

**Komparative Analyse von definierten
genetischen Elementen zur Expansion von
humanen hämatopoetischen Stamm- bzw.
Vorläuferzellen**

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 Gesine Köhne
geboren am 20. Juli 1974 in Celle

2008

Referent: Prof. Dr. C. Klein
Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Medizinische Hochschule, Hannover

Korreferent: Prof. Dr. B. Huchzermeyer
Institut für Botanik
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover

Tag der Promotion: 25. Juli 2008

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen für weiterführende Funktionsanalysen. Im Besonderen soll die etablierte Methode helfen, die molekulare Pathophysiologie von seltenen Knochenmarkserkrankungen, wie z.B. schwere kongenitale Neutropenien, zu erforschen.

Schwere kongenitale Neutropenien stellen eine heterogene Gruppe von hämatologischen Erkrankungen dar, deren molekulare Aufklärung durch die Seltenheit der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark stark erschwert wird. Besonders deutlich wird diese Einschränkung bei Patienten ohne großen Familienstammbaum, bei denen zur Identifizierung der krankheitsassoziierten Gene nicht auf konventionelle Kopplungsanalysen zurückgegriffen werden kann. Genetische Komplementationsstudien könnten hierbei zur molekularen Aufklärung der Erkrankung beitragen. Diese Experimente werden allerdings durch den Mangel an standardisierten myeloiden Zelllinien von betroffenen Patienten stark eingeschränkt.

Um diese Limitierung zu umgehen, sollten im Rahmen dieser Arbeit humane myeloide Zelllinien aus hämatopoetischen Stammzellen durch retroviralen Gentransfer generiert werden. β -Catenin(Δ) (konstitutiv aktiv), HOX11 und AML1-ETO sind transkriptionelle Modulatoren, die kürzlich in Zusammenhang mit der Selbsterneuerung bzw. Immortalisierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen gebracht wurden, weshalb sie als definierte genetische Elemente gewählt und komparativ auf ihre Eignung zur Expansion von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen überprüft wurden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese Regulatoren in Kombination mit hTERT (katalytische Untereinheit der Telomerase) eine Expansion der Zellen über den Seneszenzpunkt hinaus ermöglichen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit stellte die Analyse des Einfluss dieser Zielgene auf die Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen dar, da insbesondere für β -Catenin(Δ) und HOX11 bisher kaum experimentelle Daten für das humane System vorlagen.

Die komparativen Analysen haben ergeben, dass nur AML1-ETO eine starke Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen bewirkte. Es konnten Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien aus CD34-positiven Knochenmarkszellen von Normal Spendern als auch Patienten generiert werden, die bis zu 27 Wochen kontinuierlich proliferierten, jedoch stark in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt waren. Die Zellen wiesen keine numerischen und strukturellen Veränderungen auf, so dass von der Stabilität des Chromosomensatzes während der Langzeitkultivierung ausgegangen werden konnte. Die permanente Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch β -Catenin(Δ) führte zu einer Beeinträchtigung des Proliferations- und des Differenzierungspotentials der Zellen. Im Gegensatz dazu führte die transgene Expression von HOX11 zu einer moderaten Expansion mit verzögerter Ausreifung von myeloiden Vorläuferzellen. Die Kombination der Zielgene mit hTERT führte nicht zur Überwindung des natürlichen Seneszenzpunktes der Zellen, sondern schränkte sowohl das Proliferations- als auch das Differenzierungspotential der Zellen, mit Ausnahme der erythrozytären Vorläufer, stark ein.

Die Etablierung von Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien durch retroviralen Gentransfer von AML1-ETO könnte zukünftig als Grundlage für die molekulare Identifizierung von betroffenen Genen bei ungeklärten Subtypen der kongenitalen Neutropenie dienen. Außerdem könnte die etablierte Methode dazu beitragen, onkogene Signalkaskaden der mit diesen Erkrankungen assoziierten Leukämien zu verstehen. Des Weiteren verdeutlichen die generierten Daten, dass die Telomerase innerhalb des hämatopoetischen Systems eine vom allgemein gültigen Schema abweichende Rolle einnimmt. Insgesamt unterstreichen die Daten außerdem die Notwendigkeit weiterer kritischer Untersuchungen potentieller „Stammzellgene“ für ihren Einsatz zur *in vitro* Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und demonstrieren die Komplexität der Stammzellbiologie.

