

Serielle Untersuchungen zur Hämatopoese an *c-mpl*^{-/-} - Mäusen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Diplom-Biologin Janet Kaffanke
geboren am 23. Mai 1969 in Magdeburg

2007

Referent: Prof. Dr. Helmut Holtmann
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Karl Welte
Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 24. November 2006

Zusammenfassung

Serielle Analysen der Hämatopoese in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen

Thrombopoetin (TPO) ist der wichtigste humorale Regulator für die Megakaryozytose, spielt aber auch eine bedeutende Rolle für multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen. Mutationen im Gen für den TPO Rezeptor MPL führen im Menschen zur kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT), die sich im Laufe der ersten Lebensjahre von einer isolierten Thrombozytopenie zu einer aplastischen Panzytopenie entwickelt. Im Tiermodell der *c-mpl*^{-/-}-Maus können die Auswirkungen des TPO Rezeptorverlustes für die Hämatopoese *in vivo* untersucht werden. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in verschiedenen hämatopoetischen Organen und funktioneller Untersuchungen sortierter Vorläuferzellpopulationen wurden die Veränderungen im hämatopoetischen System bei *c-mpl*^{-/-}-Mäusen über einen Zeitraum von 24 Monaten analysiert um mögliche Parallelen im Krankheitsverlauf zwischen Mensch und Maus zu identifizieren. Wir fanden in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen eine starke Reduktion von multipotenten Stammzellen und von frühen myeloiden und lymphoiden Vorläufern in verschiedenen hämatopoetischen Geweben. Für frühe myeloide Vorläuferzellen konnte *in vitro* ein deutlich vermindertes klonogenes Potential nachgewiesen werden. Frühe T-Zell-Vorläufer im Thymus waren ebenfalls stark vermindert. Damit konnte erstmals ein Einfluss von TPO auf die Lymphopoese gezeigt werden.

Die Reduktion der frühen Vorläuferzellen wird allerdings im Laufe der weiteren hämatopoetischen Differenzierung durch zusätzliche Mitosen zunächst fast vollständig kompensiert: junge *c-mpl*^{-/-}-Mäuse wiesen, abgesehen von einer tiefen Thrombozytopenie, normale Zellzahlen im peripheren Blut auf. Im Altersverlauf zeigten *c-mpl*^{-/-}-Mäuse jedoch eine Abnahme des klonogenen Potentials hämatopoetischer Vorläufer und eine, verglichen mit Wildtypmäusen, frühere immunologische Seneszenz mit verminderten T-Zellzahlen, die auf eine Erschöpfung des hämatopoetischen Systems hinweist. Untersuchungen der mRNA Expression früher Stammzellen aus *c-mpl*^{-/-}-Mäusen zeigten eine veränderte Expression bei Genen, die für die Selbsterneuerung und das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen wichtig sind und geben damit Hinweise auf mögliche Mechanismen des Effekts von TPO auf frühe Stammzellen.

STICHWORTE: Thrombopoetin / *c-mpl* Knockout / Hämatopoese

Abstract

Serial Analysis of Hematopoiesis in *c-mpl*^{-/-} Mice

Thrombopoietin (TPO) is the pivotal regulator of megakaryocytopoiesis but is also an important factor for early multipotent hematopoietic progenitors. Loss-of-function mutations in the gene MPL coding for the TPO receptor are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) in men, a rare disease presenting as isolated thrombocytopenia at birth and progressing to aplastic pancytopenia during the first years of life. We used the model of the *c-mpl*^{-/-} mouse to study the effects of TPO receptor loss *in vivo*. Our aim was to identify parallels and differences in the course of the disease between *c-mpl*^{-/-} mice and CAMT patients. To achieve this goal we serially analyzed hematopoietic cells from early progenitors to mature peripheral blood cells over a period of 24 months using flow cytometric analyses of different hematopoietic compartments as well as functional assays of sorted progenitor populations. Multipotent hematopoietic stem cells as well as early myeloid and lymphoid progenitors were strongly reduced in different hematopoietic tissues. Furthermore, we found a reduced clonogenic potential of early myeloid progenitors *in vitro*. Even early T-cell progenitors in the thymus showed a marked reduction. These results provided first evidence for an influence of TPO on lymphopoiesis. The decreased numbers of early hematopoietic progenitors are compensated during additional mitoses during the subsequent expansion and differentiation: young *c-mpl*^{-/-}-mice demonstrated normal blood cell counts, except for a profound thrombocytopenia. However, with increasing age *c-mpl*^{-/-} mice developed signs of a starting exhaustion of the hematopoietic system: we found an age-dependent decrease of the clonogenic potential of hematopoietic progenitors and a premature immunologic senescence with decreased T-cell numbers. mRNA expression analysis of early progenitors of *c-mpl*^{-/-} mice revealed an altered expression of genes necessary for self-renewal and survival of hematopoietic stem cells and can help to clarify the mechanisms of the various effects of TPO on early hematopoiesis.

KEYWORDS:

Thrombopoietin / *c-mpl* knockout/ Hematopoiesis

Inhaltsverzeichnis

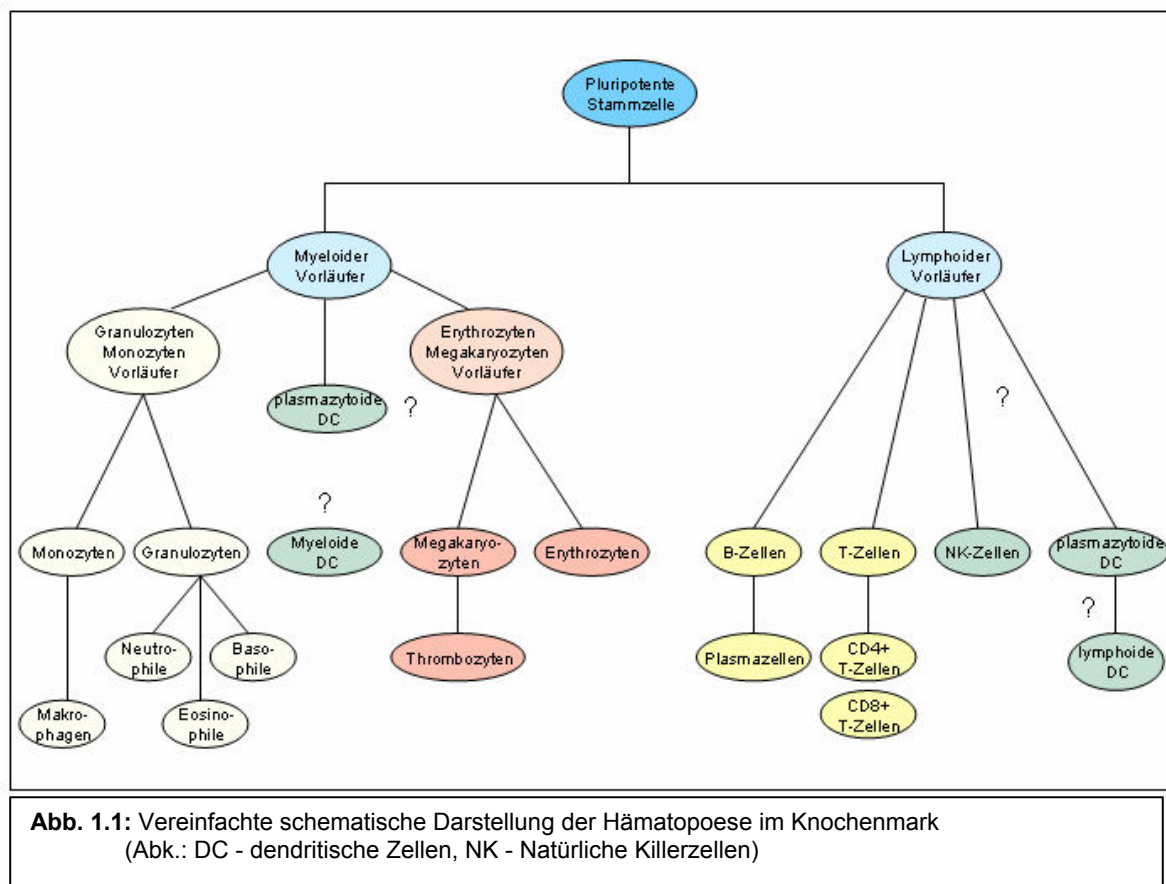
1. EINLEITUNG	7
1.1 HÄMATOPOESE	7
1.2 CHARAKTERISIERUNG VON HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN - HSC.....	10
1.3 DER THROMBOPOETIN REZEPTOR.....	14
1.4 DIE BEDEUTUNG VON TPO FÜR DIE MEGAKARYOZITOPOESE UND FRÜHE HÄMATOPOESE.....	16
1.5 DIE BEDEUTUNG VON C-MPL UND TPO IN DER EMBRYONALENTWICKLUNG UND IN NICHT-HÄMATOPOETISCHEN ORGANEN.....	18
1.6 DIE KONGENITALE AMEGAKARYOZYTÄRE THROMBOZYTOPENIE - CAMT	19
1.7 DAS <i>c-mpl</i> ^{-/-} -MAUSMODELL.....	21
1.8 ZIELE DIESER ARBEIT	23
2. MATERIAL	26
2.1 CHEMIKALIEN	26
2.2 HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN	26
2.3 GERÄTE.....	27
2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN	27
2.5 ZELLKULTURMEDIENTEN	28
2.6 ZYTOKINE.....	28
2.7 ANTIKÖRPER UND SEKUNDÄRE FARBSTOFFE	28
2.8 DNA-SEQUENZEN	30
2.9 VERSUCHSTIERE.....	30
3. METHODEN	31
3.1 HALTUNG DER VERSUCHSTIERE	31
3.2 GENOTYPISIERUNG.....	31
3.3 PRÄPARATION VON ZELLEN UND GEWEBEN	32
3.3.1 <i>Isolierung von Knochenmarkzellen der Maus</i>	32
3.3.2 <i>Isolierung von Milz- und Thymuszellen der Maus</i>	33
3.4 IN VITRO KULTIVIERUNG HÄMATOPOETISCHER VORLÄUFERZELLEN	33
3.5 FÄRBUNG VON KOLLAGEN-ASSAYS	35
3.6 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG	36
3.6.1 <i>FACS-Analyse von Knochenmark, Thymus und Milz</i>	37
3.6.2 <i>FACS-Analyse von Subpopulationen im peripheren Blut</i>	40
3.6.3 <i>Zellsortierung früher myeloider Vorläuferzellen am FACSAria™</i>	40
3.6.4 <i>Sortierung des LS Vorläufers für eine mRNA-Array-Analyse</i>	41
3.7 STATISTISCHE METHODEN	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1 UNTERSUCHUNG FRÜHER HÄMATOPOETISCHER VORLÄUFER IM KNOCHENMARK.....	43
4.2 LANGZEITBEOBACHTUNG MYELOIDER VORLÄUFER IM KNOCHENMARK UND REIFER SUBPOPULATIONEN DER MYELOIDEN REIHE IN DER MILZ UND PERIPHEREM BLUT.....	44
4.2.1 <i>Sortierung und Kultivierung früher myeloider Vorläufer aus Knochenmark</i>	45
4.2.2 <i>Untersuchung myeloider Vorläufer aus Knochenmark in Kolonie-Assays</i>	48
4.2.3 <i>Untersuchung von reifen myeloiden Zellen im Knochenmark</i>	50
4.2.4 <i>Untersuchung von reifen myeloiden Zellen in der Milz</i>	51
4.2.5 <i>Untersuchung von Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut</i>	52
4.3 LANGZEITBEOBACHTUNG VON SUBPOPULATIONEN LYMPHOIDER ZELLEN UND DEREN VORLÄUFER IN KNOCHENMARK, MILZ, THYMUS UND PERIPHEREM BLUT	53
4.3.1 <i>Untersuchung früher lymphoider Vorläufer im Knochenmark</i>	53
4.3.2 <i>Untersuchung von B-Zellen im Knochenmark</i>	56
4.3.3 <i>Untersuchung früher lymphoider Vorläufer im Thymus</i>	57
4.3.4 <i>Untersuchung von T- und B-Zellen im Thymus</i>	58
4.3.5 <i>Untersuchung reifer Zellen lymphoiden Ursprungs in der Milz</i>	60
4.3.6 <i>Untersuchung dendritischer Zellen im Thymus</i>	61
4.3.7 <i>Untersuchung reifer B- und T-Zellen im peripheren Blut</i>	62
4.4 SERIELLE BLUTBILDANALYSEN	64
4.5 UNTERSUCHUNG DER MRNA EXPRESSION VON LIN ⁻ SCA-1 ⁺ VORLÄUFERZELLEN IN <i>c-mpl</i> ^{-/-} - UND <i>c-mpl</i> ^{+/+} -MÄUSEN.....	65

5. DISKUSSION	71
5.1 SCHWERE EINSCHRÄNKUNGEN VON HÄMATOPOETISCHEN VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK VON <i>c-mpl^{-/-}</i> -MÄUSEN	72
5.2 QUANTITATIVE VERÄNDERUNGEN INNERHALB DER MYELOPOESE VON <i>c-mpl^{-/-}</i> -MÄUSEN	76
5.3 BEEINTRÄCHTIGUNG DER LYMPHOPOESE BEI <i>c-mpl^{-/-}</i> -MÄUSEN	81
5.4 VERÄNDERUNGEN DENDRITISCHER ZELLPOPULATIONEN IN <i>c-mpl^{-/-}</i> -MÄUSEN	83
5.5 ALTERSABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE IN <i>c-mpl^{+/+}</i> - UND <i>c-mpl^{-/-}</i> -MÄUSEN	85
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	91
7. LITERATUR	95
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	108
9. ANHANG	110
9.1 DANKSAGUNG	110
9.2 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	111
9.3 LEBENSLAUF	112

1. Einleitung

1.1 Hämatopoese

Alle zellulären Bestandteile des Blutes werden im Knochenmark gebildet und im Laufe eines Lebens kontinuierlich erneuert. Der Prozess der Entwicklung und Differenzierung von Blutzellen aus pluripotenten Stammzellen (*Hematopoietic Stem Cells* - HSCs) wird Hämatopoese genannt. Die Blutzellbildung ist dynamisch, da die Zellen eine ihren Funktionen entsprechend begrenzte Lebensdauer haben. Pluripotente hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark können sich lebenslang selbst erneuern und über unterschiedlich weit differenzierte Zwischenstufen alle Blutzellen in großer Zahl neu bilden. **Abbildung 1.1** zeigt stark vereinfacht die Entstehung von Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und Monozyten innerhalb der Myelo-pose im Knochenmark und die Bildung von B- und T-Zellen innerhalb der Lymphopose in Knochenmark und Thymus.



Das Zusammenspiel von intrinsischen und extrinsischen Faktoren, die diese Prozesse flexibel und präzise innerhalb der Hämatopoese steuern, ist von größtem Interesse und Gegenstand aktueller Forschung.

In der Maus konnte gezeigt werden, dass eine einzelne frühe Stammzelle das gesamte hämatopoetische System wiederherstellen kann (Osawa *et al.* 1996). Diese frühen pluripotenten Stammzellen kommen im Knochenmark der Maus je nach Spezies, Alter und verwendetem Assay-System mit einer Frequenz von 1/10 000 – 1/1 000 000 vor (Smith 2003). Unter normalen Bedingungen sind frühe Vorläufer ruhend und befinden sich überwiegend in der G₀ Phase (Wilson *et al.* 2004), während sich nur 5% dieser Zellen in der S oder G₂/M Phase des Zellzyklus befinden (Cheshier *et al.* 1999). Viele der reiferen Vorläufer proliferieren und differenzieren zu Blutzellen. Dieser Prozess wird durch kontrollierte Apoptose ausbalanciert (Domen 2000).

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind essentiell für die Bildung von Blutzellen und für die Erhaltung von Stammzellen im Knochenmark. Sie werden im Knochenmark hauptsächlich von nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Stroma- und Endothelzellen gebildet (Smith 2003). Das Zusammenspiel dieser extrinsisch wirkenden Zytokine steuert die linienspezifische Differenzierung (Metcalf 1998). Derzeit gibt es zwei Modelle zur Steuerung der Liniendifferenzierung durch Zytokine: Im stochastischen Modell erfolgt die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufern in Richtung einer bestimmten hämatopoetischen Linie zufällig. Das Zusammenspiel der auf diese Zellen wirkenden Zytokine entscheidet über ihre Ausdifferenzierung zu einer spezifischen Subpopulation oder führt zu ihrer Apoptose. Im instruktiven Modell werden die Zellen durch extrinsische Faktoren auf eine definierte Liniendifferenzierung festgelegt (Lemischka 1992). Es deutet einiges darauf hin, dass beide Mechanismen bei der Regulation eine Rolle spielen und die Hämatopoese kein rein dichotomes Modell darstellt. Wahrscheinlich existiert eine Vielzahl variierender Differenzierungsmöglichkeiten, die von intrinsischen und extrinsischen Faktoren beeinflusst werden.

Zu wichtigen Funktionen von Wachstumsfaktoren gehören die Induktion von Zellproliferation und Beteiligung an der Regulation der Differenzierung späterer Vorläufer. So unterstützt Erythropoetin (EPO) die Bildung von Erythrozyten (Lin *et al.* 1996), der Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) die Bildung von

Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (Burgess *et al.* 1980) und Thrombopoetin (TPO) die Reifung von Megakaryozyten (Kaushansky *et al.* 1994). Andere, früh agierende Zytokine wie Stammzellfaktor (SCF), Flt3-Ligand (*fms-related tyrosine kinase 3*), Interleukin 3 und 6 sowie TPO sind für das Überleben multipotenter Stammzellen notwendig (Kimura *et al.* 1998, McKenna *et al.* 2000). Flt3-Ligand und SCF schützen frühe Vorläufer vor Apoptose und sensibilisieren sie für die Wirkung von Zytokinen (Haylock *et al.* 1997, Lyman & Jacobsen 1998). Weitere wichtige Regulatoren der Hämatopoese in Mensch und Maus sind die von Knochenmarkzellen sezernierten Chemokine. Einige können die Proliferation von Vorläuferzellen inhibieren (Youn *et al.* 2000). Andere wie SDF-1, das in großen Mengen von Stromazellen und Osteoblasten gebildet wird, haben Einfluss auf die Migration von Stammzellen (Neiva 2005). Chemokine spielen auch bei der Lymphozytenentwicklung im Thymus eine große Rolle (Hedrick & Zlotnik 1999).

Mit Hilfe von Microarray-Analysen und *differential display*-PCR konnten Gene identifiziert werden, die bevorzugt in frühen Vorläufern exprimiert werden (Rosmarin *et al.* 2005). Innerhalb der Differenzierung von frühen Stammzellen werden diese Gene graduell abgeschaltet und linienspezifische Gene aktiviert (Ivanova *et al.* 2002). Dieses geordnete Muster der Genexpression wird allerdings häufig durchbrochen. Beispiele hierfür sind humane Lin⁻ CD34⁺ Zellen, die charakteristische Gene aller hämatopoetischen Entwicklungslinien koexprimieren (Hu *et al.* 1997), das myeloide Lysoszymgen, das auch in lymphoiden Zellen exprimiert wird (Ye & Iwasaki 2003) und Zytokinrezeptorgene, die nicht nur linienspezifisch exprimiert werden (Billia *et al.* 2001).

Mit der Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 beginnt die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen (Chen *et al.* 1995). Innerhalb der weiteren Entwicklung von myeloiden Vorläufern werden zusätzlich Transkriptionsfaktoren wie GATA-1, GATA-2, TAL1/SCL, NF-E2, FOG1 (*friend of gata-1*), AML1 (*acute myeloid leukemia1*) und Oberflächenrezeptoren wie G-CSFR, TPOR und EPOR exprimiert (Zhu & Emerson 2002). Bei der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufern zu lymphoiden Zellen werden zusätzlich zu PU.1 Faktoren wie Ikaros, Notch1, PAX5, und Oberflächenmarker wie IL-7R, Flt3R und CD44 exprimiert (Scott *et al.* 1994, Hirose *et al.* 2002).

Viele dieser genannten Faktoren regulieren die Hämatopoese in verschiedenen Entwicklungsphasen. Dabei werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Zellentwicklung unterschiedliche Gene aktiviert. Notch1 beispielsweise spielt zunächst in der Selbsterhaltung früher Stammzellen eine Rolle und legt zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung das Entwicklungsschicksal von myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen fest (Milner *et al.* 1999).

Die Steuerung der Selbsterhaltung von Stammzellen ist ein bedeutender, aber auch kritischer Vorgang, weil eine Dysregulation von Proliferationsprozessen zu maligner Entartung führen kann. Die Regulation erfolgt z. B. über WNT, Notch oder BMI1 vermittelte Signalwege, in deren Folge Transkriptionsaktivatoren oder -inhibitoren aktiviert werden. Die Regulation der Stammzellproliferation durch BMI1 führt zu einem komplexen Zusammenspiel von Zellzyklusproteinen wie Cyclin D, CDK4 (cyclinabhängige Kinase), p16, p19 (Cyclin-Kinase-Inhibitoren INK4A, ARF), RB und p53 (Pardal *et al.* 2003). Aber auch Faktoren wie HOXB4 (Homeobox B4), Ikaros und p21 können die Selbsterneuerungskapazität von frühen Stammzellen im Knochenmark von Mäusen erhalten (Zhu & Emerson 2002).

1.2 Charakterisierung von hämatopoetischen Stammzellen-HSC

Frühe hämatopoetische Stammzellen

Frühe Stammzellen sind undifferenziert, pluripotent, besitzen Selbsterneuerungspotential und befinden sich in einem stark verlangsamten Zellzyklus. Die Erhaltung dieses Selbsterneuerungspotentials und der Repopulationsfähigkeit wird durch eine spezifische Mikroumgebung im Knochenmark, die sogenannte „Stammzellnische“ (**Abb. 1.2**) aus Osteoblasten, Stromazellen und Blutgefäßen, reguliert. Innerhalb der Stammzellnische ist der Stammzell-Osteoblast Zellkontakt für die unlimitierte Proliferationsfähigkeit und die Inhibierung der Differenzierung von Stammzellen verantwortlich. In transgenen Mäusen, in denen sich keine Osteoblasten entwickeln, ist das Knochenmark aplastisch (Visnjic *et al.* 2004). Mäuse, die den sehr frühen für Osteoblasten spezifischen Transkriptionsfaktor RUNX2 (CBFA1) nicht exprimieren, haben eine defekte Hämatopoese (Deguchi *et al.* 1999).

Da frühe Stammzellen sehr selten, morphologisch nicht erkennbar und nur in aufwändigen *in vivo* und *in vitro* Assay-Systemen nachweisbar sind, konnten sie in der

Vergangenheit nur schwer identifiziert und charakterisiert werden. Mitte der 80er Jahre beschrieben Andrews *et al.* (1986) einen monoklonalen Antikörper (anti-CD34), mit dessen Hilfe primitive Kolonie-bildende Vorläuferzellen aus Knochenmark angereichert werden konnten. Heute ermöglichen Kenntnisse über Expressionsmuster von Oberflächenrezeptoren auf Vorläuferpopulationen detaillierte Untersuchungen zur Entstehung und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. Um die Funktion von Zellen zu charakterisieren, die eine Kombination bestimmter Oberflächenantigene aufweisen, müssen diese z.B. mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert und anschließend mit Hilfe verschiedener *in vivo* und *in vitro* Methoden untersucht werden. *In vivo* Assay-Systeme dienen dazu, das Anwachsen (*engraftment*) und die Rekonstitutionsfähigkeit transplanteder Zellpopulationen in Empfängertieren zu untersuchen.

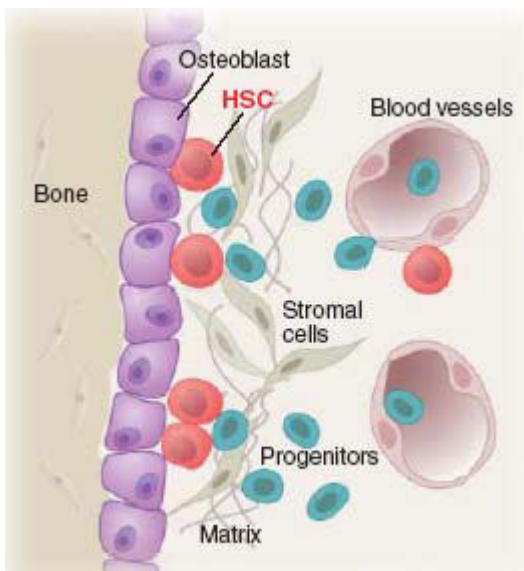


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der „Stammzellnische“ im Knochenmark mit den beteiligten hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zelltypen (aus: Moore & Lemischka 2006).

RJ. Berenson gelang 1988 zum ersten Mal eine autologe Stammzelltransplantation von CD34⁺ Knochenmarkzellen in sublethal bestrahlten Affen. Diese CD34⁺ Zellpopulation enthielt frühe Stammzellen, die in der Lage waren, hämatopoetische Subpopulationen über einen langen Zeitraum neu zu bilden (*long-term repopulation*). Durch Einsatz zusätzlicher Antikörper zur Charakterisierung dieser frühen Stammzellen wurde die Heterogenität der CD34⁺ Vorläuferpopulation deutlich. Selbst die Expression von CD34 erwies sich als kein zwingendes Merkmal hämatopoetischer Stammzellen: 1996 beschrieben Osawa *et al.* eine erfolgreiche Rekonstitution im Mausmodell durch eine CD34⁻ Zellpopulation.

Zwei Jahre später zeigten Zanjani *et al.* die Entstehung von CD34⁺ Zellen nach Transplantation von humanen CD34⁻ Knochenmarkzellen in fetalen Schafen.

Durch Transplantationsexperimente in NOD/SCID-Mäusen konnten Bhatia *et al.* (1998) den Stammzellcharakter von humanen Lin⁻ CD34⁻ CD38⁻ Zellen bestätigen. Im Gegensatz zu CD34⁺ Zellen bildeten CD34⁻ Zellen kaum Kolonien in Langzeitkulturen, was als Hinweis auf sehr frühe Reifungsstufen gewertet wurde. Zur *in vitro* Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen werden Methoden wie die Langzeitkultivierung in LTC-IC (*Long-term culture initiating cell*) Assays, CAFC Assays (*Cobblestone Area-Forming Cell Assay*) oder - für weiter differenzierte Zellen - klonogene Assays in halbfesten Medien (CFU- (*colony forming unit*)-Assay) eingesetzt. Diese Methoden dienen der funktionellen Charakterisierung von multipotenten Vorläufern und der Untersuchung ihrer Differenzierungs- und Proliferationskapazität (de Wynter & Ploemacher 2001).

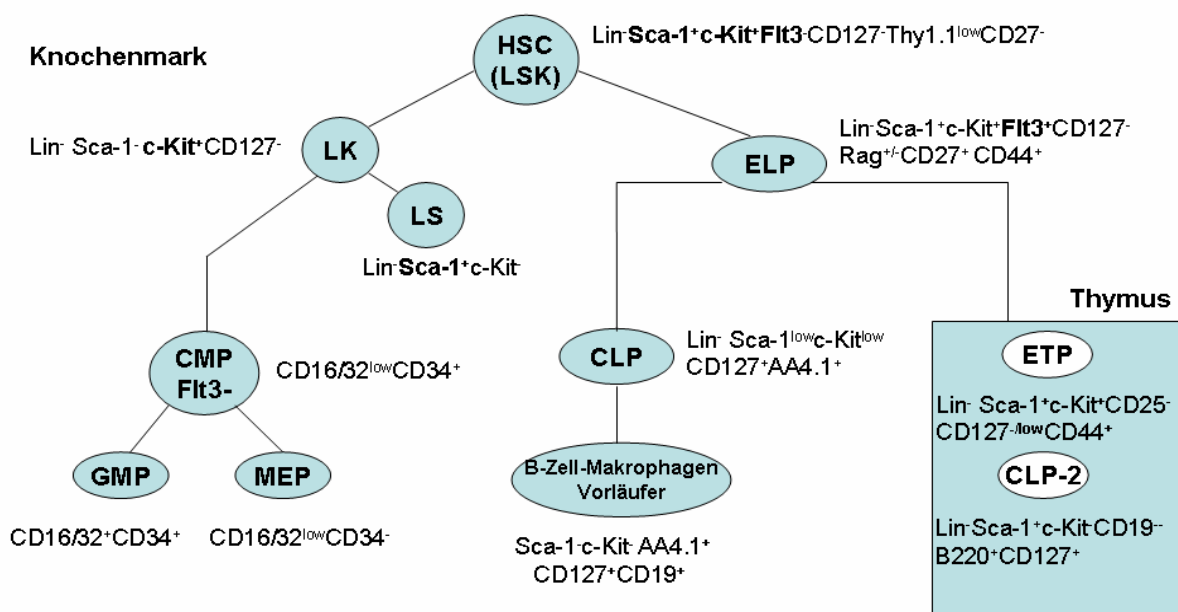


Abb. 1.3: Übersicht charakterisierter früher hämatopoetischer Stammzellen in Knochenmark und Thymus.

In der Maus werden alle HSCs in einer Zellpopulation gefunden, die keine linien-spezifischen Marker (Lin⁻) trägt, sondern den Tyrosinkinase-rezeptor c-Kit und das Stammzellantigen Ly-6A/E (Sca-1) hoch exprimiert (Ikuta & Weissman 1992,

Morrison & Weissman 1995) (**Abb. 1.3**). Diese Subpopulation Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ (LSK) enthält sehr frühe Stammzellen (CD34⁻ Flt3⁻) mit hohem Selbsterneuerungspotential (Christensen & Weissman 2001) und weiter differenzierte Stammzellen (CD34⁺ Flt3⁻) mit begrenztem Selbsterneuerungspotential (Yang *et al.* 2005). Beginnen CD34⁺ Stammzellen zu reifen Blutzellen zu differenzieren, ändern sie je nach Entwicklungsstufe ihr Oberflächenantigenmuster. Ausgehend vom frühen LSK Vorläufer können myeloide und lymphoide Vorläufer entstehen, die proliferieren und zu reifen Blutzellen differenzieren.

Lymphopoese

Innerhalb der lymphoiden Entwicklung zu lymphoiden Vorläufern verlieren die HSCs ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, beginnen CD27 und Flt3 (Flk-2, CD135) zu exprimieren und werden zu lymphoiden Vorläufern (Perry *et al.* 2003). Flt3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung von B-linienspezifischen (Adolfsson *et al.* 2003) und dendritischen Vorläufern (Dong *et al.* 2002). Die frühe lymphoide Vorläuferpopulation LSKflt3⁺ ist multipotent, hat ihr Selbsterneuerungspotential verloren und verfügt noch über schwaches myeloides Entwicklungspotential. Sie ist heterogen und enthält Zellen, die ihre rekombinationsaktivierenden Gene (RAG) noch nicht ablesen und Zellen, die die Expression von RAG-1 und RAG-2 gestartet haben. Der frühe lymphoide Vorläufer ELP (*early lymphoid progenitor*, LSK Flt3⁺ RAG-1^{+/-}) exprimiert zusätzlich CD44 und CD27 und kann B-, T- und NK-Zellen generieren (Igarashi *et al.* 2002, Pelayo *et al.* 2005).

Der weiter differenzierte lymphoide Vorläufer-CLP (*common lymphoid progenitor*) wurde von Kondo *et al.* (1997) identifiziert. Er leitet sich wahrscheinlich vom LSK Flt3⁺ RAG⁻ Vorläufer ab. CLP Vorläuferzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Lin⁻ c-Kit^{low} Sca-1^{low} CD127⁺ Thy1.1⁻ und können dendritische Zellen, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen generieren. Zellen aus der CLP Subpopulation können den Thymus nicht besiedeln und nur mit geringer Effizienz T-Zellen bilden (Allman *et al.* 2003). Darum wird heute vermutet, dass der CLP Vorläufer zwar das Differenzierungspotential für die gesamte lymphoide Reihe besitzt, aber hauptsächlich der Vorläufer von B-Zellen im Knochenmark ist (Bhandoola *et al.* 2003).

Die T-Zellen differenzieren sich aus dem frühen Thymusvorläufer ETP (*early thymic progenitor*, Allman *et al.* 2003). Im Unterschied zum CLP ist der ETP nicht in der

Lage, ausreichende Mengen von B-Zellen über einen längeren Zeitraum zu bilden. Er kann im Thymus radioaktiv bestrahlter Mäuse über einen langen Zeitraum CD4⁺ CD8⁺ doppelt positive T-Zellen generieren. Untersuchungen an Mäusen, denen der für die lymphoide Entwicklung wichtige Transkriptionsfaktor Ikaros fehlt, zeigten, dass sich der ETP Vorläufer auf einem vom CLP Vorläufer unabhängigen Weg entwickelt (Allman *et al.* 2003).

Myelopoese

Auch innerhalb der myeloiden Entwicklung wurden verschiedene Vorläufer identifiziert: Der gemeinsame myeloide Vorläufer CMP (*common myeloid progenitor*), der Vorläufer für die Granulozyten und Makrophagen GMP (*granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor*) und der Vorläufer für die erythrozytäre und megakaryozytäre Reihe MEP (*megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitor*) wurden von Akashi *et al.* (2000) identifiziert und funktionell charakterisiert. Der früheste myeloide Vorläufer CMP entsteht aus dem Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻ Vorläufer, generiert alle myeloiden Zelltypen und ist durch die Oberflächenantigene LK CD127⁻ CD16/32^{low} CD34⁺ gekennzeichnet. CMP Vorläufer haben kein Selbsterneuerungspotential mehr und verlieren in Primärkulturen schnell ihr oligopotentes Potential. Der bipotente GMP Vorläufer entwickelt sich aus dem CMP Vorläufer und exprimiert die Oberflächenmarker LK CD127⁻ CD16/32⁺ CD34⁺. In klonogenen Assays generiert er Monozyten- Granulozyten- und gemischte Granulozyten/Monozyten-Kolonien. Der MEP Vorläufer differenziert sich ebenfalls aus dem CMP Vorläufer und wird durch die Oberflächenmarker LK CD127⁻ CD16/32^{low} CD34⁻ charakterisiert. Die exakte Identifizierung und Isolierung dieser seltenen Populationen ermöglicht eine genaue Untersuchung der Regulation der Hämatopoese auf Gen- und Proteinebene.

1.3 Der Thrombopoetin Rezeptor

Seit den späten 50er Jahren wird vermutet, dass ein spezieller Wachstumsfaktor – schon damals als Thrombopoetin bezeichnet (Kelemen *et al.* 1958) – die Megakaryozytopoese steuert. Die gezielte Aufklärung der Thrombozytopoese begann als das virale Onkogen *v-mpl* des myeloproliferativen Leukämievirus (MPLV) identifiziert und kloniert wurde (Souyri *et al.* 1990). Das zelluläre Gegenstück, das Protoonkogen *c-mpl*, wurde 1992 von Vigon *et al.* auf dem humanen Chromosom 1 entdeckt.

Strukturähnlichkeiten wiesen das Protein als Mitglied der Familie der hämatopoetischen Wachstumsfaktorrezeptoren aus. Das *c-mpl* Gen besteht aus 12 Exons und kodiert ein aus 635 Aminosäuren bestehendes Transmembranprotein (Typ I), von dem 4 Splicevarianten beschrieben sind (Mignotte *et al.* 1994). Das entsprechende murine Gen wurde 1993 ebenfalls von Vigon *et al.* auf Chromosom 4 detektiert und ist ähnlich wie das humane Gen organisiert (Alexander & Dunn 1995).

Die funktionelle Aufklärung von c-Mpl erfolgte mit Hilfe von Rezeptorchimären bestehend aus c-Mpl/IL-4 und G-CSF/c-Mpl. Dabei wurde gezeigt, dass c-Mpl proliferative Signale in hämatopoetische Zellen transduziert (Skoda *et al.* 1993, Vigon *et al.* 1993). Der Zusammenhang zwischen c-Mpl vermittelter Signaltransduktion und Megakaryozytendifferenzierung konnte durch die Arbeitsgruppe um Methia *et al.* (1993) erbracht werden. Diese wies in CD34⁺ Zellen und Megakaryozyten *c-mpl* Expression nach und zeigte, dass die Inhibierung der *c-mpl* Expression in CD34⁺ Zellen zu einer selektiven Verminderung von CFU-Meg Kolonien führte, während andere myeloide Kolonien nicht betroffen waren.

Parallel zur Identifizierung des *c-mpl* Gens begann die intensive Suche nach dem c-Mpl Liganden. Innerhalb eines Jahres wurde TPO von mehreren Gruppen als c-Mpl Ligand identifiziert (Bartley *et al.* 1994, Lok *et al.* 1994, Kuter *et al.* 1994). Funktionelle Untersuchungen in Schweinen und Mäusen erbrachten den Beweis für die Rolle von TPO als linienspezifischen Hauptregulator der Megakaryozytopoese (de Sauvage *et al.* 1994, Kaushansky *et al.* 1994). Die Untersuchung einer *c-mpl*^{-/-}-Maus durch Gurney *et al.* (1994) konnte die essentielle Bedeutung von TPO für die Megakaryozytopoese bestätigen.

Der vom *c-mpl* Gen kodierte TPO Rezeptor besteht aus 2 extrazellulären „*cytokine receptor homolgy*“ Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazytoplasmatischen Domäne ohne intrinsische Tyrosinkinaseaktivität (Kaushansky 1995). Die Bindung von TPO an den Rezeptor führt zur Homodimerisierung und zur Rekrutierung von Signalmolekülen an spezifische intrazelluläre Proteinmotive (Box 1, Box 2), die verschiedene Signalkaskaden auslösen können (Gurney *et al.* 1995):

Die Dimerisierung von c-Mpl führt zur Aktivierung von JAK2 (das seinerseits zur Phosphorylierung von anderen Molekülen führt), von Tyrosinresten des c-Mpls selbst, von Molekülen aus proliferativ und anti-apoptotisch wirkenden Signalwegen

(STATs, PI3-Kinase und MAP-Kinasen) und von Molekülen, die für eine Inhibition des Signals wichtig sind wie z.B. SOCS, Phosphatasen SHP1 und SHIP1 (Kaushansky 2005).

Der TPO Rezeptor wird im Knochenmark nicht nur auf megakaryozytären Vorläufern, sondern auch auf frühen Stammzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung multipotenter Vorläufer (Kobayashi *et al.* 1996; Borge *et al.* 1997). Ninos *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Expression von *c-mpl* in humanen CD34⁺ CD38⁻ Stammzellen hoch ist und während der Differenzierung zu CD34^{low} CD38⁺ abnimmt. Die meisten Knochenmark-Stromazelllinien exprimieren ebenfalls *c-mpl* (Tsuji *et al.* 1996). Der TPO Rezeptor wurde auch auf erythrozytären Zellen gefunden, wo er nach Aktivierung zusammen mit anderen Zytokinen in myelosupprimierten Mäusen die Proliferation früher erythrozytärer Vorläufer anregt und die Erythrozytenbildung erhöht (Kaushansky *et al.* 1995).

1.4 Die Bedeutung von TPO für die Megakaryozytopoese und frühe Hämatopoese

Megakaryozytopoese

Der Prozess der Proliferation und Differenzierung von Megakaryozyten aus dem gemeinsamen Vorläufer der megakaryozytären und erythrozytären Reihe (MEP) wird Megakaryozytopoese genannt. Nach Abschluss der mitotischen Teilungsphase der megakaryozytären Vorläufer kommt es zur Vervielfachung der Chromosomenzahl (16-32N) durch Endomitose. Es folgt eine vermehrte Produktion von Zytoskelettproteinen, thrombozytenspezifischen Granula und Bestandteilen des Membransystems, die zu einer starken Zunahme des Zytoplasmas und somit zur Entstehung von Riesenzellen (160 µm) führt.

In der zweiten Phase wird das Zytoplasma in Prothrombozyten umgewandelt. Die Prothrombozytenausläufer (*Proplatelets*) schnüren mit Hilfe von Mikrotubuli die reifen Thrombozyten ab, welche im Blut für die primäre Hämostase verantwortlich sind (Italiano *et al.* 1999). Die freigesetzten Thrombozyten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von 10 Tagen und müssen kontinuierlich nachgebildet werden. Täglich werden im Menschen 10¹¹ Thrombozyten neu gebildet, eine Zahl, die im Krankheitsfall noch um das 10fache ansteigen kann (Kaushansky 1997).

