation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen anregen. Während das Ausgangsmaterial SF1 die Proliferation der Zellen aus PB stärker förderte, bewirkte der ConA-Durchlauf eine etwa gleich starke Proliferation von Zellen aus PB und NSB. Als mögliche Ursache hierfür kommt eine deutlich erhöhte IL-6 Konzentration im ConA-Durchlauf in Frage (12.587 pg/ml gegenüber 1.389 pg/ml im Ausgangsmaterial SF1).

Bei der Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen unter Zusatz von SF0 und dem daraus gewonnenen ConA-Durchlauf bzw. -Eluat (Abschnitt 4.7.2; Abb. 19) wurde deutlich, daß der größte Einfluß auf die Vermehrung der frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen) aus NSB ausgeübt wurde. Die Ursache hierfür ist vermutlich die Zytokinzusammen-

setzung der Fraktionen. Sowohl im Ausgangsmaterial, als auch im ConA-Durchlauf und ConA-Eluat von SF0 stellten die auf frühe Vorläuferzellen wirkenden Zytokine IL-6, IL-3 und GM-CSF den größten Anteil der proliferationsfördernden Zytokine dar. Die insbesondere die Proliferation später Vorläuferzellen fördernden Zytokine IL-5 und M-CSF waren nur in so geringen Konzentrationen nachweisbar, daß sie allenfalls einen sehr kleinen Effekt ausüben konnten.

Die proliferationsfördernden Eigenschaften des ConA-Durchlaufs und besonders des ConA-Eluats waren ausgeprägter als die des Ausgangsmaterials SF0. Die gesteigerte Proliferation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen unter Einfluß des ConA-Eluats ließ sich mit den Konzentrationen einiger Zytokine korrelieren. Im Vergleich zum Kulturmedium unter Zusatz des Ausgangsmaterials waren im ConA-Eluat-haltigen Medium deutlich höhere Konzentrationen von IL-3 und IL-6 nachweisbar. Hinzu kamen verringerte Konzentrationen des auf verschiedene Entwicklungsstadien inhibitorisch wirkenden TNF- $\alpha$  und des auf frühe Vorläuferzellen inhibitorisch wirkenden MIP-1 $\alpha$ . Vermutlich war also an der verbesserten Proliferation der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen die Kombination von größeren IL-3 und IL-6 Konzentrationen und geringeren TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  Konzentrationen beteiligt.

Die durch den ConA-Durchlauf gesteigerte Proliferation der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB wurde wahrscheinlich durch die gesteigerten IL-6 und GM-CSF Konzentrationen sowie die verringerten IFN- $\gamma$  und MIP-1 $\alpha$  Konzentrationen beeinflusst.

Der Vergleich der proliferationsfördernden Wirkung von ConA-Eluat mit der Zytokinkombination X (Abschnitt 4.2.5, Abb. 13) zeigte, daß die Effekte des ConA-Eluats die der Zytokinkombination X bei weitem übertrafen. Im Vergleich zum ConA-Eluat lagen IL-6 und GM-CSF in der Zytokinkombination X in fast viermal höherer Konzentration, IL-3 hingegen nur in halb so hoher Konzentration vor. Die im ConA-Eluat vorhandenen inhibitorisch wirkenden Zytokine fehlten in der Zytokinkombination X ganz. Daher ist es fraglich, ob die höhere IL-3 Konzentration im Medium mit ConA-Eluat tatsächlich die niedrigeren IL-6 und GM-CSF Konzentrationen und die Effekte verschiedener inhibitorisch wirkender Zytokine (IFN- $\gamma$  liegt beispielsweise in derselben Konzentration wie IL-3 vor) so gut kompensieren konnte, daß eine weit stärkere Proliferation möglich wurde.

Ähnliches galt für die Proliferation der Zellen aus NSB im Medium mit ConA-Durchlauf. Die IL-6 Konzentration war in der Zytokinkombination X etwa so groß wie die im ConA-Durchlauf, wohingegen die Konzentration von IL-3 in der Zytokinkombination X doppelt so groß und die von GM-CSF sogar viermal so groß war. Trotz niedrigerer Konzentrationen proliferationsfördernder Zytokine und signifikanter Konzentrationen inhibitorischer Zytokine,

konnte der ConA-Durchlauf die Proliferation der Zellen aus NSB stärker anregen als die Zytokinkombination X. Die übrigen im ConA-Eluat und ConA-Durchlauf enthaltenen proliferationsfördernden Zytokine lagen in so geringen Konzentrationen vor, daß sie wahrscheinlich nicht als Ursprung der verstärkten Proliferation in Frage kommen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß ConA-Eluat und -Durchlauf Faktoren enthalten könnten, die entweder selbst noch unbekannt sind, oder aber deren Effekte auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen bislang unbekannt sind. Da das ConA-Eluat offensichtlich eine größere Wirkung auf die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB ausübte als der ConA-Durchlauf, hat darin möglicherweise eine Anreicherung eines unbekanntes, vermutlich N-glykosylierten, Faktors stattgefunden.

Ein weiteres Indiz für einen unbekanntes Faktor liefert der Zeitpunkt, zu dem die maximale Vermehrung der Zellen erreicht wurde. Während mit SF0 und den Zytokinkombinationen A, L, M und X (Abschnitte 4.4 und 4.5) die maximale Vermehrung der Zellen aus NSB an Tag 7 bis 14 erreicht wurde, wurde mit dem ConA-Eluat von SF0 die maximale Vermehrung erst an Tag 28 erreicht. Dies deutet darauf hin, daß der unbekanntes Faktor proliferationsfördernd auf eine Subpopulation der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB wirkt, die z.B. durch LIF, FL, SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (GM-CSF) nicht angeregt wird. Da die maximale Proliferation erst nach 28 Tagen erreicht wird, könnte diese Subpopulation möglicherweise erst im Laufe der Kultivierung durch Differenzierung aus früheren Entwicklungsstadien entstehen.

Durch weitere Untersuchungen muß in diesem Zusammenhang in Zukunft geklärt werden, welche Subpopulation die starke Vermehrung der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen nach 28 Tagen Kultur ermöglicht. Außerdem sollte ermittelt werden, ob unter den beschriebenen Bedingungen die längerfristige Expandierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen, verbunden mit der Aufrechterhaltung einer CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Population, möglich ist.

Mittels der in den Abschnitten 4.6 und 4.7 beschriebenen Experimente konnten Hinweise auf bislang unbekanntes, von aktivierten T-Zellen gebildete, Hämatopoese-faktoren gefunden werden. Diese Faktoren könnten z.B. durch chromatographische Aufreinigung aus den Faktorengemischen isoliert und nachfolgend charakterisiert werden. Dieser Weg erscheint allerdings aus verschiedenen Gründen nicht sinnvoll. Da es sich um bislang unbekanntes Faktoren handelt, sind beispielsweise keine proteinchemischen Eigenschaften bekannt, die die Auswahl eines chromatographischen Verfahrens vereinfachen würden. Ob ein chromatographisches Verfahren überhaupt für die Isolierung des gewünschten Faktors geeignet ist, müßte somit für viele Verfahren aufwendig ausgetestet werden. Hinzu kommt,

daß die Faktorengemische SF0 und SF1, in denen sich die unbekanntenen Faktoren befinden, sehr komplex sind, so daß vermutlich noch mehrere Aufreinigungsschritte notwendig wären. Dabei ist davon auszugehen, daß für jeden Faktor eine eigene Aufreinigungsstrategie entwickelt werden müßte.

Ein weiteres Problem stellt die Expandierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen als *in vitro* Testverfahren für die Anwesenheit hämatopoetisch aktiver Faktoren dar. CD34<sup>+</sup>-Zellen werden nur durch Gemische zweier oder mehrerer Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt. Wird bei einem Aufreinigungsschritt der unbekannte Faktor von synergistisch wirkenden Faktoren getrennt, so besteht die Möglichkeit einer Anreicherung, ohne daß dieser Faktor eine signifikante Proliferation der CD34<sup>+</sup>-Zellen auslösen kann. Außerdem besteht die Gefahr, daß inhibierend wirkende Zytokine gemeinsam mit dem unbekanntenen Faktor angereichert werden und eine Proliferation der CD34<sup>+</sup>-Zellen verhindern. Daher ist zusätzlich zu den eigentlichen Experimenten mit einer Anzahl weiterführender Kultivierungsversuche (z.B. Versuche unter gleichzeitiger Gabe rekombinanter Zytokine) und Untersuchungen zur Charakterisierung des jeweiligen Faktorengemisches (z.B. durch ELISA oder Western-Blot) zu rechnen.

Da die chromatographische Aufreinigung unbekannter Faktoren aufgrund des damit verbundenen hohen Zeit- und Kostenaufwandes nicht sinnvoll erscheint, wurde die Suche auf molekularbiologischem Weg über die mRNA und das mRNA-Differential-Display durchgeführt.

Mit Hilfe dieses Verfahrens sollten Fragmente von mRNAs ermittelt werden, die von aktivierten (Inkubation mit PMA und A23187 für 96 h), aber nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert werden. Es wurden 23 Fragmente ausgewählt, die reproduzierbar nur in den Proben aktivierter T-Zellen auftraten. Diese wurden in Plasmidvektoren kloniert, in *E. coli* XL1-Blue transformiert und schließlich sequenziert. Durch Datenbankvergleich wurden diejenigen Fragmente ermittelt, die von unbekanntenen mRNAs stammen.

Von den 23 untersuchten Fragmenten konnten sieben identifiziert werden, die von bislang noch unbekanntenen mRNA-Spezies stammen. Zu den Fragmenten B9 (B12), B14 und B20 sind zwar die DNA-Sequenzen bereits in den Datenbanken beschrieben, die zugehörigen mRNA-Sequenzen, und damit auch die Proteine, sind jedoch noch nicht bekannt. Für die Fragmente B1, B15, B18 und B23 konnten keine homologen Sequenzen gefunden werden. Da das humane Genom vollständig sequenziert und in den Datenbanken verzeichnet ist, setzen sich die genannten Fragmente vermutlich aus zwei Exons zusammen, sind damit im Genom durch



ein Intron getrennt und können somit auch nicht als zusammenhängende Sequenz gefunden werden.

Eigentlich sollten die mRNA-Moleküle der 23 untersuchten Fragmente nur in aktivierten, aber nicht in ruhenden T-Zellen nachweisbar sein. Während z.B. die IL-2 mRNA tatsächlich nur in aktivierten Zellen exprimiert wird, werden aber beispielsweise die mRNAs der ribosomalen Proteine L24 und L7 konstitutiv gebildet. Mit Hilfe der RT-PCR konnte nachgewiesen werden, daß auch zwei der unbekannt Fragmente (Abschnitt 4.8.4; Tabelle 9; Fragmente B14 und B20) von mRNAs stammen, die von T-Zellen konstitutiv gebildet werden. Dadurch wird belegt, daß bei der hier durchgeführten Methode stets einige falsch positive Ergebnisse auftreten. Auch durch die Wiederholung der Experimente und die alleinige Verwendung solcher Banden, die reproduzierbar nur in den Proben von aktivierten Zellen auftraten, konnte ein Auftreten falsch positiver Ergebnisse nicht unterbunden werden. Sun et al. (1994) beschreiben, daß sogar mehr als 70 % der von ihnen ermittelten scheinbar positiven Ergebnisse falsch positive Ergebnisse waren. Eine Verifikation der Ergebnisse des Differential Displays z.B. durch RT-PCR oder Northern Blot erscheint also zwingend notwendig.

Der Abgleich der ermittelten Sequenzen mit den in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen zeigte, daß viele der erhaltenen Fragmente nicht wie erwartet dem 3'-Ende der zugehörigen mRNA entsprachen. Zum Beispiel stimmte das Fragment B2 zu 100 % mit den Nukleotiden 1.057-1.237 der 3.784 Nukleotiden langen cAMP responsive element binding protein-like 2 mRNA überein. Auch bei den unbekannt Fragmenten B1, B9 (B12), B14, B15 und B18 konnten keine typischen Polyadenylierungssignale gefunden werden. Dies deutet darauf, daß diese Fragmente ebenfalls nicht dem 3'-Ende der jeweiligen mRNA Moleküle entsprechen. Vermutlich kam es in diesen Fällen zu einer Bindung des oligo dT Primers an eine interne Bindungsstelle anstatt an das 3'-Ende der mRNA. Ähnlich wie bei den hier beschriebenen Experimenten, konnten auch Guimarães et al. (1995) bei ihren Versuchen verschiedene Fragmente nachweisen, die nicht wie erwartet dem 3'-Ende der mRNA Moleküle entsprachen.

Um nähere Informationen über die Expression der unbekannt mRNAs zu erhalten, wurde durch RT-PCR ermittelt, zu welchen Zeitpunkten der Aktivierung mit PMA und A23187 die unbekannt mRNAs nachweisbar waren (Abschnitt 4.8.5.1, Tabelle 10). Dabei stellte sich heraus, daß die B15-, B18-, B19-, und B22-mRNA bereits nach 24 h Stimulation nachweisbar war, wogegen die B1- und B23-mRNA erst nach 48 h und die B9- (B12-)mRNA sogar erst

nach 72 h Stimulation detektiert werden konnten. Die unterschiedlichen Zeitpunkte, ab denen die mRNAs in den Zellen nachgewiesen werden konnten, sind durch die Funktion des daraus gebildeten Proteins bedingt. So lassen sich mRNAs von Proteinen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, viel früher in den Zellen nachweisen, als z.B. Zytokin-mRNAs.