Schlagwörter: AML1-ETO, β -Catenin(Δ), Expansion, hämatopoetische Stammzelle, HOX11, hTERT, schwere kongenitale Neutropenie

Summary

The overall goal of this work was to develop an innovative technology to amplify human haematopoietic stem and progenitor cells for functional biological studies. In particular, this technology should help to investigate the molecular pathophysiology of rare bone marrow failure disorders such as severe congenital neutropenia.

Severe congenital neutropenia comprises a heterogeneous group of haematological diseases, whose molecular characterisation is severely hampered by the rareness of the haematopoietic stem cell in the bone marrow. This limitation especially becomes apparent with patients without a large pedigree, where it is not possible to perform conventional genetic linkage analysis. In these cases, functional complementation studies could help to shed light onto the molecular background of the disease. However, the major limitation for such experiments is the lack of standardized myeloid cell lines obtained from affected patients.

To solve this problem, my goal was to use retroviral gene transfer into primary human haematopoietic stem cells in attempt to generate appropriate cell lines for further studies. β -Catenin(Δ) (constitutively active form), HOX11 and AML1-ETO are transcriptional modulators recently implicated in self renewal and immortalisation of haematopoietic stem and progenitor cells, thus they were chosen as defined genetic elements and comparatively assessed for their potential to expand haematopoietic stem and progenitor cells. Furthermore, the combination of these regulators with hTERT (catalytic subunit of telomerase) was examined as a means to expand the cells beyond the point of senescence. Another aspect of this work was to analyse the influence of the genes on the differentiation of haematopoietic stem and progenitor cells given the fact that little is known about β -Catenin(Δ) und HOX11 in the human system.

The comparative analysis showed that only AML1-ETO was able to induce a strong expansion of human haematopoietic stem and progenitor cells. It was possible to generate stem and progenitor cell lines, respectively, using CD34-positive bone marrow cells as a starting population. Upon retroviral gene transfer, AML1-ETO expressing cells were proliferating continuously for 27 weeks in culture but were strongly restricted in their differentiation potential. The cells exhibited no numerical and structural changes confirming the stability of the genome during long term *in vitro* culture. The activation of the Wnt signal transduction pathway by β -Catenin(Δ) resulted in an impairment of the proliferation and differentiation potential of the cells. In contrast, transgenic expression of HOX11 led to a moderate expansion with delayed maturation of myeloid progenitor cells. The combination of the target genes with hTERT did not result in the overcome of senescence but strongly limited the proliferation potential as well as the differentiation potential of the cells - except for erythrocytic progenitors.

The establishment of stem and progenitor cell lines using retroviral mediated expression of AML1-ETO may provide a novel technology platform to identify genes involved in rare congenital bone marrow failure disorders such as severe congenital neutropenia. Furthermore, these cellular tools may help to understand aberrant signalling pathways in these diseases. In addition, these results have revealed an unexpected function of ectopically expressed telomerase in the haematopoietic system. Overall, these data underline the necessity of further critical research on potential "stem cell genes" for their usage to expand human haematopoietic stem and progenitor cells *in vitro* and demonstrate the complexity of stem cell biology.

Key words: AML1-ETO, β -Catenin(Δ), expansion, haematopoietic stem and progenitor cells, HOX11, hTERT, severe congenital neutropenia