Die Regulation der Megakaryozytopoese

TPO unterstützt das Überleben und die Expansion aller megakaryozytären Vorläuferzellen, fördert die Reifung von Megakaryozyten durch Erhöhung von Größe und Ploidie und wirkt zusammen mit anderen Plättchenaktivatoren auf die Thrombozytenaktivierung (Kaushansky 2005, de Sauvage *et al.* 1994, Teramura *et al.* 1992, Broudy *et al.* 1995). TPO wird hauptsächlich in Leber und Milz gebildet. Knochenmarkstromazellen exprimieren wenig TPO mRNA, können aber in hämatopoetischen Stresssituationen wie z.B. einer Thrombozytopenie die TPO Bildung deutlich erhöhen (Sungaran *et al.* 1997). *In vivo* erhöht die Gabe von TPO die Thrombozytenzahlen im Blut um das 10fache und stimuliert die Bildung von Megakaryozyten und ihren Vorläufern im Knochenmark (Kaushansky *et al.* 1994). Umgekehrt führt das Fehlen von Thrombopoetin in TPO^{-/-}-Mäusen zu stark reduzierten Zahlen von Megakaryozytenvorläufern und reifen Megakaryozyten im Knochenmark sowie von Thrombozyten im Blut. Die vorhandenen Megakaryozyten zeigen einen niedrigeren Ploidiegrad als die Kontrollzellen (de Sauvage *et al.* 1996). Die TPO Plasmakonzentration wird über einen negativen Feedbackmechanismus durch Bindung an c-Mpl auf Thrombozyten und Megakaryozyten reguliert und ist umgekehrt proportional zur Thrombozytenzahl im Blut (Kuter & Rosenberg 1994, Nagata *et al.* 1997).

Neben TPO wirken noch andere Wachstumsfaktoren (IL-1, SCF, IL-3, IL-6, IL-11) auf die Megakaryozytendifferenzierung ein (Gordon *et al.* 1992). Für die Bildung von Thrombozyten wichtige Migrationsprozesse von Megakaryozyten werden durch Chemokine (SDF-1, FGF-4) und spezifische Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, VLA-4) reguliert (Avecilla *et al.* 2004). SDF-1 kann alleine oder synergistisch mit TPO als Kolonie-stimulierender Faktor auf Megakaryozyten wirken (Hodohara *et al.* 2000). Außerdem können SDF-1 und FGF-4 die Thrombozytenzahlen in c-mpl^{-/-}-Mäusen normalisieren (Avecilla *et al.* 2004).

Einfluss von TPO auf die frühe Hämatopoese

In den letzten Jahren konnte die große Bedeutung von TPO für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese in Mensch und Maus durch eine Reihe von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen gezeigt werden. Schon bei ersten Untersuchungen von TPO^{-/-}- und c-Mpl^{-/-}-Mäusen fiel eine Einschränkung multipotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen auf (Carver-Moore *et al.* 1996, Gurney *et al.* 1994, Alexander *et al.* 1996).

Transplantationsexperimente zeigten eine deutliche Einschränkung der Langzeit-Rekonstitutionsfähigkeit von Knochenmarkzellen (Kimura *et al.* 1998) und von LS Zellen aus *c-mpl*^{-/-}-Mäusen (Solar *et al.* 1998). Transgene Mäuse, die Thrombopoetin überexprimieren, zeigten nicht nur 4fach erhöhte Thrombozytenzahlen sondern auch erhöhte Zahlen von zirkulierenden myeloiden und lymphoiden Zellpopulationen im Blut (Zhou *et al.* 1997). Die Behandlung von Mäusen mit TPO brachte zusätzliche Erkenntnisse über die Wirkung dieses Wachstumsfaktors auf hämatopoetische Stammzellen. Bestrahlte Mäuse, denen TPO verabreicht wurde, entwickelten keine Panzytopenie (Neelis *et al.* 1998). In normalen und myelosupprimierten Mäusen führte die Gabe von TPO zu einer signifikanten *in vitro* Expansion von erythrozytären, granulozytären und monozytären Vorläuferzellen (Kaushansky *et al.* 1996). Dabei scheint TPO wichtig für die Erhaltung früher Stammzellen, aber nicht für die Liniendetermination zu sein (Kaushansky 2005).

In Patienten mit kongenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie (CAMT), die keinen funktionsfähigen TPO Rezeptor exprimieren, kommt es zur Entwicklung einer schweren Thrombozytopenie, die mit stark reduzierten Megakaryozytenzahlen und mit der Ausbildung einer Panzytopenie einhergeht (Ballmaier *et al.* 2001, 2003; Germeshausen *et al.* 2006).

Die Bedeutung von TPO für den Selbsterhalt und die Proliferation von multipotenten Vorläuferzellen konnte auch in *in vitro* Untersuchungen belegt werden. TPO kann synergistisch mit anderen Zytokinen, die auf frühe Vorläufer wirken, das Überleben und die Proliferation multipotenter hämatopoetischer Zellen fördern (Ku *et al.* 1996, Sitnicka *et al.* 1996, Kobayashi *et al.* 1996). Zusammen mit Flt3 erhöht TPO z.B. die Zahl hämatopoetischer Stammzellen in LTC-IC Assays und unterdrückt die Differenzierung dieser Vorläuferzellen (Lewis & Verfaillie 2000). TPO kommt zusammen mit anderen frühen Wachstumsfaktoren in zahlreichen Protokollen zur *in vitro* Langzeitkultivierung von frühen Vorläufern zum Einsatz.

1.5 Die Bedeutung von c-Mpl und TPO in der Embryonalentwicklung und in nicht-hämatopoetischen Organen

Die Expression des TPO Rezeptors ist nicht auf Megakaryozyten und Thrombozyten beschränkt. c-Mpl und TPO scheinen sogar schon eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der hämatopoetischen Gewebe innerhalb der Embryonalentwicklung zu

spielen: *c-mpl* mRNA Expression ist schon während der Embryogenese im Hämangioblasten nachweisbar. TPO unterstützt *in vitro* die Bildung von Hämangioblasten-Kolonien (BL-CFC) und regt zusammen mit SCF und VEGF die Proliferation von Hämangioblastzellen und ihre Differenzierung zu CD34⁺ Zellen an (Perlingeiro *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005). Challier und Souyri (2002) fanden *c-mpl* Expression bereits ab Tag 6 der murinen Embryonalentwicklung in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) Region. Im humanen Fetus beginnt die TPO Rezeptor Expression innerhalb der 5.-6. Schwangerschaftswoche (Sola *et al.* 1999).

Auch in nicht-hämatopoetischen Zellen konnte die *c-mpl* Expression nachgewiesen werden, ihre Bedeutung ist jedoch derzeit noch unklar. *c-mpl* Expression wurde in murinen sinusoiden Leberendothelzellen (LEC-1) nachgewiesen (Cardier *et al.* 1999). In diesen Zellen induziert TPO die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α und aktiviert die Proliferation. Darüber hinaus führte die Bindung von TPO an seinen Rezeptor in der Leberzelllinie (HepG2) zur Aktivierung von MAP Kinasen wie JNK und ERK und zu einem Anstieg von NF-kappaB im Zellkern (Romanelli *et al.* 2006). Des Weiteren ist Thrombopoetin in der Lage HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) zu stimulieren und *in vivo* Neoangiogenese zu aktivieren (Brizzi *et al.* 1999).

Seit einiger Zeit wird eine Bedeutung von TPO für die Gehirnentwicklung und -regeneration vermutet. Tatsächlich konnte eine *TPO* und *c-mpl* Expression im humanen Gehirn in verschiedenen Regionen detektiert werden (Colombyova *et al.* 1995, Li *et al.* 1996, Nakanishi *et al.* 1999, Dame *et al.* 2003). Ein entscheidender Hinweis auf die Bedeutung von TPO bei der Hirnentwicklung kam von Ehrenreich *et al.* (2005), die eine proapoptotische Wirkung von TPO auf unreife Nervenzellen im Gehirn nachweisen konnten. TPO wirkt dabei als Gegenspieler von EPO, das neuroprotektive Wirkung bei cerebraler Ischämie zeigt (Brines *et al.* 2000, Siren *et al.* 2001).

1.6 Die kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie - CAMT

Ein Thrombozytenmangel im Blut (Thrombozytopenie) kann bei betroffenen Patienten zu spontanen, in schweren Fällen lebensgefährlichen Blutungen führen. Man unterscheidet angeborene und erworbene Thrombozytopenien. Erworbene

Thrombozytopenien treten häufig als Folge von Infektionen oder Autoimmunerkrankungen auf oder werden medikamentös induziert. Hereditäre Thrombozytopenien sind im Gegensatz dazu sehr selten und werden häufig schon im frühen Kindesalter diagnostiziert. Zu den angeborenen Thrombozytopenien zählen unter anderem das Thrombozytopenie-Radius-Aplasie Syndrom (TAR), die kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT), das Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) und die Fanconi-Anämie.

Die kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie wurde zunächst von O’Gorman Hughes (1974) als konstitutionelle aplastische Anämie vom Typ III beschrieben. Die CAMT ist ein rezessiv vererbtes „*bone marrow failure*“ - Syndrom, bei dem zum Zeitpunkt der Geburt zunächst eine isolierte Thrombozytopenie mit einem hypomegakaryozytärem Knochenmark vorliegt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur Entwicklung einer Panzytopenie, die derzeit nur durch eine Knochenmarktransplantation kurativ behandelt werden kann. Die Panzytopenieentwicklung deutet auf eine grundlegende Störung in der Hämatopoese hin, die nicht auf die Megakaryozytopoese beschränkt ist. Von Freedman und Estrov (1990) durchgeführte Untersuchungen erbrachten Hinweise darauf, dass es sich bei der Ursache der Erkrankung um einen intrinsischen Stammzelldefekt handeln muss. Erst einige Jahre später konnten von Ihara *et al.* (1999) Punktmutationen in Exon 4 und 10 des *c-mpl* Gens einer CAMT Patientin nachgewiesen werden, die zum frühzeitigen Abbruch der Translation und zu einem Fehlen des TPO Rezeptors führten.

In der Folge wurden von van den Oudenrijn *et al.* (2000) und von unserer Arbeitsgruppe (Ballmaier *et al.* 2001, 2003; Germeshausen *et al.* 2006) eine Vielzahl von Nonsense und Missense Mutationen in nahezu allen Exonen des *c-mpl* Gens nachgewiesen und damit die molekulare Ursache für die CAMT definiert (**Abb. 1.6**). Durch detaillierte klinische Untersuchungen an einer größeren Gruppe von CAMT Patienten konnte eine direkte Korrelation zwischen Mutationstyp und Krankheitsverlauf gezeigt werden (Ballmaier *et al.* 2001, 2003; King *et al.* 2005, Germeshausen *et al.* 2006). Diese Genotyp–Phänotyp Korrelation ermöglichte die Unterteilung der CAMT Patienten in 2 Gruppen mit unterschiedlichem klinischen Verlauf: Patienten der Gruppe CAMT I mit Mutationen, die zum Totalausfall des TPO Rezeptors führen, haben von Geburt an sehr niedrige Thrombozytenzahlen und entwickeln schon früh eine schwere Panzytopenie.

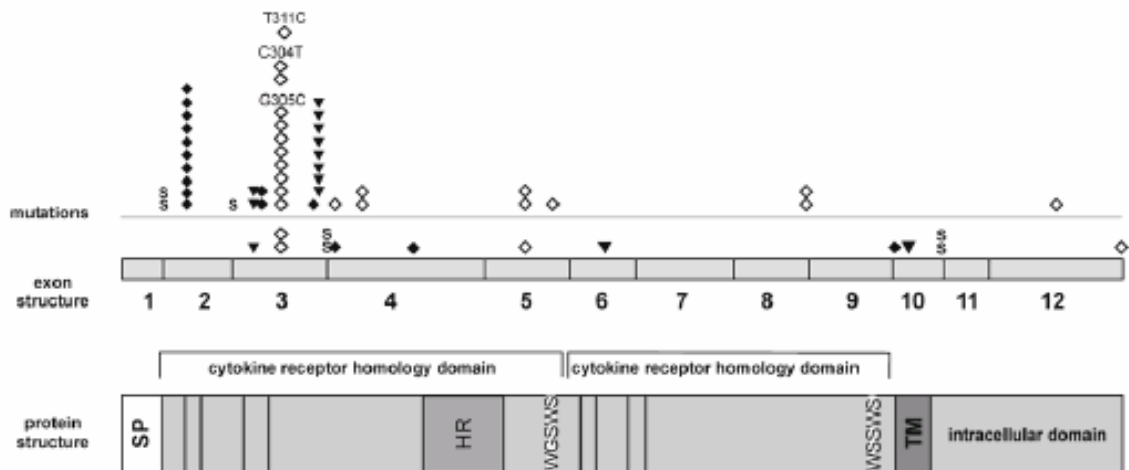


Abb. 1.6: MPL Mutationen in CAMT Patienten (Abb. aus: Germeshausen *et al.* 2006)

Die obere Reihe zeigt die in unserer Arbeitsgruppe, die untere Reihe die von anderen Arbeitsgruppen identifizierte Mutationen. Im mittleren Bildteil wird die Exonstruktur des MPL Gens und im unteren Bildteil die Proteinstruktur des c-Mpl Proteins dargestellt.

Patienten der Gruppe CAMT II zeigen im ersten Lebensjahr einen transienten Anstieg der Thrombozytenzahlen und frühestens im Alter von 3 Jahren zelluläre Einschränkungen im Knochenmark mit Entwicklung einer Panzytopenie (King *et al.* 2005). Bei diesen Patienten liegen Missense-Mutationen vor, die eine Restaktivität des TPO Rezeptors zulassen und zu einem moderateren Krankheitsverlauf führen (Germeshausen *et al.* 2006). Neben dem hämatologischen Phänotyp konnten vereinzelt auch Fehlbildungen anderer Organsysteme wie z.B. Hirn oder Herz beobachtet werden (King *et al.* 2005).

1.7 Das *c-mpl^{-/-}*-Mausmodell

1994 wurde erstmals eine *c-mpl^{-/-}*-Maus generiert und beschrieben. Die *c-mpl^{-/-}*-Maus ist bei unauffälligem nicht-hämatologischem Phänotyp charakterisiert durch erhöhte TPO Plasmakonzentrationen, um 85% reduzierte Megakaryozyten- und Thrombozytenzahlen und deutliche Einschränkungen bei nahezu allen myeloiden Vorläufern in hämatopoetischen Organen (Gurney *et al.* 1994, Carver-Moore *et al.* 1996). Dazu zählen megakaryozytäre Vorläufer, bipotente MEP Vorläufer, multipotente Vorläufer, erythrozytäre Vorläufer und GMP Vorläufer. Innerhalb der fetalen Hämatopoese ist die Zahl hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Leber allerdings normal (Alexander *et al.* 1996).

TPO ist der wichtigste Faktor für die Erhaltung der Megakaryozytopoese, indem er die Proliferation und Differenzierung früher megakaryozytärer Vorläufer steuert. Diese Ergebnisse weisen jedoch auch auf wichtige Regulatorfunktionen von TPO auf frühe hämatopoetische Vorläufer aller Linien im Knochenmark hin.

Es ist ungeklärt, wie die verbleibende Megakaryozytopoese bei den *c-mpl*^{-/-}-Mäusen ohne den Einfluss von TPO aufrechterhalten wird. In der Maus werden im Unterschied zum Menschen so viele Thrombozyten gebildet, dass die Tiere unter kontrollierten Haltungsbedingungen ein normales Alter erreichen können und keine Spontanblutungen auftreten. Mit Hilfe von Doppelknockout-Modellen konnte der Einfluss verschiedener anderer Zytokine für die residuelle Thrombozytenproduktion ausgeschlossen werden: IL-3⁻, IL-6⁻, IL-11⁻ und LIF- (*leukemia inhibitory factor*) haben keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenbildung in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen (Gainsford *et al.* 1997). Möglicherweise ist hier das Zusammenspiel verschiedener Zytokine für die verbleibende Megakaryozytopoese von Bedeutung. Wichtige TPO-unabhängige Faktoren für die Thrombozytenbildung in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen stellen die auf die Megakaryozytopoese wirkenden Chemokine FGF-4 (*fibroblast growth factor-4*) und SDF-1 (*stromal-derived factor-1*) dar. Diese Faktoren sind in der Lage, in der Regenerationsphase von myelosupprimierten *c-mpl*^{-/-}-Mäusen fast normale Thrombozytenzahlen im Blut, erhöhte myeloide Vorläuferzahlen in der Milz, aber keine Erhöhung von Vorläuferzellen im Knochenmark der KO-Mäuse zu gewährleisten (Levin *et al.* 2001, Avecilla *et al.* 2004).

Es mehren sich die Hinweise, dass TPO Einfluss auf die Bildung dendritischer Zellen haben könnte. Auf humanen dendritischen Zellen konnte der TPO Rezeptor detektiert werden (Kumamoto *et al.* 1999). Des Weiteren konnten Chen und Kollegen (2004) einen deutlichen Einfluss von TPO zusammen mit Flt3-Ligand auf die Differenzierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus frühen hämatopoetischen Vorläufern nachweisen. Es gibt bisher nur wenige Hinweise auf eine Wirkung von TPO auf Zellen lymphoiden Ursprungs: Ku und Kollegen konnten 1996 nachweisen, dass der lösliche TPO Rezeptor zusammen mit SCF die Bildung myeloider und B-lymphoider Kolonien anregt. Grassinger und Kollegen (2006) beobachteten in Expansionskulturen von Lin⁻ CD34⁺ CD38⁻ nach 7 Tagen Stimulation mit IL-3, TPO und HGF eine 55fach erhöhte CD19⁺ B-Zellzahl.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Basis dieser Arbeit bildeten die Ergebnisse aus den Untersuchungen der CAMT Patienten in unserer Arbeitsgruppe (Ballmaier *et al.* 2001, 2003; King *et al.* 2005, Germeshausen *et al.* 2006). Mit der *c-mpl*^{-/-}-Maus stand uns ein Tiermodell zur Verfügung, an dem die *in vivo* Bedeutung von Thrombopoetin für die gesamte Hämatopoese untersucht werden sollte. Hauptziel war, die durch den TPO Rezeptorverlust verursachten quantitativen und qualitativen Veränderungen hämatopoetischer Vorläuferzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erfassen, um die auftretenden Einschränkungen in der Myelo- und Lymphopoese bei CAMT Patienten und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen besser zu verstehen.

Dafür sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden: Welche Vorläufer und reife Subpopulationen sind in den KO-Mäusen eingeschränkt? Wie stark sind die Einschränkungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Hämatopoese? Gibt es einen Einfluss auf die Lymphopoese? Kommt es im Alter in den KO-Mäusen zu einer Stammzellerschöpfung ähnlich der bei CAMT Patienten? Entwickeln KO-Mäuse im Alter eine Panzytopenie? Welche Kompensationsmechanismen existieren zum Ausgleich des Stammzelldefektes? Findet eine transkriptionelle Regulation auf Stammzellebene statt?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten die verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellpopulationen in den hämatopoetischen Organen und die reifen Zellen im peripheren Blut bei *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen seriell untersucht werden. Die Charakterisierung dieser Zellpopulationen sollte durchflusszytometrisch über die Expression spezifischer Oberflächenmarker erfolgen. Verschiedene myeloide Vorläuferzellpopulationen sollten darüber hinaus in *in vitro* Assays funktionell untersucht werden. Da die Panzytopenieentwicklung ein dynamischer Prozess innerhalb der Hämatopoese ist, sollten im Abstand von 3 Monaten Zellen aus Knochenmark, Milz, Thymus und peripheren Blut der Maus über einen Altersverlauf von 2 Jahren charakterisiert werden. Die bislang veröffentlichten Untersuchungen an *c-mpl*^{-/-}-Mäusen wurden ausschließlich an 12 Wochen alten Tieren durchgeführt. Von großem Interesse sind die Mechanismen, die den Selbsterhalt, die Proliferation und die Differenzierung von multipotenten Stammzellen und die TPO-unabhängige Thrombozytenbildung regulieren.

Zellanalysen - Knochenmark

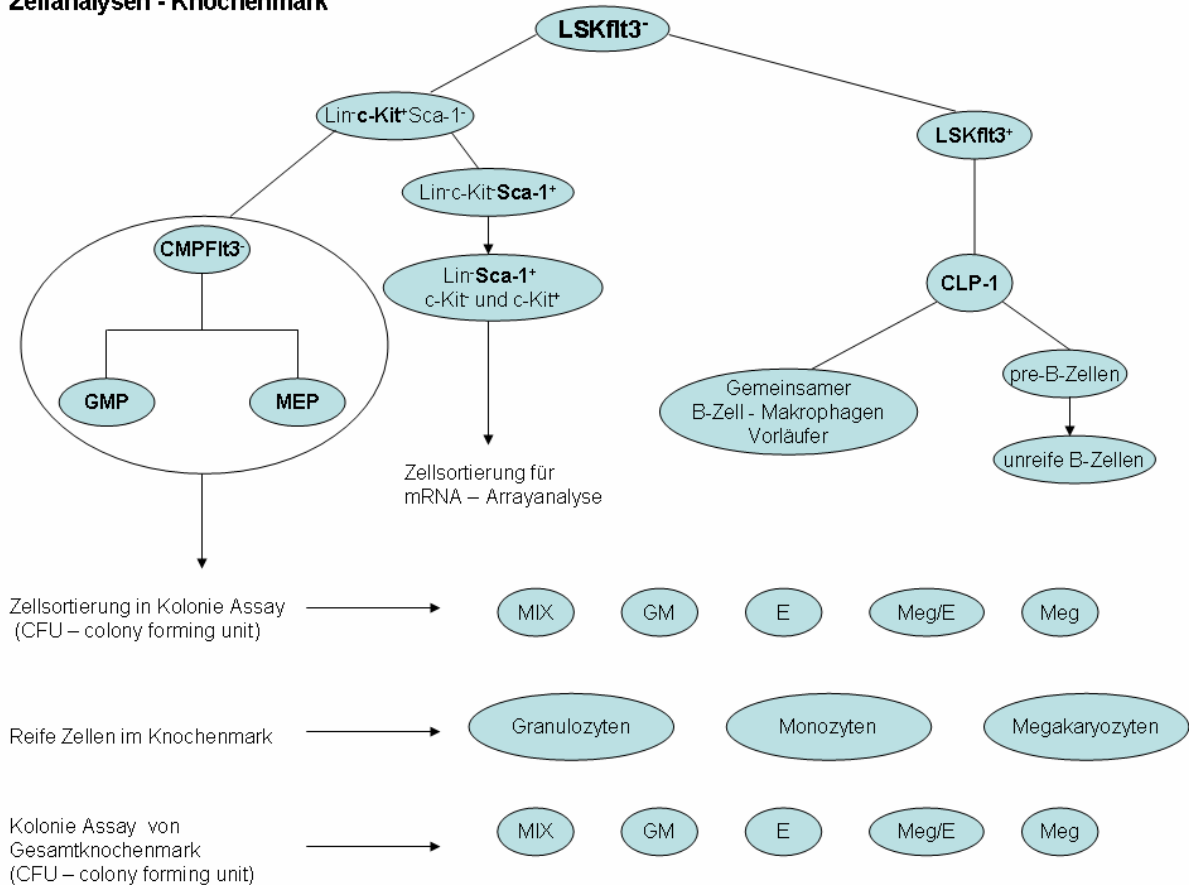
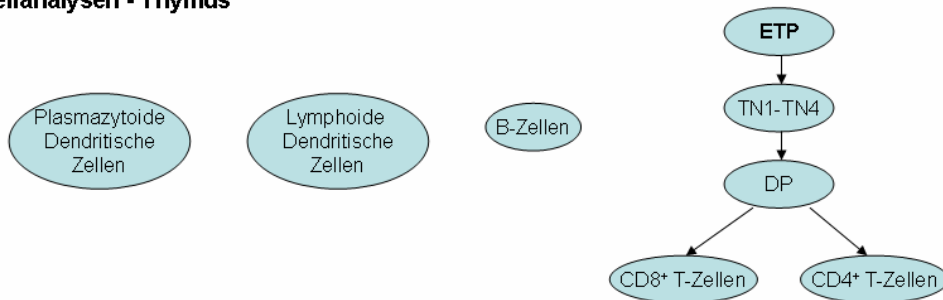


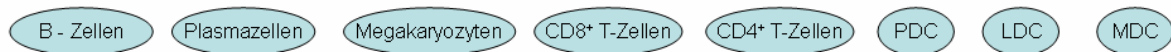
Abb. 1.8.1: Schematische Übersicht der durchgeführten Zellanalysen im Knochenmark von *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen. Abkürzungen: Die frühen Vorläufer im oberen Teil der Darstellung wurden alle in Kapitel 1.2. beschrieben. Mix = CFU-GEMM (*colony forming unit* – bestehend aus Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten), GM = CFU-GM (*colony forming unit* – bestehend aus Granulozyten, Monozyten und gemischten Granulozyten/Monozyten), E = CFU-E (*colony forming unit* – bestehend aus Erythrozyten), Meg/E = CFU-Meg/E (*colony forming unit* – bestehend aus Erythrozyten, Megakaryozyten und gemischten Erythrozyten/ Megakaryozyten), Meg = CFU-Meg (*colony forming unit* – bestehend Megakaryozyten)

Aus diesem Grund sollten vergleichende cDNA Microarray-Analysen einer frühen hämatopoetischen Stammzellpopulation bei *c-mpl*^{-/-}- und der *c-mpl*^{+/+}-Mäusen im Altersverlauf durchgeführt werden. Die **Abbildungen 1.8.1.** und **1.8.2.** geben einen Überblick über die erfolgten Untersuchungen in den *c-mpl*^{-/-}- und der *c-mpl*^{+/+}-Mäusen.

Zellanalysen - Thymus



Zellanalysen - Milz



Zellanalysen – Peripheres Blut



Abb. 1.8.2: Schematische Übersicht der durchgeführten Zellanalysen im Thymus, Milz und peripheren Blut von KO- und Wildtyp-Mäusen. Abk.: ETP – *early thymoid progenitor*, TN – Dreifach Negative (*triple negative*) T-Zellen, DP – Doppelt Positive T-Zellen, PDC – plasmazytoide dendritische Zellen, LDC – lymphoide dendritische Zellen, MDC – myeloide dendritische Zellen, G – Granulozyten, M – Monozyten, E – Erythrozyten

2. Material

2.1 Chemikalien

Acetylthiocholinjodid	Sigma
Cal-Lyse-Reagenz	Caltag
Dimethylsulfoxid	Merck
Diethylether	J.T.Baker
Ethanol 99,9%	MHH Klinikapotheke
Formamid	Merck
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Türksche Lösung	Fluka
Tween 20	Biorad
Penicillin (10.000 Einheiten/ml)	Invitrogen-Gibco
Streptomycin (10 mg/ml) (100 x Lsg.)	Sigma
Heparin (5000 U/ml)	Ratiopharm
Propidiumjodid	Sigma
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Merck
RNAzol	Biozol

Alle hier nicht aufgeführten Reagenzien wurden im jeweils höchsten Reinheitsgrad der Firmen Sigma und Merck verwendet.

2.2 Häufig verwendete Lösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄,

5,5 mM KH₂PO₄

FACS-Puffer pH 7,2:

0,1% Natriumazid in PBS

0,5% BSA

1 M Tris-HCl Stocklösung pH 7,2

2.3 Geräte

FACSCalibur™	Becton Dickinson
FACSAria™ Zellsortiersystem	Becton Dickinson
MoFlo™ Zellsortiersystem	DakoCytomation
Zellkultur Inkubator Forma Scientific	Labotect
Zentrifuge Varifuge K	Heraeus
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Inverses Mikroskop	Zeiss
Sterile Werkbank -Hera Safe 373	Heraeus
autoMACS™–Zellseparator	Miltenyi Biotec
Metall–Zellsieb	Carl Roth GmbH
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht KG
Vet abc Animal Blood Counter	Scil

2.4 Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturschalen (Ø 2,5 cm) (mit 2 mm Gitter)	Nunc
Gewebekulturschalen (Ø 2,5 cm) (ohne Gitter)	Greiner
Gewebekulturschalen (Ø 10 cm)	Greiner
Zellkulturflaschen	Nunc
Pipettenspitzen	Sarstedt
Kryoröhrchen	Greiner
Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt
15 ml Röhrchen	Greiner
50 ml Röhrchen	Greiner
Petrischalen	Sarstedt
Objektträger	Knittel-Gläser
Faltenfilter	Carl Roth GmbH
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Wägepapier	Carl Roth GmbH
Filterpapier	Schleicher & Schuell
20 µl Blutkappillaren mit EDTA	Sarstedt
2 ml Spritzen	Omnilab

2.5 Zellkulturmedien

Kolonie-Assay-Komplettmedium in 2 × IMDM (Endkonzentrationen):

7,5% Rinderserumalbumin – Stocklösung	0,0326 mg/ml
1 mg/ml Insulin–Stocklösung in IMDM	0,033 µg/ml
20 mg/ml Transferrin–Stocklösung in Ampuwa	0,66 µg/ml
Rinderkollagen	StemCell
IMDM (<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640-Medium	Sigma-Aldrich
MegaCult™-Medium	StemCell
Hanks-Puffer	Sigma
Fötale Kälberserum	Hyclone
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco-Invitrogen

2.6 Zytokine

Für die Kultivierung der Knochenmarkzellen in Kolonie-Assays wurden folgende Faktoren benutzt:

Rekombinantes murines SCF (50 ng/ml) (<i>stem cell factor</i>)	PeproTech
Rekombinantes murines Interleukin 3 (10 ng/ml)	PeproTech
rekombinantes humanes Interleukin 6 (10 ng/ml)	Boehringer
Rekombinantes humanes G-CSF (10 ng/ml) (<i>granulocyte colony stimulating factor</i>)	Amgen
Rekombinantes murines GM-CSF (10 ng/ml) (<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>)	PeproTech
Rekombinantes humanes Erythropoietin (3 U/ml)	Boehringer

2.7 Antikörper und sekundäre Farbstoffe

Name	Klonname	Isotyp	Reaktivität	Konjugation	Firma
CD3e	CTCD3	Ratte IgG2a	Maus	PE-Cy5	Caltag
CD3e	145-2C11	Hamster IgG1	Maus	FITC	Becton Dickinson
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a	Maus	PE-Cy5	Caltag
CD4	GK1.5	Ratte IgG2b	Maus	APC	BD Pharmingen
CD8a	5H10	Ratte IgG2b	Maus	PE-Cy5	Caltag
CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a	Maus	PE	Miltenyi Biotec

CD11b	M1/70	Ratte IgG2b	Maus	PE-Cy5	eBioscience
CD11b/Mac-1	M1/70	Ratte IgG2b	Maus	FITC	BD Pharmingen
CD11c	N418	Hamster IgG	Maus	FITC	eBioscience
CD11c	HL3	Hamster IgG1	Maus	APC	Becton Dickinson
CD16/32	2.4G2	Ratte IgG2b	Maus	PE	BD Pharmingen
CD16/32	CT-17.1/C	Maus Ig	Maus	unkonjugiert	Caltag
CD19	6D5	Ratte IgG2a	Maus	PE-Cy5	Caltag
CD19	1D3	Ratte IgG2a	Maus	PE-Cy7	Becton Dickinson
CD24	R7129.7	Ratte IgG	Maus	APC	Leinco
CD25	PC61.5	Ratte IgG1	Maus	PE	eBioscience
CD34	RAM34	Ratte IgG2a	Maus	FITC	BD Pharmingen
CD41	MWReg20	Ratte IgG1	Maus	FITC	BD Pharmingen
CD43	S7	Ratte IgG2a	Maus	FITC	BD Pharmingen
CD44	IM7	Ratte IgG2b	Maus	FITC	eBioscience
CD45R/B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a	Maus	Biotin	eBioscience
CD45R/B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a	Maus	PE-Cy5	Caltag
CD45R/B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a	Maus	Pacific Blue	Caltag
AA4.1	AA4.1	Ratte IgG2b	Maus	FITC	eBioscience
CD61	HMB3-1	Hamster IgG	Maus	PE	Caltag
CD90.1/Thy1.1	HIS51	Maus IgG2a	Maus/Ratte	FITC	eBioscience
CD117/c-kit	2B8	Ratte IgG2b	Maus	APC	BD Pharmingen
CD127	A7R34	Ratte IgG2a	Maus	PE-Cy5	eBioscience
CD127	A7R34	Ratte IgG2a	Maus	PE	eBioscience
CD135	A2F10.1	Ratte IgG2a	Maus	PE	Becton Dickinson
F4/80	BM8	Ratte IgG2a	Maus	APC	eBioscience
Gr-1/Ly-6G/C	RB6-8C5	Ratte IgG2b	Maus	PE-Cy5	Caltag
Gr-1/Ly-6G/C	RB6-8C5	Ratte IgG2b	Maus	PE	eBioscience
IgM	1B4B1	Ratte IgG1	Maus	Biotin	eBioscience
mPDCA-1	JF05-1C2.4.1.	Ratte IgG2b	Maus	Biotin	Miltenyi Biotec
Sca-1/Ly6A-E	D7	Ratte IgG2a	Maus	Biotin	eBioscience
Ter119	Ter119	Ratte IgG2b	Maus	PE-Cy5	eBioscience
IgM	R6-60.2	Ratte IgG2a	Maus	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson
Ly-6C	AL-21	Ratte IgM	Maus	FITC	Becton Dickinson
Streptavidin				PE	Caltag
Streptavidin				PE-Cy7	BD Pharmingen
Streptavidin				APC	Caltag

Ziege anti-Ratte IgG Microbeads

Miltenyi Biotec

2.8 DNA-Sequenzen

Primersequenzen für Genotypisierung von *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen:

5' TCC AAG GTA AAG CAC TGA AGT CCA 3'

5' GTC TCC ATG GAG GCT TAG GTG GGA 3'

5' GAA GAG CTT GGC GGC GAA TGG GCT 3'

2.9 Versuchstiere

Verwendete Mausstämme (*Mus musculus*):

c-mpl^{+/+} C57BL/6J

Charles River

c-mpl^{-/-} in C57BL/6J Hintergrund

WEHI

Der Knockout-Stamm wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Warren Alexander vom Institut of Medical Research des Walter and Eliza Hall Instituts–WEHI (Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt.

3. Methoden

3.1 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) in einem geschlossenen Barriersystem unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten. Alle Geräte und Materialien, die zur Versorgung der Tiere erforderlich waren, wurden autoklaviert in die Tierställe gegeben. Personal und Experimentatoren betraten das Barriersystem mit Schutzkleidung. Die Tiere wurden in Gruppenkäfigen gehalten. In regelmäßigen Abständen fanden mikrobiologische Untersuchungen der Tiere, Käfige und der technischen Einrichtungen statt. Alle „Tötungen von Versuchstieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ wurden von der Tierschutzkommission des Landes Niedersachsen genehmigt und den Vorschriften des Tierschutzgesetzes entsprechend durchgeführt.

3.2 Genotypisierung

Die Versuchstiere wurden mittels PCR-Analyse stichprobenartig auf die Deletion des *c-mpl* Gens untersucht. Dazu wurde DNA aus Schwanz- oder Ohrgewebe der Maus gewonnen. Die Untersuchung erfolgte gemäß einem Protokoll der Arbeitsgruppe W.-Alexander (WEHI, Melbourne, Australien).

PCR-Ansatz 50 µl:

1 µl Schwanz – DNA

2 µl Oligo lvg 17 (5 pmol/l) 5' TCC AAG GTA AAG CAC TGA AGT CCA 3'

2 µl Oligo lvg 15 (5 pmol/l) 5' GTC TCC ATG GAG GCT TAG GTG GGA 3'

1 µl Oligo lvg 19 (5 pmol/l) 5' GAA GAG CTT GGC GGC GAA TGG GCT 3'

1 µl dNTP's (10 mM)

5 µl 10 X PCR-Puffer (Roche)

0.5 µl Taq Polymerase (Roche)

37.5 µl H₂O

PCR-Zyklus (40 Zyklen):

95° C 10 min

94° C 30 sec

60° C 30 sec

72° C 1 min
72° C 5 min
4° C 5 min halten

5-10 µl der amplifizierten DNA wurde in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt. Das PCR Produkt aus dem Wildtyp-Allel war 230 bp, das aus dem KO-Allel war 670 bp lang.

3.3 Präparation von Zellen und Geweben

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach einer Ethernarkose wurde den Mäusen aus dem retrobulbären Venenplexus 500 µl Blut entnommen. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Mit einem sterilen Präparationsbesteck wurden Knochen und Organe entnommen. Getötete Tiere und Käfige wurden in das Tierhaus überführt und dort ordnungsgerecht entsorgt. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 25 Monaten im Abstand von 3 Monaten präpariert und untersucht.

3.3.1 Isolierung von Knochenmarkzellen der Maus

Femora, Tibiae und Humeri einer getöteten Maus wurden entnommen und in PBS/10% FKS auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden in einer Petrischale die Enden der Knochen mit einer Schere geöffnet und das Knochenmark mit PBS/10% FKS (20 ml Spritze und 0,4 mm Kanüle) ausgespült. Das Knochenmark wurde über ein Zellsieb gegeben und die Zellen vereinzelt. Die Suspension wurde mit einer Pipette in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 300 × g/5 min/ 4° C pelletiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Türkscher Lösung gemischt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Mit Hilfe der Formel, die die Verdünnung der Zellsuspension (Faktor 5) und den Kammerfaktor (Faktor 10⁴) berücksichtigt erhält man die Zellzahl pro ml Zellsuspension (z).

$$z = n \times 5 \times 10^4$$

Es wurden pro Maus 1-1,4 × 10⁸ Knochenmarkzellen isoliert. Da die durchflusszytometrischen Analysen und die Zellsortierung am darauf folgenden Tag stattfanden,

wurden die Zellen über Nacht in Hanks Puffer oder PBS/10% FKS bei 4° C aufbewahrt. Zellproben für die Langzeitlagerung wurden in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und in Flüssigstickstofftanks bei -188° C gelagert.

Einfriermedium:

40% RPMI 1640

10% DMSO

50% FKS

3.3.2 Isolierung von Milz- und Thymuszellen der Maus

Milz und Thymus wurden nacheinander auf Eis in 3 mm große Stücke zerkleinert und mit einem Spritzenkolben über einem Zellsieb zerrieben. Das Metallsieb wurde anschließend mit PBS/10% FKS gespült und die Zellen mittels Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 300×g/5 min/4° C abzentrifugiert. Die unerwünschten Erythrozyten im Milzpellet wurden mit 2 ml Erythrozytenlyse-Puffer für 2 min bei Raumtemperatur lysiert.

Erythrozytenlyse-Puffer pH 7,2:

0,1 mM Na₂EDTA

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃ in H₂O

Anschließend wurden die Zellen 2 × mit PBS/10% FKS gewaschen und bei 400 × g/5 min/4° C pelletiert. Für durchflusszytometrische Analysen am darauf folgenden Tag, wurden Thymus- und Milzzellen über Nacht bei 4° C in PBS/10% FKS gelagert.

3.4 In vitro Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen

Hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark können in Kollagenkulturen (Kollagen-Assay) Kolonien bilden. Diese Kolonien entstehen aus einer Vorläuferzelle und werden auch *colony forming units* (CFU's) genannt. Kolonie-Assays dienen der Bestimmung der Anzahl von Vorläuferzellen unter kontrollierten Wachstumsbedingungen. Das für Kolonie-Assays benutzte Rinderkollagen vernetzt bei 37° C und bildet eine gelartige Matrix, die die Zellen einer Kolonie im Verband zusammenhält und so eine Quantifizierung und Identifizierung möglich macht. Die Kultivierung und

Vermehrung von Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Wassermantelinkubator. Dazu wurden, über einen Zeitraum von 12 Tagen, aus frisch isoliertem Knochenmark 25000 Zellen/Schale im Kolonie-Assay kultiviert. Die Inkubation erfolgte pro Versuchstier mit 2 verschiedenen Zytokinkombinationen. Es wurde ein speziell für die Kultivierung von Megakaryozyten entwickeltes serumfreies Kulturmedium (Megakult™) der Firma StemCell eingesetzt. Am Tag 10 und 12 wurden die Kulturschalen des Doppelansatzes auf Objektträger überführt und gefärbt.