Außerdem wurde untersucht, ob die Expression der unbekanntenen Fragmente auch durch die Aktivierung der Zellen mit den Stimulatoren PHA-M und ConA induziert werden kann (Abschnitt 4.8.5.2, Tabelle 11). Dabei zeigte sich, daß die zu den Fragmenten B1, B15, B19, B22 und B23 gehörigen mRNA-Spezies auch bei der Aktivierung der T-Zellen mit ConA und PHA-M gebildet wurden, während die zum Fragment B18 gehörende mRNA nur durch PHA-M induzierbar war. Die Bildung der zum Fragment B9 (B12) gehörenden mRNA-Spezies konnte weder durch ConA noch durch PHA-M erreicht werden. Dies belegt, daß sich die durch die Aktivierung mit PMA und A23187 induzierten mRNA-Spezies nicht unbedingt auch durch andere Aktivierungsverfahren, wie in diesem Fall durch ConA und PHA-M, induzieren lassen. Die Ursache für diese Beobachtung liegt vermutlich in der Aktivierung unterschiedlicher Subpopulationen begründet. Eine Aktivierung mit Lektinen spricht in der Regel nur ca. ein Drittel der Zellen an (Klein, 1991). Da sich die aktivierten Subpopulationen je nach Stimulationsmethode unterscheiden und die Subpopulationen aufgrund unterschiedlicher Aufgaben verschiedene mRNA-Spezies (und damit Proteine) bilden, kann nicht durch jede Stimulationsmethode die Bildung jeder mRNA-Spezies induziert werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Anhaltspunkten für die Existenz noch unbekannter hämatopoeserelevanter Faktoren gesucht und ein Verfahren zur Identifizierung unbekannter mRNAs etabliert.

Mit Kulturüberständen aktivierter T-Zellen und Reinigungsfractionen einer IL-2-Produktion wurde untersucht, welchen Einfluß die von T-Zellen unter Aktivierung mit PMA und A23187 sezernierten Faktoren auf die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus NSB und PB ausüben. Bei diesen Experimenten konnte besonders die Proliferation der frühen, linienunspezifischen CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Vorläuferzellen angeregt werden. Die Proliferation dieser Zellen wurde vermutlich durch vergleichsweise niedrige Zytokinkonzentrationen und durch antagonistische Effekte zwischen aktivierend und inhibierend wirkenden Zytokinen beschränkt. Anders als bei Experimenten anderer Arbeitsgruppen (van Epps et al., 1994; Wu et al., 1999), bewirkten die hier verwendeten Zytokinkombinationen durch ihre Zusammensetzung und möglicherweise auch durch ihre Konzentration eine stärkere Proliferation von Zellen aus PB. Außerdem konnten bei Experimenten mit der Reinigungsfraction SF3 erstmals Hinweise auf hämatopoesehemmende Effekte von RANTES gefunden werden, die allerdings noch genaueren Untersuchungen bedürfen.

Durch die Kultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Kombinationen der Reinigungsfraction SF1 und unterschiedlichen rekombinanten Zytokinen, sowie durch eine Auftrennung der Reinigungsfractionen SF0 und SF1 mittels ConA-Chromatographie wurde nach Hinweisen auf bislang unbekannte Faktoren mit hämatopoetischer Wirksamkeit gesucht.

Die Ergebnisse der Kombinationsexperimente der Reinigungsfraction SF1 mit LIF und FL (einzeln oder zusammen [Zytokinkombination M]) deuteten darauf hin, daß LIF und FL die Proliferation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen beeinflussen, indem sie die Expression von Rezeptoren für inhibierende und stimulierende Wachstumsfaktoren steigern. Da andere Arbeitsgruppen (z.B. Leary et al., 1992; Ogawa, 1992 und Shah et al., 1996) LIF und FL ausschließlich mit anderen aktivierend wirkenden Zytokinen kombinierten, konnten solche Effekte bislang nicht beobachtet werden.

Kultivierungsexperimente mit der Kombination der Reinigungsfraction SF1 mit SCF (alleine oder mit LIF und FL [Zytokinkombination L], oder mit IL-3, IL-6 und G-CSF [Zytokinkombination A]) belegten, daß SCF vermutlich synergistisch mit anderen Zytokinen die Proliferation der frühen Vorläuferzellen direkt positiv beeinflußt. Leary et al. postulierten dies

bereits 1992. Ausgelöst durch eine möglicherweise unterschiedliche Expression des SCF-Rezeptors, konnte SCF die Proliferation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen aus NSB stärker stimulieren als die von Zellen aus PB.

Eine Kombination aus G-CSF, IL-3, IL-6 (Zytokinkombination X) und der Reinigungsfraction SF1 führte zu einer besseren Proliferation der NSB-Zellen, aber zu einer schlechteren Proliferation der Zellen aus PB, als bei alleiniger Verwendung der Reinigungsfraction SF1. Da die schlechtere Proliferation der Zellen aus PB nur auf Faktoren in der Reinigungsfraction SF1 beruhen konnte, aber bislang keine Faktoren bekannt sind, die trotz erhöhter Konzentrationen aktivierender Zytokine inhibierend wirken, deuten diese Ergebnisse auf die Anwesenheit eines unbekanntes Faktors hin.

Weitere Anhaltspunkte für bislang unbekanntes Faktoren ergaben sich durch die Auftrennung der Reinigungsfractionen SF0 und SF1 mittels ConA-Chromatographie. Mit den Fraktionen der ConA-Chromatographie der Reinigungsfraction SF0 wurde im Gegensatz zum Ausgangsmaterial besonders die Proliferation der NSB-Zellen gefördert. Im Vergleich zu Kontrollexperimenten mit IL-3, IL-6 und GM-CSF (Zytokinkombination X), den Hauptkomponenten der Durchlauf- und Eluatfraktion, wurden mit den Fraktionen der ConA-Chromatographie deutlich höhere Vermehrungsraten erzielt, obwohl auch inhibierende Zytokine enthalten waren. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es hämatopoetische Wachstumsfaktoren gibt, die derzeit noch unbekannt sind.

Mittels mRNA-Differential-Display wurden 23 Fragmente von mRNAs identifiziert, die in den Proben der aktivierten, aber nicht der ruhenden T-Zellen nachweisbar waren. Von diesen 23 Fragmenten stammen sieben (B1, B9 (B12), B14, B15, B18, B20 und B23) von noch unbekanntes mRNAs. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren außerdem noch die mRNAs der Fragmente B19 und B22 unbekannt. Bei nachfolgenden Kontrollen mittels RT-PCR zeigte sich, daß die B14- und B20-mRNAs konstitutiv gebildet werden und nur die B1-, B9- (B12-), B15-, B18-, B19-, B22- und B23-mRNA tatsächlich durch die Aktivierung mit PMA und A23187 induziert werden.

Bei den beiden unbekanntes Fragmenten B23 und B20 handelt es sich um die jeweiligen 3'-Enden der mRNAs, da typische Polyadenylierungssignale nachgewiesen werden konnten. Das Fehlen solcher Polyadenylierungssignale bei den übrigen unbekanntes Fragmenten resultiert aus einer Fehlbindung des oligo-dT Primers an interne Bindungsstellen, anstatt an den 3'-Terminus der mRNA, so daß diese Fragmente nicht das 3'-Ende der jeweiligen mRNA darstellen.

Die B1- und B23-mRNA konnten erstmals nach 48 h, und die B9- (B12-) mRNA erstmals nach 72h Stimulation mit PMA und A23187 nachgewiesen werden. Bereits nach 24 h waren die übrigen mRNAs detektierbar.

Die Synthese der B1-, B15-, B19-, B22- und B23-mRNA konnte auch durch die Aktivierung der T-Zellen mit ConA und PHA-M induziert werden, wohingegen die B18-mRNA zwar durch PHA-M aber nicht durch ConA induzierbar war. Weder durch ConA noch durch PHA-M konnte die Bildung der B9- (B12-) mRNA erreicht werden. Dies belegt, daß die B9- (B12-) und die B18-mRNA entweder durch andere Aktivierungswege oder durch andere T-Zell-Subpopulationen gebildet werden als die übrigen mRNAs.

Weiterführende Experimente müssen zunächst das Ziel haben, die vollständigen Sequenzen der unbekannt mRNA-Spezies zu ermitteln. Dies ist beispielsweise mittels einer cDNA-Bank oder der RACE-PCR (rapid amplification of 5' [or 3'] end of cDNA) möglich. Sind die vollständigen Sequenzen der mRNA-Spezies bekannt, können diese in einen Expressionsvektor kloniert und prokaryotisch oder auch eukaryotisch exprimiert werden. Mittels der Sequenz und der Analyse der jeweiligen rekombinant hergestellten Proteine oder Peptide ist dann eine genauere Charakterisierung der einzelnen unbekannt Proteine oder Peptide möglich.

Weiterhin können mit Hilfe der rekombinanten Proteine oder Peptide Kultivierungsexperimente mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durchgeführt werden, die Aussagen darüber zulassen, ob die Proteine oder Peptide einen Einfluß auf die Hämatopoese ausüben.

## 7. LITERATUR

- Allison J.F., Havran W.L. (1991) The immunobiology of T cells with invariant  $\gamma\delta$  antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 679-705
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zheng Zhang J.Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Andreasson P., Johansson B., Arheden K., Billstrom R., Mitelman F., Hoglund M. (1997) Deletions of CDKN1B and ETV6 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 12p abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* **19**: 77-83
- Andrews R.G., Singer J.W., Bernstein I.D. (1986) Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* **67**: 842-845
- Andrews R.G., Singer J.W., Bernstein I.D. (1989) Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of CD33 and CD34 antigens and light scattering properties. *J. Exp. Med.* **169**:1721-1731
- Azuma M, Cayabyab M., Buck D., Philips J.H., Lanier L.L. (1992) CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative response and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J Exp. Med.* **175**: 353-360
- Ballmeyer M. (1993) Untersuchungen zur Produktion von IL-5 in Zellkulturen humaner Lymphozyten. Dissertation, Universität Hannover
- Banerjee R.V., Matthews R.G. (1990) Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J.* **4**: 1450-1459
- Beck S., Abdulla S., Alderton R.P., Glynne R.J., Gut I.G., Hosking L.K., Jackson A., Kelly A., Newell W.R., Sanseau P., Radley E., Thorpe K.L., Trowsdale J. (1996) Evolutionary dynamics of non-coding sequences within the class II region of the human MHC. *J. Mol. Biol.* **255**: 1-13
- Bender J.G., Unverzagt K., Walker D.E., Lee W., Smith S., Williams S., van Epps D.E. (1994) Phenotypic analysis and characterization of CD34<sup>+</sup> cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin. Immunol. Immunopath.* **70**: 10-18
- Bergmann. In: *Zytokine: Prälinik und Klinik*; Niederle, Bergmann und Ganser; Gustav Fischer Verlag, 1996
- Beschorner W.E., Civin C.I., Strauss L.C. (1985) Localization of hematopoietic progenitor cells in tissue with the anti-My-10 monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* **119**: 1-4
- Borge O.J., Ramsfjell V., Cui L., Jacobsen E.W. (1997) Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* **90**: 2282-2292
- Brach M.A., Herrmann F. (1991) Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. *Acta Haematol.* **86**: 128-137
- Broudy V.C. (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* **90**: 1345-1364

- Brown J., Greaves M.F., Molgaard H.V. (1991) The gene encoding the stem cell antigen CD34 is conserved in mouse and expressed in hemopoietic progenitor cell lines, brain and embryonic fibroblasts. *Int. Immunol.* **3**: 175-184
- Brown T.J., Liu J., Brashem-Stein C., Shoyab M. (1993) Regulation of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by oncostatin M. *Blood* **82**:33-37
- Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G., Cooper S., Bard J., English D., Arny M., Thomas L., Boyse E.A. (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3828-3832
- Broxmeyer H.E., Sherry B., Lu L., Cooper S., Oh K.O., Tekamp-Olson P., Kwon B.S., Cerami A. (1990) Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* **76**: 1110-1116
- Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E., Auerbach A.D., Douglas G., Cooper S., Falkenberg J.H., Bard J., Boyse E.A. (1991 a) Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* **17**: 313-329
- Broxmeyer H.E., Sherry B., Cooper S., Ruscetti F.W., Williams D.E., Arosio P., Kwon B.S., Cerami A. (1991 b) Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta abrogates the capacity of MIP-1 alpha to suppress myeloid progenitor cell growth. *J. Immunol.* **147**: 2586-2594
- Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S., Ribeiro R.C., Graves V., Yoder N.M., Wagner J., Vadhan-Raj S., Benninger L., Rubinstein P. (1992) Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4109-4113
- Broxmeyer H.E., Sherry B., Cooper S., Lu L., Maze R., Beckmann M.P., Cerami A., Ralph P. (1993) Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *J. Immunol.* **150**: 3448-3458
- Broxmeyer H.E., Cooper S., Hague N., Benninger L., Sarris A., Cornetta K., Vadhan-Raj, Hendrie P., Mantel C. (1995) Human chemokines: enhancement of specific activity and effects in vitro on normal and leukemic progenitors and a factor-dependent cell line and in vivo mice. *Ann. Hematol.* **71**: 235-246
- Brugger W., Bross K.J., Glatt M., Weber F., Mertelsmann R., Kanz L. (1994) Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* **83**: 636-640
- Bruno E., Hoffmann R. (1989) Effect of interleukin-6 on in vitro human megakaryocytopoiesis: its interaction with other cytokines. *Exp. Hematol.* **17**: 1038-1043
- Bykovskaia S.N., Buffo M., Zhang H., Bunker M., Levitt M.L., Agha M., Marks S., Evans C., Ellis P., Shurin M.R., Shogan J. (1999) The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 659-666
- Cannistra S.A., Griffin J.D. (1988) Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Sem. Hematol.* **25**: 173-188
- Carraciolo D., Shirsat N., Wong G.G., Lange B., Clark S., Rovera G. (1987) Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) requires subliminal concentrations of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for optimal stimulation of human macrophage colony formation in vitro. *J. Exp. Med.* **166**: 1851-1960