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Die Hämatopoese	8
1.2 Hämatopoetische Stammzellen	11
1.3 Die hämatopoetische Nische	15
1.4 Schwere kongenitale Neutropenien	17
1.5 Strategien zur <i>ex vivo</i> Expansion von humanen HSCs	18
1.6 β -Catenin	22
1.6.1 Allgemeine Funktion von β -Catenin	22
1.6.2 Die Rolle von β -Catenin in HSCs	24
1.7 Homöobox-Proteine	27
1.7.1 Allgemeine Funktion von Homöobox-Proteinen	27
1.7.2 Die Rolle von HOX-Proteinen in HSCs	28
1.7.3 Die Rolle von HOX11 in HSCs	29
1.8 AML1-ETO	31
1.8.1 Allgemeine Funktion von AML1	32
1.8.2 Allgemeine Funktion von ETO	33
1.8.3 Eigenschaften des Fusionsproteins AML1-ETO	34
1.8.4 Die Rolle von AML1-ETO in HSCs	36
1.9 Das Phänomen der replikativen Seneszenz und die humane Telomerase	38
1.9.1 Allgemeine Funktion der Telomerase	40
1.9.2 Die Rolle der Telomerase in HSCs	41
1.10 Zielsetzung	43
2 Material und Methoden	45
2.1 Molekularbiologische Methoden	45
2.1.1 Retrovirales Vektorsystem	45
2.1.1.1 Generierung der konstitutiven Vektoren	47
2.1.1.1.1 pMMP- β -Catenin(Δ)-c-Myc-IRES-GFP	48
2.1.1.1.2 pMMP-HOX11-c-Myc-IRES-GFP	49
2.1.1.1.3 pMMP-hTERT-c-Myc-IRES-CD24	49
2.1.1.2 Generierung der konditionalen Vektoren	49
2.1.1.2.1 pMMP-IRES-GFP-xCD34	51
2.1.1.2.2 pMMP-x β -Catenin(Δ)-c-Myc-IRES-GFP-xCD34	51
2.1.1.2.3 pMMP-xHOX11-c-Myc-IRES-GFP-xCD34	51
2.1.2 Arbeiten mit <i>E.coli</i> -Bakterien	52
2.1.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von <i>E.coli</i> -Bakterien	52
2.1.2.2 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien	52
2.1.2.3 Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien	52
2.1.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	53
2.1.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	53
2.1.3 Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten	53
2.1.3.1 Horizontale Gelelektrophorese	53
2.1.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	54
2.1.4 Isolierung von genomischer DNA	54
2.1.5 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	54
2.1.6 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung	56
2.1.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	57
2.1.7.1 Restriktionsanalysen	57
2.1.7.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	57
2.1.7.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase	57
2.2 Zellbiologische Methoden	58
2.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	58
2.2.2 Arbeiten mit konventionellen Zelllinien	58
2.2.2.1 Herstellung retroviraler Überstände	60
2.2.2.2 Titration von viralen Überständen	61
2.2.2.3 Konzentrierung von retroviralen Überständen	62
2.2.2.4 Transduktion von Zelllinien	62
2.2.3 Arbeiten mit hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen	62

2.2.3.1	Isolation von CD34-positiven Knochenmarkzellen	62
2.2.3.2	Retroviraler Gentransfer in CD34-positive Knochenmarkzellen	63
2.2.3.3	Langzeitexpansion von transduzierten Zellen	64
2.2.3.4	Kolonieassay von hämatopoetischen Vorläufern	64
2.2.3.5	Panoptische Färbung nach Pappenheim	65
2.2.3.6	konventionelle Bänderungsanalyse	65
2.2.3.7	Phagozytoseassay	65
2.2.3.8	Differenzierung von neutrophilen Granulozyten	66
2.2.4	Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen	66
2.3	Biochemische Methoden	68
2.3.1	Westernblotanalysen	68
2.3.2	TRAP-Assay	69
2.4	Statistische Auswertung von Datensätzen	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Charakterisierung der generierten retroviralen Vektoren in herkömmlichen Zelllinien	70
3.1.1	Charakterisierung der retroviralen Vektoren für die konstitutive Expression der Zielgene	71
3.1.1.1	Bildung von RD114-pseudotypisierten Retroviren aus den generierten konstitutiven Vektoren	72
3.1.1.2	Nachweis der ektopischen β -Catenin(Δ)-, HOX11- und hTERT-Expression mittels Westernblotanalysen	73
3.1.1.3	Validierung der Funktionalität von hTERT im TRAP-Assay	74
3.1.2	Charakterisierung der retroviralen Vektoren für die konditionale Expression der Zielgene	75
3.1.4.1	Bildung von RD114-pseudotypisierten Retroviren aus den generierten konditionalen Vektoren	76
3.1.4.2	Überprüfung der ektopischen α -Catenin(Δ)- und α HOX11-Expression mittels Westernblotanalysen	77
3.1.4.3	Nachweis der Cre-vermittelten Exzision der Zielgen-IRES-GFP-Kassette mittels FACS-Analyse	78
3.1.3	Transduktion von CD34-positiven Knochenmarkzellen mit RD114- pseudotypisierten Überständen der generierten Vektoren	79
3.2	Charakterisierung der Zielgene in hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen	80
3.2.1	Biologische Wirkung der Zielgene auf Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen	82
3.2.1.1	Langzeitexpansion von transduzierten CD34-positiven Knochenmarkzellen	82
3.2.1.2	Effekte der Zielgene auf hämatopoetische Vorläuferzellen	84
3.2.1.3	Phänotypische Charakterisierung der Langzeitkulturen	86
3.2.2	Effekte der Zielgene in Kombination mit hTERT auf Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen	88
3.2.2.1	Langzeitexpansion von transduzierten CD34-positiven Knochenmarkzellen	88
3.2.2.2	Effekte der Zielgene in Kombination mit hTERT auf hämatopoetische Vorläuferzellen	89
3.2.2.3	Phänotypische Charakterisierung der Langzeitkulturen	91
3.3	Etablierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien	93
3.3.1	Etablierung und Charakterisierung von AML1-ETO-transduzierten Normalspenderzelllinien	93
3.4	Anwendung der Technologie bei Patienten mit genetisch unklaren Störungen der Hämatopoese	95
3.4.1	Etablierung und Charakterisierung von AML1-ETO-transduzierten Patientenzelllinien	95
3.5	Evaluierung des Differenzierungspotentials der hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien	97
3.5.1	Differenzierung von AML1-ETO-transduzierten Langzeitkulturen	97
4	Diskussion	101
4.1	Das Cre/LoxP-System	101
4.2	Einfluss der Zielgene auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen	103
4.2.1	β -Catenin(Δ)	104