Die Kultivierung erfolgte mit folgenden Ansätzen:

Teilstimulation-Ansatz 1:

1,7 ml Megakult™-Medium
1,2 ml Rinderkollagen
50 ng/ml rekombinantes murines SCF
10 ng/ml rekombinantes murines Interleukin 3
10 ng/ml rekombinantes humanes Interleukin 6
3 U/ml rekombinantes humanes Erythropoetin
1 : 100 Penicillin/Streptomycin
25000 Knochenmarkzellen/Schale

Vollstimulation-Ansatz 2:

1,7 ml Megakult™ – Medium
1,2 ml Rinderkollagen
50 ng/ml rekombinantes murines SCF
10 ng/ml rekombinantes murines Interleukin 3
10 ng/ml rekombinantes humanes Interleukin 6
3 U/ml rekombinantes humanes Erythropoetin
10 ng/ml rekombinantes murines GM-CSF
10 ng/ml rekombinantes humanes G-CSF
1 : 100 Penicillin/Streptomycin
25000 Knochenmarkzellen/Schale

Beide Ansätze wurde mit IMDM auf ein Gesamtvolumen von 3,3 ml aufgefüllt und je 1,5 ml in 2 Gitternetzschalen (Durchmesser 2,5 cm) überführt. Die Kultivierung von

sortierten frühen Vorläufern (CMP, MEP, GMP) aus dem Knochenmark erfolgte in einem serumhaltigen Assay-System in Anlehnung an Akashi *et al.* (2000).

Kultivierungsansatz für sortierte myeloide Vorläufer aus Gesamtknochenmark:

956 µl Komplettmedium

900 µl Hyclone FKS

1,2 ml Rinderkollagen

50 ng/ml rekombinantes murines SCF

10 ng/ml rekombinantes murines Interleukin 3

10 ng/ml rekombinantes humanes Interleukin 6

3 U/ml rekombinantes humanes Erythropoetin

10 ng/ml rekombinantes murines GM-CSF

10 ng/ml rekombinantes humanes G-CSF

1 : 100 Penicillin/Streptomycin

150 sortierte CMP Vorläuferzellen pro ml aus Wildtyp- und Knockout-Maus (KO)

450 sortierte GMP Vorläuferzellen pro ml aus Wildtyp-Maus

650 sortierte GMP Vorläuferzellen pro ml aus KO-Maus

3000 sortierte MEP Vorläuferzellen pro ml aus Wildtyp- und KO-Maus

Die Kulturen wurden am Tag 10 und 12 auf Objektträger überführt und gefärbt.

3.5 Färbung von Kollagen-Assays

Zur Identifizierung der megakaryozytären Kolonien wurde eine Acetylthiocholinjodid-Färbung eingesetzt. Bei dieser Färbung wird ein künstliches Substrat durch die in Megakaryozyten und Thrombozyten von Nagern spezifisch vorhandene Acetylcholinesterase abgebaut. Bei dieser Reaktion wird Eisenzyanid III zu Eisenzyanid II reduziert und mit Kupferionen zu einem unlöslichen braunen Niederschlag komplexiert. Zur Identifizierung der verbleibenden Kolonietypen wurde eine May-Grünwald-Lösung in Verbindung mit Hämatoxin nach Harris eingesetzt.

Acetylthiocholinjodid – Färbung:

15 ml Natriumphosphat Puffer 0,1 M

10 mg Acetylthiocholinjodid

1 ml Natriumcitrat Lösung 0,1 M

2 ml Kupfersulfat Lösung 30 mM

2 ml Kalium–Eisenzyanid Lösung 5 mM

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt. Die Objektträger wurden liegend in einer feuchten Kammer gefärbt. Auf einen Assay wurde 800 µl Färbelösung aufgetragen. Nach 6h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung abgekippt und die Objektträger für 10 min in 95%igen Ethanol inkubiert. Mit Leitungswasser wurde das Ethanol abgewaschen und die Objektträger an der Luft getrocknet. Anschließend wurden alle Assays 40 sec mit Hämatoxilin nach Harris gefärbt, wiederholt mit Wasser gespült und luftgetrocknet.

Nicht-megakaryozytäre Kolonien wurden liegend 4 min mit May-Grünwald-Lösung gefärbt und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Zellkerne ebenfalls 40 Sekunden mit Hämatoxilin nach Harris angefärbt. Die Auszählung der Kolonien erfolgte am Mikroskop.

3.6 Durchflusszytometrische Untersuchung

Die durchflusszytometrische Zellanalyse (FACS-Analyse) dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe Fluorochrom-markierter Antikörper. Die verwendeten Geräte werden *fluorescence activated cell sorter* (FACS) genannt, auch wenn sie nicht über eine Sortierfunktion verfügen. Durch hydrodynamische Fokussierung gelangen die Zellen einzeln durch eine Düse (*Nozzle*) in einen gebündelten Laserstrahl. Trifft das Laserlicht auf die Zelle wird es gestreut und gelangt durch spezielle Filter auf Photodetektoren. Die Seitwärtsstreuung (Signal im Seitwärtsscat = SSC) enthält Informationen über die Granularität der Zelle. Während die Vorwärtsstreuung (Signal im Vorwärtsscat = FSC) Auskunft über die Größe der Zelle gibt. Definierte Zellpopulationen lassen sich über Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, identifizieren. Dabei werden die unterschiedlichen Emissionsspektren der Farbstoffe ausgenutzt.

An einigen Geräten können bis zu 6 verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden, solange sich die Emissionsspektren nicht zu stark überlagern. Entsteht trotz korrekter Emissionsfiltereinstellung eine Überlappung der Spektren, kann diese im Rahmen der elektronischen Kompensation weitgehend ausgeglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fluorochrome eingesetzt:

	Anregungswellenlänge	Detektionswellenlänge
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	488 nm	530/30 nm
PE (Phycoerythrin)	488 nm	585/40 nm
PE–Cy5	488 nm	695/40 nm
PE–Cy7	488 nm	780/60 nm
PI (Propidiumjodid)	488 nm	610/20 nm
APC (Allophycocyanin)	630 nm	660/20 nm
Pacific Blue	405 nm	450/40 nm
DAPI	405 nm	450/40 nm

3.6.1 FACS-Analyse von Knochenmark, Thymus und Milz

Die verschiedenen Zelltypen und ihre Reifestadien lassen sich anhand der von ihnen exprimierten Differenzierungsantigene unterscheiden. Die Antigene von Leukozyten wurden zu einem großen Teil systematisch als sogenannte *cluster of differentiation* (CD) erfasst. Mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen diese spezifischen Antigene auf der Zelloberfläche können unterschiedliche Zelltypen im FACS identifiziert, quantifiziert und sortiert werden. Zur Identifizierung früher Vorläuferzellen müssen reife Blutzellen aus der Analyse ausgeschlossen werden. Das geschieht durch den Einsatz von linienspezifischen Markern. In dieser Arbeit wurden mittels FACS-Analyse hauptsächlich bereits beschriebene hämatopoetische Subpopulationen in verschiedenen Kompartimenten identifiziert und quantifiziert.

Unspezifische Antikörperbindungen gegen Fc–Rezeptoren (*fragment crystalline*) wurden in allen Proben mit anti-Maus CD16/32 blockiert. Die Fc-Rezeptoren werden auf B-Zellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen exprimiert und binden den Fc-Teil des Antikörpers im Rahmen einer unspezifischen Immunantwort. Da diese Rezeptoren Immunglobuline aller Art mit hoher Affinität binden, können sie die Bindungsspezifität von Antikörpern in durchflusszytometrischen Analysen beeinflussen.

Pro Ansatz wurden $2\text{--}6 \times 10^6$ Zellen in einem Endvolumen von 100 μl PBS/10% FKS mit den entsprechenden direkt konjugierten Antikörpern 30 min/4° C im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 2 \times mit PBS/10% FKS gewaschen und bei $300 \times g/5 \text{ min}/4^\circ \text{ C}$ abzentrifugiert.

Alle Färbeansätze mit biotinylierten Antikörpern wurden danach für 20 min bei 4° C im Dunkeln mit dem entsprechenden mit Streptavidin (SA) konjugierten Farbstoff inkubiert. Dann wurden die Zellen nochmals gewaschen und in 100 µl PBS/10% FKS zur Analyse aufgenommen. Alle Proben wurden vor der Analyse durch Nylongaze mit der Maschenweite 40 µm gegeben, um Zellkonglomerate zu entfernen.

Für jedes Versuchstier wurde eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Bei der Etablierung neuer Färbungen wurden so genannte FMO (*fluorescence minus one*) Kontrollen durchgeführt. Des Weiteren wurden für frühe Vorläuferanalysen Kontrollen eingesetzt, die nur linienspezifische Marker enthielten. Die Geräteeinstellungen, sowie die Kompensationseinstellungen am FACSAria™ erfolgten mit Einzelfarbmessungen, die in regelmäßigen Abständen wiederholt wurden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software Summit (DakoCytomation) oder FlowJo (Verity).

Färbeprotokoll für die Analyse von Gesamtknochenmarkszellen:

Zelltyp	Phänotyp	linienspezifische Marker (in PE-Cy5)	zelltyp-spezifische Marker	Referenz
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD127 ⁻ Flt3 ⁻	CD3,CD4,CD8,CD19, Gr-1,CD11b, B220, CD127, Ter119	CD117-APC (c-Kit), Sca-1-biotin-SA- PE-Cy7,	Morrison <i>et al.</i> 1995 Ikuta & Weissman 1992
LSKflt3+	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD127 ⁻ CD44 ⁺ Flt3 ⁺	CD3,CD4,CD8,CD19, Gr-1,CD11b,B220, IgM,CD127, Ter119	CD117-APC, Sca- 1-biotin-SA-PE- Cy7, CD44-FITC, Flt3-PE	Adolfsson <i>et al.</i> 2001
LK	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ CD127 ⁻	wie LSK	wie LSK	Ikuta & Weissman 1992
LS	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁻ CD127 ⁻	wie LSK	wie LSK	Ikuta & Weissman 1992
CLP	Lin ⁻ Sca-1 ^{low} c-Kit ^{low} CD127 ⁺ Thy-1.1 ⁻	CD3,CD4,CD8,CD19, Gr-1,CD11b, B220, Ter119	CD117-APC, Sca- 1-biotin-SA-PE- Cy7, Thy1.1-FITC, CD127-PE	Kondo <i>et al.</i> 1997
BMP	B220 ⁻ CD19 ⁺ CD127 ⁺ AA4.1 ⁺	keine	CD24-APC, AA4.1- FITC, B220-PE- Cy5, CD127-PE, CD19- PE-Cy7	Montecino-Rodriguez <i>et al.</i> 2001
kleine prä B-Zellen	B220 ⁺ CD43 ⁻ CD19 ⁺ IgM ⁻	keine	B220-Pacific Blue (PB), CD43-FITC, CD19-PE-Cy7, IgM-biotin-SA-PE	Hardy <i>et al.</i> 1991 (Fraktion D)
unreife B-Zellen	B220 ⁺ CD43 ⁻ CD19 ⁺ IgM ⁺	Keine	wie prä B-Zellen	Hardy <i>et al.</i> 1991 (Fraktion E)
Megakaryo- zyten	Lin ⁻ CD41 ⁺ CD61 ⁺	CD3,CD4,CD8, CD19,Gr-1,CD11b,	CD41-FITC, CD61- PE	Knapp <i>et al.</i> 1989 Yasuda <i>et al.</i> 1995

		B220, IgM, Ter119, CD11c-APC, F4/80-APC		
Granulozyten	Lin ⁻ Gr-1 ^{high} CD11b ^{int}	CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, IgM, Ter119	Gr-1-PE, CD11b- FITC	Taylor <i>et al.</i> 2003
Monozyten	Lin ⁻ Gr-1 ^{low} CD11b ⁺	wie Granulozyten	Gr-1-PE, CD11b- FITC	Taylor <i>et al.</i> 2003

Färbeprotokoll für die Analyse von Gesamthymuszellen:

Zelltyp	Phänotyp	linienspezifische Marker (in PE-Cy5)	zelltyp-spezifische Marker	Referenz
ETP	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD127 ^{/low} CD25 ⁻ CD44 ^{high}	CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, CD127, Ter119	CD117-APC, Sca-1-biotin-SA- PE-Cy7, CD44-FITC, CD25- PE	Allman <i>et al.</i> 2003
TN1-TN4	Lin ⁻ CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD25 und CD44 variieren	CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, CD127, Ter119	CD44-FITC, CD25-PE	Pearse <i>et al.</i> 1989
T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁺	keine	CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE	Samelson <i>et al.</i> 1987 Dyanilas <i>et al.</i> 1983 Ledbetter <i>et al.</i> 1980
reife B-Zellen	Lin ⁻ B220 ⁺ CD19 ⁺ IgM ⁺ CD43 ⁻	CD4, CD8, Ter119	CD43-FITC, B220- PB, CD19-PE-Cy7, IgM-biotin-SA-PE	Akashi <i>et al.</i> March 2000
plasma-zytoide DC	Lin ⁻ PDCA ⁺ Ly-6C ⁺ CD11c ^{int}	CD3, CD19, CD11b, Ter119, IgM	CD11c-APC, Ly-6C-FITC, mPDCA-biotin-SA- PE	Fischer <i>et al.</i> 2004 Vremec <i>et al.</i> 2000
lymphoide DC	Lin ⁻ CD11b ⁻ B220 ⁻ CD11c ⁺ CD8 ⁺	CD3, CD19, Ter119, IgM	CD11c-APC, CD8- PE, B220-PB, CD11b-FITC	Pia Björck 2001

Färbeprotokoll für die Analyse von Gesamtmilzzellen:

Zelltyp	Phänotyp	linienspezifische Marker (in PE-Cy5)	zelltyp-spezifische Marker	Referenz
T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁺	keine	CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE	Samelson <i>et al.</i> 1987 Dyanilas <i>et al.</i> 1983 Ledbetter <i>et al.</i> 1980
B-Zellen	B220 ⁺ CD19 ⁺ IgM ⁺	keine	B220-PB, CD19- PE-Cy7, IgM-biotin- SA-PE	Coffman 1982 Engel <i>et al.</i> 1995 Kroese <i>et al.</i> 1987
Plasmazellen	CD19 ⁺ Syndecan1 ⁺	keine	CD19-PE-Cy7 Syndecan1-biot- APC	Sanderson <i>et al.</i> 1989

plasma-zytoide DC	Lin ⁻ PDCA ⁺ Ly-6C ⁺ CD11c ^{int}	CD3,CD19,IgM, CD11b,Ter119,	CD11c-APC, Ly-6C-FITC, mPDCA-biotin-SA-PE	Fischer <i>et al.</i> 2004 Vremec <i>et al.</i> 2000
lymphoide DC	Lin ⁻ CD11b ⁻ B220 ⁺ CD11c ⁺ CD8 ⁺	CD3,CD19,Ter119, IgM	CD11c-APC, CD8-PE, B220-PB, CD11b-FITC	Björck Pia 2001
myeloide DC	Lin ⁻ CD11b ⁺ B220 ⁻ CD11c ⁺ CD8 ⁻	CD3,CD19,Ter119, IgM	CD11c-APC, CD8-PE, B220-PB, CD11b-FITC	Björck Pia 2001
Megakaryozyten	Lin ⁻ CD41 ⁺ CD61 ⁺	CD3,CD4,CD8,CD19, Gr-1,IgM,CD11b, B220,Ter119, CD11c-APC, F4/80-APC	CD41-FITC, CD61-PE	Knapp <i>et al.</i> 1989 Yasuda <i>et al.</i> 1995

3.6.2 FACS-Analyse von Subpopulationen im peripheren Blut

Das retrobulbär entnommene, heparinisierte Blut der Mäuse wurde mittels Blutbildautomaten untersucht. Der Anteil von B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Monozyten im Blut wurde zusätzlich mittels FACS-Analyse und manueller Differentialblutbildzählung bestimmt. Die durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten-Subpopulationen erfolgte nach einer Färbung in Vollblut und anschließender Erythrozytenlyse mit einem speziellen Lysereagenz (Cal-Lyse, Caltag). Für diese Methode wurden 50 µl Vollblut mit 3 µl anti-Maus CD16/32 für 10 min inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung über die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurden die Proben mit je 1 µl anti-Maus CD3-FITC und anti-Maus B220-PE-Cy5 (B- und T-Zellfärbung), sowie 1 µl anti-Maus CD11b-FITC und anti-Maus Gr-1-PE (Granulozyten und Monozytenfärbung) versehen und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 100 µl Cal-Lyse Reagenz auf die Proben pipettiert, diese gemischt und für weitere 10 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 3 ml *Aqua dest* auf die Proben gegeben und bis zur Aufhellung der Zellsuspension (höchstens 3 min) gewartet. Um die lysierten Erythrozyten zu entfernen, wurden die Proben einmal mit PBS gewaschen und pelletiert. Zur Messung am FACSCalibur™ wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACS-Software Summit.

3.6.3 Zellsortierung früher myeloider Vorläuferzellen am FACS Aria™

Bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung wird die Zellsuspension im Zellsorter nach dem Passieren des Laserstrahls und der Analyse der Zellen durch eine dünne Düse gepresst und der Flüssigkeitsstrahl durch periodische Druckschwankungen in einzelne Tröpfchen zerlegt. Der Abrisspunkt des Tropfens kann präzise bestimmt werden. Die Tropfen, die eine für die Sortierung vorgesehene Zelle enthalten,

werden mit einer Ladung versehen und durch elektrostatische Abstoßung zwischen zwei elektrisch geladenen Platten aus dem Hauptstrahl abgelenkt und in das entsprechende Auffangröhrchen geleitet. Die Zellen wurden nach definiertem Färbeprotokoll (wie in 3.6.1 beschrieben) inkubiert und in 300-400 µl PBS/10% FKS aufgenommen. Alle Proben wurden vor der Sortierung durch 40 µm Nylongaze gegeben, um Zellkonglomerate zu entfernen. Für jede Messung wurden Kontrollen mitgeführt. Direkt vor der Zellsortierung wurde zu der Zellsuspension 3 µl DAPI-Lösung gegeben, um die toten Zellen anzufärben und sie von der Sortierung auszuschließen. Die Zellen wurden direkt in Kompletmedium mit Zytokinen für Kollagen-Assays sortiert. Nach Zugabe von 1,2 ml Rinderkollagen wurden die Proben im Doppelansatz zu je 1,5 ml ausplattiert und 10-12 Tage inkubiert.

Färbeprotokoll für die Sortierung myeloider Vorläufer aus Gesamtknochenmark:

Zelltyp	Phänotyp	linienspezifische Marker (in PE-Cy5)	zelltypspezifische Marker	Referenz
CMP	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ CD127 ⁻ CD34 ⁺ CD16/32 ^{low}	CD3,CD4,CD8, CD19,Gr-1,CD11b, B220,CD127,Ter119	CD117-APC, Sca-1– biotin-SA-PE-Cy7, CD34-FITC, CD16/32- PE	Akashi <i>et al.</i> 2000
GMP	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ CD127 ⁻ CD34 ⁺ CD16/32 ⁺	wie CMP	wie CMP	Akashi <i>et al.</i> 2000
MEP	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ c-Kit ⁺ CD127 ⁻ CD34 ^{low} CD16/32 ^{low}	wie CMP	wie CMP	Akashi <i>et al.</i> 2000

3.6.4 Sortierung des LS Vorläufers für eine mRNA-Array-Analyse

Für eine vergleichende Analyse des mRNA Expressionsspektrums von hämatopoetischen Vorläufern in einem cDNA-Microarray-Experiment wurden jeweils 1×10^5 LS (Lin⁻ Sca-1⁺) Vorläuferzellen sortiert. Dazu wurden Knochenmarkzellen aus 10 Mäusen isoliert und vereinigt. Die Erythrozyten wurden mit 2 ml Lysepuffer entfernt und die Probe 2 × mit PBS/10% FKS gewaschen. Um reife Blutzellen vor der Sortierung zu entfernen wurde eine Depletion von Zellen, die linienspezifische Antigene exprimieren (*lineage-depletion*), am autoMACS™ mit paramagnetischen *MicroBeads* (Ziege anti-Ratte IgG) vorgenommen. Zunächst wurden alle Zellen mit linienspezifischen Antikörpern nach folgendem Ansatz markiert.

- 4 × 10⁸ Zellen in 820 µl PBS/5% FKS
- + 40 µl (1:50) CD3-PE-Cy5
- + 20 µl (1:100) CD4-PE-Cy5
- + 20 µl (1:100) CD8-PE-Cy5
- + 20 µl (1:100) CD19-PE-Cy5
- + 40 µl (1:50) Gr-1-PE-Cy5
- + 40 µl (1:50) B220-PE-Cy5

Nach 30 min Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen 2 × mit 4 ml MACS-Puffer pH 7,2 (2 mM EDTA in PBS, 0,5% Rinderserumalbumin) gewaschen. Anschließend wurden pro 1 × 10⁷ Zellen 20 µl *MicroBeads* und 80 µl Macs-Puffer pipettiert und für 15 min bei 4° C inkubiert. Dabei binden die *Beads* an die Fc-Domäne der Antikörper auf den Zellen und lassen sich, durch Fixierung an eine magnetische Säule im autoMACS™ aus der Zellsuspension entfernen. Dadurch erfolgt eine Anreicherung von unreifen Zellen, die keine linienspezifischen (Lin⁻) Marker tragen. Die Zellen wurden über Nacht bei 4° C in Hanks-Puffer gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die Sortierung (siehe 3.6.1.) gefärbt.

Färbeprotokoll für Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläufer aus Knochenmark:

Zelltyp	Phänotyp	linienspezifische Marker (in PE-Cy5)	zelltyp-spezifische Marker	Referenz
LS	Lin ⁻ Sca-1 ⁺	CD3,CD4,CD8,CD19, Gr-1,CD11b, B220, CD127, Ter119	Sca-1-biotin-SA-PE-Cy7	Akashi <i>et al.</i> 2000

Die sortierten Zellen wurden in 200 µl RLT-Puffer aufgenommen und bei -25° C für die spätere Gewinnung von RNA aufbewahrt.

3.7 Statistische Methoden

Für Vergleiche der einzelnen Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Student's t-Test, für die Auswertung der Zeitverläufe eine ANOVA-Varianzanalyse und für Vergleiche zwischen einzelnen Zeitpunkten der Bonferroni-Test durchgeführt. Alle Berechnungen wurden mit der Software SPSS durchgeführt.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Hämatopoese von *c-mpl*^{+/+}- und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen im Alter von 3–25 Monaten in Knochenmark, Thymus, Milz und peripherem Blut untersucht. Dabei wurden im Altersabstand von 3 Monaten frühe und späte Vorläufer myeloiden und lymphoiden Ursprungs sowie linienspezifische Zellen in unterschiedlichen Reifestadien durchflusszytometrisch quantifiziert und - zum Teil nach durchflusszytometrischer Sortierung - funktionell untersucht.

4.1 Untersuchung früher hämatopoetischer Vorläufer im Knochenmark

Der multipotente frühe hämatopoetische Progenitor LSK ($\text{Lin}^- \text{CD127}^- \text{Thy1.1}^{\text{low}} \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$) und die weiter differenzierten Vorläufer LK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+$) und LS ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^-$) wurden in Anlehnung an Spangrude *et al.* (1988), Ikuta & Weissman

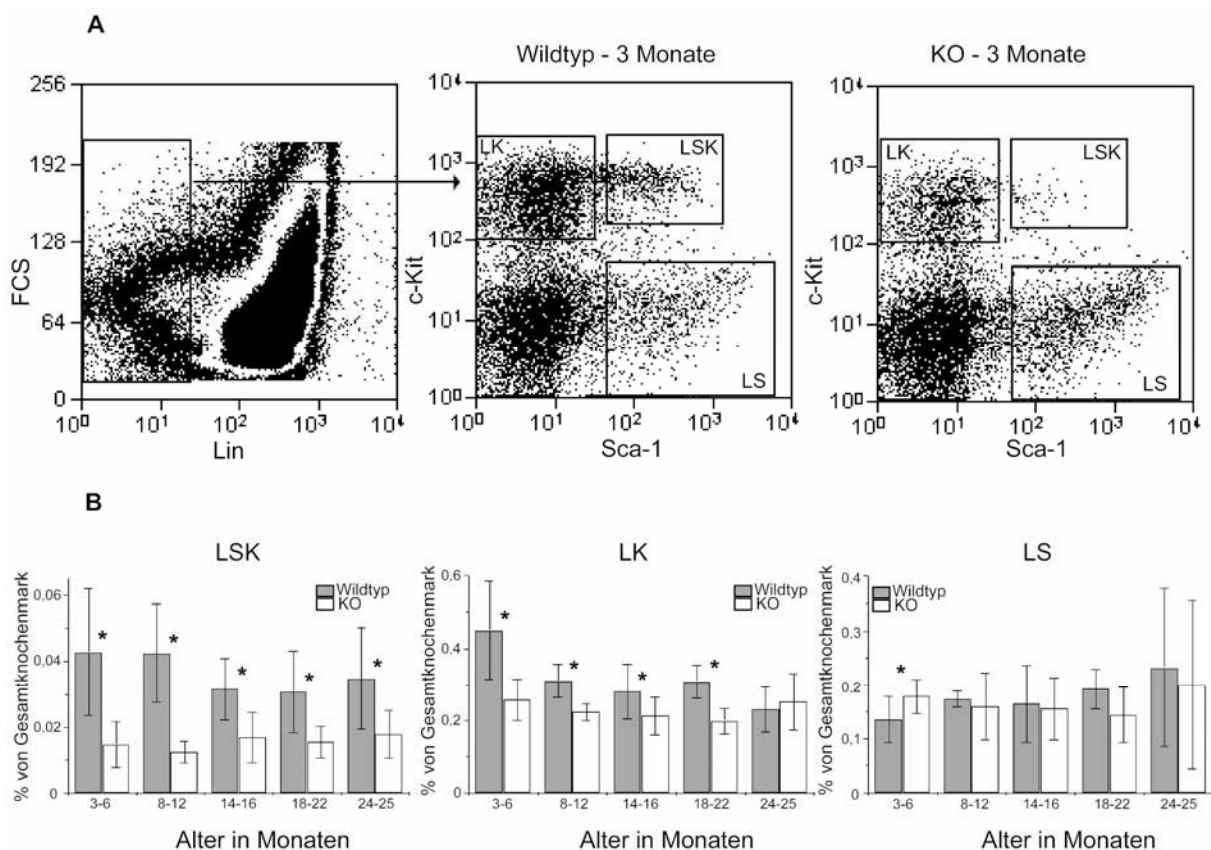


Abb. 4.1: Identifikation hämatopoetischer Vorläufer LSK, LK und LS im Gesamtknochenmark

A: Die $\text{Lin}^- \text{CD127}^-$ Zellpopulation wurde anhand der Expression von Sca-1 und c-Kit in 3 Vorläuferpopulationen unterteilt und quantifiziert. **B:** Langzeitanalyse von Knochenmarkszellen aus *c-mpl*^{+/+}- und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der Vorläuferpopulationen bezogen auf Gesamtknochenmarkszellen über einen Zeitraum von 25 Monaten. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 8-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

(1992) und Osawa *et al.* (1996*) durchflusszytometrisch untersucht. Schon bei jungen KO-Mäusen ist eine starke Reduktion der Anzahl an LSK Vorläufern im Knochenmark um 65% und an LK Vorläufern um 42% im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Diese Reduktion der frühen Vorläuferpopulationen gegenüber der Kontrollgruppe konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 25 Monaten beobachtet werden (**Abb. 4.1 B**). Die Anzahl an weiter differenzierten LS Vorläufern ist bei jungen KO-Mäusen leicht erhöht und zeigt keine signifikante altersabhängige Veränderung.

4.2 Langzeitbeobachtung myeloider Vorläufer im Knochenmark und reifer Subpopulationen der myeloiden Reihe in der Milz und peripherem Blut

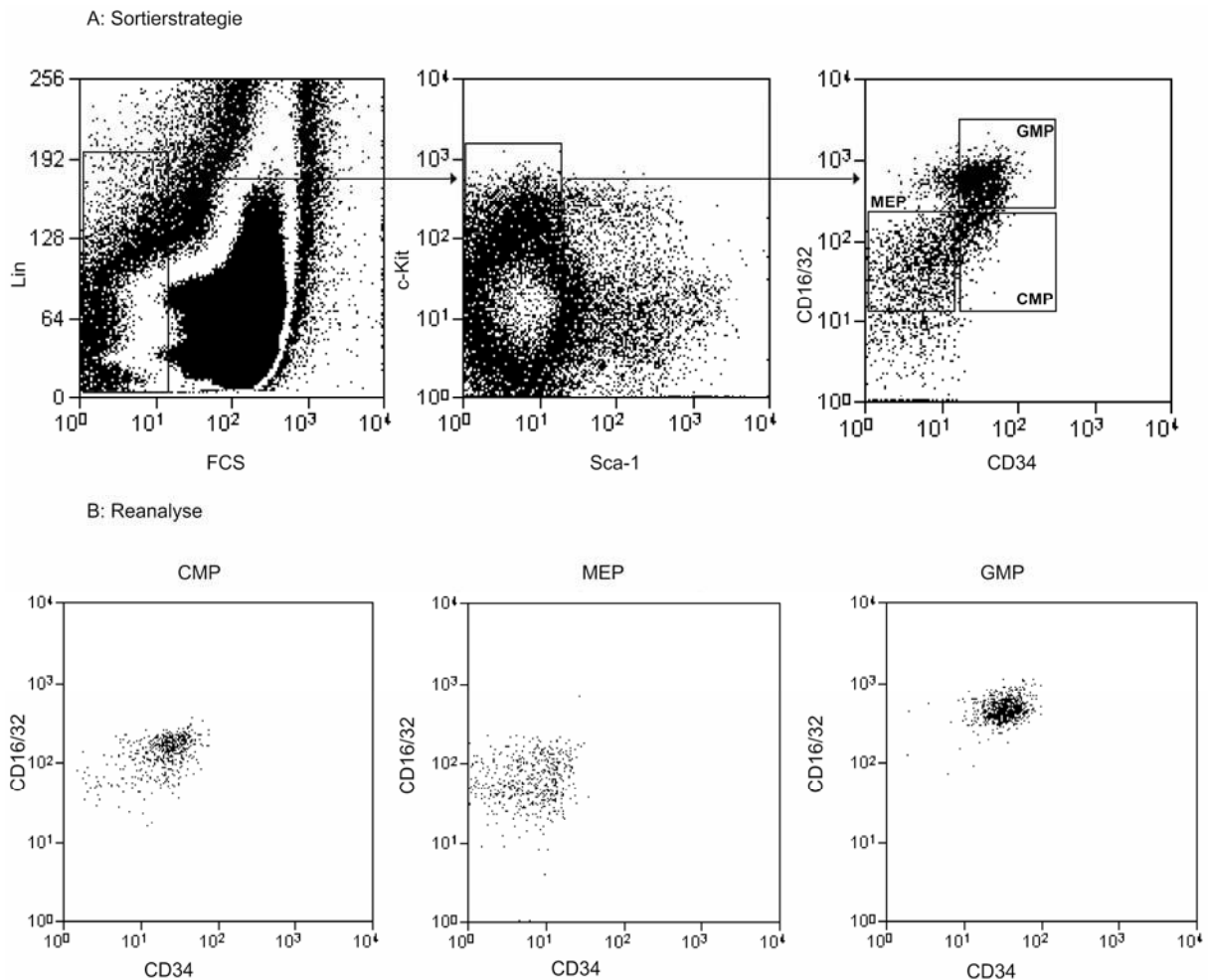


Abb. 4.2: Identifikation myeloider Vorläuferzellen im Mausknochenmark

A: Die Lin⁻ CD127⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ Population wurde durchflusszytometrisch in Abhängigkeit von der CD16/32 und CD34 Expression in 3 Subpopulationen unterteilt und sortiert. **B:** Reanalyse von sortierten CMP, GMP und MEP Vorläuferpopulationen.

4.2.1 Sortierung und Kultivierung früher myeloider Vorläufer aus Knochenmark

Die Analyse und Sortierung der frühen myeloiden Vorläufer CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor*) und MEP (*megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitor*) aus dem Knochenmark erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Akashi *et al.* (2000). Die FACS-Analyse diente der Quantifizierung dieser 3 Vorläuferpopulationen im Knochenmark in Abhängigkeit vom Alter. Zur Überprüfung des Differenzierungsspektrums und des klonogen Potentials der Zellen in diesen Populationen wurden die frühen myeloiden Vorläufer in Kolonie-Assays sortiert. Abbildung 4.2 zeigt die durchflusszytometrische Identifikation der 3 Vorläuferpopulationen und ihre Reanalyse nach der Zellsortierung.

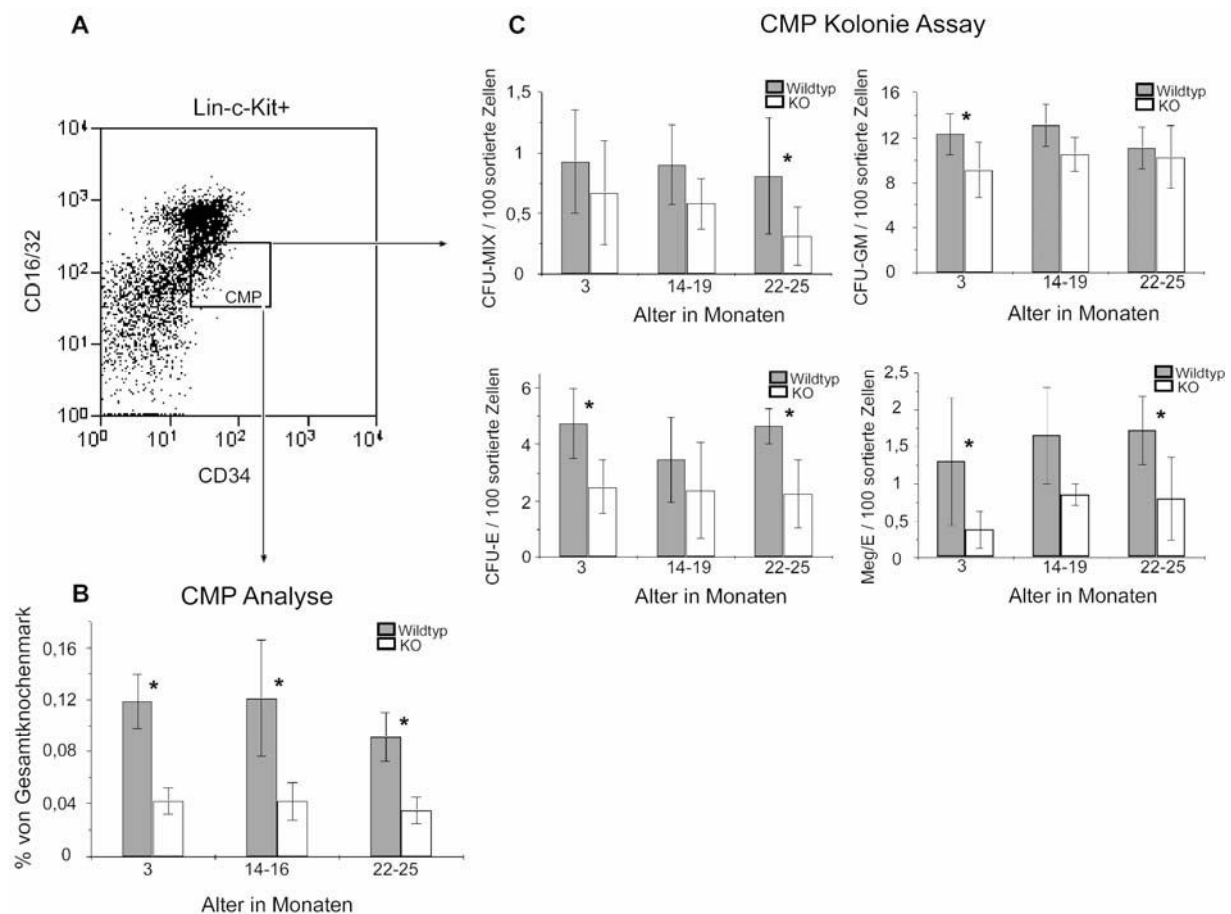


Abb. 4.2.1.1: Analyse von sortierten CMP Vorläuferzellen aus Mausknochenmark in Kolonie-Assays
A: Identifikation des CMP Vorläufers Lin⁻ CD127⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ CD16/32^{low} CD34⁺ im KM. **B:** Durchflusszytometrische Langzeitanalyse von Knochenmarkszellen aus *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der Vorläuferpopulationen bezogen auf Gesamtknochenmarkszellen über einen Zeitraum von 25 Monaten. **C:** Analyse von sortierten CMP Zellen in Kollagen-Assays (s. 3.4) mit Zytokin-Vollstimulation (SCF, IL-3, IL-6, EPO, GM-CSF, G-CSF). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 10-14 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, p<0,05).

CMP - die gemeinsame Vorläuferzelle der myeloiden Zellreihen

Die Anzahl an multipotenten Vorläufern CMP ($\text{Lin}^- \text{CD127}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD16/32}^{\text{low}} \text{CD34}^+$) war im Knochenmark von *c-mpl*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur *c-mpl*^{+/+}-Kontrollgruppe im Altersverlauf durchgehend um 60% reduziert (**Abb. 4.2.1.1 B**). Diese über die Expression von Oberflächenantigenen charakterisierten Vorläufer zeigten außerdem ein vermindertes klonogenes Potential in Kolonie-Assays (**Abb. 4.2.1.1 C**). Die Anzahl von CFU-Mix (definiert als Kolonien, die Zellen der roten und der weißen Reihe enthalten) war bei *c-mpl*^{-/-}-Mäusen deutlich reduziert (40% im Alter von 3 Monaten und 60% im Alter von 2 Jahren). Die Anzahl von CFU-GM (Granulozyten/Monozyten-Kolonien) war bei jungen *c-mpl*^{-/-}-Mäusen um 25% reduziert und veränderte sich im Altersverlauf nicht signifikant. Die Anzahl an CFU-E (Erythrozyten-Kolonien) war im Vergleich zur Kontrollgruppe um durchschnittlich 43% reduziert und zeigte bei beiden Gruppen keine Veränderung im Altersverlauf. Unerwartet nahm die Anzahl an CFU-Meg/E (Megakaryozyten/Erythrozyten-Kolonien) im Altersverlauf leicht zu, bei den KO-Mäusen war dieser Effekt sogar stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Die CFU-E- und CFU-Meg/E Kolonien aus den *c-mpl*^{-/-}-Mäusen enthielten weniger Zellen als die der Kontrollgruppe, was auf eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der Ursprungszellen verweist.

MEP - die gemeinsame Vorläuferzelle von Erythrozyten und Megakaryozyten

Die Anzahl an bipotenten MEP Vorläufern war bei den KO-Mäusen erwartungsgemäß durchgehend über den gesamten Untersuchungszeitraum stark vermindert (**Abb. 4.2.1.2 B**). Der prozentuale Anteil im Knochenmark bei jungen KO-Mäusen (3 Monate) betrug 45% und bei alten KO-Mäusen (24 Monate) nur noch 34% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es wurde eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme der Anzahl von MEP Vorläuferzellen im Altersverlauf von KO-Mäusen beobachtet. Dieses Resultat entspricht damit den Ergebnissen aus den Kolonie-Assay Untersuchungen von sortierten MEP Vorläufern: So konnte bei der KO-Maus eine Abnahme der Zahl aller Kolonietypen im Altersverlauf, eine deutliche Reduzierung der Koloniegröße und ein vollständiges Verschwinden von Megakaryozyten-Kolonien (>50 Zellen) ab einem Alter von 14 Monaten beobachtet werden. Diese Ergebnisse spiegeln die starke Einschränkung der gesamten Megakaryozytopoese bei den KO-Mäusen wider.