- Cashman J., Eaves A.C., Raines E.W. et al. (1990) Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF- $\beta$ . *Blood* **75**: 96-101
- Craig J.I., Langlands K., Parker A.C., Anthony R.S. (1994) Molecular detection of tumor contamination in peripheral blood stem cell harvests. *Exp. Hematol.* **22**: 898-902
- Chen L.H., Liu M.-L., Hwang H.-Y., Chen L.-S., Korenberg J. , Shane B. (1997) Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J. Biol. Chem.* **272**: 3628-3634
- Chichester C.O., Fernandez M., Minguell J.J. (1993) Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes. Commun.* **1**: 93-99
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
- Cicuttini F.M., Welch K., Boyd A.W. (1994) Characterization of CD34<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>-progenitor cells from human umbilical cord blood. *Growth Factors* **10**: 127-134
- Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C., Fackler M.J., Schwartz J.F., Shaper J.H. (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* **133**: 157-165
- Clark-Lewis I., Aebersold R., Ziltener H., Schrader J.W., Hood L.E., Kent S.B.H. (1986) Automated chemical synthesis of a protein growth factor for hemopoietic cells, interleukin-3. *Science* **40**: 134-139
- Craig W., Kay R., Cutler R.L. (1993) Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells *J. Exp. Med.* **177**: 1331-1342
- Debili N., Masse J.M., Katz A., Guichard J., Breton-Gorius J., Vainchenker W. (1993) Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34<sup>+</sup> cells. *Blood* **82**: 84-95
- Devos R., Plaetinck G., Cheroutre H., Simons G., Degrave W., Tavernier J., Remaut E., Fiers W. (1983) Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **11**: 4307-4323
- Donahue R.E., Yang Y.C., Clark S.C. (1990) Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation. *Blood* **75**: 2271-2275
- Dybedal I., Larsen S., Jacobsen S.E. (1995) IL-12 directly enhances in vitro murine erythropoiesis in combination with IL-4 and stem cell factor. *J. Immunol.* **154**: 4950-4955
- Eaves A.C., Eaves C.J. (1989) Maintenance and proliferation control of primitive hemopoietic progenitors in long-term cultures of human marrow cells. *Blood Cells* **14**: 355-368
- Fackler M.J., Krause D.S., Smith O.M., Civin C.I., May W.S. (1995) Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* **85**: 3040-3047.
- Fairbairn L.J., Cowling G.J., Reipert B.M., Dexter T.M. (1993) Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* **74**: 823-832



- Fardoun-Joalland D., Teixeira-Lebrun G., Lenormand B., Dzondo-Gadet M., Vannier J.P. (1995) Synergism of interleukin-12 and interleukin-3 on development of hematopoietic progenitors. *Eur. J. Haematol.* **54**: 172-175
- Fina L., Molgaard H.V., Robertson D., Bradley N.J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D.R., Baker M.A., Greaves M.F. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* **75**: 2417-2426
- Fine J.S., Macosko H.D., Grace M.J., Narula S.K. (1994) Influence of IL-10 on murine CFU-pre-B formation. *Exp. Hematol.* **22**: 1188-1196
- Flanagan J.G., Leder P. (1990) The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* **63**: 185-194
- Fossiez F., Djossou O., Chomarat P., Flores-Romo L., Ait-Yahia S., Maat C., Pin J.J., Garrone P., Garcia E., Saeland S., Blanchard D., Gaillard C., Das Mahapatra B., Rouvier E., Golstein P., Banchereau J., Lebecque S. (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* **183**:2593-2603
- Fraser J.D., Irving B.A., Crabtree G.R., Weiss A. (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* **251**: 313-316
- Gale R.P., Champlin R (1987) Progress in bone marrow transplantation. Liss, New York
- Galli S.J., Zsebo K.M., Geissler E.N. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol.* **55**: 1-96
- Gehling U.M., Ryder J.W., Hogan C.J., Hami L., McNiece I., Franklin W., Williams S., Helm K., King J., Shpall E.J. (1997) Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors: effect of various growth factor combinations on CD34<sup>+</sup> progenitor cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood. *Exp. Hematol.* **25**: 1125-1139
- Gordon M.Y., Riley G.P., Watt S.M., Greaves M.F. (1987) Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* **326**: 403-405
- Gordon M.Y., Riley G.P., Clarke D. (1988) Heparan sulfate is necessary for adhesive interactions between human early hemopoietic progenitor cells and the extracellular matrix of the marrow microenvironment. *Leukemia* **2**: 804-809
- Gounni A.S., Gregory B., Nutku E., Aris F., Latifa K., Minshall E., North J., Tavernier J., Levit R., Nicolaides N., Robinson D., Hamid Q. (2000) Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood* **96**: 2163-2171
- Guimarães M.J., Lee F., Zlotnik A., McClanahan (1995) Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1832-1833
- Han Z.C., Caen J.P. (1994) Cytokines acting on committed haematopoietic progenitors. *Baillière's Clin. Haem.* **7**: 65-89
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hao Q.-L., Shah A.J., Thiemann F.T., Smogorzewska E.M., Croks G.M. (1995) A functional comparison of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells in cord blood and bone marrow. *Blood* **86**: 3745-3753
- Hapel A.J., Fung M.C., Johnson R.M., Young I.G., Johnson G.R., Metcalf D. (1985) Biological properties of molecularly cloned and expressed murine IL-3. *Blood* **65**: 1453-1459

- Hart P.H., Vitti G.F., Burgess D.R., Whitt G.A., Piccoli D.S., Hamilton J.A. (1989) Potential antiinflammatory effects of interleukin 4. Suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3803-3807
- Haylock D.N., Horsfall M.J., Dowse T.L., Ramshaw H.S., Niutta S., Protopsaltis S., Peng L., Burrell C., Rappold I., Buhring H.-J., Simmons P.J. (1997) Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of flt3 ligand. *Blood* **90**: 2260-2272
- Haylock D.N., To L.B., Dowse T.L., Juttner C.A., Simmons P.J. (1992) Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells into the myeloid lineage. *Blood* **80**: 1405-1412
- Healy L., May G., Gale K., Grosveld F., Greaves M., Enver T. (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12240-12244
- Heinze H., Mohr H. (1990) Phorbol myristate acetate and calcium ionophore A23187 induce two waves of lymphokine mRNA transcription in stimulated human peripheral blood lymphocytes. In: *Cytokines in hemopoiesis, oncology, and AIDS*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Hemmerich P., von Mikecz A., Neumann F., Sozeri O., Wolff-Vorbeck G., Zobelein R., Krawinkel U. (1993) Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from humans and rodents. *Nucleic Acids Res.* **21**: 223-231
- Hemmler M.E. (1989) Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol. Today* **9**: 109-113
- Hirano T., Fujimoto K., Teranishi T., Nishino N., Onoue K., Maeda S., Shimada K. (1984) Phorbol ester increases the level of interleukin 2 mRNA in mitogen-stimulated human lymphocytes. *J. Immunol.* **132**: 2165-2167
- Hoornaert I., Marynen P., Baens M. (1998) CREBL2, a novel transcript from the chromosome 12 region flanked by ETV6 and CDKN1B. *Genomics* **51**: 154-157
- Huang S., Terstappen L.W.M.M. (1992) Formation of hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* **360**: 745-749
- Jacobsen E.W., Ruscetti F.W., Dubois C.M., Keller J.R. (1992) Tumor necrosis factor directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: role of colony-stimulating factor receptor modulation. *J. Exp. Med.* **175**: 1759-1772
- Jacobsen S.E., Okkenhaug C., Veiby O.P., Caput D., Ferrara P., Minty A. (1994) Interleukin 13: novel role in direct regulation of proliferation and differentiation of primitive hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* **180**: 75-82
- Jacobsen S.E.W., Okkenhaug C., Myklebust J., Veiby O.P., Lyman S.D. (1995) The flt3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: synergistic interactions with Interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J. Exp. Med.* **181**: 1357-1363
- Johnson K.R. (1993) Characterization of cDNA clones encoding the human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L30. *Gene* **123**: 283-285
- Katz F., Tindle R.W., Sutherland D.R., Greaves M.D. (1985) Identification of a membrane glycoprotein associated with hemopoietic progenitor cells. *Leuk. Res.* **9**: 191-198
- Keating A., Gordon M.Y. (1988) Hierarchical organization of hemopoietic microenvironments. *Leukemia* **2**: 766-769

- Kirchhoff C., Willison K. (1990) Nucleotide and amino-acid sequence of human testis-derived TCP1. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4247
- Kishimoto T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood* **74**: 1-10
- Kissil J.L., Deiss L.P., Bayewitch M., Raveh T., Khaspekov G., Kimchi A. (1995) Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **270**: 27932-27936
- Kjellén L., Lindahl U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Rev. Biochem.* **60**: 443-475
- Klein G., Müller C.A., Tillet E., Chu M.L., Timpl R. (1995) Collagene type VI in human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* **86**: 1740-1748
- Klein J. *Immunologie* VCH Verlagsgesellschaft 1991
- Koller M.R., Bender J.G., Miller W.M., Papoutsakis E.T. (1993 a) Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6 and stem cell factor. *Biol. Technol.* **11**: 358-363
- Koller M.R., Emerson S. G., Palsson B.O. (1993 b) Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continous perfusion cultures. *Blood* **82**: 378-384
- Koller M.R, Bradley M.S., Palsson B.O. (1995) Growth factor consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlate with specific cell production. *Exp. Hematol.* **23**: 1275-1283
- Kolset S.O., Gallagher J.T. (1990) Proteoglycans in hematopoietic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1032**: 191-211
- Königsmann M., Griffin J.D., DiCarlo J., Cannistra S.A. (1992) Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagene Type I. *Blood* **79**: 657-665
- Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S. (1996) CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* **87**: 1-13
- Lajtha L.G. (1963) On the concept of the cell cycle. *J. Cell. Comp. Physiol.* **62**: 143
- Lansdorp P.M., Dragowska W. (1992) Long term erythropoiesis from constant numbers of CD34<sup>+</sup> cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. *J. Exp. Med.* **175**: 1501-1509
- Lansdorp P.M., Dragowska W., Mayani H. (1993) Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* **178**: 787-791
- Laver J.H., Abboud M.R., Kawashima I., Leary A.G., Ashman L.K., Ogawa M. (1995) Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* **23**: 1515-1519
- Leary G., Ogawa M. (1987) Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood* **69**: 953-956
- Leary A.G., Ikebuchi K., Hirai Y., Wong G.G., Yang Y.C., Clark S.C., Ogawa M. (1988) Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. *Blood* **71**:1759-1763
- Leary A.G., Zeng H.Q., Clark S.C., Ogawa M. (1992) Growth factor requirements for survival in G0 and entry into cell cycle of primitive human hematopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4013-4017