4.2.2	HOX11.....	108
4.2.3	AML1-ETO.....	110
4.3	Einfluss von hTERT in Kombination mit den Zielgenen auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen.....	113
4.4	Etablierung und Charakterisierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien	117
4.5	Ausblick	119
5	Literaturverzeichnis	122
6	Abbildungsverzeichnis	140
7	Abkürzungsverzeichnis	141
8	Anhang	143
8.1	Danksagung	143
8.2	Curriculum Vitae	144
8.3	Eidesstattliche Erklärung	145

1 Einleitung

1.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese ist ein streng hierarchisch strukturiertes dynamisches System, das aufgrund einer Vielzahl von geregelten Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine kontinuierliche Bildung von reifen hämatopoetischen Zellen gewährleistet. An der Spitze befindet sich die hämatopoetische Stammzelle (HSC), die durch aufeinanderfolgende Reifungsprozesse von sich stetig festlegenden Vorläuferzellen in der Lage ist, sich in reife Blutzellen zu differenzieren (**Abb. 1.1**). Aufgrund der kurzen Lebensspanne der meisten Blutzellen ist die Produktion der Zellen ein kontinuierlicher Prozess (Bryder et al. 2006). In einem erwachsenen Menschen werden täglich schätzungsweise 10^{12} neue Blutzellen gebildet, um den stetigen Verlust von reifen Zellen auszugleichen (Sharma et al. 2006). Dieser hohe Bedarf erfordert präzise homöostatische Kontrollmechanismen auf unterschiedlichen Differenzierungsstufen, die durch ein Zusammenspiel von intrinsischen und extrinsischen Faktoren vermittelt werden.

Die Stammzellen des hämatopoetischen Systems sind bezüglich ihrer Fähigkeit sich selbst zu erneuern heterogen und können in drei Hauptpopulationen eingeteilt werden. Die hämatopoetische Stammzelle mit dem größten Selbsterneuerungspotential ist die *long term hematopoietic stem cell* (LT-HSC). Als pluripotente Stammzelle besitzt sie die Fähigkeit, über die gesamte Lebensspanne eines Organismus die Blutzellbildung zu gewährleisten. Die direkten Nachkommen der LT-HSC sind multipotente Vorläufer, die ebenfalls in alle Blutzelltypen differenzieren können, aber nur noch über eine eingeschränkte Fähigkeit zur Selbsterneuerung verfügen. Da diese Zellen jedoch in der Lage sind, über einen Zeitraum von ca. sechs Wochen einen letal bestrahlten Empfänger zu rekonstituieren, werden sie auch als *short term*

haematopoietic stem cell (ST-HSC) bezeichnet. Aus ihnen geht der multipotente Vorläufer (MPP) hervor, dessen Fähigkeit zur Selbsterneuerung weiter eingeschränkt ist (Morrison et al. 1997). Der multipotente Vorläufer hat die Möglichkeit, sich in zwei Arten von oligopotenten Vorläufern weiter zu entwickeln; in den lymphoiden Vorläufer (CLP) oder den myeloiden Vorläufer (CMP).