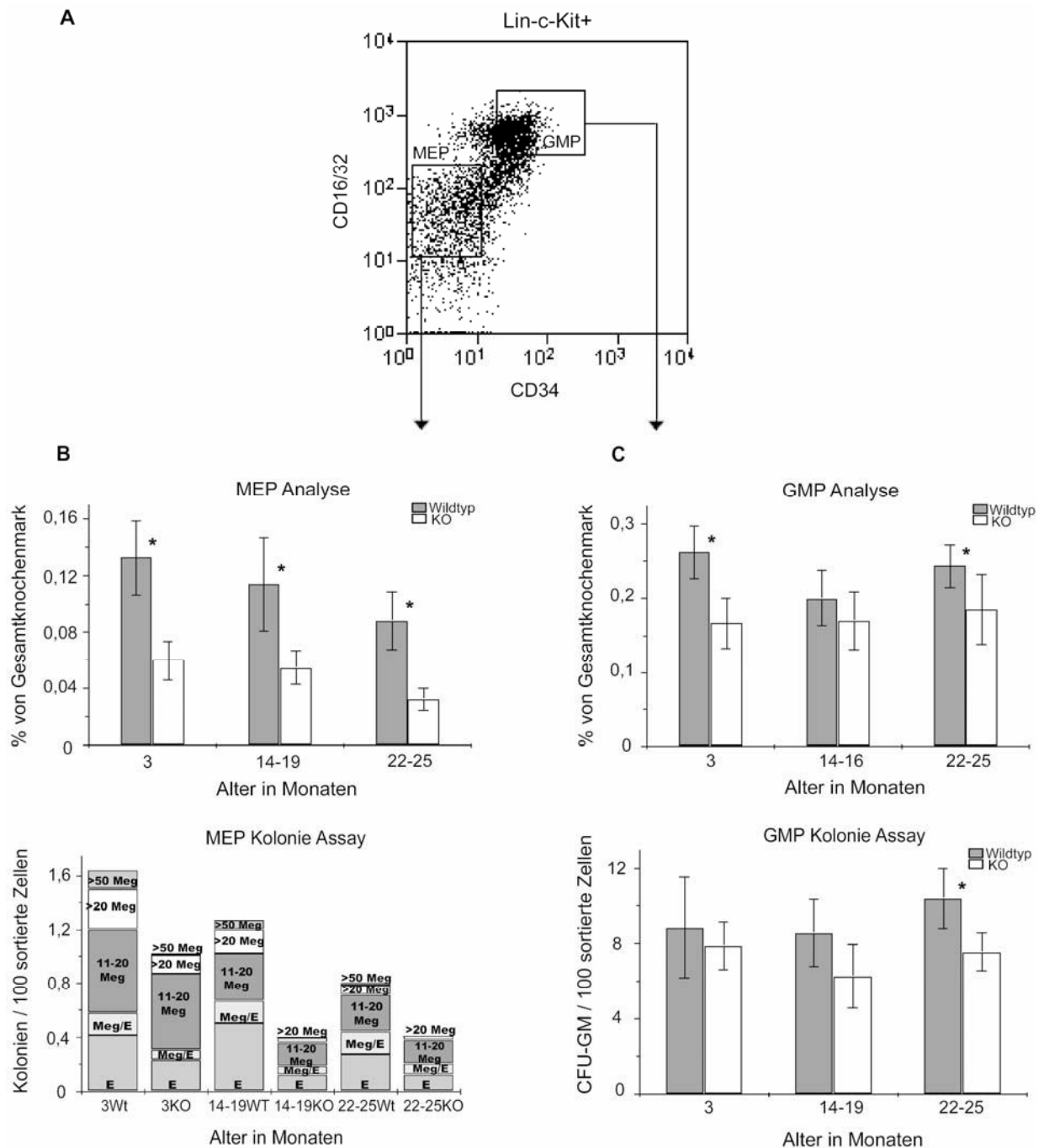


Abbildung 4.2.1.2: Sortierung der GMP und MEP Vorläuferzellen aus Mausknochenmark in Kolonie-Assays
A: Identifikation des MEP Vorläufers ($\text{Lin}^- \text{CD127}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD16/32}^{\text{low}} \text{CD34}^{\text{low}}$) und des GMP Vorläufers ($\text{Lin}^- \text{CD127}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD16/32}^+ \text{CD34}^+$) im Knochenmark von $c\text{-mpl}^{\text{+/+}}$ - und $c\text{-mpl}^{\text{-/-}}$ -Mäusen.
B oben: Durchflusszytometrische Analyse des MEP Vorläufers im KM. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der Vorläuferpopulationen bezogen auf Gesamtknochenmarkzellen über einen Zeitraum von 25 Monaten.
B unten: Langzeitanalyse von sortierten Zellen des MEP Vorläufers in serumhaltigen Kollagen-Assays mit Zytokin-Vollstimulation (SCF, IL-3, IL-6, EPO, GM-CSF, G-CSF). Es erfolgte eine Differenzierung in CFU-E, CFU-Meg/E und CFU-Meg Kolonien (letztere weiter differenziert nach Koloniegröße 3-10, 11-20, 20-50 und >50 Zellen). **C:** Untersuchung des GMP Vorläufers. Quantifiziert wurde die Gesamtzahl an CFU-GM, CFU-G und CFU-M. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 10-14 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

GMP - der Granulozyten-Monozyten Vorläufer

Die Anzahl an den bipotenten Vorläufern GMP war im Knochenmark der KO-Mäuse um 25% und im Kolonie-Assay um 22% gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Eine funktionelle Einschränkung wie bei den frühen myeloiden Vorläufern und bei den Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufern zeigte sich bei den GMP-Vorläuferzellen nicht. Sortierte GMP Zellen aus KO-Mäusen zeigten *in vitro* das gleiche klonogene Potential wie die aus Wildtyp-Mäusen (**Abb. 4.2.1.2 C**).

4.2.2 Untersuchung myeloider Vorläufer aus Knochenmark in Kolonie-Assays

Um zu überprüfen wie stark die quantitativen Reduktionen innerhalb der gesamten Myelopoese sind und ob die verschiedenen Differenzierungsstadien funktionelle Einschränkungen zeigen, sollte der Anteil Kolonie-bildender Zellen im Gesamtknochenmark über den Experimentierzeitraum von 2 Jahren in Kolonie-Assays untersucht werden. Dazu wurden Gesamtknochenmarkzellen mit zwei verschiedenen Zytokinkombinationen in einem halbfesten Medium auf Kollagen-Basis für 12 Tage kultiviert und die Kolonietypen nach Fixierung und Färbung bestimmt. Die Zytokinkombination „Teilstimulation“ enthielt Faktoren, die vorwiegend die Erythrozytopoese und Megakaryozytopoese stimulieren wie: SCF, EPO, IL-6 und IL-3. Für eine Stimulation granulozytärer und monozytärer Vorläufer enthielt die Kombination „Vollstimulation“ zusätzlich zu den Faktoren in der Kombination „Teilstimulation“ noch G-CSF und GM-CSF.

Die Anzahl Kolonie-bildender Zellen im Knochenmark von KO-Mäusen war über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Monaten signifikant reduziert und nahm im Alter weiter ab (**Abb. 4.2.2 A-B**). Dies betraf granulozytäre und erythrozytäre Kolonietypen gleichermaßen. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen unterschieden sich daher nur unwesentlich (**Abb. 4.2.2 A vs. B**). KO-Mäuse im Alter von 3 Monaten hatten eine um 58% reduzierte Gesamtkoloniezahl, während KO-Mäuse im Alter von 2 Jahren eine Verminderung um 70% zeigten. Zusätzlich konnte eine deutlich reduzierte Proliferationsfähigkeit der frühen und erythrozytären Vorläufer (CFU-Mix, CFU-Meg/E, CFU-E) beobachtet werden, die kleinere Kolonien bildeten als die Zellen in der Kontrollgruppe. Die Anzahl der Megakaryozyten-Kolonien war in 3 Monate alten KO-Mäusen um 40% und in 18-22 Monate alten KO-Mäusen um 63% reduziert.

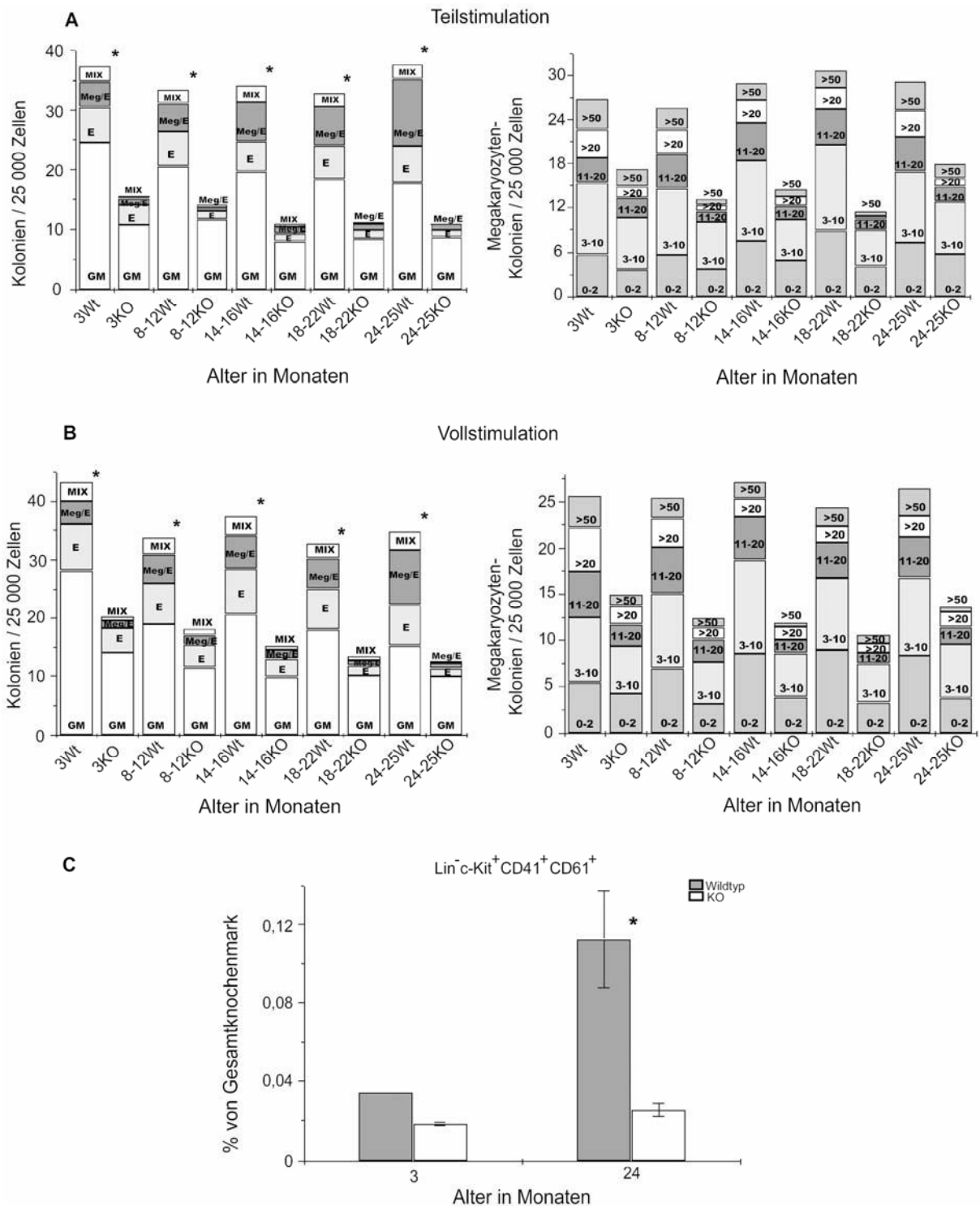


Abb. 4.2.2: Langzeitbeobachtung von Knochenmarkvorläuferzellen aus $c\text{-mp}^{+/+}$ - und $c\text{-mp}^{-/-}$ -Mäusen im Kolonie-Assay nach Teil- und Vollstimulation mit Zytokinen
A: Jeweils $2,5 \times 10^4$ Knochenmarkszellen/Schale wurden mit SCF, EPO, IL-6 und IL-3 über 12 Tage im Kollagen Assay inkubiert. Quantifiziert wurden folgende Kolonietypen CFU-GM, CFU-Mix, CFU-E, CFU-Meg/E und Megakaryozytenkolonien differenziert nach Zellzahl (3-10, 11-20, >20 und >50 Zellen). **B:** wie A, jedoch mit SCF, EPO, IL-6, IL-3, G-CSF und GM-CSF **C:** Prozentualer Anteil von Megakaryozyten ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD41}^+ \text{CD61}^+$) im Knochenmark von $c\text{-mp}^{+/+}$ - und $c\text{-mp}^{-/-}$ -Mäusen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 8-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

Überraschenderweise beobachteten wir einen Anstieg der Megakaryozyten-Kolonien bei den KO-Mäusen im Alter von 25 Monaten. Um zu überprüfen, ob diese *in vitro* Beobachtung mit dem Vorkommen von durchflusszytometrisch nachweisbaren megakaryozytären Vorläufern im Knochenmark korreliert, wurde der prozentuale Anteil der frühen Megakaryozytenvorläufer $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD41}^+ \text{CD61}^+$ (Hodohara *et al.* 2000) im Knochenmark von KO- und Wildtyp-Mäusen untersucht (**Abb. 4.2.2 C**).

Im Knochenmark von KO- und Wildtyp-Mäusen zeigten die frühen Megakaryozytenvorläufer eine deutliche altersabhängige Zunahme. In der Wildtyppopulation war diese Zunahme im Alter mit einer Verdreifachung des Megakaryozytenvorläuferanteils im Knochenmark sehr deutlich zu beobachten. Die Megakaryozyten in der LK Population bei jungen KO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe waren zwar erwartungsgemäß quantitativ verringert, aber auch ihre Zahl nahm bis zum Alter von 24 Monaten um ca. 30% zu.

Es wurde nicht überprüft, ob diese Megakaryozyten ausreifen und Thrombozyten bilden können. Eventuell handelt es sich um eine Verschiebung des Verhältnisses von Endomitosen und Mitosen mit vollständiger Zellteilung innerhalb der Ausreifung der Megakaryozyten.

4.2.3 Untersuchung von reifen myeloiden Zellen im Knochenmark

Zusätzlich zur Untersuchung der hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde auch der Anteil reifer Zellen der myeloiden Reihe im Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert. Aus den Resultaten geht hervor, dass der Anteil reifer Granulozyten bei $\text{c-mp}^{\text{L-}}$ -Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe um 40–50% vermindert war (**Abb. 4.2.3 A**). Der Anteil von Monozyten war bei $\text{c-mp}^{\text{L-}}$ -Mäusen ebenfalls deutlich reduziert (50% im Alter von 3 Monaten, 25% im Alter von 2 Jahren) (**Abb. 4.2.3 B**).

Der Unterschied zwischen KO- und Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der Anteile an reifen Granulozyten und Monozyten war bei jungen Mäusen stärker ausgeprägt als bei den 2 Jahre alten Tieren. Die $\text{CD41}^+ \text{CD61}^+$ Megakaryozyten waren bei den KO-Mäusen über den gesamten Altersverlauf stark reduziert (**Abb. 4.2.3 C**).

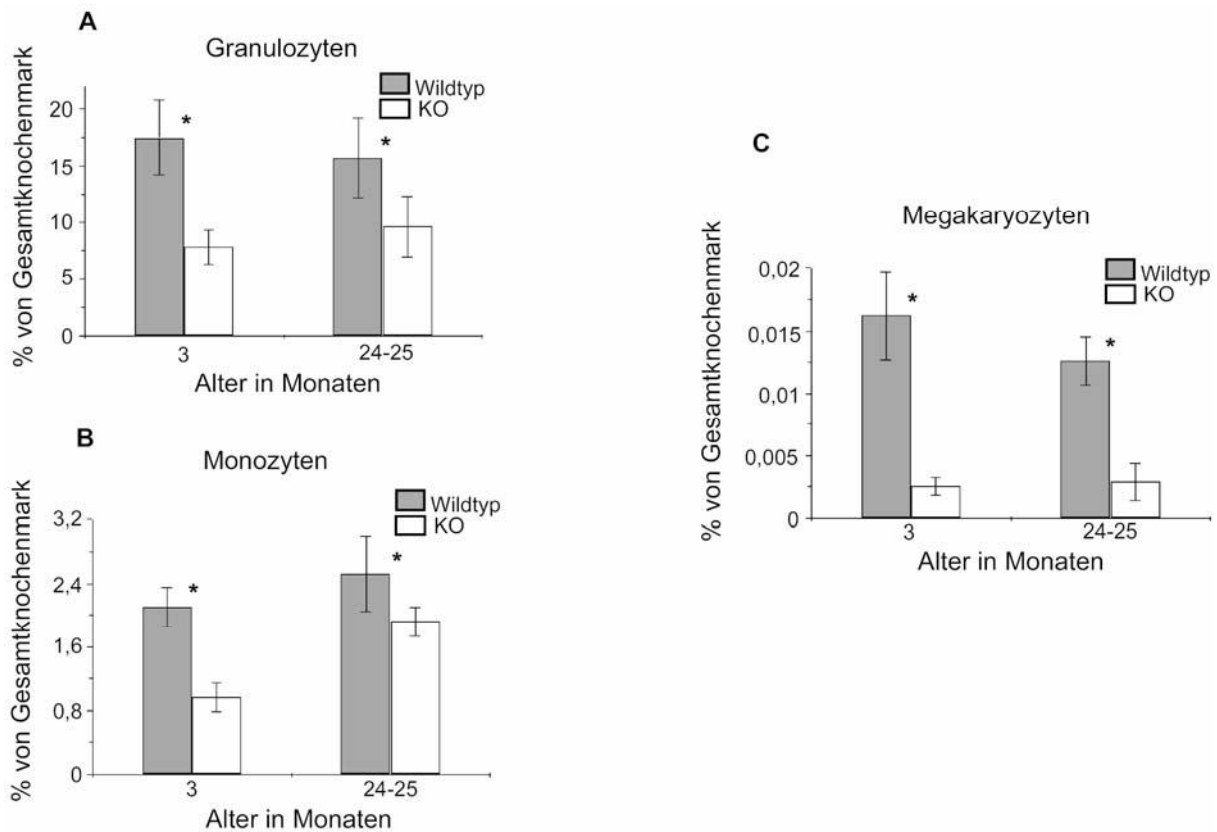


Abb. 4.2.3: Durchflusszytometrische Analyse von Granulozyten, Monozyten und Megakaryozyten im Knochenmark von *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen
A: Lin⁻ (CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b, B220, IgM, Ter119) Gr-1^{high} Granulozyten (n=8); **B:** Lin⁻ (wie Granulozyten) CD11b⁺ Monozyten (n=5-8); **C:** Lin⁻ (CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, IgM, Ter119, CD11c-APC, F4/80-APC) CD41⁺ CD61⁺ Megakaryozyten wurden im Gesamtknochenmark identifiziert und im Altersverlauf quantifiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, p<0,05).

4.2.4 Untersuchung von reifen myeloiden Zellen in der Milz

Um zu überprüfen, ob die Verminderung der Zellen aus der myeloiden Reihe nur auf das Knochenmark beschränkt ist, wurden reife myeloide Zellen in der Milz und im peripheren Blut (siehe 4.2.5) untersucht.

In der Milz befinden sich besonders viele dendritische Zellen, die hier naive Lymphozyten durch Antigenpräsentation aktivieren. Die durchflusszytometrische Untersuchung der dendritischen Zellen myeloiden Ursprungs (MDC) in der Milz ergab eine leichte Verminderung bei den *c-mpl^{-/-}*-Mäusen (79% vom Wildtyp, s. **Abb. 4.2.4 A**). Um herauszufinden, inwieweit die extramedulläre Hämatopoese in der Milz an der TPO-unabhängigen Produktion von Thrombozyten beteiligt ist, wurde auch hier der Anteil von Megakaryozyten untersucht.

Dabei zeigte sich in der Megakaryozytenpopulation, ähnlich wie im Knochenmark, eine altersunabhängige Verminderung um 90% im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 4.2.4 B**). Die Hämatopoese in der Milz trägt also nicht im verstärkten Maße zur Thrombozytenbildung in der KO-Maus bei.

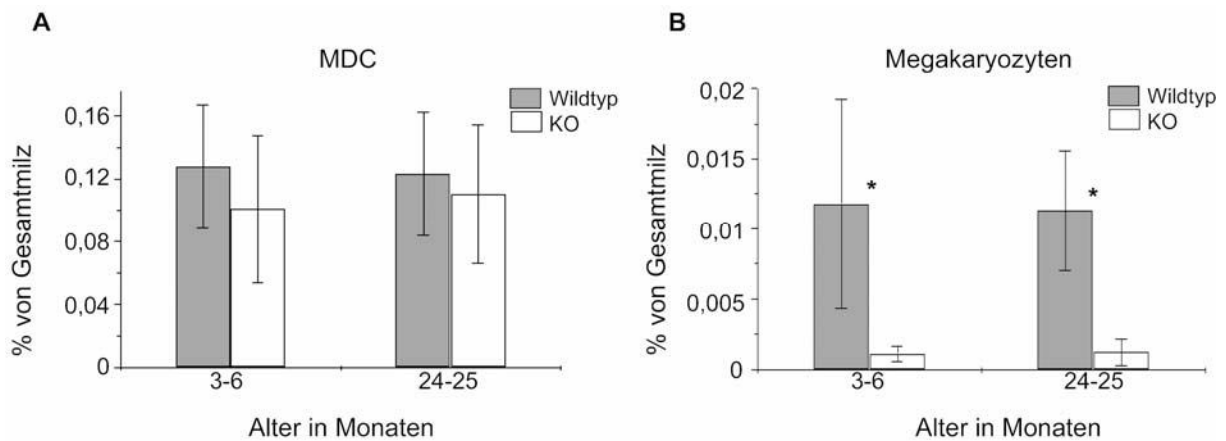


Abb. 4.2.4: Durchflusszytometrische Untersuchung von myeloiden dendritischen Zellen (MDC) und Megakaryozyten in der Milz von *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen
A: Prozentualer Anteil von MDCs Lin⁻ (CD3, CD19, Ter119, IgM) CD11c⁺ CD11b⁺ B220⁻ CD8⁻ in der Milz **B:** Prozentualer Anteil von Lin⁻ CD41⁺ CD61⁺ Megakaryozyten in der Milz. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-8 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, p<0,05).

4.2.5 Untersuchung von Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut

Der Anteil reifer Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut wurde, analog zu den Untersuchungen im Knochenmark, seriell untersucht (**Abb. 4.2.5**). Im Blut beobachteten wir eine altersabhängige Abnahme der Zahl an Granulozyten und Monozyten bei Wildtyp- und KO-Mäusen, die zwischen 20-27% liegt. Dabei waren die Zahlen bei den *c-mpl^{-/-}*-Mäusen nur unwesentlich niedriger als bei den Wildtyp-Tieren. Innerhalb der hämatopoetischen Entwicklung dieser Zellen findet eine fast vollständige Kompensation des Stammzelldefektes statt.

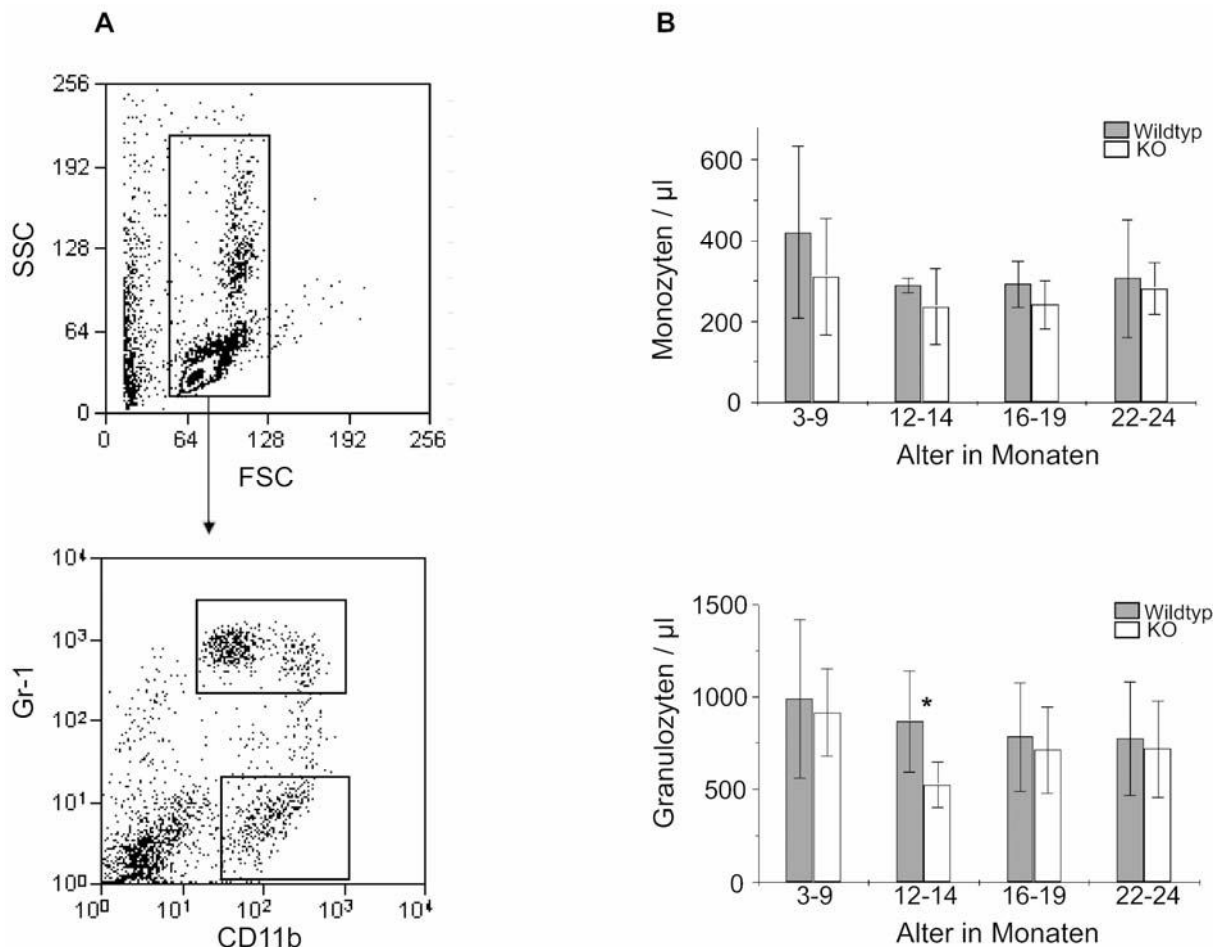


Abb. 4.2.5: Durchflusszytometrische Analyse von Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut
A: Identifizierung der Subpopulationen mittels FACS-Analyse. Gr-1^{high} CD11b^{int} Granulozyten wurden von Gr-1^{low} CD11b^{int} Monozyten unterschieden und quantifiziert. **B:** Serielle Analyse von Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut von *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen. Die Zellzahl in B ergibt sich aus der Kombination von Messung der Gesamtleukozytenzahl im Blutbild-Automaten und der Bestimmung des prozentualen Anteils der Zellpopulation aus der FACS-Analyse. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

4.3 Langzeitbeobachtung von Subpopulationen lymphoider Zellen und deren Vorläufer in Knochenmark, Milz, Thymus und peripherem Blut

4.3.1 Untersuchung früher lymphoider Vorläufer im Knochenmark

Im Rahmen der Versuche an frühen Vorläuferzellen im Knochenmark von *c-mpl^{-/-}*-Mäusen sollte geklärt werden, ob lymphoide Vorläufer ähnliche quantitative und funktionelle Einschränkungen zeigen wie myeloide Vorläufer. In früheren Untersuchungen wurden keine auffälligen Veränderungen in Lymphozyten-Subpopulationen beschrieben (Alexander *et al.* 1996). Vorläufer der lymphoiden Reihe wurden bisher

noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der frühe lymphoide LSKflt3⁺ (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ Flt3⁺ CD127⁻ CD44⁺) Vorläufer seriell im Abstand von 3 Monaten in Anlehnung an ein Protokoll von Adolfsson *et al.* (2001) identifiziert und quantifiziert. Die Anzahl an frühen lymphoiden LSKflt3⁺ Vorläufern im Knochenmark von *c-mpl*^{-/-}-Mäusen war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 65% deutlich reduziert (**Abb. 4.3.1.1 A**). In den Wildtyp-Mäusen war eine altersabhängige signifikante Abnahme der LSKflt3⁺ Zellen von 50% über einen Zeitraum von 2 Jahren (Abb. 4.3.1.1 B) nachzuweisen (p<0,006). Bei den KO-Mäusen zeigte sich dagegen im Altersverlauf keine wesentliche Veränderung des Anteils von LSKflt3⁺ Zellen. Für den von Kondo *et al.* (1997) definierten gemeinsamen Vorläufer der lymphoiden Reihe CLP (*common lymphoid progenitor*) ergaben sich ähnliche Ergebnisse (**Abb. 4.3.1.2**).

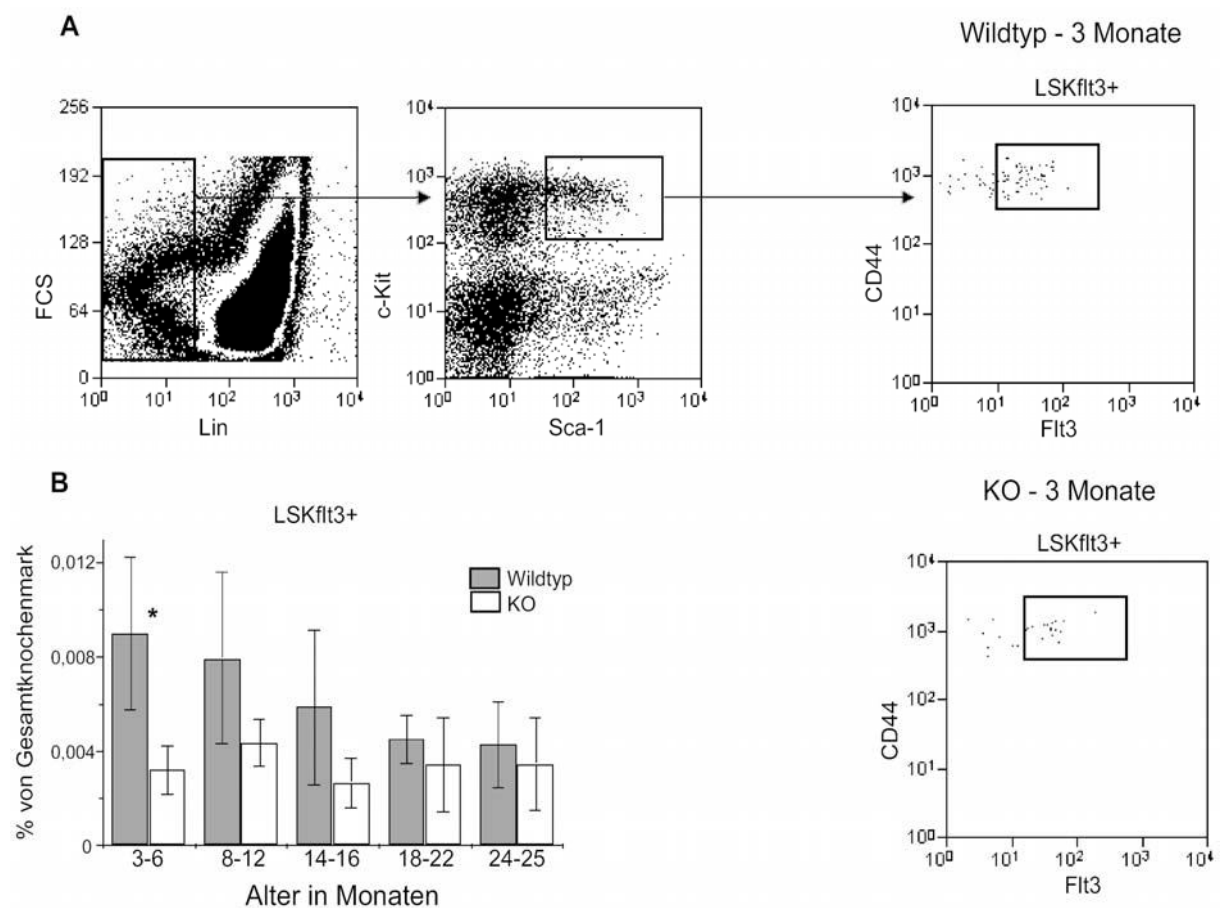


Abb. 4.3.1.1: Identifizierung und Quantifizierung des frühen lymphoiden Vorläufers LSKflt3⁺ im Knochenmark
A: Identifizierung und Vergleich des LSKflt3⁺ Vorläufers zwischen 3 Monate alten KO- und Wildtyp-Mäusen.
B: Durchflusszytometrische Analyse des LSKflt3⁺ Vorläufers im Knochenmark. Als linienspezifische Marker dienten CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, IgM, CD127, Ter119. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, p<0,05).

Der CLP Vorläufer ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{low}} \text{c-Kit}^{\text{low}} \text{CD127}^+ \text{Thy-1.1}^-$) stammt von dem früheren LSKflt3^+ Vorläufer ab und generiert vorwiegend B-Zellen, aber auch T-Zellen, NK Zellen und dendritische Zellen. Auch für diesen lymphoiden Vorläufer konnte wie für den früheren LSKflt3^+ Vorläufer bei den Wildtyp-Mäusen, eine signifikante altersabhängige Abnahme gezeigt werden ($p < 0,001$). Bei den KO-Mäusen war der Anteil an CLP Vorläuferzellen ähnlich stark reduziert wie der des LSKflt3^+ Vorläufers und zeigte ebenfalls eine weitere signifikante Abnahme im Alter ($p < 0,007$) (**Abb. 4.3.1.2**). Insgesamt konnten wir also eine ähnlich starke Verminderung der Anzahl früher lymphoider Vorläufer feststellen, wie für die frühen hämatopoetischen Stammzellen (s. 4.1) und die frühen myeloiden Vorläuferzellen (s. 4.2.1).

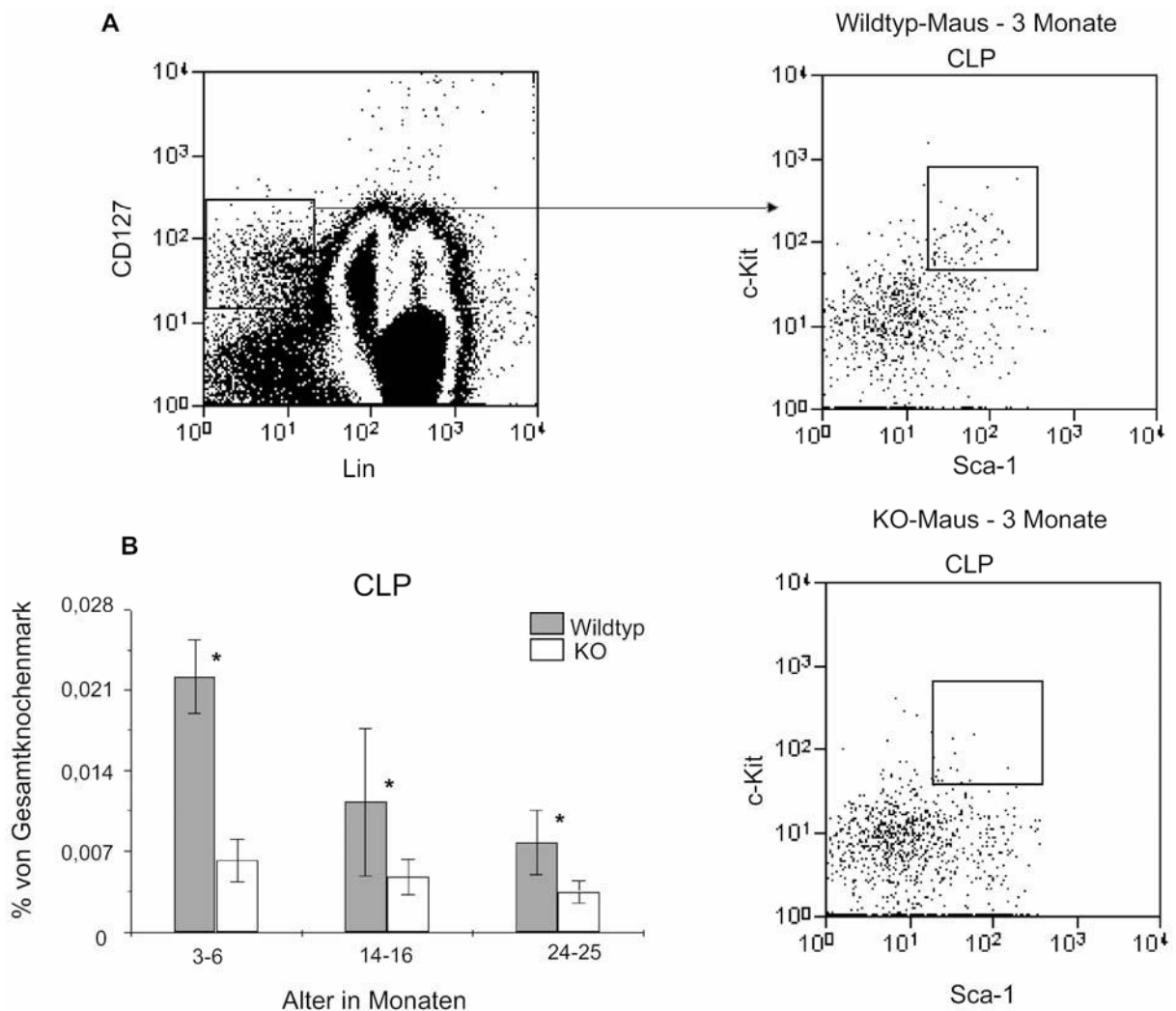


Abb. 4.3.1.2: Durchflusszytometrische Untersuchung des lymphoiden Vorläufers CLP im Altersverlauf **A:** Identifizierung der CLP Population mit folgenden linienspezifischen Markern (CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, Ter119). **B:** Serielle Analyse des prozentualen Anteils von CLP im Gesamtknochenmark von KO- und Wildtyp-Mäusen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

4.3.2 Untersuchung von B-Zellen im Knochenmark

Die Analyse von B-Zellen im Knochenmark sollte Aufschluss darüber geben, ob die Reduzierung des CLP Vorläufers der KO-Mäuse Auswirkungen auf die weitere Entwicklung der B-Zell-Reihe hat. Dafür wurden die von Hardy *et al.* (1991) definierten B-Zell-Vorläuferpopulationen Fraktion D (kleine prä-B-Zellen) und Fraktion E (unreife B-Zellen) durchflusszytometrisch untersucht (**Abb. 4.3.2**).