- Lemoli R.M., Fortuna A., Fogli M., Motta M.R., Rizzi S., Benini C., Tura S. (1994) Stem cell factor (c-kit ligand) enhances the interleukin-9-dependent proliferation of human CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD33-DR- cells. *Exp. Hematol.* **22**: 919-923
- Li Y.N., Gulati S., Baker P.J., Brody L.C., Banerjee R. Kruger W.D. (1996) Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 1851-1858
- Liang P., Pardee A.B. (1992) Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-970
- Lichtman A.H., Segel G.B., Lichtman M.A. (1983) The role of Calcium in lymphocyte proliferation (an interpretative review). *J. Am. Soc. Hem.* **61**:413-422
- Ling N.R., Kay J.E. *Lymphocyte stimulation*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975
- Linsley P.S., Brady W., Grosmaire L., Aruffo A., Damle N.K., Ledbetter J.A. (1991) Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**: 721-730
- Long M.W. (1992) Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp. Hematol.* **20**: 228-301
- Lopez M., Amorim L., Gane P., Cristoph A., Bardin D., Abina A.M., Minty A., Bernard J. (1997) IL-13 induces CD34<sup>+</sup> cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. *J. Immunol. Methods* **208**: 117-129
- Lowenthal J.W., Ballard D.W., Bogerd H., Bohnlein E., Greene W.C. (1989) Tumor necrosis factor alpha activation of the IL-2 receptor-alpha gene involves the induction of kappa B-specific DNA binding proteins. *J. Immunol.* **142**: 3121-3128
- Ludwig M.L., Matthews R.G. (1997) Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 269-313
- Lyman S.D., Jacobson S.E.W. (1998) c-kit ligand and flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* **91**: 1101-1134
- Matthews R.G., Sheppard C., Goulding C. (1998) Methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur. J. Pediatr.* **157**: 54-59
- Mayani H., Guilbert L.J., Janowska-Wieczorek A. (1992) Biology of the hemopoietic micro-environment. *Eur. J. Haematol.* **49**: 225-233.
- Mayani H., Lansdorp P.M. (1994) Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* **83**: 2410-2417.
- Mayani H., Little M.T., Dragowska W., Thornbury G., Lansdorp P.M. (1995) Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34<sup>+</sup> cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp. Hematol.* **23**: 422-427.
- Mazur E.M., Cohen J.L., Wong G.G., Clark S.C. (1987) Modest stimulatory effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megakaryocyte progenitor cells. *Exp. Hematol.* **15**: 1128-1133
- McAdams T.A., Miller W.M., Papoutsakis E.T. (1996) Hematopoietic cell culture therapies (Part I): cell culture considerations. *Trends Biotechnol.* **14**: 341-349
- Metcalf D., Johnson G.R., Burgess A.W. (1980) Direct stimulation by purified GM-CSF on the proliferation of multipotent and erythroid precursor cells. *Blood* **55**: 138-147

- Metcalf, D. (1985) The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* **229**: 16-22.
- Metcalf D. (1986 a) The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* **67**: 257-268
- Metcalf D., Begley C.G., Johnson G.R., Nocila N.A., Vadas M.A., Lopez A.F., Williamson D.J., Wong G.G., Clark S.C., Wang E.A. (1986 b) Biologic properties in vitro of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **67**: 37-45
- Metcalf D. (1993) Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety. *Blood* **82**: 3515-3523
- Mohr H., Monner D., Plessing A. (1986) Calcium Ionophore A23187 in the presence of phorbol ester PMA: a potent inducer of interleukin-2 and interferon-gamma synthesis by human blood cells. *Immunobiol.* **171**: 195-204
- Mohr H., Knüver-Hopf J. (1990) Degree of O- and N-glycosylation of lymphokines released from A23187-/TPA-induced lymphocytes varies differently with culture time. In: *Cytokines in Hematopoiesis, oncology and AIDS*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 351-358.
- Moller G. (1991)  $\gamma/\delta$  T cells. *Immunol. Rev.* **120**: 1-204
- Moore M.A.S. (1993) Ex vivo expansion and gene therapy using cord blood CD34<sup>+</sup> cells. *J. Hematother.* **2**: 221-224
- Moore M.A.S., Hoskins I. (1994) Ex vivo expansion of cord blood-derived stem cells and progenitors. *Blood Cells* **20**: 468-481
- Mrozek E., Anderson P., Caligiuri M.A. (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56<sup>+</sup> natural killer cells from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**: 2632-2640
- Muench M.O., Humeau L., Paek B., Ohkubo T., Lanier L.L., Albanese C.T., Barcena A. (2000) Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors. *Exp. Hematol.* **28**: 961-973
- Murphy M., Perussia B., Trinchieri G. (1988) Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor. *Exp. Hematol.* **16**: 131-138
- Nicola N.A. (1989) Haemopoietic cell growth factors and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 45-77
- Ogata S., Muramatsu T., Kobata A. (1975) Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on concanavalin A-sepharose. *J. Biochem.* **78**: 687-96
- Ogawa M. (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**: 2844-2853
- Olweus J., Terstappen L.W., Thompson P.A., Lund-Johansen F. (1996) Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* **88**: 1594-1607
- O'Reilly R.J. (1983) Allogeneic bone marrow transplantation: current status and future directions. *Blood* **62**: 941-964
- Owen M. (1988) Marrow stromal stem cells. *J. Cell. Sci.* **10**: 63-76
- Paul W.E. *Fundamental Immunology*; Third Edition; Raven Press 1993
- Petzer A.L., Hogge D.E., Landsdorp P.M., Reid D.S., Eaves C.J. (1996) Self-renewal of

- primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 1470-1474
- Ralph P., Warren M.K., Lee M.T., Csejtey J., Weaver J.F., Broxmeyer H.E., Williams D.E., Stanley E.R., Kawasaki E.S. (1986) Inducible production of human macrophage growth factor, CSF-1. *Blood* **68**: 633-639
- Ratajczak J., Machalinski B., Marlicz W., Halasa M., Ratajczak M.Z. (1997) Influence of leukemia inhibitory factor (LIF) on the survival, proliferation and differentiation of human erythroid progenitor cells. In vitro studies under serum free conditions. *Folia Histochem. Cytobiol.* **35**: 63-68
- Rennick D., Jackson J., Yang G. (1989) Interleukin-6 interacts with interleukin-4 and other hematopoietic growth factors to selectively enhance the growth of megakaryocytic, erythroid, myeloid and multipotential progenitor cells. *Blood* **73**: 1828-1835
- Rennick D., Hunte B., Dang W., Thompson-Snipes L., Hudak S. (1994) Interleukin-10 promotes the growth of megakaryocyte, mast cell, and multilineage colonies: analysis with committed progenitors and Thy1<sup>lo</sup>Sca1<sup>+</sup> stem cells. *Exp. Hematol.* **22**: 136-41
- Riedl E., Strobl H., Majdic O., Knapp W. (1997) TGF- $\beta$ 1 promotes in vitro generation of dendritic cells by protecting progenitor cells from apoptosis. *J. Immunol.* **36**: 1591-1597
- Rill D.R., Santana V.M., Roberts W.M., Nilson T., Bowman L.C., Krance R.A., Heslop H.E., Moen R.C., Ihle J.N., Brenner M.K. (1994) Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* **84**: 380-383
- Roberts R., Gallagher J., Spooncer E., Allen T.D., Bloomfield F., Dexter T.M. (1988) Heparan sulfate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated hemopoiesis. *Nature* **332**: 376-378
- Rosenzweig M., Camus S., Guigon M., Gluckman J.C. (1998) The influence of interleukin (IL)-4, IL-13, and Flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Exp. Hematol.* **26**: 63-72
- Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. (1993) Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* **81**: 1679-1690
- Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor
- Sanderson C.J. (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* **79**: 3101-3109
- Santiago-Schwarz F., Belilos E., Diamond B., Carsons S.E. (1992) TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **52**: 274-281
- Sato N., Sawada K., Koizumi K., Tarumi T., Ieko M., Yasukouchi T., Yamaguchi M., Takahashi T.A., Sekiguchi S., Koike T. (1993) In vitro expansion of human peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells. *Blood* **82**: 3600-3609
- Serke S., Säuberlich S., Abe Y., Huhn D. (1991) Analysis of CD34-positive hemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood: flow-cytometrical studies and in vitro colony (CFU-GM, BFU-E) assays. *Ann. Hematol.* **62**: 45-53
- Shah A.J., Smogorzewska E.M., Hanum C., and Crooks G.M. (1996) Flt3 Ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood* **87**: 3563-3570

- Skobin V., Jelkmann W., Morschakova E., Pavlov A.D., Schlenke P. (2000) Tumor necrosis factor-alpha and TNF-beta inhibit clonogenicity of mobilized human hematopoietic progenitors. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**: 507-510
- Sören L., Biberfeld P (1973) Quantitative studies on RNA accumulation in human PHA-stimulated lymphocytes during blast transformation. *Exp. Cell. Res.* **79**: 359-367.
- Sonoda Y., Kuzuyama Y., Tanaka S., Yokota S., Maekawa T., Clark S.C., Abe T. (1993) Human interleukin-4 inhibits proliferation of megakaryocyte progenitor cells in culture. *Blood* **81**: 624-630
- Spivak J.L., Smith R.R.L., Ihle J.N. Interleukin 3 promotes the in vitro proliferation of murine pluripotent hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* **76**: 1613-1621
- Sprent J., Schaefer M., Lo D., Korngold R. (1986) Functions of purified L3T4<sup>+</sup> and Lyt-2<sup>+</sup> cells in vitro and in vivo. *Immunol Rev.* **91**: 195-218
- Sprent J., Webb S.R. (1987) Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv. Immunol.* **41**: 39-133
- Springer A.S. (1990) Adhesion receptor of the immune system. *Nature* **346**: 425-434
- Stein J., Borzillo G.V., Rettenmier C.W. (1990) Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane bound precursor of human CSF-1. *Blood* **76**: 1308-1314
- Sulston J.E., Waterston R. (1998) Toward a complete human genome sequence. *Genome Res.* **8**: 1097-1108
- Sun Y., Hegamyer G., Colburn N.H. (1994) Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res.* **54**: 1139-1144
- Sutherland D.R., Keating A. (1992) The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J. Hematother.* **1**: 115-129
- Swain S. (1983) T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol. Rev.* **74**: 129-142
- Tavassoli M. (1984) Marrow adipose cells and hemopoiesis: an interpretative review. *Exp. Hematol.* **12**: 139-146
- Terstappen L.W.M.M., Huang S., Safford M., Lansdorp P.M., Coken M.R. (1991) Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> progenitor cells. *Blood* **77**: 1218-1227
- Thoma S.J., Lamping C.P., Ziegler B.L. (1994) Phenotype analysis of hematopoietic CD34<sup>+</sup> cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood* **83**: 2103-2114
- Tomonaga M., Golde D.W., Gasson J.C. (1986) Biosynthetic (recombinant) human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effect on normal bone marrow and leukemia cell lines. *Blood* **67**: 31-36
- Torok-Storb B. (1988) Cellular interactions. *Blood* **72**: 373-358
- Traish A.M., Huang Y.H., Ashba J., Pronovost M., Pavao M., McAneny D.B. Moreland R.B. (1997) Loss of expression of a 55 kDa nuclear protein (nmt55) in estrogen receptor-negative human breast cancer. *Diagn. Mol. Pathol.* **6**: 209-221

- Traycoff C.M., Abboud M.R., Layer J., Brand J.E., Hoffman R., Law P., Ishizawa L., Srouf E.F. (1994) Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **22**: 215-222
- Tsuji K., Muraoka K., Nakahata T. (1989) Interferon-gamma and human megakaryopoiesis. *Leuk. Lymphoma* **31**: 107-113
- Van Epps D.E., Bender J., Lee W., Schilling M., Smith A., Smith S., Unverzagt K., Law P., Burgess J. (1994) Harvesting, characterization, and culture of CD34<sup>+</sup> cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells* **20**: 411-23
- Vilcek J., Gray P.W., Rinderknecht E., Sevastopoulos C.G. (1983) Interferon-gamma: a lymphokine for all seasons. In: *Lymphokines*. Academic Press, New York; 1-32
- Vilcek J., Le J. Immunology of cytokines: an introduction. In: *The cytokine handbook* [Thomson A, eds] Academic press, London, 1994
- Wallace P.M., MacMaster J.F., Rillema J.R., Peng J., Burstein S.A., Shoyab M. (1993) Thrombocytopoietic properties of oncostatin M. *Blood* **86**: 1310-1315
- Wang C.Q., Udupa K.B., Lipschitz D.A. (1996) Evidence suggesting a stimulatory role for interleukin-10 in erythropoiesis in vitro. *J. Cell. Physiol.* **166**: 305-310
- Weiss L. (1976) The hematopoietic microenvironment of the bone marrow; an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat. Rec.* **186**: 161-184
- Weiss A., Imboden J.B. (1987) Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* **41**: 1-38
- Weiss A., Shields R., Newton M., Manger B., Imboden J. (1987) Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukine 2 gene. *J. Immunol.* **138**: 2169-2176
- Weiss M., Yetz-Aldape J., Crosier P.S., Nathan D.G., Sieff C.A. (1991) Committed hematopoietic progenitors of human bone marrow are restricted to the CD38<sup>+</sup>34<sup>+</sup> fraction whereas c-kit expression is greatest in CD38<sup>+</sup>34<sup>+</sup> cells. *Blood* **78**:161a
- Williams D.E., Morrissey P.J., Mochizuki D.Y., de Vries P., Anderson D., Cosman D., Boswell H.S., Cooper S., Grabstein K.H., Broxmeyer H.E. (1990) T-cell growth factor P40 promotes the proliferation of myeloid cell lines and enhances erythroid burst formation by normal murine bone marrow cells in vitro. *Blood* **76**: 906-911
- Wlodarska I., Baens M., Peeters P., Aerssens J., Mecucci C., Brock P., Marynen P., van den Berghe H. (1996) Biallelic alterations of both ETV6 and CDKN1B genes in a t(12;21) childhood acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res.* **56**: 2655-2661
- Wu A.G., Michejda M., Mazumder A., Meehan K.R., Menendez F.A., Tchabo J.G., Slack R., Johnson M.P., Bellanti J.A. (1999) Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Pediatr. Res.* **46**: 163-169
- Xi X., Schlegel N., Caen J.P., Minty A., Fournier S., Caput D., Ferrara P., Han Z.C. (1995) Differential effects of recombinant human interleukin-13 on the in vitro growth of human haemopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* **90**: 921-927
- Yang Y.C., Ciarletta J.S., Temple P.A., Chung M.P., Koviacic S., Witek-Giannotti J.S., Leary A.C., Kriz R., Donahue R.E., Wong G., Clark S.C. (1986) Human IL-3, Multi-CSF: Identification by expressing cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* **47**: 3-10



## 8. ANHANG

Im Folgenden sind die Sequenzen der Fragmente B1 bis B23 angegeben. Die Sequenz der für die PCR verwendeten Primer sowie die Sequenz des Vektors werden nicht mit aufgeführt. Soweit vorhanden sind außerdem die homologen Sequenzen aufgeführt. Dabei sind Sequenzabweichungen von ein oder zwei Basen durch Fettschrift in der homologen Sequenz hervorgehoben. Punkte markieren Sequenzbereiche der homologen Sequenz, die sich um mehr als zwei Basen von der Sequenz des jeweiligen Fragments unterscheiden. Gedankenstriche zeigen Lücken an, die eingefügt wurden, um die Homologie zu maximieren.