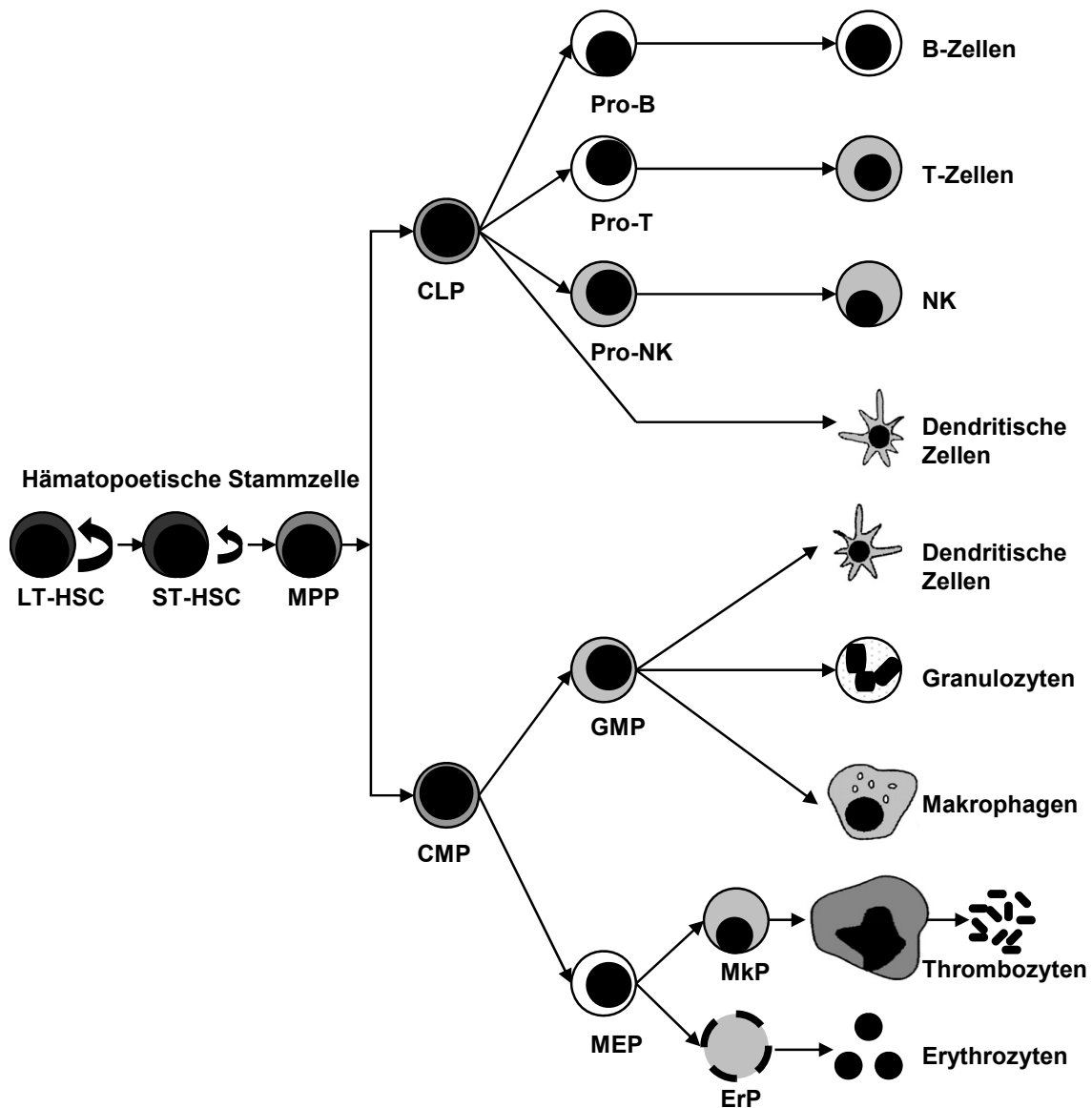


Abb. 1.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Hämatopoese im Knochenmark

HSCs werden basierend auf ihr Selbsterneuerungspotential in LT-HSC, ST-HSC und MPP unterteilt. Sie durchlaufen verschiedene Reifungsstadien, aus denen letztendlich die lymphoiden und myeloiden Zellen des Blutes entstehen. (Abk.: CLP: lymphoide Vorläuferzelle, CMP: myeloide Vorläuferzelle, GMP: Granulozyten-Monozyten-Vorläufer, ErP: erythrozytäre Vorläuferzelle, LT-HSC: *long term hematopoietic stem cell*, MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer, MkP: megakaryozytäre Vorläuferzelle, MMP: multipotente Vorläuferzelle, NK: natürliche Killerzelle, ST-HSC: *short term hematopoietic stem cell*), (Abb. modifiziert nach Reya 2003).