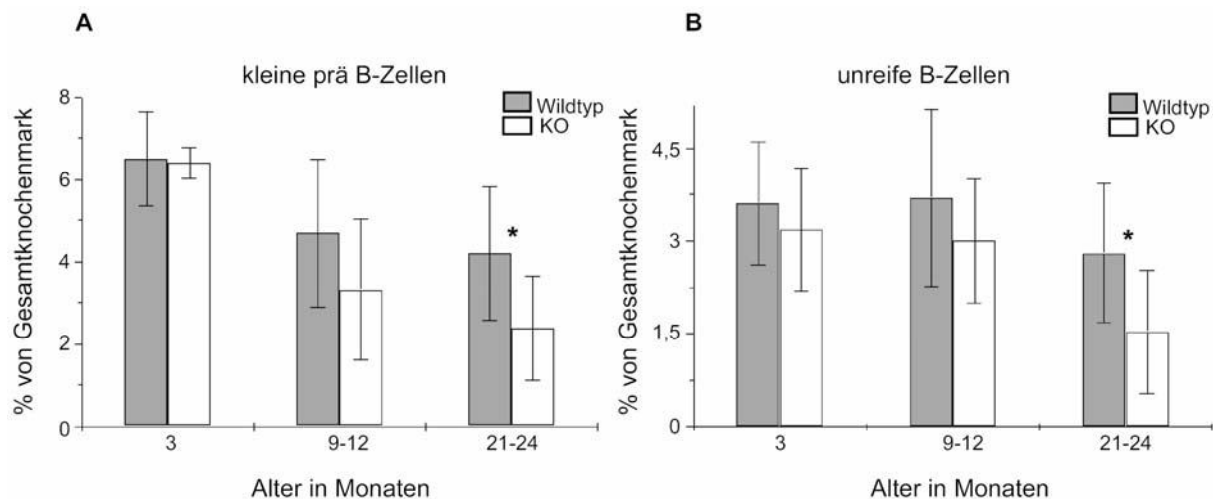


Abb. 4.3.2: Durchflusszytometrische Untersuchung von B-Zellen im Knochenmark von $c-mpl^{+/+}$ - und $c-mpl^{-/-}$ -Mäusen
A: Prozentualer Anteil von kleinen prä-B-Zellen ($B220^+ CD43^- CD19^+ IgM^-$ Fraktion D nach Hardy *et al.* 1991) im KM. **B:** Prozentualer Anteil von unreifen B-Zellen ($B220^{int} CD43^- CD19^+ IgM^+$ Fraktion E nach Hardy *et al.* 1991) im KM. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-8 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

Sowohl die Anzahl an prä B-Zell-Vorläufern als auch die an unreifen B-Zellen waren bei den KO-Mäusen bis zum Alter von 12 Monaten nicht oder nur leicht vermindert. Die Reduktion des Anteils dieser Vorläuferzellen wurde offensichtlich in jungen Mäusen durch vermehrte Zellteilungen während der B-Zell-Differenzierung ausgeglichen. Im Altersverlauf jedoch wurde in KO-Mäusen eine signifikant stärkere Abnahme der Anzahl an kleinen prä B-Zellen ($p < 0,001$) und unreifen B-Zellen ($p < 0,003$) um jeweils 45% beobachtet (21–24 Monate). In den Wildtyp-Mäusen konnte im Altersverlauf ebenfalls eine signifikante Abnahme von kleinen prä B-Zellen ($p < 0,05$) um 35% nachgewiesen werden. Diese altersabhängige Verringerung von prä B-Zellen und unreifen B-Zellen der Wildtyp-Population entsprach den Ergebnissen der Untersuchungen von Allman *et al.* (2005). Die stärkere Reduktion dieser Vorläufer bei den KO-Mäusen zeigt vermutlich die frühere „Alterung“ der B-Zell-Entwicklung an.

4.3.3 Untersuchung früher lymphoider Vorläufer im Thymus

Um festzustellen, ob sich die im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen deutlich reduzierte Zahl früher lymphoider Vorläufer im Knochenmark von KO-Mäusen auf die weitere Entwicklung der lymphoiden Reihe auswirkt, untersuchten wir die Entwicklung der T-Zellen im Thymus. Dabei wurde eine durchflusszytometrische Analyse des ETP (*early thymic progenitor*) und der T-Zell-Vorläuferpopulationen TN1-TN4 (*triple negative*: $CD3^- CD4^- CD8^-$) vorgenommen (s. **Abb. 4.3.3.1**).

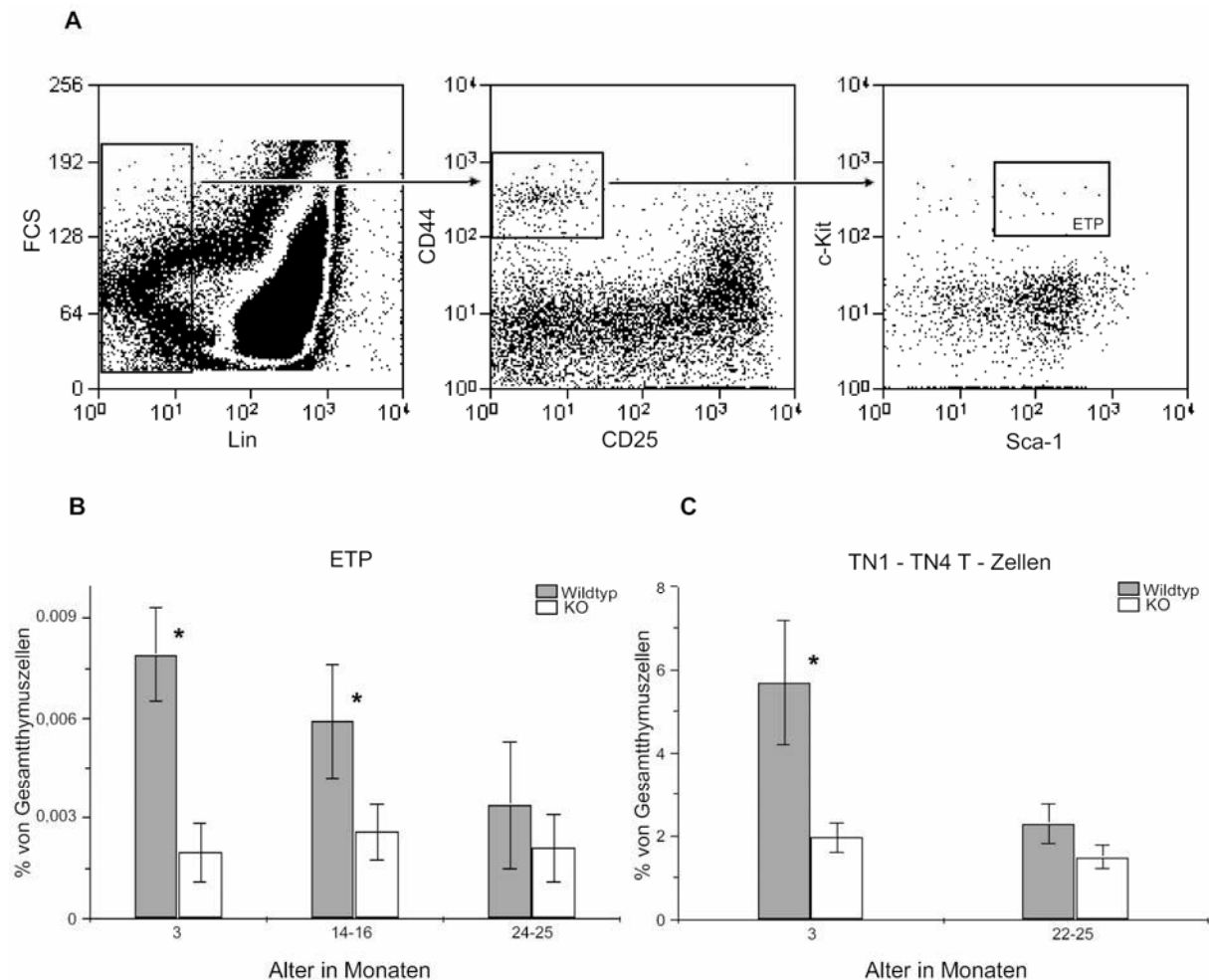


Abb. 4.3.3.1: Durchflusszytometrische Untersuchung lymphoider Vorläufer im Thymus

A: FACS-Analyse zur Identifizierung des seltenen ETP Vorläufers in Gesamthymus von *c-mp1^{+/+}*- und *c-mp1^{-/-}*-Mäusen. Als linienspezifische Marker wurden folgende Antikörper eingesetzt (CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, CD11b, B220, CD127, Ter119); **B:** Prozentualer Anteil von ETP Vorläufern in Gesamthymus. **C:** Analyse der T-Zell-Vorläuferpopulationen TN1-4 ($CD3^- CD4^- CD8^-$): TN1 ($Lin^- c-Kit^+ CD44^+ CD25^-$), TN2 ($Lin^- c-Kit^+ CD44^+ CD25^+$), TN3 ($Lin^- c-Kit^- CD44^- CD25^+$), TN4 ($Lin^- c-Kit^- CD44^- CD25^-$) in Gesamthymus. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden.. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

Die Anzahl an ETP Vorläufern ($\text{Lin}^- \text{CD127}^{-/\text{low}} \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{CD44}^+ \text{CD25}^-$), die ebenfalls vom LSKflt3^+ Vorläufer aus dem Knochenmark abstammen, war bei KO-Mäusen über den gesamten Altersverlauf stark vermindert. Der größte Unterschied zwischen KO- und Wildtyp-Mäusen war mit 75% in den Gruppen der 3 Monate alten Mäuse zu verzeichnen. Durch eine altersbedingte signifikante Reduktion des ETP Vorläufers in den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$), die bereits bei Min *et al.* (2004) beschrieben wurde, betrug dieser Unterschied in 21-24 Monate alten KO-Mäusen nur noch 35% (**Abb. 4.3.3.1 B**).

Ein vergleichbares Ergebnis wurde aus der Analyse der in der Entwicklung später folgenden *triple negative* Vorläuferpopulationen TN1-TN4 erhalten. Es zeigte sich ein paralleler Verlauf zwischen ETP und TN1-4 Vorläufern in Wildtyp- und KO-Mäusen: Dabei wurde eine ähnlich starke Verminderung dieser Vorläufer in den jungen KO-Mäusen wie für den ETP Vorläufer (-70%) und einen signifikanten altersbedingten Abfall der TN-Population in der Wildtyp-Maus ($p < 0,007$), der im Alter von 2 Jahren zu einer Angleichung der Vorläuferzahlen zwischen Wildtyp und KO-Maus führte, beobachtet (**Abb. 4.3.3.1 C**). Bei den TN1-4 Vorläufern konnte keine wesentliche Kompensation der Verminderung des frühen ETP Vorläufers beobachtet werden.

4.3.4 Untersuchung von T- und B-Zellen im Thymus

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der weiter ausgereiften doppelt positiven und einfach positiven Thymozyten stützten die Beobachtungen aus frühen lymphoiden Vorläufer – Analysen. Innerhalb der T-Zellreifung in den KO-Mäusen fand nur in CD8^+ T-Zellen eine vollständige Kompensation des Vorläuferzelldefizits statt, während bei den unreiferen doppelt positiven T-Zellen eine deutliche Reduzierung des Zellanteils im Vergleich zum Wildtyp vorlag (24% im Alter von 3 Monaten, 44% im Alter von 2 Jahren). Zusätzlich dazu zeigte sich in beiden Mauspopulationen eine signifikante Abnahme von CD4^+ T-Zellen im Altersverlauf (Wildtyp $p < 0,001$; KO $p < =,002$), die bei KO-Mäusen stärker ausgeprägt war (**Abb. 4.3.4 A**).

B-Zellen stellen im Thymus eine sehr kleine Zellpopulation dar. Sie wurden nach einem Protokoll von Akashi und Weissman (2000) identifiziert und quantifiziert. In der *c-mpl*^{+/+}-Maus wurde ein deutlicher Anstieg der B-Zellzahlen im Alter: Während bei jungen Mäusen die B-Zellen weniger als 0,5 ‰ der Thymuszellen ausmachten, stieg dieser Anteil im Alter von 2 Jahren auf > 3 ‰ an.

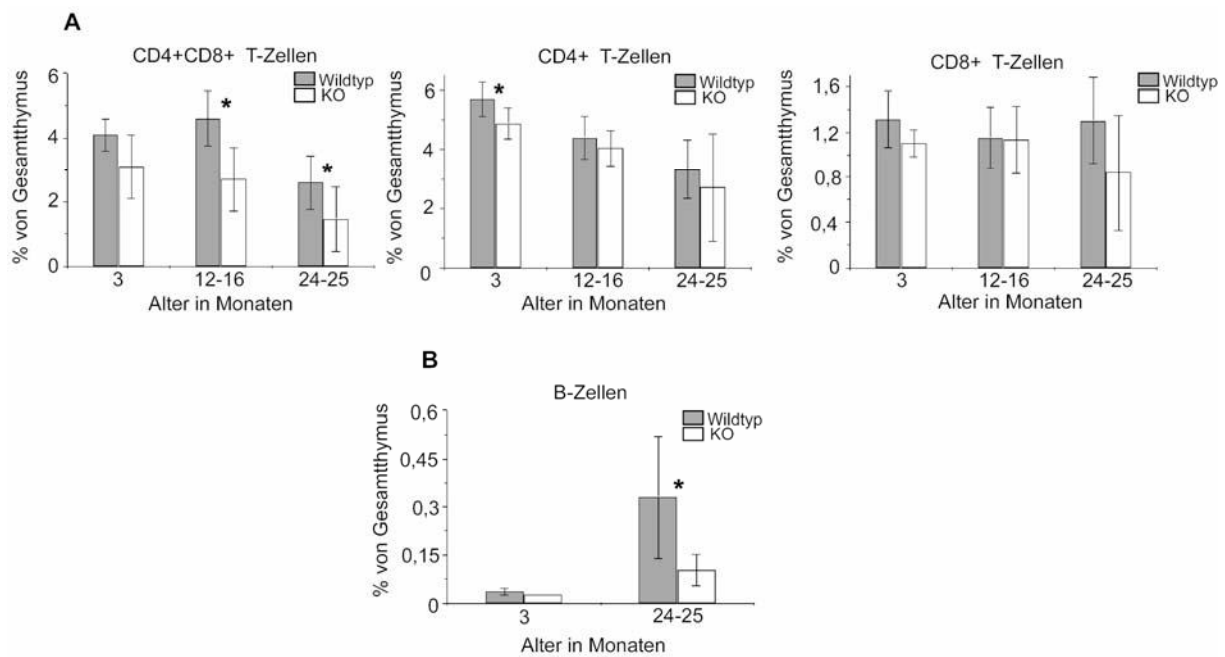


Abb. 4.3.4: Durchflusszytometrische Analyse von T- und B-Zellen im Thymus von *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen
A: Prozentualer Anteil von CD4⁺CD8⁺ T-Zellen und von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Altersverlauf. **B:** Prozentualer Anteil von B-Zellen (Lin⁻ B220⁺ CD19⁺ IgM⁺ CD43⁻). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-10 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, p<0,05).

Bei der *c-mpl^{-/-}*-Maus wurde dagegen ein deutlich geringerer Anstieg der Thymus-B-Zellen auf Werte um 1‰ nachgewiesen (**Abb. 4.3.4 B**). Die Rolle der B-Zellen im Thymus ist noch nicht vollständig geklärt.

Bekannt ist, dass dendritische Zellen und B-Zellen in der negativen Selektion (Selbsttoleranz) von T-Zellen im Thymus eine Bedeutung besitzen (Brocker *et al.* 1997, Fukuba *et al.* 1994). Sie tragen aber auch zum B-Zell-Repertoire in der Peripherie bei: Akashi *et al.* (2000) konnten zeigen, dass in der Maus ca. 2×10^4 B-Zellen pro Tag aus dem Thymus in die Peripherie entlassen werden. Die Autoren vermuten, dass Thymus-B-Zellen auf Grund eines abweichenden Immunglobulin (Ig)-Repertoires in der Lage sind, die Ig-Diversität in der Peripherie zu erhöhen.

Obwohl im Bereich der T-Lymphozyten-Entwicklung im Thymus eine fast vollständige Kompensation der Vorläuferzelldefizite zu beobachten war, deuten die Unterschiede des Anteils von Thymus-B-Zellen in den alten Mäusen auf Unterschiede in der Produktion reifer Lymphozyten zwischen *c-mpl^{-/-}*- und *c-mpl^{+/+}*-Mäusen hin, die sich erst im höheren Alter auswirken.

4.3.5 Untersuchung reifer Zellen lymphoiden Ursprungs in der Milz

Die Milz stellt in der Maus ein wichtiges hämatopoetisches Organ dar. In der Milz werden naive B-Zellen von aktivierten T-Zellen und naive T-Zellen von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen aktiviert. Dabei entstehen aus B-Zellen Plasmazellen und aus unreifen T-Zellen aktivierte T-Zellen, die in die Peripherie emigrieren.

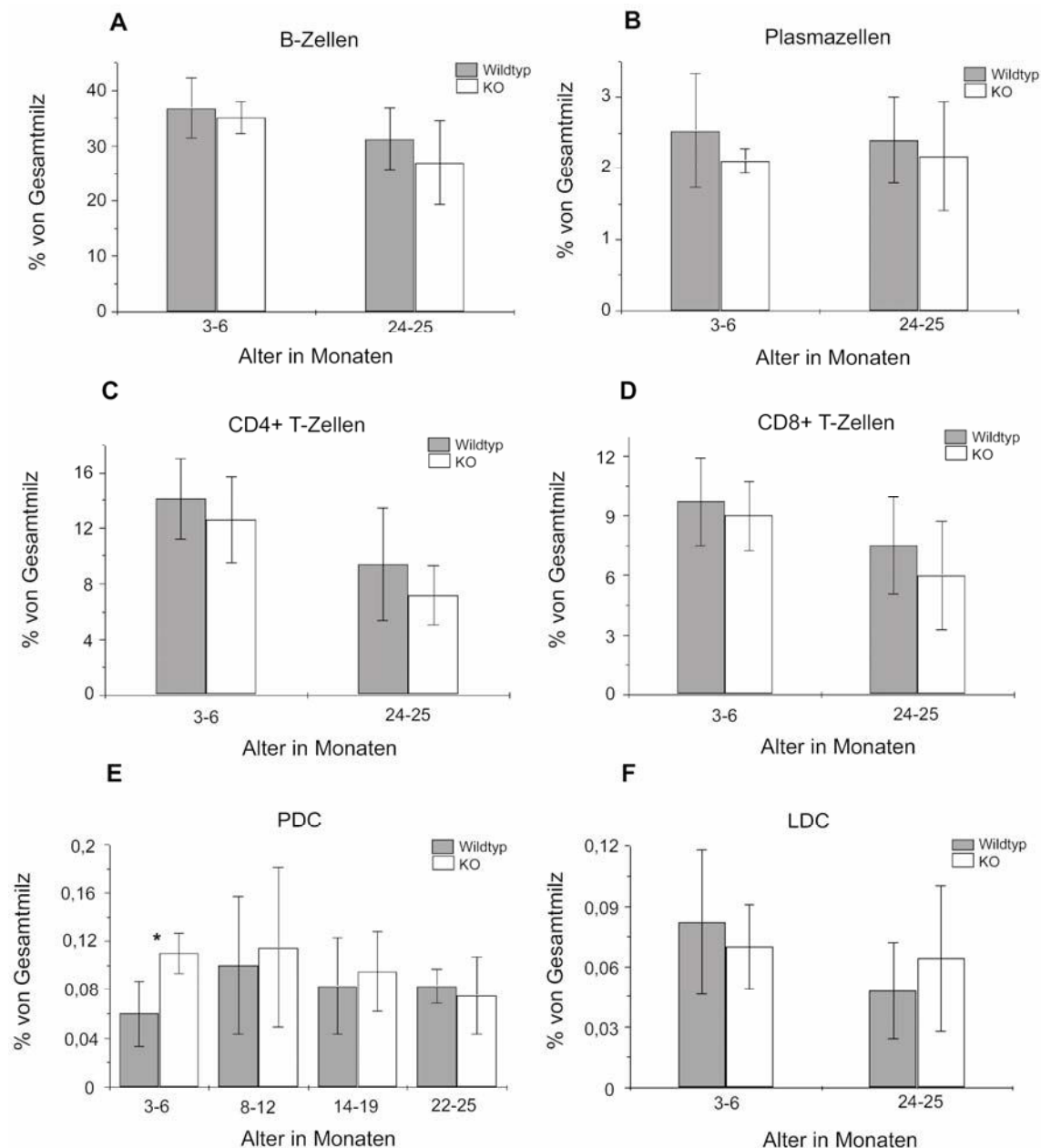


Abb. 4.3.5: Untersuchung reifer Lymphozyten und dendritischer Zellen in der Milz von *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen

A-B: Prozentualer Anteil von B-Zellen ($B220^+ CD19^+ IgM^+$) und Plasmazellen ($CD19^+ Sydecan1^+$); **C-D:** Prozentualer Anteil von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen; **E-F:** Prozentualer Anteil von PDC ($Lin^- mPDCA^+ Ly-6C^+ CD11c^{int}$) und LDC ($Lin^- CD11b^- B220^- CD11c^+ CD8^+$). Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

In der Milz finden sich aber auch frühe hämatopoetische Vorläufer aus dem Knochenmark, die hier zu verschiedenen Zelltypen wie Megakaryozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen differenzieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Anteil von B-Zellen, Plasmazellen, T-Zellen sowie plasmazytoiden und lymphoiden DCs in der Milz untersucht. Obwohl CLP Vorläufer im Knochenmark stark reduziert sind, wurde keine signifikante Reduktion von B-Zellen und Plasmazellen in der Milz von KO-Mäusen gefunden (**Abb. 4.3.5 A-B**): der Anteil dieser Zellen in der Milz war in Wildtyp- und KO-Mäusen vergleichbar. Auch der prozentuale Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz von KO-Mäusen war nur leicht vermindert (**Abb. 4.3.5 C-D**). Bei den KO-Mäusen zeigte sich allerdings im Alter eine etwas stärkere Abnahme der T-Zellen in der Milz als sie bei den Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden konnte: Während bei den 3 Monate alten KO-Mäusen die T-Zellzahl in der Milz noch mehr als 90% des Wertes vom Wildtyp betrug, erreichten die Zahlen bei 2 Jahre alten KO-Mäusen nur noch ca. 80% des Wildtyp-Wertes. Diese Tendenz könnte auf eine sich im Alter erschöpfende Kompensation des Stammzelldefekts bei *c-mpl*^{-/-}-Mäusen hinweisen. Überraschenderweise war der Anteil von plasmazytoiden dendritischen Zellen in der Milz junger KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich erhöht (um 88%). Dieser Unterschied wurde jedoch durch eine nur bei den Wildtyp-Mäusen beobachtete Zunahme dieser Population ausgeglichen, was dazu führte dass der Anteil von PDCs bei 2 Jahre alten KO-Mäusen leicht unter dem Wert der Kontrollgruppe lag (**Abb. 4.3.5 E**). Die lymphoiden dendritischen Zellen waren in der Milz junger KO-Mäuse kaum verändert. Sie zeigten nicht die bei den Wildtyp-Mäusen beobachtete Abnahme im Alter (**Abb. 4.3.5 F**).

4.3.6 Untersuchung dendritischer Zellen im Thymus

Neben Lymphozyten wurden auch lymphoide dendritische Zellen (LDC) und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) im Thymus untersucht (Nomenklatur nach Björck 2001). Dabei ergab sich ein überraschendes Ergebnis: Die Anzahl an PDCs stieg im Altersverlauf leicht an und zeigte nicht die bei den Wildtyp-Mäusen beobachtete Abnahme im Alter (**Abb. 4.3.6 A-B**). Die 2 Jahre alten KO-Mäuse zeigten daher einen gegenüber den Wildtyp-Mäusen erhöhten Anteil dieser Zellen im Thymus. Analog konnte für den Anteil an LDC am Gesamthymus ein kontinuierlicher Anstieg im Altersverlauf nur bei den *c-mpl*^{-/-}-Mäusen beobachtet werden (**Abb. 4.3.6 C**). Während Wildtyp-Mäuse einen mit ca. 0,8‰ relativ konstanten Anteil von LDCs im

Thymus aufwiesen, zeigten die KO-Mäuse im Verlauf von 3-24 Monaten – ausgehend von einem ähnlichen Ausgangswert - eine über 50%ige Zunahme des Anteils an Thymus-LDCs. Die PDC und LDC Populationen waren in dieser Untersuchung die einzigen Zellpopulationen, die in der KO-Maus erhöht waren.

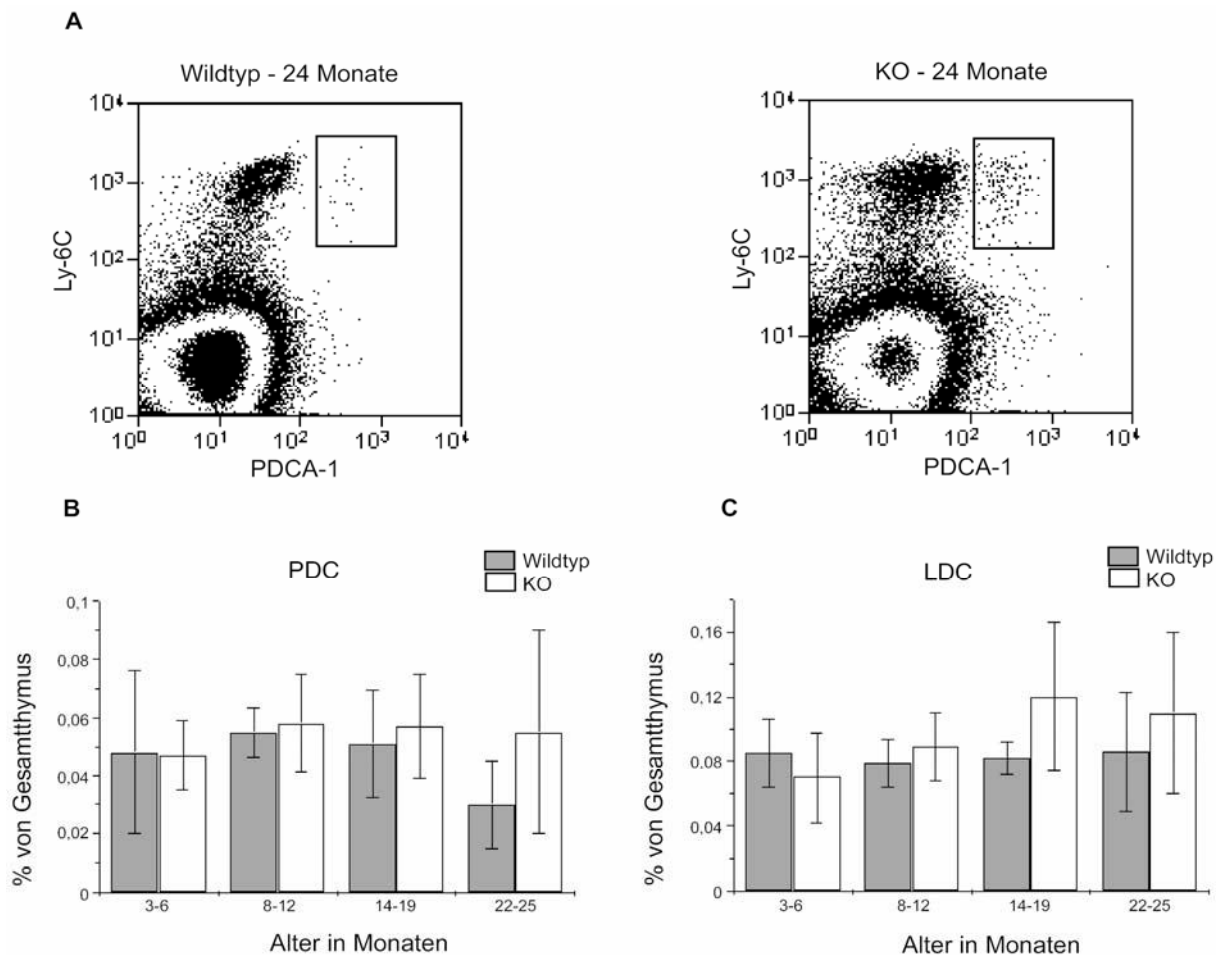


Abb. 4.3.6: Durchflusszytometrische Analyse von PDCs und LDCs im Thymus von *c-mpl^{+/+}*- und *c-mpl^{-/-}*-Mäusen

A: FACS-Analyse von PDC (plasmazytoide dendritische Zellen: Lin⁻ mPDCA⁺ Ly-6C⁺ CD11c^{int}) mit folgenden linienspezifischen Markern: CD3, CD19, CD11b, Ter119, IgM; **B:** Prozentualer Anteil von PDCs im Altersverlauf; **C:** Prozentualer Anteil von LDC im Altersverlauf (lymphoide dendritische Zellen: Lin⁻ CD11b⁻ B220⁻ CD11c⁺ CD8⁺) mit folgenden linienspezifischen Markern: CD3, CD19, Ter119, IgM. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 5-10 Mäuse untersucht wurden.

4.3.7 Untersuchung reifer B- und T-Zellen im peripheren Blut

Die durchflusszytometrische Analyse von B- und T-Zellen im peripheren Blut wurde wie in Abschnitt 3.6.2. beschrieben vorgenommen (**Abb. 4.3.7 A**). Im Gegensatz zu den Untersuchungen in den blutbildenden Organen konnten nicht nur Aussagen über den relativen Anteil sondern auch über die absolute Zellzahl im Blut getroffen werden. Über den gesamten Altersverlauf konnte eine leichte Verminderung von B-

Zellen um 20% bei den *c-mpl*^{-/-}-Mäusen gezeigt werden. Die T-Zellzahlen im Blut unterschieden sich bei jungen *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen nicht. Allerdings konnte in beiden Gruppen im Altersverlauf eine signifikante Abnahme der T-Zellzahlen verzeichnet werden (Wildtyp $p < 0,017$; KO $p < 0,001$). Diese Reduktion war jedoch, wie schon im Thymus beobachtet, bei den KO-Mäusen signifikant stärker ausgeprägt als bei den Wildtyp-Mäusen, so dass 22-24 Monate alte KO-Mäuse um 40% reduzierte T-Zellzahlen aufwiesen (**Abb. 4.3.7 B**). Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorläuferdefizite im Thymus von KO-Mäusen in der Peripherie nicht ausreichend kompensiert werden können. Eine Ursache dafür ist die im Alter einsetzende Thymusatrophie, die auch die Wildtyp-Mäuse betrifft. Eine andere Ursache könnte eine früher eintretende Seneszenz lymphoider Vorläuferzellen von KO-Mäusen sein.

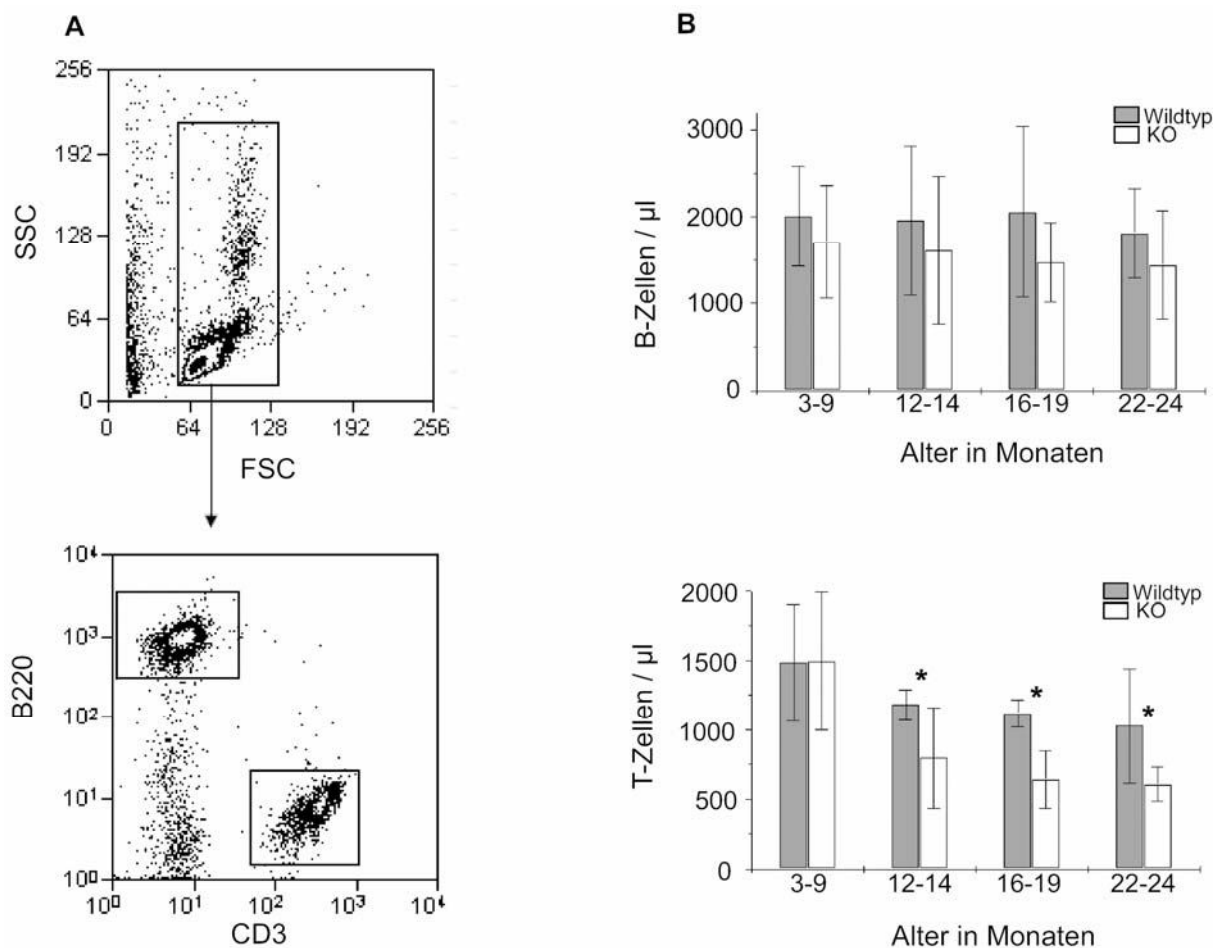


Abb. 4.3.7: Untersuchung von B- und T-Zellen im peripheren Blut von *c-mpl*^{+/+}- und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen
A: Serielle FACS – Analyse von B220⁺ B-Zellen und CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut. **B:** Zellzahlen von B-Zellen und T-Zellen im Altersverlauf. Die Absolutzahlen wurden aus dem prozentualen Anteil der Zellen in der FACS-Analyse und den im Blutbildautomaten ermittelten Leukozytenzahlen errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 6-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

4.4 Serielle Blutbildanalysen

Die Blutbildanalysen wurden mit Hilfe eines speziell für murine Blutzellen geeichten Blutbildautomaten (Vet abc *Animal Blood Counter*, Scil GmbH) erstellt. Dabei wurden die Konzentrationen für Erythrozyten (und Hämoglobin), Thrombozyten und Leukozyten ermittelt. Der ebenfalls bestimmte Hämatokrit gibt einen Wert für den Anteil der korpuskulären Bestandteile im peripheren Blut an. Hämoglobin und Hämatokrit Werte waren in beiden Maus-Populationen nur leicht altersbedingt reduziert (um 12%, ohne Abbildung). Die Erythrozytenzahlen zeigten ebenfalls bei beiden Gruppen eine leichte altersabhängig Verminderung. Ein Unterschied zwischen KO- und Wildtyp-Mäusen wurde hingegen nicht festgestellt (**Abb. 4.4 A**).

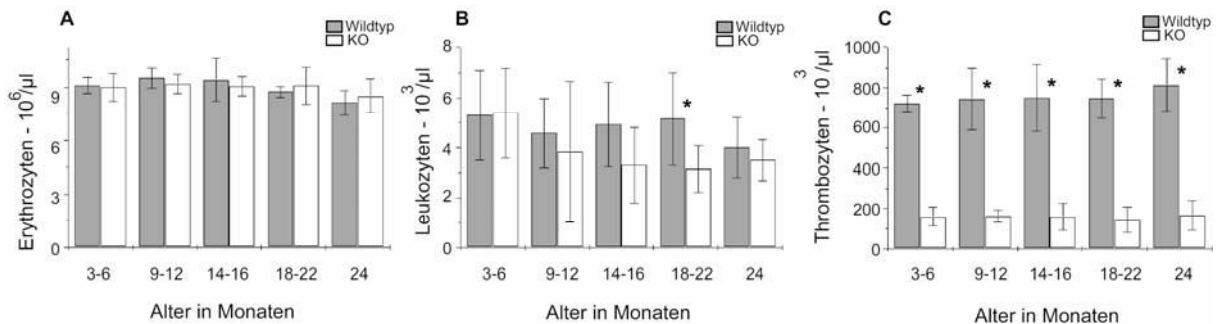


Abb. 4.4: Ergebnisse der seriellen Blutbildanalysen von $c-mpl^{+/+}$ - und $c-mpl^{-/-}$ -Mäusen
A-C: Heparinisiertes Blut aus dem retrobulbären Venenplexus der Mäuse wurde im Blutbildautomaten auf Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen untersucht. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten, für die pro Altersgruppe und Genotyp 8-12 Mäuse untersucht wurden. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (Student's t-Test, $p < 0,05$).

Die Leukozytenzahlen unterschieden sich nicht zwischen KO- und Wildtyp-Population bis zu einem Alter von ca. 15 Monaten. Danach nahmen die Leukozytenwerte bei den KO-Mäusen etwas stärker ab, als bei den Wildtyp-Mäusen: Im Alter von 2 Jahren wiesen die Wildtyp-Mäuse noch ca. 85% der Leukozytenzahl von jungen Mäusen (3-9 Monate) auf, während bei den KO-Mäusen die Leukozytenzahl im gleichen Zeitraum auf ca. 60% abfiel (**Abb. 4.4 B**).

Die Thrombozytenzahlen waren mit durchschnittlich 160/nl in den KO-Mäusen wie erwartet um durchschnittlich 80% im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Durchschnitt 750/nl) vermindert (**Abb. 4.4 C**). Sowohl bei KO- als auch bei Wildtyp-Mäusen blieb der Thrombozytenwert über die gesamte Lebensspanne relativ konstant, eine weitere Abnahme der Thrombozytenzahlen war bei den KO-Mäusen bis zu einem

Alter von 30 Monaten nicht feststellbar (Daten nicht gezeigt). Trotz der vergleichsweise niedrigen Thrombozytenzahlen zeigten die KO Mäuse jedoch keine Spontanblutungen.

4.5 Untersuchung der mRNA Expression von Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläuferzellen in *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen

Mit Hilfe von cDNA-Microarrays wurde das mRNA Expressionsspektrum früher hämatopoetischen Stammzellen in *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen im Alter von 3 und 12 Monaten verglichen. Dieses Experiment sollte Aufschluss über Veränderungen in der Expression von Genen, die für die Regulation der Stammzellfunktion wichtig sind, geben. Dazu wurden Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Wildtyp- und KO-Mäusen sortiert und die extrahierten mRNAs in einem *high-density Microarray* (25.000 Gene) untersucht. Die untersuchte Population enthielt neben Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁻ Zellen auch ca. 8-10% LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺) Zellen und Osteoblasten, die wie hämatopoetische Stammzellen c-Kit und Sca-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Gattei *et al.* 1996, van Vlasselaer *et al.* 1994). Bei der Analyse der Ergebnisse musste berücksichtigt werden, dass die von uns untersuchte Lin⁻ Sca-1⁺ Population entsprechend heterogen ist und Unterschiede in der Expression von spezifischen mRNAs auch Verschiebungen im Verhältnis der Vorläufer-Subpopulationen untereinander innerhalb der sortierten Zellpopulation repräsentieren können. Andererseits war eine Untersuchung der früheren LSK Zellen nicht möglich, da die Zahlen dieser Vorläuferpopulation in den *c-mpl*^{-/-}-Mäusen stark reduziert war und nicht genügend Zellen dieser Population für eine cDNA-Microarray-Analyse gewonnen werden konnten.

In *c-mpl*^{-/-}-Mäusen war erwartungsgemäß die Expression der Gene stark vermindert, die TPO-abhängig innerhalb der Megakaryozyten- und Thrombozytenbildung reguliert werden (ohne Abbildung). Es wurde eine starke Verminderung der mRNA Expression von *c-mpl*, *Selp* (CD62p), *GpIb* (CD41) und *Trfr2* (Transferrin 2 Rezeptor) in KO-Mäusen. Diese für Megakaryozyten und Thrombozyten typischen Oberflächenmarker werden TPO-abhängig exprimiert. CD41 und CD61 haben große Bedeutung bei der Plättchenadhäsion und -aggregation innerhalb der Homöostase. Der Transferrin-Rezeptor wird ebenfalls auf Megakaryozyten exprimiert und ist wichtig für den Eisenstoffwechsel der Zellen.

In der weiteren Auswertung beschränkten wir uns zunächst auf die Gene, denen wichtige Funktionen in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellpopulationen zugeschrieben werden (Auswahl aus Forsberg *et al.* 2005, Passegue *et al.* 2005). Die in Stammzellen regulierten Gene werden gemäß des Klassifizierungsschemas „*gene ontology*“ (Ashburner *et al.* 2000) in verschiedene Kategorien eingeteilt. Dabei bildeten ihre Beteiligung an biologischen Prozessen innerhalb der Zelle, ihre molekulare Funktion und ihre zelluläre Lokalisation die Grundlage für die Unterteilung. Die Gruppierung der dargestellten Gene und ihre Diskussion im Text folgen dieser Einteilung. Im Text näher erwähnt werden nur Gene, denen nach derzeitigem Kenntnisstand eine entscheidende Bedeutung in der Hämatopoese bzw. für die Stammzellfunktionen zukommt.