### B1

Das Fragment B1 zeigt keine Homologie zu bekannten Sequenzen. Angegeben ist daher nur die ermittelte Sequenz.

```

B1  ACCAACATTG TACTCTGAAA GCAAATGGTT GATCCCATTT GGAAAAGCCA    50
B1  AGAAGAGGCC ATTGAGTGTC CAGCCCAGGC CTCCTGTGAC TGCTGTACAG    100
B1  GAAAGAGCAT CAGCATCCTT GGTGAATGTA CCATGTTCTT TTCCCAACTT    150
B1  CTAAGGATGC GAGGAGTGAC AACTGCCATT CTCCCAGGCA CACCTCTCCC    200
B1  TGCCCTGAGC CACTTGTTCT CAATTCTGGT TAAACTTCTT TTTTGGTACT    250
B1  TAAAAATCTT AAATCTTAAA AAAAAA                                276

```

### B2

Das Fragment B2 stimmt zu 100 % mit den Nukleotiden 1.057 bis 1.238 der 3.748 Nukleotide langen humanen cAMP responsive element binding protein-like 2 (CREBL2) mRNA (Wlodarska et al., 1996; Andreasson et al., 1997; Hoornaert et al., 1998; Datenbanknummer NM001310) überein.

```

B2      CTACAAAGAG AAACCAAATG AGCTGATTAC TGACTATAAG TTCTCAGCCT    50
CREBL 2 CTACAAAGAG AAACCAAATG AGCTGATTAC TGACTATAAG TTCTCAGCCT   1106

B2      TTATGGACCT AATCTTATTT TTATTTACTT GAGTAATGTT TATTCTCTGC    100
CREBL 2 TTATGGACCT AATCTTATTT TTATTTACTT GAGTAATGTT TATTCTCTGC   1156

B2      ATGAACCATG ATTTCTCCTG TGAGCCATTC CAGCATAAGC TGTGAATATG    150
CREBL 2 ATGAACCATG ATTTCTCCTG TGAGCCATTC CAGCATAAGC TGTGAATATG   1206

B2      TATTAACAAA TATATACATT TCTATTTTAA TAAAAAAAAA                190
CREBL 2 TATTAACAAA TATATACATT TCTATTTTAA TA.....                1238

```

**B3 und B4**

Ein Datenbankabgleich für die Fragmente B3 und B4 belegte eine Übereinstimmung von 98 % (B3) bzw. 99 % (B4) mit den Nukleotiden 439-844 der 844 Nukleotide langen humanen IL-2 mRNA (Devos et al., 1983; Datenbanknummer X01586).

B3	TAATAGTTCT	GGAAGTAAAG	GGATCTGAAA	CAACATTCAT	GTGTGAATAT	50
B4	TAATAGTTCT	GGAAGTAAAG	GGATCTGAAAT	CAACATTCAT	GTGTGAATAT	50
IL-2	TAATAGTTCT	GGAAGTAAAG	GGATCTGAAA	CAACATTCAT	GTGTGAATAT	488
B3	GCTGATGAGA	CAGCAACCAT	TGTAGAATTT	CTGAACAGAT	GGATTACCTT	100
B4	GCTGATGAGA	CAGCAACCAT	TGTAGAATTT	CTGAACAGAT	GGATTACCTT	100
IL-2	GCTGATGAGA	CAGCAACCAT	TGTAGAATTT	CTGAACAGAT	GGATTACCTT	538
B3	TTGTCAAAGC	ATTCATCTCA	ACGCTGACTT	GGATAATTAA	GTGCTTCCCC	150
B4	TTGTCAAAGC	AT-CATCTCA	ACACTGACTT	G-ATAATTAA	GTGCTTCCCC-	147
IL-2	TTGTCAAAGC	AT-CATCTCA	AC-CTGACTT	G-ATAATTAA	GTGCTTCCCC-	585
B3	ACCTTAAAAC	ATATCAGGCC	TTGTATTTAT	TTAAATATTT	AAATTTTATA	200
B4	AC-TTAAAAC	ATATCAGGCC	TTCTATTTAT	TTAAATATTT	AAATTTTATA	196
IL-2	AC-TTAAAAC	ATATCAGGCC	TTCTATTTAT	TTAAATATTT	AAATTTTATA	634
B3	TTTATTGTTG	AATGTATGGT	TTGCTACCTA	TTGTAACAT	TATTCCTAAT	250
B4	TTTATTGTTG	AATGTATGGT	TTGCTACCTA	TTGTAACAT	TATTCCTAAT	246
IL-2	TTTATTGTTG	AATGTATGGT	TTGCTACCTA	TTGTAACAT	TATTCCTAAT	684
B3	CTTAAAACCTA	TAAATATGGA	TCTTTTATGA	TTCTTTTTTG	TAA-CCCTAG	299
B4	CTTAAAACCTA	TAAATATGGA	TCTTTTATGA	TTCTTTTT-G	TAAGCCCTAG	295
IL-2	CTTAAAACCTA	TAAATATGGA	TCTTTTATGA	TTCTTTTT-G	TAAGCCCTAG	733
B3	GGGCTCTAAA	ATGGTTTCAC	TTATTTATCC	CAAAATATTT	ATTATTATGT	349
B4	GGGCTCTAAA	ATGGTTTCAC	TTATTTATCC	CAAAATATTT	ATTATTATGT	345
IL-2	GGGCTCTAAA	ATGGTTTCAC	TTATTTATCC	CAAAATATTT	ATTATTATGT	783
B3	TGAATGTTAA	ATGTAGTATC	TATGTAGATT	GGTTAGTAAA	ACTATTTAAT	399
B4	TGAATGTTAA	ATGTAGTATC	TATGTAGATT	GGTTAGTAAA	ACCATTTAAT	395
IL-2	TGAATGTTAA	ATGTAGTATC	TATGTAGATT	GGTTAGTAAA	ACTATTTAAT	833
B3	AAATTTGATA	AATATAAAAA	AAAAAAA			426
B4	AAATTTGATA	AATATAAAAA	AAAA			419
IL-2	AAATTTGATA	A				844

**B5 und B7**

Ein Abgleich der Fragmente B5 und B7 mit der Datenbank ergab eine große Ähnlichkeit mit dem 3'-Terminus der 1608 Nukleotide langen humanen death associated protein 3 (DAP3) mRNA (Kissil et al., 1995; Datenbanknummer NM004632). Das Fragment B5 setzte sich aus den Nukleotiden 923-978 und 1.069-1.563 und das Fragment B7 aus den Nukleotiden 924-1.066 und 1.185-1.568 der DAP3 mRNA zusammen. Berücksichtigt man die Deletionen nicht, so ergibt sich bei beiden Fragmenten eine Übereinstimmung mit der DAP3 mRNA von 99,8 %.

B5	CCCGAGGAAT	TAGCACTTGT	TCACAACCTTG	AGGAAAATGA	TGAAAAATGA	50
B7	-CCGAGGAAT	TAGCACTTGT	TCACAACCTTG	AGGAAAATGA	TGAAAAATGA	49
DAP3	CCCGAGGAAT	TAGCACTTGT	TCACAACCTTG	AGGAAAATGA	TGAAAAATGA	972
B5	TTGGGA					56
B7	TTGGCATGGA	GGCGCCATTG	TGTCGGCTTT	GAGCCAGACT	GGGTCTCTCT	99
DAP3	TTGGCATGGA	GGCGCCATTG	TGTCGGCTTT	GAGCCAGACT	GGGTCTCTCT	1022
B5					AGGA	60
B7	TTAAGCCCCG	GAAAGCCTAT	CTGCCCCAGG	AGTTGCTGGG	AAAG	143
DAP3	TTAAGCCCCG	GAAAGCCTAT	CTGCCCCAGG	AGTTGCTGGG	AAAGGAAGGA	1072
B5	TTTGATGCCC	TGGATCCCTT	TATTCCCATC	CTGGTTTCCA	ACTATAACCC	110
B7						
DAP3	TTTGATGCCC	TGGATCCCTT	TATTCCCATC	CTGGTTTCCA	ACTATAACCC	1122
B5	AAAGGAATTT	GAAAGTTGTA	TTCAGTATTA	TTTGGAAAAC	AATTGGCTTC	160
B7						
DAP3	AAAGGAATTT	GAAAGTTGTA	TTCAGTATTA	TTTGGAAAAC	AATTGGCTTC	1172
B5	AACATGAGAA	AGCTCCTACA	GAAGAAGGGA	AAAAAGAGCT	GCTGTTCCCTA	210
B7		CTCCTACA	GAAGAAGGGA	AAAAAGAGCT	GCTGTTCCCTA	181
DAP3	AACATGAGAA	AGCTCCTACA	GAAGAAGGGA	AAAAAGAGCT	GCTGTTCCCTA	1222
B5	AGTAACGCGT	TCCCCTCGCT	GCTGGAGCGG	CACTGTGCCT	ACCTCTAAGC	260
B7	AGTAACGCGA	ACCCCTCGCT	GCTGGAGCGG	CACTGTGCCT	ACCTCTAAGC	231
DAP3	AGTAACGCGA	ACCCCTCGCT	GCTGGAGCGG	CACTGTGCCT	ACCTCTAAGC	1272
B5	CAAGATCACA	GCATGTGAGG	AAGACAGTGG	ACATCTGCTT	TATGCTGGAC	310
B7	CAAGATCACA	GCATGTGAGG	AAGACAGTGG	ACATCTGCTT	TATGCTGGAC	281
DAP3	CAAGATCACA	GCATGTGAGG	AAGACAGTGG	ACATCTGCTT	TATGCTGGAC	1322
B5	CCAGTAAGAT	GAGGAAGTCG	GGCAGTACAC	AGGAAGAGGA	GCCAGGCCCT	370
B7	CCAGTAAGAT	GAGGAAGTCG	GGCAGTACAC	AGGAAGAGGA	GCCAGGCCCT	331
DAP3	CCAGTAAGAT	GAGGAAGTCG	GGCAGTACAC	AGGAAGAGGA	GCCAGGCCCT	1372
B5	TGTACCTATG	GGATTGGACA	GGACTGCAGT	TGGCTCTGGA	CCTGCATTAA	410
B7	TGTACCTATG	GGATTGGACA	GGACTGCAGT	TGGCTCTGGA	CCTGCATTAA	381
DAP3	TGTACCTATG	GGATTGGACA	GGACTGCAGT	TGGCTCTGGA	CCTGCATTAA	1422
B5	AATGGGTTTC	ACTGTGAATG	CGTGACAATA	AGATATTCCC	TTGTTCCCTAA	470
B7	AATGGGTTTC	ACTGTGAATG	CGTGACAATA	AGATATTCCC	TTGTTCCCTAA	431
DAP3	AATGGGTTTC	ACTGTGAATG	CGTGACAATA	AGATATTCCC	TTGTTCCCTAA	1472
B5	AACTTTATAT	CAGTTTATTG	GATGTGGGTT	TTTCACATTT	AAGATAATTA	510
B7	AACTTTATAT	CAGTTTATTG	GATGTGG-TT	TTTCACATTT	AAGATAATTA	480
DAP3	AACTTTATAT	CAGTTTATTG	GATGTGG-TT	TTTCACATTT	AAGATAATTA	1521
B5	TGGCTCTTTT	CCTAAAAAAT	AAAATATCTT	TCTAAAAAAA	AA	552
B7	TGGCTCTTTT	CCTAAAAAAT	AAAATATCTT	TCTAAAAAAA	AA	522
DAP3	TGGCTCTTTT	CCTAAAAAAT	AAAATATCTT	TCTAAAAAAA	AA	1563

**B6**

Das Fragment B6 stimmt zu 98% mit den Nukleotiden 2720 bis 3251 der 6.631 Nukleotide langen humanen oxysterol binding protein-related protein 3 (ORP3) mRNA (Datenbankeintrag von Gregorio-King C.C., Collier G.C., McMillan J., Waugh C., Kirkland M.A., 2000; keine weiteren Referenzen; Datenbanknummer AY008372) überein.