Aus dem CLP gehen über liniendeterminierte Vorläufer die reifen lymphoiden Zellen (B-, T- und lymphoide dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen) hervor. Der CMP kann sich entweder zum Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (GMP) entwickeln, aus dem Granulozyten, Makrophagen und myeloide dendritische Zellen hervorgehen, oder zum Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer (MEP), aus dem die Erythrozyten und Megakaryozyten entstehen (Kondo et al. 1997).

Das hierarchisch strukturierte dynamische System der hämatopoetischen Differenzierung besitzt zwei wesentliche Vorteile. Erstens erlaubt es die enorme Vermehrung von differenzierten Zellen ausgehend von nur einer Stammzelle. Dies wird durch die Kopplung verschiedener Reifungsstadien mit gleichzeitiger Zunahme des Proliferationspotentials erreicht (Hodgson et al. 1984). Dadurch wird es möglich, dass der Körper gezielt auf die spezifischen Bedürfnisse des Blut- und Immunsystems reagieren kann. So besitzt der GMP ein viel höheres Proliferationspotential als der CLP. Aus ersteren gehen u.a. die sehr kurzlebigen Granulozyten hervor, wohingegen aus dem CLP u.a. die längerlebigen B- und T-Zellen entstehen, die während ihres Reifungsprozesses selbst ausgiebig proliferieren (Passegue et al. 2005). Zweitens wird durch die hierarchische Anordnung des Systems gewährleistet, dass die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen keinem proliferativen Druck ausgesetzt werden. Die Mehrheit der Stammzellen befindet sich in der G_0 -Phase des Zellzyklus und tritt nur bei Bedarf in die G_1 -Phase ein (Bradford et al. 1997). Nur 8% der LT-HSCs verlassen täglich die G_0 -Phase, um sich zu teilen, wohingegen der Prozentsatz an aktiv proliferierenden ST-HSCs, MPPs, CLPs und CMPs viel höher ist. (Morrison & Weissman 1994, Kondo et al. 1997, Akashi et al. 2000, Cheshier et al. 1999). Der minimale Proliferationsdruck auf die HSCs verhindert eine Anhäufung von Mutationen während der DNA-Replikation und Zellteilung und trägt so zu der Integrität und Langlebigkeit der Zellen bei. Des Weiteren weisen HSCs eine starke Expression von zytoprotektiven Genen, wie z.B. *ABC/MDR*-Transporter-Gene (*ATP-binding cassette, multiple drug resistance*), auf (Zhou et al. 2001). Es ist anzunehmen, dass die HSCs geringeren Mengen an metabolischen Nebenprodukten und reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt werden als stoffwechselaktive

differenzierte Zellen, da die G₀-Phase eine metabolisch inaktive Phase des Zellzyklus darstellt (Rossi et al. 2005).

1.2 Hämatopoetische Stammzellen

HSCs stellen die am gründlichsten untersuchten gewebespezifischen Stammzellen dar und fungieren als Prototyp für die Definition allgemein gültiger biologischer Charakteristika von Stammzellen (Kondo et al. 2003). Die grundlegenden Eigenschaften der HSC wurden 1963 von Till und McCulloch (Siminovitch et al. 1963) definiert. Mittels serieller Transplantationsexperimente im Mausmodell konnten sie zeigen, dass im Knochenmark Zellen existieren, die zur Neubildung des gesamten blutbildenden Systems in der Lage sind und gleichzeitig ihr Potential zur Selbsterneuerung aufrechterhalten können. Basierend auf diesen Experimenten wurden HSCs als Zellen charakterisiert, die über Selbsterneuerungspotential verfügen und sich in jede Zelle des hämatopoetischen Systems differenzieren können.