Extrazelluläre Proteine

Eine Reihe von Genen, die für Proteine der Extrazellulären Matrix (ECM) oder andere sezernierte Proteine kodieren, sind spezifisch in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Forsberg *et al.* 2005). Offensichtlich tragen die frühen Stammzellen damit selbst zum speziellen Umfeld der Stammzellnische bei. Für die Mehrzahl dieser Gene fanden wir in den KO-Mäusen eine deutlich geringere Expression als im Wildtyp (**Abb. 4.5.1 A**).

Zu den beschriebenen ECM Genen, die als in hämatopoetischen Stammzellen hochreguliert beschrieben wurden und in den *c-mpl*^{-/-}-Mäusen eine verminderte Expression zeigten, gehören *Tgm2* (Transglutaminase 2), *Bgn* (Biglycan), *Dag1* (Dystroglycan), *Emilin1* (*elastin microfibril interfacier 1*) sowie die Gene für die Prokollagene (Type IV, alpha 2) *Col4a1* und *Col4a2*. Neben den ECM-Genen fanden sich bei den KO-Mäusen hochregulierte Gene für andere durch hämatopoetische Stammzellen sezernierte Proteine. Hierzu zählten *Mmp2* und *Timp2*, die für Matrix Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren kodieren und Motilität und Differenzierung von HSCs regulieren (Forsberg *et al.* 2005). Für die meisten der oben beschriebenen Gene konnten wir die verminderte mRNA Expression in der *c-mpl*^{-/-}-Maus unabhängig vom Alter nachweisen. Ein spezifisches Schema einer altersabhängigen Regulation konnte bei den durchgeführten Analysen nicht festgestellt werden.

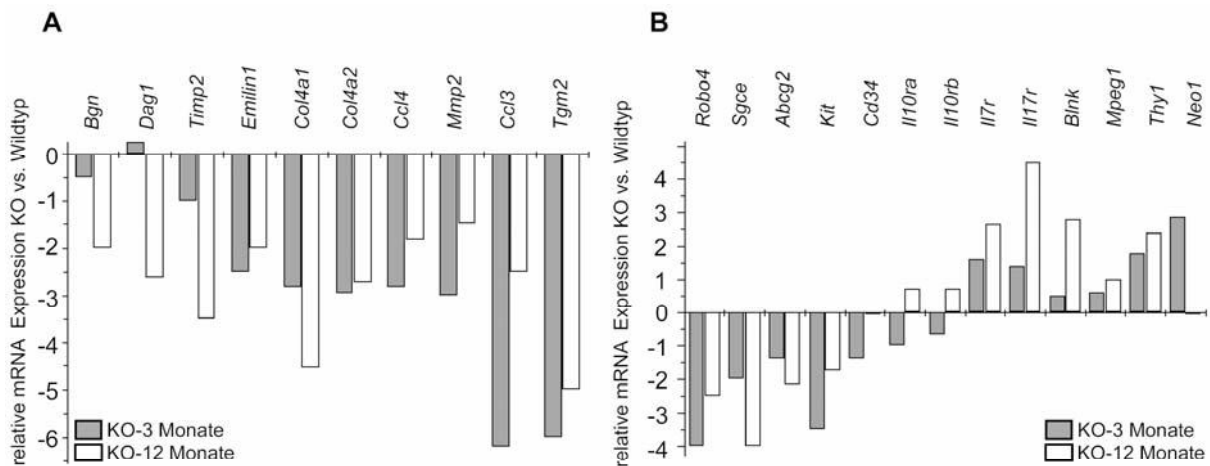


Abb. 4.5.1: Untersuchung der mRNA Expression von sortierten Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläuferzellen in einem cDNA-Microarray Experiment.

Gezeigt wird die relative mRNA Expression regulierter Gene in hämatopoetischen Stammzellen von KO-Mäusen. Die Signalintensitäten wurden auf eine Basis bezogen (Kontrollgruppe: Wildtyp-Mäuse) und als Log₂ Wert ausgegeben. Es wurden die Gene ausgewählt, die sich bezogen auf die Kontrollgruppe mehr als 2fach unterscheiden (Log₂ Wert > 1 oder < -1).

A: Expression von Genen, die für extrazelluläre Matrixproteine kodieren. **B:** Expression von Genen die für membrangebundene Proteine kodieren.

Membranproteine

Innerhalb der Gruppe der membrangebundenen Proteine konnte eine deutlich verminderte Expression früher Stammzellmarkergene wie *Abcg2* (ABC-Transporter, verantwortlich für den SP-Phänotyp von hämatopoetischen Stammzellen), *Cd34* und *Kit* beobachtet werden (**Abb. 4.5.1 B**). Dieses Ergebnis stützt die während der Arbeit gewonnenen Daten aus den FACS-Analysen von HSCs im Knochenmark der KO-Mäuse, die deutlich verminderte Stammzellzahlen zeigten. Die mRNA Expression von *Il7r* (IL-7-Rezeptor), *Il17r* (IL-17-Rezeptor), *Blnk* (SLP-65) sowie von *Thy1* war dagegen bei den KO-Mäusen höher als im Wildtyp (**Abb. 4.5.1 B**). Die meisten dieser Gene werden spezifisch innerhalb der Lymphopoese exprimiert und die erhöhte Expression dieser Marker könnte auf einen höheren relativen Anteil lymphoider Vorläufer in der untersuchten Lin⁻ Sca-1⁺ Population bei KO-Mäusen zurückzuführen sein. Membranproteine aus der Gruppe der *Gap Junction* und *Tight Junction* Proteine, Syndekane und Adhäsionsmoleküle, für die eine erhöhte Expression in hämatopoetischen Stammzellen beschrieben wurden (Forsberg *et al.* 2005), unterschieden sich nicht auffällig in ihrem Expressionslevel zwischen Wildtyp- und KO-Mäusen.

Intrazelluläre und intranukleäre Faktoren

Auch bei der Untersuchung von Genen für Moleküle intrazellulärer Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, für die eine erhöhte Expression in hämatopoetischen Stammzellen von Wildtyp-Mäusen beschrieben wurde, zeigte sich in der Tendenz eine verringerte mRNA Expression in KO-Mäusen. Eine verminderte mRNA Expression in den KO-Mäusen betraf folgende Gruppen (**Abb. 4.5.2**):

- die Homeobox-Gene *Hoxa5*, *Hoxb5* und *Hoxa9*, die wichtige Funktionen für die Entwicklung und Erhaltung von hämatopoetischen Stammzellen besitzen,
- die Transkriptionsfaktoren Tal-1, Gata-1 und Nf-e2, die eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten besitzen und die eine erhöhte Expression in hämatopoetischen Stammzellen zeigen (Forsberg *et al.* 2005),
- intrazelluläre Adapterproteine wie Epb4.1 und Fgd1, die Transmembranproteine mit dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett verbinden,
- die Glutathion-S-Transferasen Gstm1 und Gstk1, die wichtige Schutzsysteme langlebiger Zellen gegen zelltoxische Verbindungen darstellen.

Alle aufgeführten Gene müssen als potentielle Zielgene für die Funktion von TPO auf frühe hämatopoetische Zellen in Betracht gezogen werden.

Abweichend davon fanden sich für *Hoxa4* und *Hoxb4* keine unterschiedlichen Expressionslevel für 3 Monate alte KO- und Wildtyp-Mäuse. In den 12 Monate alten KO-Mäusen wurde sogar eine höhere Expression dieser Gene festgestellt. Für das *Hoxb4* Gen wurde eine Bedeutung als Zielgen von TPO auf hämatopoetischen Stammzellen postuliert (Kirito *et al.* 2003). Auch die mRNA Expression von *Notch1* war bei 12 Monate alten KO-Mäusen deutlich höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Die Notch-vermittelte Signalkaskade ist wichtig für die Inhibition der HSC Differenzierung und somit für die Selbsterhaltung von hämatopoetischen Stammzellen (Duncan *et al.* 2005). Das Gen *Cat*, welches für das Protein Katalase kodiert und für die Selbsterneuerung von HSCs wichtig ist (Ito *et al.* 2004), fanden wir in 3 Monate alten KO-Mäusen erhöht exprimiert.

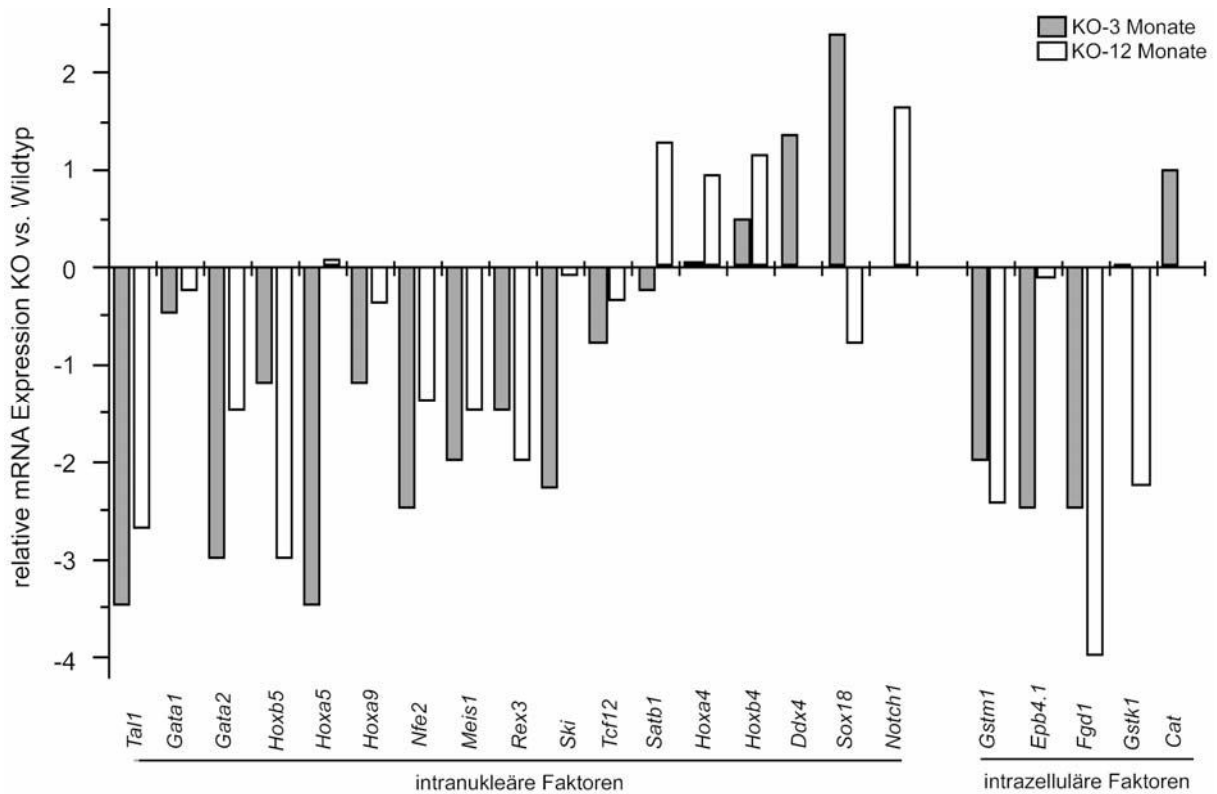


Abbildung 4.5.2: Untersuchung der mRNA Expression von sortierten Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläuferzellen in einem cDNA-Microarray Experiment. Gezeigt wird die relative mRNA Expression regulierter Gene in hämatopoetischen Stammzellen von KO-Mäusen, die für spezifische Transkriptionsfaktoren und intrazelluläre Signalmoleküle kodieren. Die Signalintensitäten wurden auf eine Basis bezogen (Kontrollgruppe: Wildtyp-Mäuse) und als Log₂ Wert ausgegeben. Es wurden die Gene ausgewählt, die sich bezogen auf die Kontrollgruppe mehr als 2fach unterscheiden (Log₂ Wert >1 oder <-1).

Zellzyklusregulatoren

Basierend auf Ergebnissen von Passegué *et al.* (2005) zur Zellzyklus-Regulation früher hämatopoetischer Stammzellpopulationen in der Maus zeigt Abbildung 4.5.3 ausgewählte Zellzyklusgene, die bei frühen Stammzellen differenziell hochreguliert sind. Die Unterschiede in den Expressionslevels der verschiedenen Zellzyklusgene zwischen KO- und Wildtyp-Mäusen ergaben ein komplexes Bild, das auf eine veränderte Zellzyklusregulation in den Stammzellen der KO-Mäuse hindeutet.

Die Genexpression der zyklinabhängigen Kinasen *Cdk2*, 4, 5, 8, 9 war bei den 3 Monate alten KO-Mäusen vermindert, während im Alter von 12 Monaten keine Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden konnten. Die mRNA Expression des Cdk Inhibitors p57 (*Cdkn1c*) war bei KO-Mäusen stark reduziert, während die Cdk Inhibitoren p18 (*Cdkn2c*) und p27 (*Cdkn1a*) eine leicht erhöhte Expression zeigten. Einige Faktoren, die wichtig für die Kontrolle der Differenzierung und

Proliferation von Stammzellen sind, wiesen in KO-Mäusen deutlich veränderte mRNA Expressionsmuster auf (**Abb. 4.5.3**). Eine in KO-Mäusen reduzierte mRNA Expression wurde für die S-G₂/M-Zykline G2 und F sowie für *Spag5* (hMAP126, *mitotic spindle associated protein*) beobachtet, während *Rb1* (Retinoblastom1), *Ier5* (*immediate early response*) und Sestrin1 erhöhte Expression zeigten.

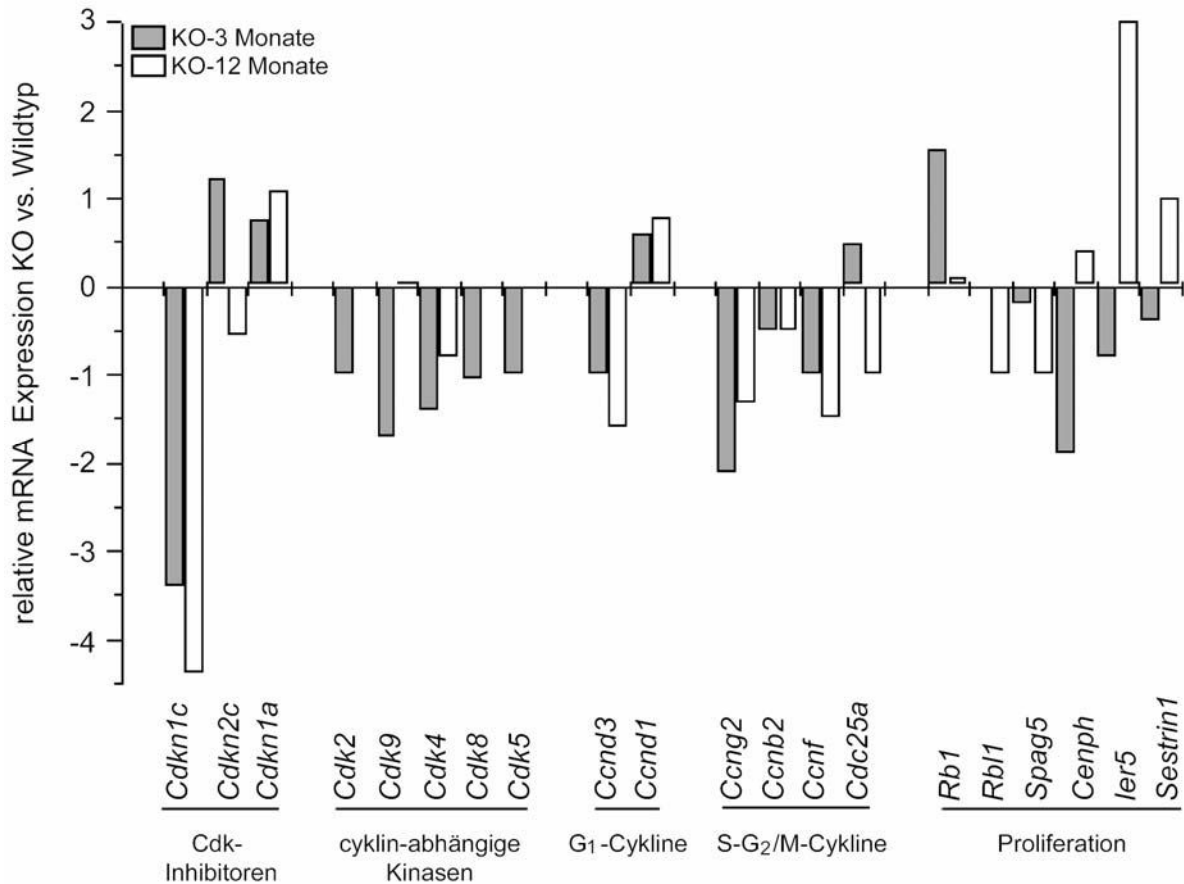


Abb. 4.5.3: Untersuchung der mRNA Expression von sortierten Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläuferzellen in einem cDNA-Microarray Experiment.

Gezeigt wird die relative mRNA Expression von Zellzyklusgenen in hämatopoetischen Stammzellen von KO-Mäusen. Die Signalintensitäten wurden auf eine Basis bezogen (Kontrollgruppe: Wildtyp-Mäuse) und als Log₂ Wert ausgegeben. Es wurden die Gene ausgewählt, die sich bezogen auf die Kontrollgruppe mehr als 2fach unterscheiden (Log₂ Wert >1 oder <-1).

5. Diskussion

Mit der *c-mpl*^{-/-}-Maus (Alexander *et al.* 1996) stand uns für diese Arbeit ein Tiermodell zur Verfügung, das wichtige Aufschlüsse über die *in vivo* Bedeutung von Thrombopoetin und seinem Rezeptor c-Mpl für die Regulation der frühen Hämatopoese im Knochenmark geben und somit auch zur Aufklärung der Ursachen der hämatopoetischen Störungen bei Patienten mit CAMT beitragen kann. Die *c-mpl*^{-/-}-Maus wurde in den letzten Jahren von mehreren Arbeitsgruppen untersucht und beschrieben (Gurney *et al.* 1994, Alexander *et al.* 1996, Carver-Moore *et al.* 1996, Kimura *et al.* 1997, Gainsford *et al.* 2000, Levin *et al.* 2001). Alle diese Untersuchungen spiegelten allerdings nur Momentaufnahmen des hämatopoetischen Systems der Knockout-Mäuse wider, da alle Tiere zu einem definierten Zeitpunkt, i.d.R. im Alter von 3-6 Monaten, untersucht wurden. Ein Vergleich mit dem Krankheitsbild der CAMT beim Menschen, bei der es im Verlauf von einer isolierten Thrombozytopenie zu einem Ausfall aller hämatopoetischen Zellen und einer Panzytopenie des peripheren Blutes kommt, war daher nur sehr bedingt möglich. Aus diesem Grund schien uns eine detaillierte Untersuchung der Tiere über einen längeren Zeitraum notwendig. Aus der Tatsache, dass CAMT-Patienten eine Panzytopenie entwickeln, kann gefolgert werden, dass TPO für den Erhalt der Hämatopoese im Menschen essentiell ist (Ballmaier *et al.* 2003). Für die *c-mpl*^{-/-}-Mäuse waren jedoch keine Auffälligkeiten in Zellpopulationen des peripheren Blutes, keine Veränderungen lymphoider Zellpopulationen und keine Entwicklung einer Panzytopenie beschrieben.

In dieser Arbeit wird erstmals detailliert der quantitative und qualitative Verlauf hämatopoetischer Vorläufer und reifer Blutzellen der myeloiden und lymphoiden Reihe in der *c-mpl*^{-/-}-Maus über einen Zeitraum von 2 Lebensjahren beschrieben. Dazu wurde seriell im Abstand von 3 Monaten die Zellverteilung verschiedener hämatopoetischer Kompartimente in Wildtyp- und Knockout-Mäusen untersucht, um mögliche Parallelen im Krankheitsverlauf zwischen Mensch und Maus zu identifizieren. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Identifizierung von Hinweisen auf eine altersabhängige Anämie- oder Panzytopenieentwicklung in der *c-mpl*^{-/-}-Maus. Die vertiefende Untersuchung der Hämatopoese sollte aber auch Hinweise auf mögliche Kompensationsmechanismen in der Maus geben, die eine TPO-unabhängige Thrombozytenbildung ermöglichen und eine Panzytopenieentwicklung verhindern. Zusätzlich dazu sollte durch den Vergleich von Wildtyp- und KO-Mäusen die Regu-

lation der Genexpression von hämatopoetischen Stammzellen durch TPO untersucht werden.

5.1 Schwere Einschränkungen von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark von *c-mpl*^{-/-}-Mäusen

Schon frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass TPO nicht nur in der Thrombozytopoese, sondern auch in der frühen Hämatopoese eine essentielle Rolle spielt. In einer Anzahl von Arbeiten konnte eine deutliche Verminderung hämatopoetischer Stammzellen bei fehlendem TPO Rezeptor beobachtet werden (Fox *et al.* 2002, Solar *et al.* 1998, Kaushansky 2005, Ballmaier *et al.* 2001, 2003, Ninos *et al.* 2006). TPO gilt zusammen mit SCF, IL-3 und Flt3-Ligand als früh wirkender Wachstumsfaktor innerhalb der Hämatopoese (Antonschuk *et al.* 2004). Es wird vermutet, dass TPO Einfluss auf das Selbsterneuerungspotential und die Expansion von hämatopoetischen Stammzellen hat (Lewis *et al.* 2000, Ku *et al.* 1996, Kobayashi *et al.* 1996, Grassinger *et al.* 2006). Untersuchungen von *c-mpl*^{-/-}-Mäusen zeigten Einschränkungen vor allem früher myeloider Vorläufer, aber auch multipotenter Vorläufer im Knochenmark (Alexander *et al.* 1996, Carver-Moore *et al.* 1996, Murone *et al.* 1998, Kimura *et al.* 1998). Trotz einer Reihe von Untersuchungen in KO-Mäusen ist bis heute nicht genau geklärt, wie stark diese Vorläufer quantitativ und funktionell eingeschränkt sind und welche Entwicklungsstufen in Knochenmark, Thymus und Milz betroffen sind. In dieser Arbeit konnte detailliert die Bedeutung von TPO für die frühe Hämatopoese in der Maus nachgewiesen werden.

Die Rolle von c-Mpl innerhalb der frühen Hämatopoese im Knochenmark

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass der Verlust des TPO Rezeptors zu einer gravierenden quantitativen und qualitativen Einschränkung des gesamten frühen hämatopoetischen Stammzellpools im Knochenmark führt und sich die Folgen dieser Stammzelleinschränkung in alle hämatopoetischen Kompartimente erstrecken. In jungen (3 Monate) und alten *c-mpl*^{-/-}-Mäusen (2 Jahre) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant starke Reduzierung sehr früher multipotenter Stammzellen sowie verminderte myeloide und lymphoide Vorläuferzahlen in Knochenmark und Thymus beobachtet werden. Durch die Identifizierung und Quantifizierung aller bedeutenden hämatopoetischen Vorläufer können wir ein genaueres Bild der Stammzellsituation im Knochenmark von KO- und Wildtyp-

Mäusen im Altersverlauf zeichnen (**Abb. 5.1**). Diese Untersuchungen zeigten eine Stammzellverminderung aller Differenzierungslinien in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen. Auffallend war die starke Reduzierung des multipotenten Stammzellvorläufers HSC schon bei jungen KO-Mäusen.

Zellanalysen - Knochenmark

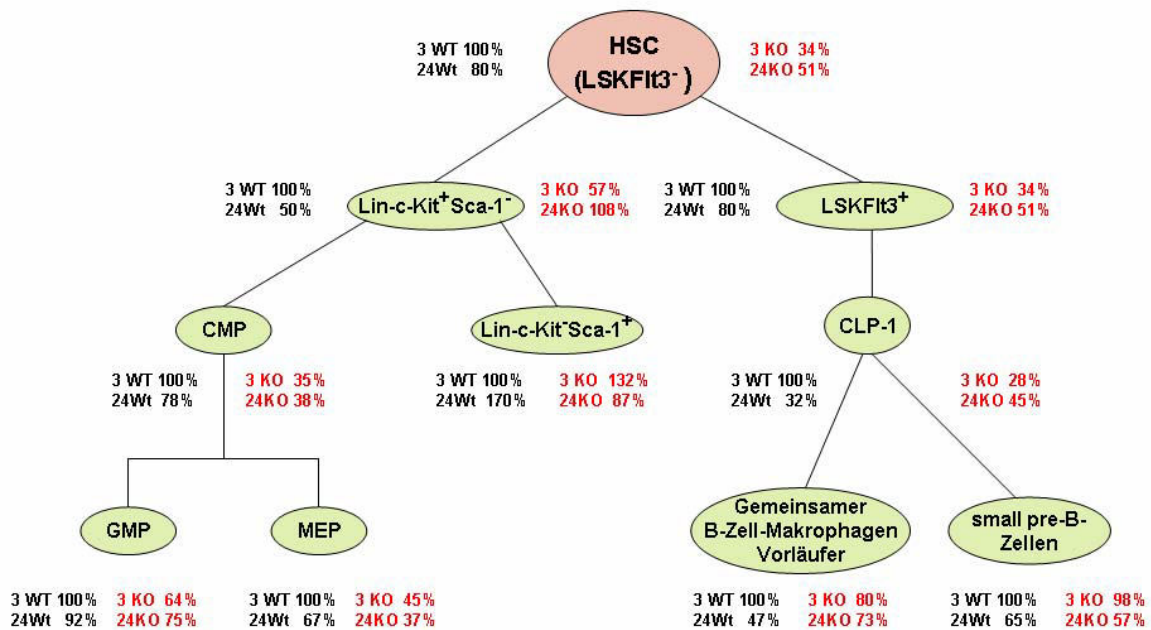


Abbildung 5.1: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten frühen hämatopoetischen Vorläufer im Knochenmark von *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen im Alter von 3 und 24 Monaten. Die dargestellten Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die Werte bei 3 Monate alten Wildtyp-Mäusen.

Diese Verminderung könnte darauf hinweisen, dass TPO eine wichtige Rolle bei der Etablierung der frühen Hämatopoese innerhalb der Embryogenese spielt. Tatsächlich konnte von anderen Autoren ein Einfluss von TPO auf die Entwicklung des Hämangioblasten innerhalb der Embryogenese gezeigt werden. Perlingeiro *et al.* (2003) und Wang *et al.* (2005) zeigten, dass TPO *in vitro* die Bildung von Hämangioblasten-Kolonien (BL-CFC) unterstützt und zusammen mit SCF und VEGF die Proliferation und Differenzierung von Hämangioblastzellen zu CD34⁺ Zellen anregt. Xie und Chan fanden 2002 in murinen embryonalen Stammzellen (ES) *c-mpl* - Expression und konnten zeigen, dass TPO die Proliferation undifferenzierter ES Zellen anregt. Auf Grund dieser Ergebnisse vermuten wir, dass die Stammzellverminderung, die wir im Knochenmark der KO-Mäuse beobachten, möglicherweise

eine „Folgekomplikation“ einer früher in der Embryogenese auftretenden Entwicklungsstörung widerspiegelt.

Die fehlende Wirkung von TPO auf den hämatopoetischen Stammzellpool kann offensichtlich nicht durch andere Zytokine kompensiert werden. Allerdings werden die Einschränkungen, die im Stammzellpool der KO-Mäuse beobachtet werden, in der weiteren Entwicklung durch zusätzliche Mitosen weitgehend ausgeglichen. Nur innerhalb der Megakaryozytopoese und Thrombozytopoese und der T-Zellentwicklung werden auch im Altersverlauf bei den KO-Mäusen deutliche Einschränkungen beobachtet. Ansonsten ist das Knochenmark normozellulär und die KO-Mäuse entwickeln keine Panzytopenie. Abweichend vom Krankheitsbild der CAMT wurden im peripheren Blut trotz verminderter B- und T-Zellzahlen keine Anzeichen für eine Leukozytopenie oder Anämie gefunden. Trotzdem zeigten die KO-Mäuse im Alter von 2 Jahren eine den Patienten ähnliche Erschöpfung des Stammzellpools. Wir beobachteten dabei nicht nur eine quantitative Abnahme des CMP Vorläufers im Knochenmark, sondern auch eine Abnahme der Proliferationsfähigkeit und eine stark eingeschränkte Fähigkeit dieses frühen myeloiden Vorläufers gemischte Kolonien (CFU-Mix) zu bilden. Einen ähnlichen Befund erhielten wir aus der Untersuchung der Erythrozytenvorläufer. Die beobachtete Einschränkung der Expansionsfähigkeit von Vorläuferzellen der myeloiden Linie ist wahrscheinlich eine Folge der Erschöpfung des Stammzellvorläufers HSC. Durch die für die Kompensation der Hämatopoese notwendigen zusätzlichen Mitosen könnte es zu einer Verminderung der Proliferationskapazität von weiter ausdifferenzierten Vorläufern kommen. Trotz dieser Beobachtungen bleibt die Frage offen, ob die Mäuse eine Panzytopenie entwickeln würden, wenn sie ein höheres Lebensalter erreichen könnten.

Transkriptionelle Regulation in hämatopoetischen Stammzellen

Die gravierende Einschränkung früher hämatopoetischer Stammzellen, die in den KO-Mäusen im gesamten Altersverlauf beobachtet wurde, deutet auf eine reduzierte Fähigkeit dieser Zellen auf Selbsterneuerung hin. Im mRNA Expressionsprofil der Lin⁻ Sca-1⁺ Vorläuferzellen fanden sich Hinweise auf mögliche Mechanismen für diese Stammzelleinschränkung. Notch, WNT und BMI1 vermittelte Signalkaskaden sind wichtig für die Inhibition der HSC Differenzierung und somit für die Selbsterhaltung von hämatopoetischen Stammzellen essentiell (Duncan *et al.* 2005,

Pardal *et al.* 2003). Die mRNA Expression von *Wnt2b*, *3a*, *10a* und *Bmi1* war in den LS-Zellen von KO-Mäusen im Alter von 3 Monaten 2fach höher als bei Wildtyp-Mäusen. In 12 Monate alten KO-Mäusen wurde eine erhöhte mRNA Expression von *Wnt10a*, *Bmi1*, *Notch1* und seinem Zielgen, dem Negativregulator der Transkription bHLH gemessen. Möglicherweise ist die Erhöhung der mRNA Expression von *Wnt*, *Bmi1* und *Notch1* in 12 Monate alten KO-Mäusen eine Antwort auf die verringerte Selbsterneuerungs- und Proliferationskapazität von Vorläuferzellen in Folge des TPO Rezeptorverlustes.

Die Homeobox Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren mit bedeutenden Funktionen innerhalb der Embryonalentwicklung. Sie übernehmen Aufgaben bei der Selbsterhaltung von Stammzellen und in der Regulation der Differenzierung verschiedener Zelltypen (Kirito *et al.* 2003). Mäuse die kein *Hoxa9* exprimieren entwickeln weniger Lymphozyten, Granulozyten und linienspezifische Vorläufer, aber zeigen keine Einschränkung in frühen Vorläufern (Owens *et al.* 2002), während eine *Hoxb4* Überexpression *in vitro* in embryonalen Stammzellen zur Erhöhung von repopulationsfähigen Vorläuferzellen führt (Antonchuk *et al.* 2002). Auf Grund der Bedeutung der Hox Gene für die Entwicklung von Stammzellen und der Funktion von TPO als früh agierender Faktor innerhalb der Hämatopoese, vermuteten wir in Vorläuferzellen von KO-Mäusen Veränderungen in der Expression von Hox Genen. Tatsächlich zeigten sich in der mRNA Analyse die für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen bedeutenden *Hoxa5*, *Hoxb5* und *Hoxa9* Gene und der Kofaktor von HOXA9 - MEIS1 - in KO-Mäusen runterreguliert. Interessanterweise waren *Hoxa4* und *Hoxb4* in 12 Monate alten KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht hochreguliert. Dieses stand im Kontrast zu den Ergebnissen von Kirito *et al.* (2003), die eine Erhöhung der *Hoxb4* mRNA Expression durch TPO in hämatopoetischen Vorläuferzelllinien als wesentlichen Mechanismus für die Wirkung von TPO auf frühe hämatopoetische Stammzellen postulierten. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass dieser Mechanismus *in vivo* offensichtlich keine Rolle zu spielen scheint.

Bedeutung der Stammzellnische

Während dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob die Mikroumgebung der Stammzelle im Knochenmark, die so genannte „Stammzellnische“, Einfluss auf diese Prozesse hat. Tatsächlich erfolgt die Selbsterhaltung, Proliferation und Migration früher Stammzellen in enger Wechselwirkung mit den Zellen der Stammzellnische, so dass eine Beteiligung nicht auszuschließen ist. Liang *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die Einnistung junger HSCs in das Knochenmark alter Mäuse um 70% verringert war. Das deutet auf eine veränderte Funktion der Stromazellen in alten Mäusen hin. Möglicherweise sind die Zell-Zell-Interaktionen und somit die Kommunikation zwischen Stammzellen und Stromazellen gestört. Tatsächlich produzieren gealterte Stromazellen geringere Mengen IL-7 und SDF-1 und zeigen eine eingeschränkte Fähigkeit die B-Zellproliferation zu unterstützen (Petit *et al.* 2002).

Einen Hinweis auf eine veränderte Mikroumgebung der Hämatopoese könnten die Ergebnisse der cDNA Microarray Untersuchungen liefern: Die von uns für die mRNA Expressionsuntersuchung sortierte Zellpopulation LS enthielt auch Osteoblasten, die genau wie die frühen hämatopoetischen Stammzellen c-Kit und Sca-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Gattei *et al.* 1996, van Vlasselaer *et al.* 1994). Die Osteoblasten sind der Hauptproduzent von SDF-1, das unter anderem Migration und Proliferation von Stammzellen reguliert. Das Resultat der Untersuchung dieser LS Zellpopulation verdeutlichte, dass die *Sdf1* mRNA Expression in Wildtyp-Mäusen im Alter von 12 Monaten um mehr als 50% hochreguliert wird, während in der KO Maus Population die Expression gleich bleibt.

5.2 Quantitative Veränderungen innerhalb der Myelopoese von *c-mpl*^{-/-}-Mäusen

In mehreren Untersuchungen wurde die Einschränkung des myeloiden Vorläuferpools in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen beschrieben (Alexander *et al.* 1996, Carver-Moore *et al.* 1996, Murone *et al.* 1998, Kimura *et al.* 1998). Viele unserer Daten konnten diese Ergebnisse bestätigen. Wie erwartet waren sowohl der gemeinsame Vorläufer der myeloiden Zellen CMP und Vorläufer von Megakaryozytopoese und Erythrozytopoese MEP stark reduziert. Besonders starke Einschränkungen wurden bei Vorläufern der erythrozytären und megakaryozytären Linien und bei den Thrombozyten im peripheren Blut, die den Endpunkt der megakaryozytären Entwicklung darstellen,

gefunden. Dieses ist einem kumulativen Effekt auf Grund der Wirkung von TPO in der frühen Hämatopoese und als linienspezifischer Faktor innerhalb der Megakaryozytopoese zuzuschreiben.

Parallel zur Verminderung der megakaryozytären Vorläufer beobachteten wir eine verminderte mRNA Expression vieler für die Megakaryozytopoese beschriebener wichtiger Faktoren wie TAL1/SCL, Nf-e2, GATA-1 und STAT3 in den Lin⁻ Sca⁺ Vorläufern der *c-mpl*^{-/-}-Mäuse.

In dieser Arbeit konnte erstmals die quantitative Verteilung der verschiedenen myeloiden Vorläufer (CMP, MEP, GMP) in verschiedenen Entwicklungsstadien und unterschiedlichen hämatopoetischen Kompartimenten von KO- und Wildtyp-Mäusen gezeigt werden (**Abb. 5.2**).

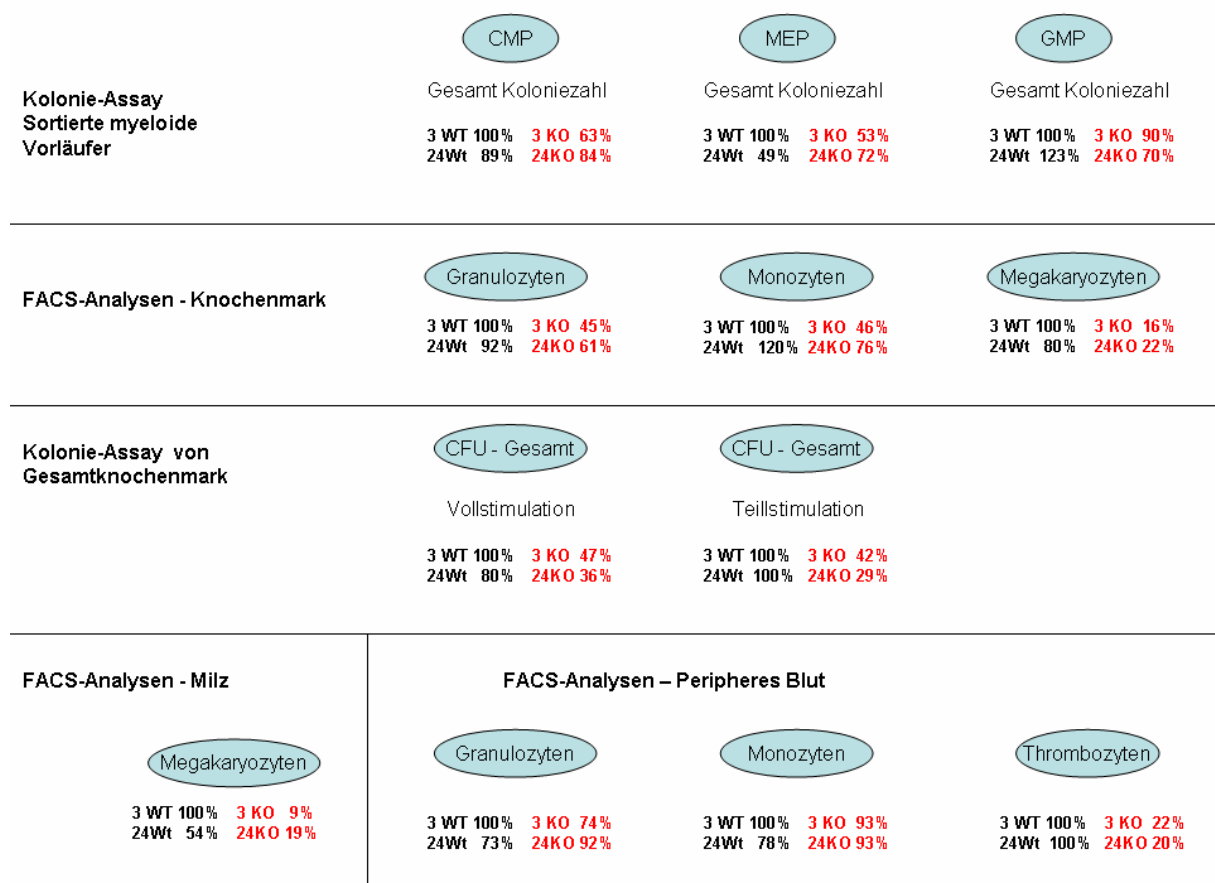


Abbildung 5.2: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Zellen der myeloiden Reihe in *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen im Alter von 3 und 24 Monaten. Die dargestellten Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die Werte bei 3 Monate alten Wildtyp-Mäusen.

Um herauszufinden, ob die verminderten myeloiden Vorläufer (CMP, MEP, GMP) in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen auch funktionell eingeschränkt sind, wurden diese in *in vitro* Assays zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Diese Untersuchungen wiesen ein deutlich verringertes klonogenes Potential dieser Vorläufer nach, was weitestgehend dem Befund in CAMT Patienten entspricht.

Für CAMT Patienten konnte in unserer Gruppe nicht nur eine Reduktion von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, sondern auch ein stark vermindertes klonogenes Potential dieser Stammzellen *in vitro* gezeigt werden (Ballmaier *et al.* 2003).