B6	GATTGCCAAC	CTTACTGACA	CTTGATTTAG	GCCCAGACCA	GGGGTTTCTA	50
ORP3	TATTGC-CAC	C-TACTGACA	CT-GATTTAG	G-CCAGACCA	GAGGTTTCTA	2756
B6	GAGGAAAGGG	AACTTAGAAG	AAGCTGAAAT	ACAAAAAGCA	GAGGATTGAA	100
ORP3	GAGG-AAGGG	AACTTAGAAG	AAGCTGAAAT	ACAAAA-GCA	GAGGATTGAA	2804
B6	CAACTGCAAA	GAGAAAGGCG	GCGGGTCTTA	AAAGAAAATC	ATGTGGAGCA	150
ORP3	CAACTGCAG <b>A</b>	GAGAAAGGCG	GCGGGTCTTA	GAAGAAAATC	ATGTGGAGCA	2854
B6	CCAGCCTCGG	TTTTTCAGGA	AATCCGACGA	TGACTCTTGG	GTGAGCAACG	200
ORP3	CCAGCCTCGG	TTTTTCAGGA	AATCCGACGA	TGACTCTTGG	GTGAGCAACG	2904
B6	GCACCTATTT	GGAACCTAGA	AAAGATCTTG	GTTTTTTCCA	AACTGGACCA	250
ORP3	GCACCTATTT	GGAACCTAGA	AAAGATCTTG	GTTTTT-CCA	AACTGGACCA	2953
B6	TCCTGTCTTA	TGGTGAAAAA	GTAAAGAAGA	AAGATAACAT	TAGTGTATTT	300
ORP3	TCCTGTCTTA	TGGTGAAAAA	GTAAAGAAGA	AAGATAACAT	TAGTGTATTT	3003
B6	CTCCTGTGCT	TGCCTTCTGA	AGTGGCACAA	ACCTGTGTTT	ATATATTTAA	350
ORP3	CTCCTGTGCT	TGCCTTCTGA	AGTGGCACAA	ACCTGTGTTT	ATATATTTAA	3053
B6	AAGATACTCT	AGGATGATCA	CTTGTGCTTA	GGCTTAGCAT	TGTAACTCTT	400
ORP3	AAGATACTCT	AGGATGATCA	CTTGTGCTTA	G-CTTAGCAT	TGTAACTCTT	3102
B6	TAAGTCTATA	TTTTCCTCAG	TGCGTTTCTT	TACAATTTCA	AATGTTCCCC	450
ORP3	TAAGTCTATA	TTTTCCTCAG	TGCGTTTCTT	TACAATTTCA	AATGTT <b>A</b> CCC	3152
B6	TGATTGTTTA	TATGAATGTA	GAACCCCTTG	ACATATCCCC	CCATATATAA	500
ORP3	TGATTGTTTA	TATGAATGTA	GAAC <b>A</b> CCTTG	ACAT <b>TTCTTT</b>	<b>TT</b> ATATATAA	3202
B6	GCTATTTAAT	AAAAATAAAA	GGATTGAATG	TTCATGTGGG	GGGCTAAAAA	550
ORP3	<b>A</b> CTATTTAAT	AAAAAT <b>G</b> AAA	G-ATTGAATG	TTCATGT <b>G</b> T-	GGG- <b>TT</b> AAAAA	3249
B6	AA					552
ORP3	AA					3251

**B8**

Ein Vergleich mit der Datenbank ergab für das Fragment B8 eine 99%ige Übereinstimmung mit den Nukleotiden 107 bis 328 der 2.019 Nukleotide langen humanen t-complex polypeptide 1 mRNA (Kirchhoff und Willison, 1990; Datenbanknummer X52882).

B8	CAATATTGTA	AAAAGTTCTC	TTGGTCCTTT	TGGCTTGGAT	AAAATGTTGG	50
Tcp1	CAATATTGTA	AAAAGTTCTC	TTGGTCC <b>AGT</b>	TGGCTTGGAT	AAAATGTTGG	156
B8	TGGATGATAT	TGGTGATGTA	ACCATTACTA	ACGATGGTGC	AACCATCCTG	100
Tcp1	TGGATGATAT	TGGTGATGTA	ACCATTACTA	ACGATGGTGC	AACCATCCTG	206
B8	AAGATACTGG	AGGTAGAACA	TCCTGCAGCT	AAAGTTCTTT	GTGAGCTGGC	150
Tcp1	AAG <b>TT</b> ACTGG	AGGTAGAACA	TCCTGCAGCT	AAAGTTCTTT	GTGAGCTGGC	256
B8	TGATCTGCAA	GACAAAGAAG	TTGGAGATGG	AATCACTTCA	GTGGTTATTA	200
Tcp1	TGATCTGCAA	GACAAAGAAG	TTGGAGATGG	A <b>ACT</b> ACTTCA	GTGGTTATTA	306
B8	TTGCAGCAGA	ACTCCTAAAA	AAAAA			225
Tcp1	TTGCAGCAGA	ACTCCTAAAA	AA•••			328

**B9 und B12**

Die Sequenzierung der Fragmente B9 und B12 ergab identische Sequenzen. Der Vergleich mit der Datenbank zeigte, daß noch keine mRNA bekannt ist, die mit den ermittelten Sequenzen übereinstimmt. Es konnte aber eine 99%ige Übereinstimmung mit den Nukleotiden 67.032 bis 67.588 des 96.995 bp langen BAC-Klons RP11-394J1 (Datenbankeintrag von Worley et al., 1999; keine weiteren Referenzen; AC008149) festgestellt werden. Dieser Klon beinhaltet einen Abschnitt des humanen Chromosoms 12 (12q22 102.7-103.4).

B9	TTTTTTTTTTA	<b>GCGCAATGAA</b>	ATTTGATGAC	CACTTACTAT	GTACCAGGAA	50
B12	TTTTTTTTTTA	GTGCAATTAA	ATTTGATGAC	CACTTACTAT	GTACCAGGAA	50
RP11-394J1	TTTCTTTTTTA	GTGCAATTAA	ATTTGATGAC	CACTTACTAT	GTACCAGGAA	67081
B9	TTGTGCTGAG	TGCTTTATAC	ATGCTGTCTA	<b>TTTTTTTAATA</b>	CTCTCAGTTG	100
B12	TTGTGCTGAG	TGCTTTATAC	ATGCTGTCTA	-AATTTAATA	CTCTCAGTTG	99
RP11-394J1	TTGTGCTGAG	TGCTTTATAC	ATGCTGTCTA	-AATTTAATA	CTCTCAGTTG	67130
B9	GCTGTGCCCA	CGAGGAACTA	TGACTTCGAA	AGGTGAAATA	AGACACTCAT	150
B12	GCTGTGCCCA	CGAGGAACTA	TGACTTCGAA	AGGTGAAATA	AGACACTCAT	149
RP11-394J1	GCTGTGCCCA	CGAGGAACTA	TGACTTCGAA	AGGTGAAATA	AGACACTCAT	67180
B9	GGCCACATGG	GTAAAATGGG	CCAACAGAGC	CTCATATCCA	GGGGCATCTG	200
B12	GGCCACATGG	GTAAAATGGG	CCAACAGAGC	CTCATATCCA	GGGGCATCTG	199
RP11-394J1	GGCCACATGG	GTAAAATGGG	CCAACAGAGC	CTCATATCCA	GGGGCATCTG	67230
B9	GCTCCAAAGT	CCAGGTTCTT	AATCAACGCG	CATATGCCCC	CAGTAGAGGC	250
B12	GCTCCAAAGT	CCAGGTTCTT	AATCAACGCG	CATATGCCCC	CAGTAGAGGC	249
RP11-394J1	GCTCCAAAGT	CCAGGTTCTT	AATCAACGCG	CATATGCCCC	CAGTAGAGGC	67280
B9	TTCTTTTCTC	ATATGCACAC	TTCACTGCTG	CTAAGGGAAA	CGTCTCATTG	300
B9	TTCTTTTCTC	ATATGCACAC	TTCACTGCTG	CTAAGGGAAA	CGTCTCATTG	299
RP11-394J1	TTCTTTTCTC	ATATGCACAC	TTCACTGCTG	CTAAGGGAAA	CGTCTCATTG	67330
B9	TAATGCGTGG	GAAATACATT	CCTACTAGGA	ATCAAATCAG	GACATTTCCCT	350
B12	TAATGCGTGG	GAAATACATT	CCTACTAGGA	ATCAAATCAG	GACATTTCCCT	349
RP11-394J1	TAATGCGTGG	GAAATACATT	CCTACTAGGA	ATCAAATCAG	GACATTTCCCT	67380
B9	TGTTCAATTC	TGGTGTTGCC	TCATCTGTGT	CTCCAGCTGC	TCCAGTTGGG	400
B12	TGTTCAATTC	TGGTGTTGCC	TCATCTGTGT	CTCCAGCTGC	TCCAGTTGGG	399
RP11-394J1	TGTTCAATTC	TGGTGTTGCC	TCATCTGTGT	CTCCAGCTGC	TCCAGTTGGG	67430
B9	TTGTTTCAAG	AAAGAATCTT	TGAATCCACC	CCATCCACCA	TTTTGTTAAC	450
B12	TTGTTTCAAG	AAAGAATCTT	TGAATCCACC	CCATCCACCA	TTTTGTTAAC	449
RP11-394J1	TTGTTTCAAG	AAAGAATCTT	TGAATCCACC	CCATCCACCA	TTTTGTTAAC	67480
B9	CAGTGCCCTC	CTTTCAAAGA	TCTGTATCGT	GGTTTAA <b>AAAT</b>	<b>AGGGT</b> CAAGG	500
B12	CAGTGCCCTC	CTTTCAAAGA	TCTGTATCGT	GGTTTAAATA	GGGT <b>CAAGGG</b>	499
RP11-394J1	CAGTGCCCTC	CTTTCAAAGA	TCTGTATCGT	GGTTTAAATA	-GGT <b>CAAGG</b>	67529
B9	TTCACCCCAA	CACTAAATAA	GCAAGGGGGG	GCTCTC-GAT	ACAAAGTGGG	550
B12	T-CACCCCA-	CACTAAATAA	GCAAGGGGGG	-CTCTCTGAT	ACAA-GTGGG	545
RP11-394J1	TTCACCC-AA	CACTAAATAA	GCAAGGG <b>TGG</b>	- <b>TTCTC</b> -GAT	ACAA-GTGGG	67575
B9	GCCGTTGGAGA	AGCT				564
B12	-CCGTT-GAGA	AGCT				558
RP11-394J1	-CCGTT-GAGA	AGCT				67588

**B10**

Die Sequenz von Fragment B10 stimmt zu 99 % mit der Sequenz der humanen Methionin Synthase mRNA (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR) mRNA) überein (Chen et al., 1996; Banerjee und Matthews, 1990; Li et al., 1996; Ludwig und Matthews, 1997; Matthews et al., 1998; Datenbanknummern U73338 bzw. NM000254).

B10	TTGGTCAGGG	AAATATGAAT	TAGGACCACA	ATGAGATTCC	ATTTTATATC	50
MS	TTGGTCAGGG	AAATATGAAT	TAGGACCACA	ATGAGATTCC	ATTTTATATC	6453
MTR	TTGGTCAGGG	AAATATGAAT	TAGGACCACA	ATGAGATTCC	ATTTTATATC	6335
B10	CATAAGATTT	GCAAAGGTTG	GGTCTGACAG	TACCAGTTGT	TAGATCTGTA	100
MS	CATAAGATTT	GCAAAGGTTG	GGTCTGACAG	TACCAGTTGT	TAGATCTGTA	6503
MTR	CATAAGATTT	GCAAAGGTTG	GGTCTGACAG	TACCAGTTGT	TAGATCTGTA	6385
B10	GGGACTTGTA	CAACATTGTG	GATGTGTAAA	CAGGCACCAC	TGCTTTAAAA	150
MS	GGGACTTGTA	CAACATTGTG	GATGTGTAAA	CAGGCACCAC	TGCTTTAAAA	6553
MTR	GGGACTTGTA	CAACATTGTG	GATGTGTAAA	CAGGCACCAC	TGCTTTAAAA	6435
B10	AACAATTATC	CCTTACAGAC	TTGAACATTT	GCAGACGTTA	TGATCTTGCT	200
MS	AACAATTATC	CCTTACAGAC	TTGAACATTT	GCAGACCTTA	TGATCTTGCT	6603
MTR	AACAATTATC	CCTTACAGAC	TTGAACATTT	GCAGACGTTA	TGATCTTGCT	6485
B10	TCCAACTCCC	ACCTGTATGT	CCAGCAAACCT	CTTGATGTG	GCCACTAGGA	250
MS	TCCAACTCCC	ACCTGTATGT	CCAGCAAACCT	CTTGATGTG	GCCACTAGGA	6653
MTR	TCCAACTCCC	ACCTGTATGT	CCAGCAAACCT	CTTGATGTG	GCCACTAGGA	6535
B10	GGAATGTGTA	AGAATGTTCA	TAGTTACATA	TTTATAATAG	TTAATAACTG	300
MS	GGAATGTGTA	AGAATGTTCA	TAGTTACATA	TTTATAATAG	TTAATAACTG	6703
MTR	GGAATGTGTA	AGAATGTTCA	TAGTTACATA	TTTATAATAG	TTAATAACTG	6585
B10	GAAAAAGTGA	AATGTATGTC	TGTCTACAGG	AAAATAGGTG	AATAATTAGA	350
MS	GAAAAAGTGA	AATGTATGTC	TGTCTACAGG	AAAATAGGTG	AATAATTAGA	6753
MTR	GAAAAAGTGA	AATGTATGTC	TGTCTACAGG	AAAATAGGTG	AATAATTAGA	6635
B10	TATATATATT	CATTCTACGG	GATATTATTC	AGTAGTGGAA	ATGAGTGAAC	400
MS	TATATATATT	CATTCTACGG	GATATTATTC	AGTAGTGGAA	ATGAGTGAAC	6803
MTR	TATATATATT	CATTCTACGG	GATATTATTC	AGTAGTGGAA	ATGAGTGAAC	6685
B10	TACAGCTATA	CCTCACAATA	AGAATGAATC	TCAGAAAATA	TTAAGGAAAA	450
MS	TACAGCTATA	CCTCACAATA	AGAATGAATC	TCAGAAAATA	TTAAGGAAAA	6853
MTR	TACAGCTATA	CCTCACAATA	AGAATGAATC	TCAGAAAATA	TTAAGGAAAA	6735
B10	AAGCAAGTTT	GAAGAGACCA	CATGGGGCGT	ACTATTTTTTA	TTGAGCCCAA	500
MS	AAGCAAGTTT	GAAGAGACCA	CATGGGGCGT	ACTATTTTTTA	TTGAGCCCAA	6903
MTR	AAGCAAGTTT	GAAGAGACCA	CATGGGGCGT	ACTATTTTTTA	TTGGGCCCAA	6785
B10	AAACAAGCAA	AACCAAAGAA	-ATGTAGTCT	AAGCATCCGT	ATACCATAAA	549
MS	AAACAAGCAA	A-C-AAAGAA	TATGTAGTCT	AAGCATACGT	ATACAATAAA	6951
MTR	AAACAAGCAA	AACCAAAGAA	TATGTAGTCT	AAGCATACGT	ATACAATAAA	6835
B10	ACTATGCTAT	TAAAAAAAAA				569
MS	ACTATGCTAT	TAAAAAAAAA				6971
MTR	ACTATGCTAT	AAAAAAAAAA				6855

**B11**

Ein Vergleich der Sequenz von Fragment B11 mit der Datenbank zeigte eine Übereinstimmung von 99,7 % mit den Nukleotiden 1.397 bis 1.696 der 1.791 Nukleotide langen humanen nuclear matrix protein 55 (nmt55) mRNA (Traish et al., 1997; Datenbanknummer U89867).

B11	GCTGCTACAA	TGGAAGGAAT	TGGGGCAATT	GGTGGAACTC	CTCCTGCATT	50
nmt55	GCTGCTACAA	TGGAAGGAAT	TGGGGCAATT	GGTGGAACTC	CTCCTGCATT	1446
B11	CAACCGTGCA	GCTCCTGGAG	CTGAATTTGC	CCCAAACAAA	CGTCGCCGAT	100
nmt55	CAACCGTGCA	GCTCCTGGAG	CTGAATTTGC	CCCAAACAAA	CGTCGCCGAT	1496
B11	ACTAATAAGT	TGCAGTGTCT	AGTTTCTCAA	AACCCTTAAA	AGAAGGACCC	150
nmt55	ACTAATAAGT	TGCAGTGTCT	AGTTTCTCAA	AACCCTTAAA	AGAAGGACCC	1546
B11	TTTTTGGACT	AGCCAGAATT	CTACCCTGGA	AAAGTGTTAG	GGATTCCTTC	200
nmt55	TTTTTGGACT	AGCCAGAATT	CTACCCTGGA	AAAGTGTTAG	GGATTCCTTC	1596
B11	CAATAGTTAG	ATCTACCCTG	CCTGTACTAC	TCTAGGGAGT	ATGCTGGAGG	250
nmt55	CAATAGTTAG	ATCTACCCTG	CCTGTACTAC	TCTAGGGAGT	ATGCTGGAGG	1646
B11	CAGAGGGCAA	GGGAGGGGTG	GTATTAAACA	AGTCAATTCT	GTGTGGTAAA	300
nmt55	CAGAGGGCAA	GGGAGGGGTG	GTATTAAACA	AGTCAATTCT	GTGTGGTATA	1696
B11	AAAAAA					306
nmt55	•••••					



**B13**

Für das Fragment B13 ergab sich durch den Datenbankabgleich eine Übereinstimmung von 99,8 % mit den Nukleotiden 393 bis 827 der 827 Nukleotide langen humanen ribosomal protein L7 (RPL7) mRNA (Hemmerich et al., 1993; Datenbanknummer NM000971).

B13	CTTCGATTAA	CATGCTGAGG	ATTGTAGAGC	CATATATTGC	ATGGGGGTAC	50
RPL7	CTTCGATTAA	CATGCTGAGG	ATTGTAGAGC	CATATATTGC	ATGGGGGTAC	442
B13	CCCAATCTGA	AGTCAGTAAA	TGAACTAATC	TACAAGCGTG	GTTATGGCAA	100
RPL7	CCCAATCTGA	AGTCAGTAAA	TGAACTAATC	TACAAGCTTG	GTTATGGCAA	492
B13	AATCAATAAG	AAGCGAATTG	CTTTGACAGA	TAACGCTTTG	ATTGCTCGAT	150
RPL7	AATCAATAAG	AAGCGAATTG	CTTTGACAGA	TAACGCTTTG	ATTGCTCGAT	542
B13	CTCTTGGTAA	ATACGGCATC	ATCTGCATGG	AGGATTTGAT	TCATGAGATC	200
RPL7	CTCTTGGTAA	ATACGGCATC	ATCTGCATGG	AGGATTTGAT	TCATGAGATC	592
B13	TATACTGTTG	GAAAACGCTT	CAAAGAGGCA	AATAACTTCC	CTGTGGCCCT	250
RPL7	TATACTGTTG	GAAAACGCTT	CAAAGAGGCA	AATAACTTCC	CTGTGGCCCT	642
B13	TCAAATTGTC	TTCTCCACGA	GGTGGAATGA	AGAAAAAGAC	CACCCATTTT	300
RPL7	TCAAATTGTC	TTCTCCACGA	GGTGGAATGA	AGAAAAAGAC	CACCCATTTT	692
B13	GTAGAAGGTG	GAGATGCTGG	CAACAGGGAG	GACCAGATCA	ACAGGCTTAT	350
RPL7	GTAGAAGGTG	GAGATGCTGG	CAACAGGGAG	GACCAGATCA	ACAGGCTTAT	742
B13	TAGAAGAATG	AACTAAGGTG	TCTACCATGA	TTATTTTTCT	AAGCTGGTTG	400
RPL7	TAGAAGAATG	AACTAAGGTG	TCTACCATGA	TTATTTTTCT	AAGCTGGTTG	792
B13	GTTAATAAAC	AGTACCTGCT	CTCAAATTGA	AATAAAAAAA	AA	442
RPL7	GTTAATAAAC	AGTACCTGCT	CTCAAATTGA	AAAAA•••••	••	827

**B14**

Ein Vergleich der Sequenz von Fragment B14 mit den Datenbanken ergab keine ausreichende Übereinstimmung mit einer bereits bekannten mRNA. Es konnte aber eine Übereinstimmung von 99 % mit den Nukleotiden 157.812 bis 158.156 des 196.848 bp langen BAC-Klons RP11-449G16 (Sulston und Waterston, 1998; Datenbanknummer AC007684) festgestellt werden. Dieser Klon beinhaltet einen Abschnitt des humanen Chromosoms 2.

B14	TAACGAGGCT	GAAGTTCTAT	TTATGGGAAA	ATAAACAGTT	GGCATTGAA	50
RP11/449G16	TAACGAGGCT	GAAGTTTAT	TTATGGGAAA	ATAAACAGTT	GGCATTGAA	157861
B14	CAAGCATTTA	TTTATGGTGC	AGTCAGTTTG	TGCCAGGAAC	AATGCTAGAC	100
RP11/449G16	CAAGCATTTA	TTTATGGTGC	AGTCAGTTTG	TGCCAGGAAC	AATGCTAGAC	157911
B14	CGTAGGCTGT	AAGGAAAGAA	GATAGATTTG	ATTATTTCCC	ATTGTTTAAAG	150
RP11/449G16	CGTAGGCTGT	AAGGAAAGAA	GATAGATTTG	ATTATTTCCC	ATTGTTTAAAG	157961
B14	GAGCTCGCTT	TTACAAACAT	GTAATAGAT	TAAAATGCAG	TGTAAGTGCT	200
RP11/449G16	GAGCTCGCTT	TTACAAACAT	GTAATAGAT	TAAAATGCAG	TGTAAGTGCT	158011
301	AGAGCAGCTC	TGTGTGTTAA	ATGCTATGGA	AACTTAGAGA	AAGCTGCAGA	250
RP11/449G16	AGAGCAGCTC	TGTGTGTTAA	ATGCTATGGA	AACTTAGAGA	AAGCTGCAGA	158061
351	TAATTTTCCC	TGGCAATCTT	GGAAGGCGGC	TGCTCCAAGG	TAGCTTTTGT	300
RP11/449G16	TAATTTTCCC	TGGCAATCTT	GGAAGGCGGC	TGCTCCAAGG	TGGCTTTTGT	158111
401	GTTAAGCCCT	GATCATGAAT	CTGAGAATAT	CTTGTAATAA	AAAAA	345
RP11/449G16	GTTAAGCCCT	GATCATGAAT	CTGAGAATAT	CTTGTAATAA	TAAAA	158156

**B15**

Das Fragment B15 zeigt keine Homologie zu bekannten Sequenzen. Angegeben ist daher nur die ermittelte Sequenz.

B15	GATGTATTTT	TAGTTTGGAC	CATGAAGCCA	GAATGGAGGG	CACAGAACTT	50
B15	GTGAAAATTC	ATTAAAGATG	AACAGTCTGG	GAAAGGCATG	TAAAAGAATC	100
B15	TGAGTTTATT	TAGGAAGAAG	CTAAGGATGG	CATCGTAATT	GTTTTTAAAT	150
B15	TCTTACATTA	AAAAAATATT	GTATTTTGTG	TAAAAAATAA		190

**B16**

Ein Datenbankvergleich der Sequenz von Fragment B16 zeigte eine Übereinstimmung von 100 % mit den Nukleotiden 2.531 bis 2.826 der 2.826 Nukleotide langen humanen ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 2 (ABCB2) mRNA (Datenbanknummer XM004227).

B16	GTAGGCAGCT	GCCTCCAGGA	TGAGTTACTT	GAAATTTGCC	TTGAGTGTGT	50
ABCB2	GTAGGCAGCT	GCCTCCAGGA	TGAGTTACTT	GAAATTTGCC	TTGAGTGTGT	2580
B16	TACCTCCTTT	CCAAGCTCCT	CGTGATAATG	CAGACTTCCT	GGAGTACAAA	100
ABCB2	TACCTCCTTT	CCAAGCTCCT	CGTGATAATG	CAGACTTCCT	GGAGTACAAA	2630
B16	CCCAGGATTT	GTAATTCCTT	ACTGTAACGG	AGTTTAGAGC	CAGGGCTGAT	150
ABCB2	<b>C</b> ACAGGATTT	GTAATTCCTT	ACTGTAACGG	AGTTTAGAGC	CAGGGCTGAT	2680
B16	GCTTTGGTGT	GGCCAGCACT	CTGAAACTGA	GAAATGTTCA	GAATGTACGG	200
ABCB2	GCTTTGGTGT	GGCCAGCACT	CTGAAACTGA	GAAATGTTCA	GAATGTACGG	2730
B16	AAAGATGATC	AGCTATTTTC	AACATAACTG	AAGGCATATG	CTGGCCCATA	250
ABCB2	AAAGATGATC	AGCTATTTTC	AACATAACTG	AAGGCATATG	CTGGCCCATA	2780
B16	AACACCCTGT	AGGTTCTTGA	TATTTATAAT	AAAATTGGTG	TTTTGTAAAA	300
ABCB2	AACACCCTGT	AGGTTCTTGA	TATTTATAAT	AAAATTGGTG	TTTTGT	2826
B16	AAAAA					305

**B17**

Das Fragment B17 stimmt zu 99 % mit den Nukleotiden 497 bis 796 der 907 Nukleotide langen humanen PNAS-102 mRNA (Datenbankeintrag von Yu et al., 2000; keine weiteren Referenzen; Datenbanknummer AF275798) überein. Jedoch weichen 42 Nukleotide am 3'-Terminus des Fragments B17 von der Sequenz der PNAS-102 mRNA ab.