In den KO-Mäusen konnte die stärkste Einschränkung für erythrozytäre und megakaryozytäre Kolonien sowie für HPP-CFC (*high proliferative potential-colony forming cells*) aus dem CMP Vorläufer nachgewiesen werden (**Abb. 5.2**). Die CMP und MEP Vorläufer zeigten im Alter von 2 Jahren eine deutliche Erschöpfung ihres replikativen Potentials. Sie waren nicht nur quantitativ im Knochenmark noch stärker vermindert als in jungen KO-Mäusen, sondern wiesen außerdem eine stark eingeschränkte Proliferationskapazität auf, die auf eine Stammzellerschöpfung hindeutet. Dieser Befund zeigte sich deutlich im Kolonie-Assay von Gesamtknochenmarkzellen. Möglicherweise wird dieser Effekt durch eine erhöhte Zahl von Zellteilungen hervorgerufen, die eine verfrühte Alterung induzieren, (*stress-induced premature senescence* – SIPS) (Toussaint *et al.* 2000).

Replikative Seneszenz wird als Erschöpfung des Proliferationspotentials von Zellen definiert (Toussaint *et al.* 2000). So kann z. B. ein T-Lymphozyt maximal 80 Zellverdoppelungen nach der Generierung aus einem T-Zell-Vorläufer im Knochenmark durchlaufen (Adibzadeh *et al.* 1995). Charakteristika der replikativen Seneszenz sind z.B. permanenter Zellzyklusarrest, DNA-Abbau und Induktion spezifischer apoptosefördernder Signaltransduktionswege (Meng *et al.* 2003). Tatsächlich kann ein Zustand verfrühter Seneszenz durch Chemotherapie oder Bestrahlung in Vorläuferzellen künstlich erzeugt werden, die dann alle Merkmale replikativer Seneszenz von Vorläuferzellen aus alten Tiere zeigen (Meng *et al.* 2003). Auf Grund der begrenzten Proliferationskapazität differenzierter Zellen kann ein Mechanismus, der durch zusätzliche Zellteilungen eine Stammzelleinschränkung kompensiert, über lange Zeiträume nur bedingt erfolgreich sein. Vermehrte asymmetrische Zellteilungen von HSCs, die einerseits der Selbsterneuerung und andererseits der Bildung multi-

potenter Vorläufer dienen, führen in KO-Mäusen wahrscheinlich schon im Alter von 15 Monaten zu einer replikativen Seneszenz und Erschöpfung früher Stammzellen.

Die quantitative Einschränkung des GMP Vorläufers im Knochenmark ist moderater und bleibt im Altersverlauf ungefähr gleich. Interessant ist, dass dieser Vorläufer über den gesamten Altersverlauf durch zusätzliche Zellteilungen in ganz unterschiedlichen Entwicklungsstadien sehr erfolgreich die Stammzelleinschränkung ausgleichen kann. Im Knochenmark wurde im Alter sogar eine Erhöhung reifer Granulozyten und Monozyten in KO- und Wildtyp-Mäusen beobachtet. Dieser Effekt wurde für Mäuse im Alter von 20 Monaten von Wang *et al.* (1995) beschrieben. Hier konnte eine vermehrte Monozytenbildung im Alter als Folge einer reduzierten Funktion dieser Zellen beobachtet werden. Das Auftreten dieser Funktionseinschränkung ist möglicherweise eine Folge der replikativen Seneszenz früher Stammzellen. Bestätigt wird dieses Ergebnis auch von der Arbeitsgruppe um Barrat *et al.* (1999), die in 23 Monate alten Mäusen um 20% erhöhte Monozyten- und Granulozytenzahlen im Knochenmark fanden.

Megakaryozytopoese und Thrombozytenbildung in der $c\text{-mpl}^{-/-}$ -Maus

Trotz dieser beschriebenen quantitativen und funktionellen Einschränkungen der myeloiden Reihe sind die KO-Mäuse in der Lage über die gesamte Lebensspanne von 2 Jahren eine TPO-unabhängige Megakaryozytopoese aufrechtzuerhalten. Tatsächlich kommt es trotz einer um 90% reduzierten Thrombozytenzahl zu einem ausreichend schnellen Blutungsstopp in den KO-Mäusen. Die verbleibenden Megakaryozyten sind in $c\text{-mpl}^{-/-}$ -Mäusen morphologisch identisch mit denen in Wildtyp-Mäusen und können funktionell aktive Thrombozyten bilden (Bunting *et al.* 1997). Auf Grundlage dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren, dass TPO nur für die Regulation der Thrombozytenzahlen, nicht aber für deren Ausreifung essentiell ist. Ein interessantes Experiment von Levin *et al.* (2001) gab einen weiteren Hinweis für die TPO-unabhängige Regulation der Thrombozytenbildung: Obwohl in $c\text{-mpl}^{-/-}$ -Mäusen alle frühen Vorläufer stark eingeschränkt sind, können die Mäuse nach 5-Fluorouracil-Gabe in der Regenerationsphase der Hämatopoese erhöhte Zellzahlen aller myeloiden Vorläufer bilden. Interessanterweise wurde in dieser Phase auch eine erhöhte Zahl von Megakaryozyten generiert, was vorübergehend zu normalen Thrombozytenzahlen im Blut führte.

Die im wesentlichen für diese Regulation verantwortlichen Faktoren konnten kürzlich als SDF-1 (*stromal-cell derived factor*) und FGF-4 (*fibroblast growth factor*) identifiziert werden (Avecilla *et al.* 2004).

Einige frühe Vorläuferpopulationen im Knochenmark können ohne Wirkung von TPO zumindest über einen begrenzten Zeitraum ausreichende Mengen von Megakaryozyten bilden. Möglicherweise spielt dabei die Stammzellnische eine wichtige Rolle.

Es gibt einige Hinweise darauf, dass in der TPO unabhängigen Megakaryozytenbildung auch Erythropoetin eine wichtige Rolle spielt. Auf Grund des gemeinsamen Ursprungs von Megakaryozyten und Erythrozyten wird schon länger ein wechselseitiger Einfluss der „linienspezifischen“ Faktoren TPO und EPO auf Erythrozytopoese und Megakaryozytopoese vermutet, der experimentell bestätigt werden konnte: Hiernach exprimieren mehr als 90% der Zellen der MEP Population und reife Megakaryozyten den EPO Rezeptor (Terskikh *et al.* 2003, Kieran *et al.* 1996). Metcalf *et al.* (2002) konnten in *in vitro* Assays zeigen, dass EPO als Einzelstimulus in der Lage war, mehr Megakaryozyten-Kolonien zu induzieren als TPO. SCF und EPO zusammen induzierten die Bildung von doppelt soviel Megakaryozyten-Kolonien als eine Kombination von SCF und TPO. Andererseits können TPO und SCF *in vitro* in EPO Rezeptor^{-/-} Leberzellen die Bildung von BFU-E stimulieren. Diese Kolonien sind morphologisch normal und exprimieren den c-Mpl Rezeptor (Kieran *et al.* 1996).

In myelosupprimierten Mäusen kann TPO die Erythrozytenvorläuferzahl deutlich erhöhen und Retikulozytenbildung anregen (Kaushansky *et al.* 1995). In der Erythropoese kann TPO als später Faktor bei der Differenzierung von Erythrozyten mitwirken (Liu *et al.* 1999). Diese Ergebnisse bestätigen, dass EPO und TPO Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der jeweils anderen Zellreihe haben. Der Grund hierfür liegt womöglich in der großen Übereinstimmung von Signalmolekülen innerhalb der EPO und TPO Signalkaskade und in der Überlappung linien-spezifischer Transkriptionsfaktoren wie GATA-1 und GATA-2. Beide Zytokine induzieren durch Bindung an ihren Rezeptor über einen JAK/STAT vermittelten Signalweg gemeinsame intrazelluläre Faktoren (Ghezzi *et al.* 2004, Kaushansky *et al.* 2005).

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die intrazytoplasmatischen Domänen verschiedener Zytokinrezeptoren in ihrer Wirkung teilweise

ersetzen können: So konnten z.B. Stoffel *et al.* (1999) mit einem chimären Rezeptor, der aus einer extrazellulären c-Mpl Domäne und einer intrazellulären G-CSF-Rezeptordomäne bestand, in einem Knock-In Modell durch Stimulation mit TPO eine normale Thrombozytenbildung induzieren. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass zumindest für einen Teil der MEP Vorläufer die Entscheidung über die Richtung der Zelldifferenzierung in megakaryozytäre oder erythrozytäre Vorläufer zytokinunabhängig nach dem stochastischen Modell erfolgt.

Die linienspezifischen Faktoren steuern in diesem Modell nicht die Differenzierung des MEP Vorläufers, sondern vermitteln antiapoptotische Signale und erhöhen die Proliferationsfähigkeit bereits differenzierter Zellen.

5.3 Beeinträchtigung der Lymphopoese bei *c-mpl*^{-/-}-Mäusen

Innerhalb der komplexen Entwicklungsreihe hämatopoetischer Stammzellen finden sich frühe lymphoide Vorläufer im Knochenmark nur sehr selten. Die bisher frühesten beschriebenen lymphoiden Vorläuferzellen befinden sich in der LSK Flt3⁺ CD127⁺ CD44^{hi} (LSKflt3⁺) Stammzellpopulation. Diese multipotente Subpopulation ist heterogen: Ein Teil der LSKflt3⁺ Zellen exprimiert RAG1 und RAG2 und wird dann ELP (*early lymphoid progenitor*) genannt. Der CLP (*common LP*) differenziert sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem ELP und ist auf Grund neuester Erkenntnisse kein gemeinsamer Vorläufer für die gesamte lymphoide Entwicklungslinie sondern eher ein sehr früher B-Zellvorläufer (Bhandoola *et al.* 2006, Miller *et al.* 2003). Ein weiterer früher lymphoide Vorläufer ETP konnte im Thymus in der TN1 Population identifiziert werden. Der ETP Vorläufer entwickelt sich im Thymus wahrscheinlich auf einem CLP unabhängigen Weg und zeigt große phänotypische Ähnlichkeit mit dem multipotenten LSKflt3⁺ Vorläufer.

Ein Einfluss von TPO auf die Lymphopoese wurde bisher nicht beschrieben. Umso interessanter ist die von uns erstmals gezeigte Einschränkung der lymphoiden Vorläufer in Folge des *c-mpl* - Defekts. Schon in jungen KO-Mäusen beobachten wir eine starke Verringerung des prozentualen Anteils von LSKflt3⁺ und CLP Vorläufern (um 70%) im Knochenmark im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der frühe ETP Vorläufer und die frühen T-Zellstadien TN1-4 im Thymus sind ähnlich stark betroffen (**Abb. 5.3.**). Der Thymus hat eine besondere Rolle in der Hämatopoese inne. Obwohl im Thymus sehr frühe HSCs ausdifferenzieren, bietet er keine Nische für die Selbst-

erneuerung von Stammzellen. Man nimmt an, dass der Thymus kontinuierlich von frühen lymphoiden Vorläufern (LSK CD127⁻) aus dem Knochenmark besiedelt wird, die im Blut zirkulieren (Pelayo *et al.* 2005). Tatsächlich fanden Schwarz und Bhandoola (2004) zirkulierende LSKflt3⁻, LSKflt3⁺ und ELP aber keine CLP Vorläuferzellen im peripheren Blut. Wenn signifikant weniger oder funktionell eingeschränkte LSKflt3⁺ Vorläufer den Thymus der KO-Mäuse besiedeln, könnte daraus eine Verminderung des ETP Vorläufers resultieren. Die deutliche Verminderung früher lymphoider Vorläufer in Knochenmark und Thymus entsteht wahrscheinlich in Folge der quantitativen und funktionellen Einschränkung der multipotenten Vorläuferzellen HSC (**Abb. 5.1**). Anscheinend sind diese frühen lymphoiden Vorläufer in dieser Differenzierungsphase nicht in der Lage durch vermehrte Zellteilungen das Stammzelldefizit auszugleichen. Erst im Rahmen der linienspezifischen Differenzierung beobachten wir in den KO-Mäusen eine durch zusätzliche Zellteilungen in der B-Zell-Entwicklung stattfindende Kompensation.

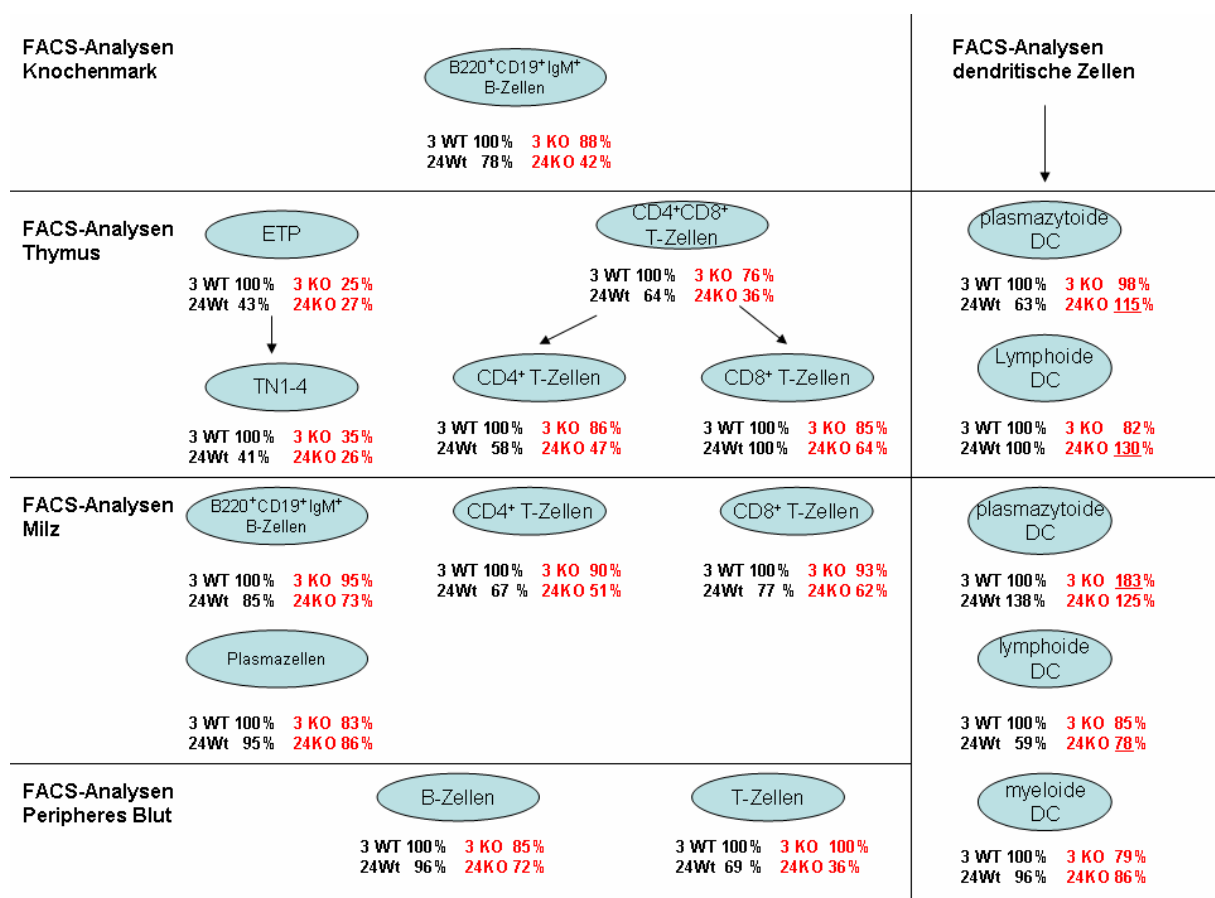


Abbildung 5.3: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten lymphoiden Zellen und dendritischen Zellen in *c-mpl*^{-/-}- und *c-mpl*^{+/+}-Mäusen im Alter von 3 und 24 Monaten. Die dargestellten Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die Werte bei 3 Monate alten Wildtyp-Mäusen.

Dieser Mechanismus sorgt dafür, dass sich die drastische Reduzierung des CLP und ETP Vorläufers in der Peripherie junger KO-Mäuse zunächst nicht auswirkt. Reife T-Zellen sind im Thymus junger Mäusen nur moderat vermindert. Obwohl sich bereits in KO-Mäusen im Alter von 12 Monaten eine Verminderung doppelt positiver T-Zellen im Thymus um die Hälfte einstellt, beobachten wir die Auswirkungen dieser Einschränkung in reifen T-Zellen erst im Alter von 2 Jahren. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir aus den Untersuchungen von T-Zellen in der Milz. Im peripheren Blut beginnt eine kontinuierliche signifikante Verminderung von CD3⁺ T-Zellen ab einem Alter von 12 Monaten (**Abb. 5.3**). In der B-Zellreihe beobachteten wir einen ähnlichen Effekt. Während der kleine prä B-Zellvorläufer schon in einem Alter von 12 Monaten reduziert ist, finden wir erst im Alter von 2 Jahren eine Verminderung reifer B-Zellen im Knochenmark. Im peripheren Blut ist der prozentuale Anteil von B-Zellen (75%) in KO-Mäusen im Alter von 2 Jahren nicht so stark verringert wie der von T-Zellen (59%) (**Abb. 5.3**).

B-Zellen und Plasmazellen sind in der Milz nur leicht vermindert und spiegeln in diesem hämatopoetischen Organ nicht die starken Einschränkungen im Knochenmark wieder. Ein ähnlicher Effekt wurde für alte Mäuse beschrieben. So findet man, trotz stark verminderter B-Zellvorläufer im Knochenmark, normale Zellzahlen für reife B-Zellen in der Milz. Gründe dafür sind eine im Alter zunehmende Lebensdauer von B-Zellen und die Anreicherung von IgM⁺ B-Zellen und Gedächtniszellen in der Milz (Kline *et al.* 1999). Obwohl die Zellzahl normal ist, zeigen sich in der Diversität der B-Zellen erhebliche Einschränkungen (Weksler *et al.* 2002) und die Repopulationsfähigkeit ist deutlich vermindert (Kim *et al.* 2003).

5.4 Veränderungen dendritischer Zellpopulationen in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen

Dendritische Zellen wurden in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen bisher nicht untersucht. Da dendritische Zellen sich wahrscheinlich aus Vorläufern ableiten, die in den KO-Mäusen reduziert sind und TPO einen Einfluss auf die Bildung von spezifischen Vorläufern dendritischer Zellen hat (Arrighi *et al.* 1999), war für uns interessant, ob sich ein Ausfall des TPO Rezeptors *in vivo* negativ auf die Produktion von dendritischen Zellen auswirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden myeloide dendritische Zellen (MDC: CD11c⁺ CD11b⁺ CD8⁻ B220⁻), lymphoide dendritische

Zellen (LDC: CD11c⁺ CD11b⁻ CD8⁺ B220⁻), sowie plasmazytoide dendritische Zellen (PDC: CD11c⁺ CD11b⁻ CD8⁻ B220⁺) in Thymus und Milz untersucht (Einteilung nach: Björck 2001).

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen, die für die Erhaltung der Selbsttoleranz und die Initiierung einer Immunantwort verantwortlich sind. Die Gruppe dendritischer Zellen ist heterogen und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen innerhalb des Immunsystems (Wu *et al.* 2001). Bisher ist wenig über dendritische Vorläufer im Knochenmark bekannt. Ursprünglich vermutete man einen myeloiden Vorläufer für MDCs und einen lymphoiden Vorläufer für LDCs im Knochenmark auf Grund der Expression des Oberflächenmarkers CD8. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Flt3⁺ Fraktionen myeloider und lymphoider Vorläufer (CMP, CLP, ELP) im Knochenmark CD8⁺ und CD8⁻ dendritische Zellen bilden können (D'Amico *et al.* 2003). Ein dendritischer Vorläufer wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Fogg und Geissman (2006) in der LK Population entdeckt. Immunophänotypisch befindet sich dieser Vorläufer sehr nah am GMP Vorläufer. Er exprimiert Lin⁻ c-Kit⁺ CD16/32⁺ CD34⁺ CX3CR1⁺ und generiert CD11b⁺ Makrophagen und CD11c⁺ dendritische Zellen (Fogg *et al.* 2006).

Die Ergebnisse aus den FACS-Analysen von dendritischen Zellen in KO-Mäusen waren vor diesem Hintergrund überraschend. Tatsächlich waren zwar die MDCs, die sich höchstwahrscheinlich aus myeloiden Vorläufern ableiten, in der Milz moderat vermindert. Ganz anders stellte sich uns jedoch die Situation für die PDC und LDC Populationen dar: Bei den KO-Mäusen beobachteten wir im Thymus eine altersabhängige Zunahme von PDCs (um 17%) und LDCs (um 57%), während in der Kontrollgruppe die LDC Zahlen im Altersverlauf gleich blieben und die PDC Zahlen sogar abnahmen (**Abb. 5.3**). In der Milz waren die LDCs in jungen KO-Mäusen (3 Monate) leicht vermindert, bleiben aber im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, bei denen im Alter eine deutliche Reduktion festzustellen war, im Altersverlauf unverändert. Interessanterweise beobachteten wir eine signifikant vergrößerte PDC Population (um 88%) in jungen KO-Mäusen. Im Altersverlauf sank dieser Anteil allerdings wieder auf 90% im Vergleich zum Wildtyp ab (Abb. 5.3.). Offensichtlich hat der Verlust des TPO Rezeptors nur einen negativen Einfluss auf dendritische Zellen, die sich aus myeloiden Vorläufern entwickeln. Tatsächlich konnte die Expression des TPO Rezeptors auf humanen myeloiden dendritischen Zellen (Kumamoto *et al.* 1999) und ein synergistischer Einfluss von TPO bei der *in vitro* Generierung von

myeloiden dendritischen Zellen aus CD34⁺ Zellen nachgewiesen werden (Encabo *et al.* 2004).

Die Rolle von PDCs im Thymus ist weitgehend unbekannt. PDCs entstehen im Thymus unabhängig von T-Zellen (Ferrero *et al.* 2002). Es deutet einiges darauf hin, dass sich PDCs aus LSK Flt3⁺ CD62L⁺ Vorläufern im Knochenmark und Thymus über die Zwischenstufen ELP, CMPflt3⁺ und CLPflt3⁺ entwickeln (Pelayo *et al.* 2005). Danach gelangen die ausdifferenzierten PDCs ähnlich wie B-Zellen über das Blut in die lymphoiden Organe (Naik *et al.* 2005). Ausgehend von diesen Untersuchungen entwickeln sich die PDCs und LDCs möglicherweise aus einer TPO-unabhängigen Vorläuferpopulation, die in den KO-Mäusen ausreichende Zellzahlen produzieren kann. Allerdings konnte *in vitro* auch ein positiver Einfluss von TPO auf die Generation plasmazytoider dendritischer Zellen aus HSCs gezeigt werden (Chen *et al.* 2004). Wahrscheinlich handelt es sich daher bei der Erhöhung der DC Subpopulationen eher um einen sekundären Effekt des c-Mpl Defekts. Die DCs als Produzenten hämatopoetischer Wachstumsfaktoren könnten auch als Antwort auf die Stammzellverminderung in KO-Mäusen regulatorisch erhöht sein: Tatsächlich gibt es Hinweise auf einen möglichen Einfluss von antigenstimulierten dendritischen Zellen auf die Expansion hämatopoetischer Vorläufer im Knochenmark von Mäusen. Dabei sollen diese DCs *in vivo* durch Expression löslicher Mediatoren wie TPO, IL-6 und IL-12 und durch Zell–Zell Interaktionen mit Stammzellen sogar die Megakaryozytopoese unterstützen (Wang *et al.* 2001).

Insgesamt bleiben die Mechanismen, die für diesen Befund in den KO-Mäusen verantwortlich sind, unklar und müssen weiter untersucht werden.

5.5 Altersabhängige Veränderungen der Hämatopoese in *c-mpl*^{+/+}- und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen

Unsere Ergebnisse aus den Untersuchungen von *c-mpl*^{+/+}- und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen im Alter von 22-25 Monaten, müssen im Kontext mit bereits beschriebenen altersabhängigen Veränderungen innerhalb der Hämatopoese von Wildtyp-Mäusen gesehen werden. Der Alterungsprozess wird durch einen graduellen Verlust des Zellentwicklungspotentials begleitet (Kamminga *et al.* 2006). Anders als früher angenommen unterliegen auch die sich selbsterneuernden Stammzellen Hayflicks „mitotischer Uhr“ (de Haan *et al.* 1997, Hayflick *et al.* 1961). Stammzellen von alten

Mäusen zeigen eine verminderte Repopulationseffizienz im Vergleich zu jungen Mäusen, die auf Veränderungen intrinsischer Faktoren beruht (Linton *et al.* 2004).

Altersabhängige Veränderungen in hämatopoetischen Stammzellen

Es häufen sich Hinweise dafür, dass die „Stammzellqualität“ mit jeder Selbsterneuerungsteilung abnimmt (van Zant 1997). Tatsächlich beobachteten wir in den von uns untersuchten KO-Mäusen nicht nur eine Einschränkung des Selbsterneuerungspotentials früher Stammzellen, sondern auch eine verminderte Fähigkeit, *in vitro* Kolonien zu bilden und eine reduzierte Proliferationsfähigkeit. Diese Defekte sind möglicherweise Ausdruck für einen früh einsetzenden beschleunigten Alterungsprozess von Stammzellen in KO-Mäusen als Folge einer andauernden hämatopoetischen Stresssituation. Van Zant (2003) vertritt die Hypothese, dass Stammzellen innerhalb des Alterungsprozesses zelluläre Schädigungen anhäufen, die ihr Entwicklungspotential und ihre Fähigkeit zur Blutzellregeneration vermindern. Diese veränderte Stammzellfunktion wird besonders in hämatopoetischen Stresssituationen sichtbar und äußert sich in einer fehlerhaften Neubildung früher Vorläufer, in einem frühen Auftreten replikativer Seneszenz differenzierter Zellen und in einem eingeschränkten Selbsterneuerungs- und Expansionspotential von Stammzellen.

Die Arbeitsgruppe um Morrison *et al.* (1996) fand heraus, dass die Mehrzahl der HSCs in jungen und mittelalten Mäusen in der G₀-Phase ruht, während sich in alten Mäusen fast alle HSCs im Zellzyklus befinden. Weitere Untersuchungen in der Maus konnten intrinsische Faktoren als Hauptursache für die altersabhängige Stammzellerschöpfung identifizieren. Aus jeder Zellteilung resultieren DNA Veränderungen, die durch Versagen von Reparatur-Mechanismen entstehen können (Prasher *et al.* 2005). Diese DNA Läsionen häufen sich je nach Replikationsgeschichte einer Stammzelle früher oder später im Alterungsprozess an und können Ursache einer Stammzellerschöpfung sein. Folge von DNA Läsionen können z.B. Heterochromatinverluste sein. Die graduellen Veränderungen in der Heterochromatinstruktur der DNA im Alter reflektieren die Anzahl der Zellteilungen einer Stammzelle und resultieren in einer veränderten Genexpression, die zur Transkription von Genen führt, die nicht mehr stammzellspezifisch sind (Kamminga *et al.* 2006).

Ein weiterer Faktor für die replikative Seneszenz in HSCs ist das Ansteigen von altersbedingten Proteinveränderungen durch oxidativen Stress. Eine Vielzahl von

Untersuchungen konnte einen Anstieg der Carbonylierung und eine vermehrte Proteolyse in alten Zellen zeigen (Levine *et al.* 2002). Induziert man in Mäusen hämatopoetischen Stress durch radioaktive Bestrahlung oder Verabreichung von Chemotherapeutika, verändert sich die Zellzyklusregulation. Interessanterweise werden dabei Zellzyklusproteine exprimiert, die als Biomarker für replikative Seneszenz gelten (Wang *et al.* 2006).

Zytokine haben als extrinsische Faktoren ebenfalls Einfluss auf altersabhängige Veränderungen von Stammzellen. Tatsächlich ändert sich das Profil der Zytokinproduktion in alten Mäusen. So nimmt die IL-2 Produktion in der Milz im Alter deutlich ab, während die IFN-gamma Bildung zunimmt. Die Arbeitsgruppe um Henckaerts *et al.* (2004) konnte eine dramatische Einschränkung der Proliferationsantwort von LSK Zellen alter Mäuse auf Flt3 Ligand und TPO feststellen.

Fasst man all diese Ergebnisse zusammen, zeigen hämatopoetische Stammzellen als Folge von hämatopoetischem Stress oder natürlichen Alterungsprozessen deutliche Anzeichen einer Stammzellerschöpfung und haben damit eine limitierte Lebenserwartung. Da der TPO Rezeptordefekt in den von uns untersuchten Mäusen wahrscheinlich zu einer hämatopoetischen Stresssituation führt, muss man in KO-Mäusen viel früher als in Wildtyp-Mäusen mit einer replikativen Seneszenz von klonal expandierenden Stammzellen und als Folge mit einer früheren Stammzellerschöpfung rechnen. Die Ergebnisse aus der mRNA Analyse hämatopoetischer Vorläuferzellen konnten zeigen, dass einige der Gene, die als hochreguliert in ruhenden Stammzellen beschrieben wurden, in den KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Expression deutlich vermindert waren. Dazu gehörten *Abcg2*, das für einen ABC Transporter kodiert, der für den für Stammzellen beschriebenen „*side population* „ Phänotyp verantwortlich ist (Zhou *et al.* 2001), *Cdkn1c* (p57/Kip2), ein Hauptregulator für den Zellzyklusarrest von ruhenden Stammzellen (Umemoto *et al.* 2005) sowie die Transkriptions-Repressoren *E2f6* (Trimarchi *et al.* 1998) und *Rb1* (p107, Zhamanian & La Thangue 1993). Die verminderte Expression dieser für ruhende Stammzellen wichtigen Faktoren könnte bedeuten, dass auf Grund der verringerten myeloiden und lymphoiden Vorläuferzahlen in den KO-Mäusen nur noch wenige HSCs ruhen und die Mehrzahl der Stammzellen proliferiert, um den Zellpool in der Peripherie aufzufüllen. Die mRNA Analyseergebnisse bestätigen damit unsere These einer replikativen Seneszenz der Stammzellen in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen. Unsere Beobachtungen können einen Hinweis auf den Mechanismus des auch von anderen

Arbeitsgruppen beobachteten Effekte von TPO auf den Selbsterhalt und die Proliferation früher Stammzellen geben (Grassinger *et al.* 2006, Neelis *et al.* 1998, Lewis *et al.* 2000, Yagi *et al.* 1999).

Altersabhängige Veränderungen zeigten sich in einer signifikanten Reduktion der Anzahl an CLP Vorläuferzellen nicht nur in KO-Mäusen, sondern auch in 24 Monate alten Wildtyp-Mäusen. Miller und Allman (2003) konnten diese altersabhängige Reduzierung des CLP Vorläufers um 90% in 20 Monate alten Mäusen zeigen. Während der LSKflt3⁺ Vorläufer in den Wildtyp-Mäusen im Altersverlauf kontinuierlich abnahm, blieb dieser Vorläufer in der KO-Maus immer gleich stark vermindert. Die signifikante Abnahme des CLP Vorläufers in den KO-Mäusen im Alter scheint unabhängig vom TPO Rezeptordefekt zu sein, da sie auch bei den Wildtyp-Mäusen beobachtet wird. Parallel verlief auch die altersabhängige Zunahme des LS Vorläufers im Knochenmark von KO- und Wildtyp-Mäusen. Diese wurde für Wildtyp-Mäuse schon in Studien von Morrison *et al.* (1996) und Sudo *et al.* (2000) beschrieben.

Altersabhängige Veränderungen in der Myelopoese

Detaillierte Untersuchungen altersabhängiger Veränderungen sind in Mäusen hauptsächlich für lymphoide Zellen und kaum für myeloide Zellen beschrieben. Die wenigen Ergebnisse die es aus Untersuchungen der Myelopoese gibt, sind zum Teil kontrovers. So beobachteten Wang *et al.* (1995) im Alter erhöhte Makrophagenzahlen im Knochenmark, während Morrison *et al.* (1996) keine Veränderungen in der myeloiden Reihe zeigen konnten. Altersabhängige Veränderungen der Immunantworten die durch Makrophagen oder neutrophile Granulozyten vermittelt werden, wurden durch Plackett *et al.* (2004) beschrieben. Daraus geht hervor, dass diese Dysfunktion eine Folge der altersabhängigen Veränderungen der Makrophagen-Gewebeumgebung ist (Stout *et al.* 2005). Trotz der verminderten T-Zellzahlen als Folge der Thymusatrophie sind Makrophagen und dendritische Zellen im Alter kaum reduziert (Varas *et al.* 2003).

Die Arbeitsgruppe von Min *et al.* (2005) fand keine Unterschiede in der Frequenz von CMP, GMP und MEP Vorläufern zwischen jungen und alten Mäusen im Knochenmark während Rossi und Mitarbeiter (2005) in alten Mäusen eine erhöhte Zahl von GMP Vorläufern fanden. Wir konnten den Befund von H. Min für die GMP und CMP

Vorläufer in Wildtyp-Mäusen bestätigen, beobachteten aber im Unterschied zu seinen Ergebnissen eine deutliche Verringerung des prozentualen Anteils des MEP Vorläufers (um 33%) im Knochenmark alter Wildtyp-Mäuse. Die sortierten MEP Vorläufer aus alten Wildtyp-Mäusen zeigten im Unterschied zu den aus jungen Wildtyp-Mäusen eine verringerte Fähigkeit CFU-E, CFU-Meg und CFU-Meg/E zu bilden.

Auf den ersten Blick schienen die Ergebnisse der Stammzellassays aus Gesamtknochenmarkzellen diesen Daten zu widersprechen. Es wurde hier keine altersabhängige Verringerung in der Anzahl an megakaryozytären und erythrozytären Kolonien in alten Wildtyp-Mäusen beobachtet. Das deutet darauf hin, dass sich diese Kolonien aus dem CMP Vorläufer entwickeln. Die CMP Vorläuferzellen aus alten Wildtyp-Mäusen waren in der Lage, normale Zahlen an CFU-E und im Vergleich zu jungen Mäusen sogar erhöhte Zahlen (um 40%) an CFU-Meg/E zu bilden. Dies könnte Folge eines Kompensationsmechanismus sein, der durch klonale Expansion bereits differenzierter Vorläufer aus der CMP Population die altersabhängige Reduzierung des MEP Vorläufers im Knochenmark ausgleicht. Zum Mechanismus dieser Kompensation kann hier noch keine Angabe gemacht werden.

Altersabhängige Veränderungen in der Lymphopoese

Die Lymphozytenbildung in Knochenmark und Thymus geht im Altersverlauf zurück. Es ist nicht vollständig geklärt warum es zu dieser Verminderung kommt, die Teil der beobachteten Immunseneszenz ist (Min *et al.* 2005). Beschrieben sind Faktoren die die T-Zell Immunseneszenz hervorrufen wie a) veränderte Bildung von T-Zell-Vorläufern durch Stammzelldefekte, b) Thymusatrophie, c) Alterung von ruhenden Zellen, d) altersbedingte Veränderungen in T-Zellrezeptor vermittelten Signaltransduktionskaskaden und e) replikative Seneszenz von klonal expandierenden Zellen (Pawelec *et al.* 2002). Der frühe Thymusvorläufer ETP ist im Alter stark vermindert und zeigt eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit (Min *et al.* 2004). Zusätzlich zu dieser Stammzelleinschränkung führt die Thymusatrophie zu einer signifikanten Verminderung von T-Zellzahlen in der Peripherie, zu Veränderungen in T-Zell-Subpopulationen und zu einer veränderten Immunantwort (Prelog *et al.* 2006). Naive T-Zellen werden im Alter durch Gedächtnis T-Zellen ersetzt und die transendotheliale Migration ist verschlechtert (Kudlacek *et al.* 2000).

TN1 T-Zellen alter Mäuse haben ein normales Entwicklungspotential. Sie können aber nicht ausreifen, weil die Thymusumgebung durch den Alterungsprozess funktionell stark eingeschränkt ist (Aspinall *et al.* 2001). Die von uns untersuchten Wildtyp-Mäuse zeigten im Alter von 24 Monaten im Thymus deutlich verringerte Zellzahlen von doppelt positiven T-Lymphozyten. Die klonale Expansion von CD8⁺ T-Zellen im Thymus, die wir in alten Wildtyp-Mäusen beobachteten, entsprach der von Ku *et al.* (2000) beschriebenen. Möglicherweise ist diese Erhöhung der CD8⁺ T-Zellen eine Reaktion auf häufige Virusinfektionen im Alter (Khan *et al.* 2002).

Altersabhängige Defekte treten in der B-Zellentwicklung vom prä B-Zellstadium (Hardy C) zum pro B-Zellstadium (Hardy D) auf. Dabei sind die prä B-Zellzahlen in alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen um ca. 20% vermindert (Kirman *et al.* 1998). In unseren Untersuchungen wurde eine signifikante Verringerung von kleinen prä B-Zellen in 24 Monate alten Wildtyp-Mäusen um 35% im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen im Alter von 3 Monaten beobachtet. Miller und Allman (2003) konnten zuerst eine starke altersabhängige Reduzierung des CLP Vorläufers zeigen. Die Verminderung der B-Zellvorläufer und die Einschränkung ihres Selbsterneuerungspotentials führt im Alter zu einer starken Reduzierung von naiven B-Zellen, zu einer Ansammlung von Gedächtnis-B-Zellen in sekundären Lymphorganen, zur Abnahme der Rezeptorvielfalt und zur Entstehung von Immunseneszenz (Colonna-Romano *et al.* 2006). Dabei kommt es häufiger zur Bildung von autoreaktiven Antikörpern und zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Johnson *et al.* 2002).

Es konnte nachgewiesen werden, dass in pro-B-Zellen die V(D)J Gene nicht erfolgreich rekombiniert werden (Labrie *et al.* 2004) und demzufolge die prä B-Zellen in Folge des fehlenden pre-BCR Signals in Apoptose gehen (Kirman *et al.* 1998). Die V(D)J Rekombination ist ein IL-7-abhängiges Ereignis. Ursache für die fehlerhafte Rekombination könnte ein Defekt in der IL-7 Signalkaskade sein, welcher als Folge einer verminderten Reaktivität des IL-7 Rezeptors auf den IL-7 Ligand auftritt (Corcoran *et al.* 1998).

Wir beobachteten eine altersabhängige Abnahme (um 45%) von Lin⁺ IL-7⁺ Zellen im Knochenmark von Wildtyp-Mäusen im Alter von 24 Monaten und konnten zeigen, dass die unreifen B-Zellen im Knochenmark von Wildtyp-Mäusen im Alter von 24 Monaten um 22% vermindert sind. Tatsächlich konnte Linton *et al.* (2004) nachweisen, dass neu generierte B-Zellen, die aus dem Knochenmark in die Milz emigrieren, verringert sind.

Trotzdem ist die Anzahl peripherer B-Lymphozyten im Alter nicht verändert (Kline *et al.* 1999), weil sich Gedächtnis B-Zellen in der Peripherie ansammeln.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Thrombopoetin ist der wichtigste humorale Regulator für die Bildung von Thrombozyten und spielt darüber hinaus jedoch auch eine bedeutende Rolle bei der Regulation multipotenter hämatopoetischer Vorläufer. Der Verlust des TPO Rezeptors c-Mpl führt beim Menschen zu einer schweren hämatologischen Erkrankung der kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT). Im Verlauf dieser Erkrankung entwickelt sich die bei Geburt auftretende schwere Thrombozytopenie zu einer generellen Erschöpfung der gesamten Hämatopoese, die nur durch eine Knochenmarktransplantation kurativ behandelt werden kann. Das Krankheitsbild der CAMT zeigt die essentielle Bedeutung von TPO sowohl für die Bildung von Thrombozyten als auch für die Erhaltung der gesamten Hämatopoese. Mit der *c-mpl*^{-/-}-Maus steht uns ein Tiermodell zur Verfügung, in dem die Funktion von TPO und seinem Rezeptor für die Hämatopoese untersucht werden kann.

Obwohl auch *c-mpl*^{-/-}-Mäuse um ca. 80% verminderte Thrombozytenzahlen sowie eine deutliche Verminderung früher hämatopoetischer Vorläuferzellen zeigen, entwickelt sich in den KO-Mäusen jedoch kein der CAMT vergleichbares Krankheitsbild: Die Thrombozytenzahlen sind ausreichend hoch um spontane Blutungen zu verhindern, das Knochenmark ist normozellulär und die Erythrozyten- und Leukozytenzahlen im peripheren Blut sind normal. Allerdings lagen Literaturdaten bislang nur für Mäuse im Alter von 12 Wochen vor, die Entwicklung der Hämatopoese über einen längeren Altersverlauf war nicht bekannt.