B17	GCATCGACTG	TTTGCACAAG	GGGACAAATG	ATATGAAGCA	ACAGCATGTC	50
PNAS-102	GCATCGACTG	TTTGCACAAG	GGGACAAATG	ATATGAAGCA	ACAGCATGTC	546
B17	ATAGAAACCT	TGATTGGCAA	AAAGCAACAG	ATATCTCTTG	CAACACAAAT	100
PNAS-102	ATAGAAACCT	TGATTGGCAA	AAAGCAACAG	ATATCTCTTG	CAACACAAAT	596
B17	GGTTAGAATG	ATTTTGAAGA	TTGATGACAT	TCGTAAGCCT	GGAGAATCTG	150
PNAS-102	GGTTAGAATG	ATTTTGAAGA	TTGATGACAT	TCGTAAGCCT	GGAGAATCTG	646
B17	AAGAATGAAG	ACATTGAGAA	AACTATGTAG	CAAGATCCAC	TTCTGTGATT	200
PNAS-102	AAGAATGAAG	ACATTGAGAA	AACTATGTAG	CAAGATCCAC	TTCTGTGATT	696
B17	AAGTAAATGG	ATGTCTCGTG	ATGCGTCTAC	AGTTATTTAT	TGTTACATCC	250
PNAS-102	AAGTAAATGG	ATGTCTCGTG	ATGCGTCTAC	AGTTATTTAT	TGTTACATCC	746
B17	TTTTCCAGAC	ACTGTAGATG	CTATAATAAA	AATAGCCTGT	TTGGTACCC-	299
PNAS-102	TTTTCCAGAC	ACTGTAGATG	CTATAATAAA	AATAGC-TGT	TTGGTAAACCA	795
301	TCTATAATAA	AAATAGCCTG	TTTGGTACCC	ATTAAAAAAA	AAA	342
PNAS-102	T.....	.....	.....	.....	....	796

**B18**

Das Fragment **B18** zeigt keine Homologie zu bekannten Sequenzen. Angegeben ist daher nur die ermittelte Sequenz.

B18	AGTGAGTTAA	CTTTCACCTCA	TAATAGAAAT	AGCTAGAGGT	TGGATTATTT	50
B18	CAAAAAGCCA	GTCAGTGTTT	TTAGAGCTTC	TGATTCTCAC	AAGAACAGAT	100
B18	GAAAAAATGC	ACGTATCAGT	TATAGAGAAG	ACTTTCCATT	TGAGACTCTC	150
B18	AGAAAAGGTG	TGGGTGGTTA	CTGTGTTTGT	TTGACATTGC	ATCCTTTAAT	200
B18	GAGCTTGTTT	AGTACGAGAG	GAAGTGAAC	TTTACCTTGG	GCCTCTCTGA	250
B18	AGCCCAGATT	CCTCCAATA	ATAAAAAAAA	AA		282

**B19**

Der Vergleich des Fragments B19 mit den Datenbanken ergab eine Übereinstimmung von 100 % mit den Nukleotiden 908 bis 1.167 einer 1.442 Nukleotide langen mRNA. Diese wird nach ihrem cDNA-Klon als FLJ20934 fis, Klon ADSE01518 bezeichnet (Datenbankeintrag von Kawakami et al., 2000; keine weiteren Referenzen; Datenbanknummer AK024587).

B19	TCTCAACGCA	TAGATAAATT	TAGGGGAATT	GGATGTATTA	TTCAACTTTG	50
ADSE01518	TCTCAACGCA	TAGATAAATT	TAGGGGAATT	GGATGTATTA	TTCAACTTTG	957
B19	ATTTGGGTTG	TAAAATGTGT	TAAATCCTGT	TCATTGAACT	CCCATCAACT	100
ADSE01518	ATTTGGGTTG	TAAAATGTGT	TAAATCCTGT	TCATTGAACT	CCCATCAACT	1007
B19	CTTATAAAAT	TCATGCTGAT	CTTCATTACC	GTTGCATGAT	TGGAAATGTT	150
ADSE01518	CTTATAAAAT	TCATGCTGAT	CTTCATTACC	GTTGCATGAT	TGGAAATGTT	1057
B19	TAAAACATTG	TACAGTTTTA	GTATAGAGAA	ATGTAATGGT	TTTTGTGACC	200
ADSE01518	TGAAACATTG	TACAGTTTTA	GTATAGAGAA	ATGTAATGGT	TTTTGTGACC	1107
B19	AGTTTCTGTC	TGCATGTAAT	TTGGATTTCT	CAAATACATT	CATTAGTAAT	250
ADSE01518	AGTTTCTGTC	TGCATGTAAT	TTGGATTTCT	CAAATACATT	CATTAGTAAT	1157
B19	TTATCAGTAA	AAAAAAA				267
ADSE01518	TTATCAGTAA	•••••••				1167

**B20**

Ein Vergleich der Sequenz von Fragment B20 mit den Datenbanken ergab keine ausreichende Übereinstimmung mit einer bereits bekannten mRNA. Es konnte aber eine Übereinstimmung von 99,6 % mit den Nukleotiden 99.785 bis 100.049 des 126.586 bp langen Klon RP4-806M20 (Datenbankeintrag von Lloyd, 2001; keine weiteren Referenzen; Datenbanknummer AL132655) festgestellt werden. Dieser Klon beinhaltet einen Abschnitt des humanen Chromosoms 20.

B20	TTTTTTTTTTA	TATGTGGCTC	CTCACATGCC	TGAAACCAAA	TCTGCCATTT	50
RP4-806M20	TTTTCTTTTTA	TATGTGGCTC	CTCACATGCC	TGAAACCAAA	TCTGCCATTT	99834
B20	GGAAAACCGG	AAAGGCTTCT	CTTGCTCCTC	TTCCCTCCCT	CCTCAGTGAA	100
RP4-806M20	GGAAAACCGG	AAAGTCTTCT	CTTGCTCCTC	TTCCCTCCCT	CCTCAGTGAA	99884
B20	GAGCAGGGAG	AGAAGTGACG	GCTGCTTCCT	GAGGGAACCT	CTAGACCAGT	150
RP4-806M20	GAGCAGGGAG	AGAAGTGACG	GCTGCTTCCT	GAGGGAACCT	CTAGACCAGT	99934
B20	AAAGGGAAGG	ACTCCCAATT	TATGATGACT	TTTAGCCCGA	AACAATGGAT	200
RP4-806M20	AAAGGGAAGG	ACTCCCAATT	TATGATGACT	TTTAGCCCGA	AACAATGGAT	99984
B20	GGGAAGAGGG	GGTCCAGAAG	TAATCACCAG	CCTCCAGTGC	ATTCTCATTT	250
RP4-806M20	GGGAAGCGGG	GGTCCAGAAG	TAATCACCAG	CCTCCAGTGC	ATTCTCATTT	100034
B20	CTGACGTTGAG	AAGC				264
RP4-806M20	CTGACGTTGAG	AGGC				100049

**B21**

Das Fragment B21 weist eine große Homologie zur 556 Nukleotide langen ribosomal protein L24 (RPL24) mRNA (Johnson, 1993; Datenbanknummer NM000986) auf. Die Nukleotide 347 bis 552 der RPL24 mRNA stimmen zu 99,5 % mit den Nukleotiden des Fragments B21 überein.

B21	CTCAACGAGG	AACAAGCTAT	CAGGGCTGCT	AAGGAAGCAA	AAAAGGCTAA	50
RPL24	CTCAACGA-G	AACAAGCTAT	CAGGGCTGCT	AAGGAAGCAA	AAAAGGCTAA	395
B24	GCAAGCATCT	AAAAAGACTG	CAATGGCTGC	TGCTAAGGCA	CCTACAAAGG	100
RPL24	GCAAGCATCT	AAAAAGACTG	CAATGGCTGC	TGCTAAGGCA	CCTACAAAGG	445
B24	CAGCACCTAA	GCAAAAGATT	GTGAAGCCTG	TGAAAGTTTC	AGCTCCCCGA	150
RPL24	CAGCACCTAA	GCAAAAGATT	GTGAAGCCTG	TGAAAGTTTC	AGCTCCCCGA	495
B24	GTTGGTGGAA	AACGCTAAAC	TGGCAGATTA	GATTTTTTAAA	TAAAGATTGG	200
RPL24	GTTGGTGGAA	AACGCTAAAC	TGGCAGATTA	GATTTTTTAAA	TAAAGATTGG	545
B24	ATTATAAAAA	AAAA				214
RPL24	ATTATAA•••	••••				552

**B22**

Der Vergleich des Fragments B22 mit den Datenbanken ergab eine Übereinstimmung von 97 % mit den Nukleotiden 1.189 bis 1.522 der 2.060 Nukleotide langen pre-mRNA splicing factor (SFRS3) mRNA (Datenbankeintrag von Liu et al., 1998; keine weiteren Referenzen; Datenbanknummer AF107405).

1	TGTATATGTA	TACATGGCTG	TTCGTGACAT	TCTTTATGTG	CAAATTTGTG	50
SFRS3	TGTATATGGA	TACATGGCTG	TTCGTGACAT	T-TTTATGTG	CAAATTTGTG	1237
B22	ATTTCAAAAA	TGTCCTGCCA	GTTTAAGGGT	ACATTGGAGA	GCCGAACTTT	100
SFRS3	ATTTCAAAAA	TGTCCTGCCA	GTTTAAGGGT	ACATTGTAGA	GCCGAACTTT	1287
B22	GAGTTACTGT	GCAAGATTTT	TTTTTCATGC	TGTCATTTGT	AATATGTTTT	150
SFRS3	GAGTTACTGT	GCAAGATTTT	TTTTTCATGC	TGTCATTTGT	AATATGTTTT	1337
B22	GTGAGAATCC	TTGGGATTAA	AGTTTTGGTT	ACAAATTGTT	CTTTAACTTG	200
SFRS3	GTGAGAATCC	TTGGGATTAA	AGTTTTGGTT	ACAAATTGTT	CTTTAACTTG	1387
B20	AAAGCCTGTT	TTTCCTTGCA	AACTCAAATC	TGTGAGCTTG	GTACCAAGTC	250
SFRS3	AAAGCCTGTT	TTTCCTTGCA	AACTCAAATC	TGTGAGCTTG	GTACCAAGTC	1437
B20	CAGGTATAAC	ATTCCTATTG	GAAGCCATAC	TTATATTTTC	TTGTAAAGTG	300
SFRS3	CAGGTATAAC	ATTCCTATTG	GAAGCCATAC	TTATATTTTC	TTGTAAAGTG	1487
B20	CTTTTGAATT	AATAAAATAT	TAGCATAATT	GTGTAAAAAA	AAA	343
SFRS3	CTTTTGAATT	AATAAAATAT	TAGCATAATT	GTGTA•••••	•••	1522

**B23**

Das Fragment **B23** zeigt keine Homologie zu bekannten Sequenzen. Angegeben ist daher nur die ermittelte Sequenz.

B23	AGACCAGCTA	TATGTAAAAG	AATAAATTAT	GATTTTATTC	TGAGGAGTTA	50
B23	TACTTTTAAT	CCACATTTGT	AGTAGGATTT	ATTTAATAGA	GAATAGCACA	100
B23	GCCTAGATTG	TTAGACAGCA	TACAATGTAT	GAATGAATCA	ATATAATACT	150
B23	GTGCAACTTG	ATTGGTATAA	ATTCTGTTTC	TTTTGCATAT	GACCTTCATT	200
B23	TATTTAACAA	CTGAAAATCT	GTGGTGAATT	AAAATAATTT	CTTGAAACAA	250
B23	TCTTTTGGGT	AAGAAATAAA	ATATACGCAT	TTAATTCTAT	AAAAAAAAAA	299

## **DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt:

Herrn PD Dr. H. Mohr sowie dem DRK-Blutspendedienst NSOB, Institut Springe für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in der Abteilung Forschung und Entwicklung,

Herrn Prof. Dr. T. Scheper für die Betreuung der Arbeit als Hauptreferent,

Herrn Prof. Dr. em. K. Schügerl für die Übernahme des Korreferats,

Frau Dr. B. Eiz-Vesper und Herrn Dr. Knüver-Hopf für die Betreuung meiner Arbeit, ihre Anregungen bei der Durchführung der Versuche und ihre stete Diskussionsbereitschaft, die mir oft eine große Hilfe waren,

den übrigen Mitarbeitern der Abteilung Forschung und Entwicklung für das tolle Arbeitsklima,

der Dr.-Wilhelm-Kempe-Stiftung des DRK-Blutspendedienstes NSOB für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit,

den verantwortlichen Ärzten, Schwestern und Hebammen im Krankenhaus Nordstadt (Hannover), im Vinzenzkrankenhaus (Hannover), in der Frauenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover und im Robert-Koch-Krankenhaus (Gehrden) für die Bereitstellung der unzähligen Nabelschnurblutproben,

meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, die durch ihr Verständnis und Interesse sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

last but not least meinem Mann für seine Liebe, sein Verständnis und seine seelische Unterstützung.



## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten:**

Name: Ilona Vogt-Humberg  
Geburtsdatum: 16.12.1971  
Geburtsort: Hattingen  
Familienstand: verheiratet

### **Schulbildung:**

1978-1982 evangelische Grundschule Neviges  
1982-1991 Nikolaus-Ehlen-Gymnasium Velbert  
Abiturprüfung im Juni 1991

### **Studium:**

1991-1996 Studium Biologie (Diplom) an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, mit dem Hauptfach Biologische Chemie;  
Diplomarbeit im immunologischen Labor des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Düsseldorf;  
Thema: Spezifität und Restriktion von NK-Zellen gegen primitive neuroektodermale Tumorzellen.

### **Promotion:**

1997-2001: Anstellung als Doktorandin in der Abteilung Forschung und Entwicklung des DRK-Blutspendedienstes NSOB in Springe

**Promotionsprüfung:** 07. Februar 2002