In dieser Arbeit sollten seriell über einen Altersverlauf von 2 Jahren verschiedene hämatopoetische Kompartimente in *c-mpl*^{+/+}- und *c-mpl*^{-/-}-Mäusen untersucht werden mit dem Ziel, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche Vorläufer und reife Subpopulationen sind in den KO-Mäusen eingeschränkt?
- Wie stark sind die Einschränkungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Hämatopoese?
- Gibt es einen Einfluss auf die Lymphopoese?
- Kommt es im Alter in den KO-Mäusen zu einer Stammzellerschöpfung ähnlich der bei CAMT Patienten? Entwickeln KO-Mäuse im Alter eine Panzytopenie?

- Welche Kompensationsmechanismen existieren zum Ausgleich des Stammzelldefektes? Findet eine transkriptionelle Regulation auf Stammzellebene statt?

Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen verschiedener hämatopoetischer Kompartimente und funktionellen Untersuchungen von sortierten Vorläuferzellpopulationen konnte ein detailliertes Bild der veränderten hämatopoetischen Entwicklung von frühen Vorläuferzellen bis hin zu den reifen Zellen des peripheren Blutes bei *c-mpl^{-/-}*-Mäusen gezeichnet werden.

*Altersunabhängige Unterschiede zwischen *c-mpl^{-/-}*- und *c-mpl^{+/+}*-Mäusen*

Bei der Untersuchung der Ausreifungsstadien der verschiedenen hämatopoetischen Entwicklungslinien zeigte sich als allgemeine Tendenz eine erhebliche Verminderung früher hämatopoetischer Vorläuferzellen bei *c-mpl^{-/-}*-Mäusen, die im Verlauf der weiteren Liniendifferenzierung der Vorläufer zum Teil kompensiert wird. So fanden wir die frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen LSK in den *c-mpl^{-/-}*-Mäusen gegenüber dem Wildtyp um 2/3 reduziert. Bei den reifen Zellen des peripheren Blutes fanden sich, abgesehen von der Thrombozytopenie bei der *c-mpl^{-/-}*-Maus, keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die Kompensation durch zusätzliche Zellteilungen innerhalb der Ausreifung aller hämatopoetischen Entwicklungslinien, die megakaryozytäre Linie ausgenommen, konnte durch quantitative Untersuchungen verschiedener Zwischenstufen der hämatopoetischen Entwicklung belegt werden. In mRNA-Array Analysen von sortierten hämatopoetischen Vorläufern fanden sich zahlreiche für frühe, ruhende hämatopoetische Vorläufer typische mRNAs in *c-mpl^{-/-}*-Mäusen deutlich weniger exprimiert als im Wildtyp. Im Kontrast zu der *in vivo* beobachteten erhöhten mitotischen Aktivität hämatopoetischer Vorläufer wurde *in vitro* eine eingeschränkte Koloniebildung myeloider Vorläufer beobachtet. Das klonogene Potential durchflusszytometrisch-sortierter Vorläufer war bei *c-mpl^{-/-}*-Mäusen deutlich eingeschränkt und die Koloniegroße als Maß für das mitotische Potential der Ursprungszelle war geringer. Dies deutet auf die enorme Bedeutung der hämatopoetischen Umgebung im Organismus für die Kompensation des Stammzelldefektes bei *c-mpl^{-/-}*-Mäusen hin.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine starke Reduktion früher lymphoider Vorläufer in Knochenmark und Thymus bei *c-mpl^{-/-}*-Mäusen beschrieben werden, die der Verminderung früher myeloider Vorläufer vergleichbar war (LSKfl⁺: 34%, CLP: 28% von Wildtyp-Mäusen). Innerhalb der T-Zellentwicklung fanden wir in der *c-mpl^{-/-}*-Maus

signifikant verminderte Zahlen der frühen Thymus-Vorläufer (ETP und TN1-4) und reifer CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie. Bei der weiteren Ausreifung des CLP Vorläufers kam es innerhalb der B-Zellentwicklung durch zusätzliche Mitosen zu einer vollständigen Kompensation der verminderten Vorläuferzellzahlen. Abweichend von den Beobachtungen für alle anderen Zelltypen konnten wir eine bisher nicht beschriebene erhöhte Zahl plasmazytoider dendritischer Zellen (PDC) in der Milz junger KO-Mäuse und eine erhöhte Zahl lymphoider dendritischer Zellen im Thymus von alten KO-Mäusen beobachten.

Entwicklung der Hämatopoese im Altersverlauf bei $c-mpl^{-/-}$ - und $c-mpl^{+/+}$ -Mäusen

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der jungen $c-mpl^{-/-}$ -Mäuse entsprachen im Wesentlichen den Befunden bei CAMT-Patienten während der ersten Lebensmonate, in denen eine isolierte Thrombozytopenie vorliegt. Die Kompensation des Stammzelldefektes durch zusätzliche Mitosen innerhalb der Hämatopoese führt in CAMT-Patienten im Verlauf der Erkrankung zu einer vollständigen Erschöpfung des Stammzellpools und zur Entwicklung einer aplastischen Anämie und Panzytopenie.

Trotz verminderter B- und T-Zellzahlen im peripheren Blut zeigten die $c-mpl^{-/-}$ -Mäuse im Gegensatz zu den CAMT-Patienten bis zum Alter von 2 Jahren keine Anzeichen für eine Anämie oder Leukozytopenie. Die stark verminderten Zahlen an frühen hämatopoetischen Vorläufern bei den KO-Mäusen veränderten sich im Altersverlauf kaum. Interessanterweise zeigten einige Gene (wie *Wnt*, *Bmi1*, *Notch1*, *Hoxa4*, *Hoxb4*), die für die Selbsterneuerung von Stammzellen wichtige Faktoren kodieren in $c-mpl^{-/-}$ -Mäusen im Alter von 12 Monaten eine gegenüber den Wildtyp-Mäusen erhöhte Expression, die einen Hinweis auf eine Gegenregulation als Antwort auf den erhöhten Verbrauch früher Vorläufer innerhalb der Hämatopoese geben könnte.

Im Altersverlauf konnten Unterschiede zwischen $c-mpl^{-/-}$ - und $c-mpl^{+/+}$ -Mäusen beobachtet werden, die auf eine frühere Alterung des hämatopoetischen Systems hindeuten. So konnten wir z.B. bei den KO-Mäusen eine frühere Immunseneszenz als bei Wildtyp-Mäusen beobachten. Des Weiteren zeigten die KO-Mäuse im Altersverlauf eine stärkere Abnahme des klonogenen Potentials früher Koloniebildender Zellen als Wildtyp-Mäuse. Interessant im Vergleich mit den CAMT Patienten ist in diesem Zusammenhang, dass dort die Abnahme des klonogenen Potentials hämatopoetischer Vorläufer *in vitro* der verminderten Produktion der entsprechenden reifen Zellen deutlich vorausgeht. Der beobachtete Phänotyp in der

24 Monate alten *c-mpl*^{-/-}-Maus könnte daher als Zeichen einer beginnenden hämatopoetischen Erschöpfung gedeutet werden.

Auffällig war ein Anstieg der Anzahl megakaryozytärer Vorläufer im Knochenmark im Alter, der bei Wildtyp und KO-Mäusen zu beobachten war und daher TPO-unabhängig erfolgte. Aus der weiteren Untersuchung dieses Phänomens könnte man in Zukunft Hinweise auf eine TPO-unabhängige Regulation der Hämatopoese erhalten.

Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit konnten neue wichtige Erkenntnisse über die veränderte hämatopoetische Entwicklung in *c-mpl*^{-/-}-Mäusen gewonnen werden. Dabei wurde auch eine starke Beeinträchtigung der Entwicklung früher lymphoider Vorläufer nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Forschung stellt sich jetzt vor allem die Frage nach den Zielgenen von TPO in den frühen hämatopoetischen Stammzellen: Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich vielversprechende Hinweise für die weitere Forschung. So zeigten sich in den Vorläuferzellen von *c-mpl*^{-/-}-Mäusen Veränderungen in der Genexpression diverser Zellzyklusgene und Transkriptionsfaktoren, die bei der Selbsterhaltung und Proliferation früher Stammzellen eine wichtige Bedeutung haben.

Eine weitere Aufgabe wird sein die Genregulation in frühen Vorläufern zwischen Mensch und Maus zu vergleichen, um Mechanismen ausfindig zu machen, die möglicherweise eine Stammzellerschöpfung in der Maus verhindern.

Die Suche nach Kompensationsmechanismen, die in der Maus die TPO-unabhängige Thrombozytenbildung regulieren, ist ebenfalls noch nicht abgeschlossen. Unsere Ergebnisse und aktuelle Literaturdaten geben Hinweise auf mögliche Mechanismen, die näher untersucht werden müssen wie z.B. der Einfluss der Stammzellnische und ihrer sezernierten Chemokine.

7. Literatur

Adibzadeh M, Pohla H, Rehbein A, Pawelec G.: Long-term culture of monoclonal human T lymphocytes: models for immunosenescence? *Mech Ageing Dev.* 1995 Sep 15;83(3):171-83.

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE.: Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity.* 2001 Oct;15(4):659-69.

Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D.: Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood.* 1996 Mar 15;87(6):2162-70.

Alexander WS, Dunn AR.: Structure and transcription of the genomic locus encoding murine c-Mpl, a receptor for thrombopoietin. *Oncogene.* 1995 Feb 16;10(4):795-803.

Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A, Bhandoola A.: Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol.* 2003 Feb;4(2):168-74.

Allman D, Miller JP.: The aging of early B-cell precursors. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:18-29.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000 Mar 9;404(6774):193-7.

***Akashi K**, Richie LI, Miyamoto T, Carr WH, Weissman IL.: B lymphopoiesis in the thymus. *J Immunol.* 2000 May 15;164(10):5221-6.

Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID.: Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 1986 67(3), 842-845

Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK.: HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell.* 2002 Apr 5;109(1):39-45.

Antonchuk J, Hyland CD, Hilton DJ, Alexander WS.: Synergistic effects on erythropoiesis, thrombopoiesis, and stem cell competitiveness in mice deficient in thrombopoietin and steel factor receptors. *Blood.* 2004 Sep 1;104(5):1306-13.

Arrighi JF, Hauser C, Chapuis B, Zubler RH, Kindler V.: Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and a CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor. *Blood.* 1999 Apr 1;93(7):2244-52.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):25-9.

Aspinall R, Andrew D.: Age-associated thymic atrophy is not associated with a deficiency in the CD44(+)CD25(-)CD3(-)CD4(-)CD8(-) thymocyte population. *Cell Immunol.* 2001 Sep 15;212(2):150-7.

Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S.: Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):64-71.

Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K.: c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):139-46.

Ballmaier M, Germeshausen M, Krukemeier S, Welte K.: Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans: development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;996:17-25.

Barrat FS, Lesourd BM, Louise AS, Boulouis H, Thibault DJ, Neway T, Pilet CA.: Pregnancies modulate B lymphopoiesis and myelopoiesis during murine ageing. *Immunology*. 1999 Dec;98(4):604-11.

Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-1124

Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID.: Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest*. 1988 Mar;81(3):951-5.

Bhandoola A, Sambandam A, Allman D, Meraz A, Schwarz B.: Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):5653-8.

Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE.: A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1038-45.

Billia F, Barbara M, McEwen J, Trevisan M, Iscove NN.: Resolution of pluripotential intermediates in murine hematopoietic differentiation by global complementary DNA amplification from single cells: confirmation of assignments by expression profiling of cytokine receptor transcripts. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2257-68.

Björck P.: Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 2001 July 26;98(13):3520-3526

Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE.: Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood*. 1997 Sep 15;90(6):2282-92.

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A.: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10526-31.

Brizzi MF, Battaglia E, Montrucchio G, Dentelli P, Del Sorbo L, Garbarino G, Pegoraro L, Camussi G.: Thrombopoietin stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis by a platelet-activating factor-dependent mechanism. *Circ Res*. 1999 Apr 16;84(7):785-96.

Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K.: Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):541-50.

Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K.: Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood*. 1995 Apr 1;85(7):1719-26.

Bunting S, Widmer R, Lipari T, Rangell L, Steinmetz H, Carver-Moore K, Moore MW, Keller GA, de Sauvage FJ.: Normal platelets and megakaryocytes are produced in vivo in the absence of thrombopoietin. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3423-9.

Burgess AW, Metcalf D.: The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*. 1980 Dec;56(6):947-58.

- Cardier JE.:** Effects of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) on liver endothelial cells in vitro. *Microvasc Res.* 1999 Sep;58(2):108-13.
- Carver-Moore K, Broxmeyer HE, Luoh SM, Cooper S, Peng J, Burstein SA, Moore MW, de Sauvage FJ.:** Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood.* 1996 Aug 1;88(3):803-8.
- Challier C, Cocault L, Berthier R, Binart N, Dusanter-Fourt I, Uzan G, Souyri M.:** The cytoplasmic domain of Mpl receptor transduces exclusive signals in embryonic and fetal hematopoietic cells. *Blood.* 2002 Sep 15;100(6):2063-70.
- Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE, Moreau-Gachelin F, Tenen DG.:** PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene.* 1995 Oct 19;11(8):1549-60.
- Chen W, Antonenko S, Sederstrom JM, Liang X, Chan AS, Kanzler H, Blom B, Blazar BR, Liu YJ.:** Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood.* 2004 Apr 1;103(7):2547-53.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, : Weissman IL.** In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):3120-5.
- Christensen JL, Weissman IL.:** Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 4;98(25):14541-6.
- Coffman RL.:** Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev.* 1982;69:5-23.
- Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, Di Lorenzo G, Listi F, Vitello S, Lio D, Candore G, Clesi G, Caruso C.:** Memory B cell subpopulations in the aged. *Rejuvenation Res.* 2006 Spring;9(1):149-52.
- Columbyova L, Loda M, Scadden DT.:** Thrombopoietin receptor expression in human cancer cell lines and primary tissues. *Cancer Res.* 1995 Aug 15;55(16):3509-12.
- Corcoran AE, Riddell A, Krooshoop D, Venkitaraman AR.:** Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature.* 1998 Feb 26;391(6670):904-7.
- D'Amico A, Wu L.:** The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med.* 2003 Jul 21;198(2):293-303.
- Dame C, Wolber EM, Freitag P, Hofmann D, Bartmann P, Fandrey J.:** Thrombopoietin gene expression in the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Jul 12;143(2):217-23.
- Deguchi K, Yagi H, Inada M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Komori T.:** Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Feb 16;255(2):352-9.
- de Haan G, Nijhof W, Van Zant G.:** Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood.* 1997 Mar 1;89(5):1543-50.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al.:** Stimulation of megakaryo-cytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* 1994 Jun 16;369(6481): 533-8.

de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, Moore MW.: Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med.* 1996 Feb 1;183(2):651-6.

de Wynter E, Ploemacher RE.: Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001 Jan-Mar;15(1):23-7.

Dialynas DP, Quan ZS, Wall KA, Pierres A, Quintans J, Loken MR, Pierres M, Fitch FW.: Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J Immunol.* 1983 Nov;131(5):2445-51.

Domen J.: The role of apoptosis in regulating hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Immunol Res.* 2000;22(2-3):83-94.

Dong J, McPherson CM, Stambrook PJ.: Flt-3 ligand: a potent dendritic cell stimulator and novel antitumor agent. *Cancer Biol Ther.* 2002 Sep-Oct;1(5):486-9.

Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T.: Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol.* 2005 Mar;6(3):314-22.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Knerlich F, von Ahsen N, Jacob S, Sperling S, Woldt H, Vehmeyer K, Nave KA, Siren AL.: A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 18;102(3):862-7.

Encabo A, Solves P, Mateu E, Sepulveda P, Carbonell-Uberos F, Minana MD.: Selective generation of different dendritic cell precursors from CD34+ cells by interleukin-6 and interleukin-3. *Stem Cells.* 2004;22(5):725-40.

Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity.* 1995 Jul;3(1):39-50.

Ferrero I, Held W, Wilson A, Tacchini-Cottier F, Radtke F, MacDonald HR.: Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood.* 2002 Oct 15;100(8):2852-7.

Fischer Jens AA, Jürgen Schmitz, Andrzej Dzionek.: A Panel of New Monoclonal Antibodies with Specificity for Mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1 (mPDCA-1), a Presumably Novel Antigen Exclusively Expressed by Murine Plasmacytoid Dendritic Cells. R&D, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany. 2004

Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F.: A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 2006 Jan 6;311(5757):83-7.

Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K.: Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *Journal of Clinical Investigation* 2002 Aug;110(3):389-394

Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL.: Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet.* 2005 Sep;1(3):e28.

Freedman MH, Estrov Z. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: an intrinsic hematopoietic stem cell defect. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990 Summer;12(2): 225-30.

Fukuba Y, Inaba M, Taketani S, Hitoshi Y, Adachi Y, Tokunaga R, Inaba K, Takatsu K, Ikehara S.: Functional analysis of thymic B cells. *Immunobiology.* 1994 Feb;190(1-2):150-63.

Gainsford T, Nandurkar H, Metcalf D, Robb L, Begley CG, Alexander WS.: The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):528-34.

Gattei V, Aldinucci D, Quinn JM, Degan M, Cozzi M, Perin V, Iulii AD, Juzbasic S, Improta S, Athanasou NA, Ashman LK, Pinto A.: Human osteoclasts and preosteoclast cells (FLG 29.1) express functional c-kit receptors and interact with osteoblast and stromal cells via membrane-bound stem cell factor. *Cell Growth Differ*. 1996 Jun;7(6):753-63.

Germeshausen M, Schulze H, Gaudig A, Krukemeier S, Strauss G, Welte K, Ballmaier M.: [Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) - a defect of the thrombopoietin receptor c-Mpl] *Klin Padiatr*. 2001 Jul-Aug;213(4):155-61.

Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K.: MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Hum Mutat*. 2006 Mar;27(3):296.

Ghezzi P, Brines M.: Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ*. 2004 Jul;11 Suppl 1:S37-44.

Gordon MS, Hoffman R.: Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood*. 1992 Jul 15;80(2):302-7.

Grassinger J, Mueller G, Zaiss M, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Hennemann B.: Differentiation of hematopoietic progenitor cells towards the myeloid and B-lymphoid lineage by hepatocyte growth factor (HGF) and thrombopoietin (TPO) together with early acting cytokines. *Eur J Haematol*. 2006 Apr 26;

Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW.: Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*. 1994 Sep 2;265(5177):1445-7.

Gurney AL, Wong SC, Henzel WJ, de Sauvage FJ.: Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5292-6.

Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K.: Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*. 1991 May 1;173(5):1213-25.

Hayflick L, Moorhead PS.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25:585-621.

Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL, Ramshaw HS, Niuitta S, Protopsaltis S, Peng L, Burrell C, Rappold I, Buhning HJ, Simmons PJ.: Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood*. 1997 Sep 15;90(6):2260-72.

Hedrick JA, Zlotnik A.: Chemokines and chemokine receptors in T-cell development. *Chem Immunol*. 1999;72:57-68.

Henckaerts E, Langer JC, Orenstein J, Snoeck HW.: The positive regulatory effect of TGF-beta2 on primitive murine hemopoietic stem and progenitor cells is dependent on age, genetic background, and serum factors. *J Immunol*. 2004 Aug 15;173(4):2486-93.

Hirose J, Kouro T, Igarashi H, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW.: A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol Rev*. 2002 Nov;189:28-40.

Hodohara K, Fujii N, Yamamoto N, Kaushansky K.: Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):769-75.

- Hu M**, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T.: Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* 1997 Mar 15;11(6):774-85.
- Igarashi H**, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW.: Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity.* 2002 Aug;17(2):117-30.
- Ihara K**, Ishii E, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good RA, Hara T.: Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):3132-6.
- Ikuta K**, Weissman IL.: Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Feb 15;89(4):1502-6.
- Italiano JE Jr**, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH.: Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13;147(6):1299-312.
- Ito K**, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T.: Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stemcells. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):997-1002.
- Ivanova NB**, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR.: A stem cell molecular signature. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):601-4.
- Johnson SA**, Rozzo SJ, Cambier JC.: Aging-dependent exclusion of antigen-inexperienced cells from the peripheral B cell repertoire. *J Immunol.* 2002 May 15;168(10):5014-23.
- Kamminga LM**, de Haan G.: Cellular memory and hematopoietic stem cell aging. *Stem Cells.* 2006 May;24(5):1143-9.
- Kaushansky K**, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, et al.: Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature.* 1994 Jun 16;369(6481):568-71.
- Kaushansky K**.: Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood.* 1995 Jul 15;86(2):419-31.
- Kaushansky K**, Broudy VC, Grossmann A, Humes J, Lin N, Ren HP, Bailey MC, Papayannopoulou T, Forstrom JW, Sprugel KH.: Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1683-7.
- Kaushansky K**.: Thrombopoietin: understanding and manipulating platelet production. *Annu Rev Med.* 1997;48:1-11.
- Kaushansky K**.: The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005 Dec; 115(12):3339-47.
- Kelemen E**, Cserhati I, Tanos B.: Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol.* 1958 Dec;20(6):350-5.
- Khan N**, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, Nayak L, Moss PA.: Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol.* 2002 Aug 15;169(4):1984-92.
- Kieran MW**, Perkins AC, Orkin SH, Zon LI.: Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20;93(17):9126-31.

- Kim M**, Moon HB, Spangrude GJ.: Major age-related changes of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;996:195-208.
- Kimura S**, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS.: Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 3;95(3):1195-200.
- King S**, Germeshausen M, Strauss G, Welte K, Ballmaier M.: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: a retrospective clinical analysis of 20 patients. *Br J Haematol.* 2005 Dec;131 (5):636-44.
- Kirman I**, Zhao K, Wang Y, Szabo P, Telford W, Weksler ME.: Increased apoptosis of bone marrow pre-B cells in old mice associated with their low number. *Int Immunol.* 1998 Sep;10(9):1385-92.
- Kirito K**, Fox N, Kaushansky K.: Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood.* 2003 Nov 1;102(9):3172-8.
- Kline GH**, Hayden TA, Klinman NR.: B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3342-9.
- Knapp W**, Dorken B, Rieber P, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AE.: CD antigens 1989. *Blood.* 1989 Sep;74(4):1448-50.
- Kobayashi S**, Teramura M, Ito K, Iwabe K, Inaba T, Mizoguchi H.: Transcription factor NF-E2 is essential for the polyploidization of a human megakaryoblastic cell line, Meg-J. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 9;247(1):65-9.
- Kondo M**, Weissman IL, Akashi K.: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997 Nov 28;91(5):661-72.
- Kroese FG**, Wubbena AS, Opstelten D, Deenen GJ, Schwander EH, De Leij L, Vos H, Poppema S, Volberda J, Nieuwenhuis P.: B lymphocyte differentiation in the rat: production and characterization of monoclonal antibodies to B lineage-associated antigens. *Eur J Immunol.* 1987 Jul;17(7):921-8.
- Ku CC**, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P.: Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science.* 2000 Apr 28;288(5466):675-8.
- Ku H**, Hirayama F, Kato T, Miyazaki H, Aritomi M, Ota Y, D'Andrea AD, Lyman SD, Ogawa M.: Soluble thrombopoietin receptor (Mpl) and granulocyte colony-stimulating factor receptor directly stimulate proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice in synergy with steel factor or the ligand for Flt3/Flk2. *Blood.* 1996 Dec 1;88(11):4124-31.
- Kudlacek S**, Willvonseder R, Stohlawetz P, Hahn P, Pietschmann P.: Immunology and aging. *Aging Male.* 2000 Sep;3(3):137-42.
- Kumamoto T**, Azuma E, Tanaka M, Qi J, Hirayama M, Zhang SL, Kobayashi M, Iwamoto S, Komada Y, Yamamoto H, Nakashima K, Sakurai M.: Human dendritic cells express the thrombopoietin receptor, c-Mpl. *Br J Haematol.* 1999 Jun;105(4):1025-33.
- Kuter DJ**, Beeler DL, Rosenberg RD.: The purification of megapoietin: A physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *PNAS.* 1994, 91, 11104-11108.
- Labrie JE 3rd**, Sah AP, Allman DM, Cancro MP, Gerstein RM.: Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *J Exp Med.* 2004 Aug 16;200(4):411-23.
- Ledbetter JA**, Rouse RV, Micklem HS, Herzenberg LA.: T cell subsets defined by expression of Lyl-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med.* 1980 Aug 1;152(2):280-95.

Lemischka IR.: The haematopoietic stem cell and its clonal progeny: mechanisms regulating the hierarchy of primitive haematopoietic cells. *Cancer Surv.* 1992;15:3-18.

Levin J, Cocault L, Demerens C, Challier C, Pauchard M, Caen J, Souyri M.: Thrombocytopenic *c-mpl*^{-/-} mice can produce a normal level of platelets after administration of 5-fluoro-uracil: the effect of age on the response. *Blood.* 2001 Aug 15;98(4):1019-27.

Levine RL.: Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002 May 1;32(9):790-6.

Lewis ID, Verfaillie CM.: Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol.* 2000 Sep;28(9):1087-95.

Li B, Pan H, Winkelmann JC, Dai W.: Thrombopoietin and its alternatively spliced form are expressed in human amygdala and hippocampus. *Blood.* 1996 Jun 15;87(12):5382-4.

Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ.: Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1479-87.

Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F.: Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev.* 1996 Jan 15;10(2):154-64.

Linton PJ, Dorshkind K.: Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):133-9.

Liu W, Wang M, Tang DC, Ding I, Rodgers GP.: Thrombopoietin has a differentiative effect on late-stage human erythropoiesis. *Br J Haematol.* 1999 May;105(2):459-69.

Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, et al.: Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature.* 1994 Jun 16;369(6481):565-8.

Lyman SD, Jacobsen SE.: *c-kit* ligand and *Flt3* ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 1998 Feb 15;91(4):1101-34.

McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ.: Mice lacking *flt3* ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3489-97.

Meng A, Wang Y, Brown SA, Van Zant G, Zhou D.: Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Exp Hematol.* 2003 Dec;31(12):1348-56.

Metcalf D.: Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood.* 1998 Jul 15;92(2):345-7; discussion 352.

Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S.: Synergistic and inhibitory interactions in the in vitro control of murine megakaryocyte colony formation. *Stem Cells.* 2002;20(6):552-60.

Methia N, Louache F, Vainchenker W, Wendling F.: Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene *c-mpl* specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood.* 1993 Sep 1;82(5):1395-401.

Mignotte V, Deveaux S, Filipe A.: Transcriptional regulation in megakaryocytes: the thrombopoietin receptor gene as a model. *Stem Cells.* 1996;14 Suppl 1:232-9.

Miller JP, Allman D.: The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2326-30.

Milner LA, Bigas A.: Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood.* 1999 Apr 15;93(8):2431-48.

Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K.: Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):245-50.

Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K.: Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:7-17.

Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K.: Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol.* 2001 Jan;2(1):83-8.

Moore KA, Lemischka IR.: Stem cells and their niches. *Science.* 2006 Mar 31;311 (5769):1880-5.

Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL.: The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 1996 Sep;2(9):1011-6.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL.: The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.

Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ.: Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells.* 1998;16(1):1-6.

Nagata Y, Shozaki Y, Nagahisa H, Nagasawa T, Abe T, Todokoro K.: Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis. *Thromb Haemost.* 1997 May;77(5):808-14.

Nakanishi K, Tajima F, Osada H, Kato T, Miyazaki H, Kawai T, Torikata C, Suga T, Takishima K, Aurues T, Ikeda T.: Thrombopoietin expression in normal and hypo-baric hypoxia-induced thrombocytopenic rats. *Lab Invest.* 1999 Jun;79(6):679-88.

Naik SH, Corcoran LM, Wu L.: Development of murine plasmacytoid dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol.* 2005 Oct;83(5):563-70..

Neelis KJ, Visser TP, Dimjati W, Thomas GR, Fielder PJ, Bloedow D, Eaton DL, Wagemaker G.: A single dose of thrombopoietin shortly after myelosuppressive total body irradiation prevents pancytopenia in mice by promoting short-term multilineage spleen-repopulating cells at the transient expense of bone marrow-repopulating cells. *Blood.* 1998 Sep 1;92(5):1586-97.

Neiva K, Sun YX, Taichman RS.: The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Oct;38(10):1449-54.

Ninos John M, Leigh C Jefferies, Christopher R Cogle, William G Kerr: The thrombopoietin receptor, c-Mpl, is a selective surface marker for human hemato-poietic stem cells. *Journal of Translational Medicine* 2006, 4:9 (16 February 2006)

O'Gorman Huhges DW.: Aplastic anemia in childhood. III. Constitutional aplastic anemia and related cytopenias. *Med J Austr.* 1974; 1: 519

***Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H.:** Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):242-5.

Osawa M, Nakamura K, Nishi N, Takahasi N, Tokuomoto Y, Inoue H, Nakauchi H.: In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3207-14.

- Owens** BM, Hawley RG.: HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*. 2002;20(5):364-79.
- Pardal** R, Clarke MF, Morrison SJ.: Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):895-902.
- Passegue** E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL.: Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med*. 2005 Dec 5;202(11):1599-611.
- Pawelec** G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R.: T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci*. 2002 May 1;7:d1056-183.
- Pearse** M, Wu L, Egerton M, Wilson A, Shortman K, Scollay R.: A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(5):1614-8.
- Pelayo** R, Welner R, Perry SS, Huang J, Baba Y, Yokota T, Kincade PW.: Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2005 Apr;17(2):100-7.
- Perlingeiro** RC, Kyba M, Bodie S, Daley GQ. : A role for thrombopoietin in hemangioblast development. *Stem Cells*. 2003;21(3):272-80.
- Perry** SS, Pierce LJ, Slayton WB, Spangrude GJ.: Characterization of thymic progenitors in adult mouse bone marrow. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):1877-86.
- Petit** I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T.: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002 Jul;3(7):687-94.
- Plackett** TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ.: Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol*. 2004 Aug;76(2):291-9.
- Prasher** JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, Ploemacher RE, Hoeijmakers JH, Touw IP, Niedernhofer LJ.: Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient *Ercc1-/-* mice. *EMBO J*. 2005 Feb 23;24(4):861-71.
- Prelog** M.: Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun Rev*. 2006 Feb;5(2):136-9.
- Romanelli** RG, Petrai I, Robino G, Efsen E, Novo E, Bonacchi A, Pagliai G, Grossi A, Parola M, Navari N, Delogu W, Vizzutti F, Rombouts K, Gentilini P, Laffi G, Marra F.: Thrombopoietin stimulates migration and activates multiple signaling pathways in hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006Jan;290(1): G120-8.
- Rosmarin** AG, Yang Z, Resendes KK.: Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol*. 2005 Feb;33(2):131-43.
- Rossi** DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL.: Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9194-9.
- Samelson** LE, O'Shea JJ, Luong H, Ross P, Urdahl KB, Klausner RD, Bluestone J.: T cell antigen receptor phosphorylation induced by an anti-receptor antibody. *J Immunol*. 1987 Oct 15;139(8):2708-14.

Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M.: B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* 1989 Nov;1(1):27-35.

Schwarz BA, Bhandoola A.: Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol.* 2004 Sep;5(9):953-60.

Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H.: Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science.* 1994 Sep 9;265(5178):1573-7.

Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P.: Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):4044-9.

Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE.: Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity.* 2002 Oct;17(4):463-72.

Skoda RC, Seldin DC, Chiang MK, Peichel CL, Vogt TF, Leder P.: Murine c-mpl: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2645-53.

Smith C.: Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control.* 2003 Jan-Feb;10(1):9-16.

Sola MC, Juul SE, Meng YG, Garg S, Sims P, Calhoun DA, Dame JB, Christensen D.: Thrombopoietin (Tpo) in the fetus and neonate: Tpo concentrations in preterm and term neonates, and organ distribution of Tpo and its receptor (c-mpl) during human fetal development. *Early Hum Dev.* 1999 Jan;53(3):239-50.

Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL.: Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood.* 1998 Jul 1;92(1):4-10.

Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F.: A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell.* 1990 Dec 21;63(6):1137-47.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL.: Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):58-62.

Stoffel R, Ziegler S, Ghilardi N, Ledermann B, de Sauvage FJ, Skoda RC.: Permissive role of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor receptors in hematopoietic cell fate decisions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):698-702.

Stout RD, Suttles J.: Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:60-71.

Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H.: Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000 Nov 6;192(9):1273-80.

Sungaran R, Markovic B, Chong BH.: Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood.* 1997 Jan 1;89(1):101-7.

Taylor PR, Brown GD, Geldhof AB, Martinez-Pomares L, Gordon S.: Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. *Eur J Immunol.* 2003 Aug;33(8):2090-7.

- Teramura M**, Kobayashi S, Hoshino S, Oshimi K, Mizoguchi H. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 1992 Jan 15;79(2):327-31.
- Terskikh AV**, Miyamoto T, Chang C, Diatchenko L, Weissman IL. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):94-101.
- Toussaint O**, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 2000 Oct;35(8):927-45.
- Trimarchi JM**, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):2850-5.
- Tsuji T**, Ogasawara H, Aoki Y, Tsurumaki Y, Kodama H. Characterization of murine stromal cell clones established from bone marrow and spleen. *Leukemia*. 1996 May;10(5):803-12.
- Umemoto T**, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T. p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Nov 11;337(1):14-21.
- van den Oudenrijn S**, Bruin M, Folman CC, Peters M, Faulkner LB, de Haas M, von dem Borne AE. Mutations in the thrombopoietin receptor, *Mpl*, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2000 Aug;110(2):441-8.
- van Vlasselaer P**, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood*. 1994 Aug 1;84(3):753-63.
- van Zant G**, de Haan G, Rich IN. Alternatives to stem cell renewal from a developmental viewpoint. *Exp Hematol*. 1997 Mar;25(3):187-92.
- van Zant G**. Genetic control of stem cells: implications for aging. *Int J Hematol*. 2003 Jan;77(1):29-36.
- Varas A**, Vicente A, Sacedon R, Zapata AG. Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. *Blood*. 1998 Jul 1;92(1):93-100.
- Vigon I**, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 15;89(12):5640-4.
- Vigon I**, Florindo C, Fichelson S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, Cosman D, Gisselbrecht S. Characterization of the murine *Mpl* proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene*. 1993 Oct;8(10):2607-15.
- Visnjic D**, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3258-64.
- Vremec D**, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol*. 2000 Mar 15;164(6):2978-86.
- Wang CQ**, Udupa KB, Xiao H, Lipschitz DA. Effect of age on marrow macrophage number and function. *Aging (Milano)*. 1995 Oct;7(5):379-84.
- Wang Q**, Zhang W, Ding G, Sun L, Chen G, Cao X. Dendritic cells support hematopoiesis of bone marrow cells. *Transplantation*. 2001 Sep 15;72(5):891-9.

- Wang Y**, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D.: Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):358-66.
- Wang Z**, Skokowa J, Pramono A, Ballmaier M, Welte K.: Thrombopoietin regulates differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells to hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1044:29-40.
- Weksler ME**, Goodhardt M, Szabo P.: The effect of age on B cell development and humoral immunity. *Springer Semin Immunopathol*. 2002;24(1):35-52.
- Wilson A**, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche AC, Knabenhans C, Macdonald HR, Trumpp A.: c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004 Nov 15;18(22):2747-63.
- Wu L**, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K.: Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3376-82.
- Xie X**, Chan RJ, Yoder MC.: Thrombopoietin acts synergistically with LIF to maintain an undifferentiated state of embryonic stem cells homozygous for a Shp-2 deletion mutation. *FEBS Lett*. 2002 Oct 9;529(2-3):361-4.
- Yagi M**, Ritchie KA, Sitnicka E, Storey C, Roth GJ, Bartelmez S.: Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6;96(14):8126-31.
- Yang L**, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Mansson R, Sigvardsson M, Jacobsen SE.: Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2717-23.
- Yasuda M**, Hasunuma Y, Adachi H, Sekine C, Sakanishi T, Hashimoto H, Ra C, Yagita H, Okumura K.: Expression and function of fibronectin binding integrins on rat mast cells. *Int Immunol*. 1995 Feb;7(2): 251-8.
- Ye M**, Iwasaki H, Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, Heck S, Clausen B, Akashi K, Graf T.: Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity*. 2003 Nov;19(5):689-99.
- Youn BS**, Mantel C, Broxmeyer HE.: Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:150-74.
- Zamanian M**, La Thangue NB.: Transcriptional repression by the Rb-related protein p107. *Mol Biol Cell*. 1993 Apr;4(4):389-96.
- Zanjani ED**, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M.: Human bone marrow CD34-cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol*. 1998 Apr;26(4):353-60.
- Zhou W**, Toombs CF, Zou T, Guo J, Robinson MO.: Transgenic mice overexpressing human c-mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. *Blood*. 1997 Mar 1;89(5): 1551-9.
- Zhou S**, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP.: The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001 Sep; 7(9):1028-34.
- Zhu J**, Emerson SG.: Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002 May 13;21(21):3295-313.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
AML	<i>acute myeloid leukemia</i>
Bmi1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1</i>
BMP	<i>bipotent macrophage-B-cell progenitor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAMT	kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie
Ccn	Cyclin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdk	zyklinabhängige Kinasen
CFU	<i>colony forming units</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ERK	<i>extracellular signal-transduced kinase</i>
ES	embryonale Stammzellen
ETP	<i>early thymoid progenitor</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
Fc	<i>fragment crystalline</i>
FGF-4	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
Flt	<i>fms like tyrosine Kinase</i>
FOG	<i>friend of gata</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GMP	<i>granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor</i>
HOX	Homeobox
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
i.d.R.	in der Regel
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
JAK	Janus Kinasen
KO	<i>knockout</i>
LDC	lymphoide dendritische Zellen
Lin	linienspezifische Oberflächenmarker
MDC	myeloide dendritische Zellen
MEIS1	<i>myeloid ecotropic viral integration site 1</i>
MEP	<i>megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitor</i>
min	Minuten
Mpl	<i>myeloproliferatives Leukämie Protein</i>
NF-E2	<i>nuclear factor, erythroid derived 2</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PI3	Phosphatidylinositol Kinase 3
RAG	rekombinationsaktivierende Gene
RLT	Zell-Lysepuffer vor mRNA Extraktion
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDF-1 α	<i>stromal cell derived factor</i>
SHP2	<i>SH2 (sarkoma homology domain 2) domain containing Phosphatase 2</i>
sec	Sekunden
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TN	<i>triple negative T-cell population (CD3⁻CD4⁻CD8⁻)</i>
TPO	Thrombopoetin
VCAM	<i>vasculare cell adhesion molecule</i>
VEGR	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>
Wnt	<i>wingless related MMTV integration site</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9. Anhang

9.1 Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren insbesondere jedoch

Herrn Prof. Welte für die Aufnahme in sein Institut, für die Bereitstellung vielfältiger Arbeitsmöglichkeiten und der Übernahme des Korreferates,

Herrn Prof. Dr. Holtmann für die Übernahme des Hauptreferates und der damit verbundenen Unterstützung und Ratschläge,

Herrn Dr. Ballmaier für die Betreuung der Arbeit, für die vielen Anregungen, Ideen und Gespräche, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben und für die sehr faire Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima,

Frau Dr. Germeshausen für die praktische molekularbiologische Unterstützung und die guten Ratschläge,

Christina Reimer für die geduldige Sortierung von Unmengen von Zellen, die sehr große Hilfsbereitschaft und die überaus freundschaftliche Zusammenarbeit,

Klara Cherkaoui für die vielen Ratschläge und die warmherzige Zusammenarbeit,

Marly Dalton und Eva Brinkmann für die fleißigen molekularbiologischen Arbeiten an der Maus DNA,

Markus Grähler und Petra Hähnel für die Bereitstellung von Laborarbeitsfläche und die guten Gespräche.

Konny Kerberger für die gute Pflege und Fürsorge meiner Versuchstiere,

Jörg Scheffler für IT-Support, unendliche Geduld, die Bereitwilligkeit zum Verzicht und viel Verständnis für eine oft erschöpfte Partnerin,

Fatih Noyan und Gesine Köhne für die mentale Stärkung und die guten freundschaftlichen Beziehungen,

und meiner Großmutter ohne deren Hilfe und Verständnis dieser lange Weg viel schwieriger gewesen wäre.

9.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet oder in einem anderen Fachbereich eingereicht.

Hannover, den 02.10.2006

Janet Kaffanke