Bedingt durch ihre Seltenheit im Knochenmark und der eingeschränkten technischen Möglichkeiten erwies sich die Charakterisierung von frühen Stammzellen in der Vergangenheit als sehr schwierig. Durch die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen das CD34-Oberflächenmolekül Mitte der 80er Jahre wurde ein weiterer Grundstein zur Erforschung der HSC gelegt. Mittels des Antikörpers konnten primitive Kolonie-bildende Vorläuferzellen aus dem Knochenmark angereichert werden (Andrews et al. 1986). Humane als auch murine HSCs sowie ihre Vorläuferzellen (Siena et al. 1991, Simmons et al. 1992) exprimieren das CD34-Molekül, dessen Expression mit zunehmender Reifung der Zellen herunterreguliert wird (Krause et al. 1996). Die Funktion des CD34-Moleküls im hämatopoetischen System bleibt jedoch bis heute ungeklärt. Möglicherweise spielt es bei der Adhäsion und dem *homing* von Zellen eine Rolle (Healy et al. 1995). Das CD34-Molekül wird nicht ausschließlich von HSCs und Vorläuferzellen exprimiert, sondern konnte auch auf vaskulären Endothelzellen (Fina et al. 1990) und Fibroblasten (Brown et al. 1991) nachgewiesen werden. Diese Verteilung weist daraufhin, dass das CD34-

Molekül keine spezifische Funktion bei der Hämatopoese erfüllt. So konnte auch in Studien mit CD34^{-/-}-Mäusen keine Beeinträchtigung der Hämatopoese festgestellt werden (Suzuki et al. 1996). Trotz allem ist heutzutage die Verwendung von CD34-positiven Zellen sowohl in klinischen als auch experimentellen Ansätzen Standard. Im menschlichen Knochenmark wird das CD34-Antigen von 1 bis 4% der Zellen exprimiert. Ende der 80er Jahre wurde die erste autologe Stammzelltransplantation von CD34-positiven Knochenmarkszellen in subletal bestrahlten Affen durchgeführt. In der verabreichten Zellpopulation befanden sich LT-HSCs, die in der Lage waren, den Empfänger zu rekonstituieren (Berenson et al. 1988).

Die Expression von CD34 erwies sich jedoch nicht als zwingendes Merkmal hämatopoetischer Stammzellen. Verschiedene Gruppen konnten nachweisen, dass im Menschen und in der Maus CD34-negative HSCs vorhanden sind. So zeigten Osawa et al. 1996 im Mausmodell die erfolgreiche Rekonstitution der subletal bestrahlten Empfänger mittels einer CD34-negativen Zellpopulation. Im fetalen Schafmodell konnte zwei Jahre später die Existenz von humanen CD34-negativen HSCs mit Langzeitrekonstitutionspotential nachgewiesen werden (Zanjani et al. 1998). Die Existenz von humanen CD34-negativen HSCs wurde ebenfalls im NOD/SCID-Mausmodell (*nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) bestätigt (Bhatia et al. 1998). In beiden Modellen wurde die Entwicklung von CD34-positiven Zellen aus den transplantierten, CD34-negativen Zellen beschrieben. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei den CD34-negativen Zellen um eine innerhalb der Entwicklungshierarchie unreifere Population von HSCs handelte als bei den CD34-positiven Zellen. In unabhängigen Studien sowohl mit humanen als auch murinen Zellen kam man zu dem Ergebnis, dass die CD34-positiven Zellen aktivierte Zellen darstellen, die jedoch wieder in die ruhende G₀-Phase, gekennzeichnet durch einen CD34-negativen Status, revertieren können (Sato et al. 1999, Dao et al. 2003, Zanjani et al. 2003). Möglicherweise stehen die ruhenden CD34-negativen HSCs an der Spitze der hämatopoetischen Hierarchie und nehmen nicht an der alltäglichen Produktion von Vorläuferzellen teil, sondern kommen nur bei Verletzung, Krankheit oder Stress zum Einsatz. Die tägliche Produktion von Vorläuferzellen würde dann von sich

selbsterneuernden CD34-positiven HSCs übernommen werden (Wilson et al. 2007).

Goodell et al. beschrieben 1996 eine neue Methode zur Aufreinigung einer HSC-angereicherten Population. Die Methode basiert auf der Fähigkeit von HSCs, den Farbstoff Hoechst-33342 aktiv aus der Zelle zu schleusen. Der Efflux des Farbstoffes ist auf die Funktion des BCRP1/ABCG2-Transporters zurück zu führen (Zhou et al. 2001). Die Hoechst-33342-negativen Zellen werden als Seitenpopulation (SP-Zellen) bezeichnet, da sie in der bildlichen Darstellung nach der Anfärbung mit Hoechst-33342 einen randständigen Schweif neben den positiven Zellen bilden. Sie weisen ebenfalls keine CD34-Expression auf. SP-Zellen wurden seitdem in verschiedenen Spezies, u.a. auch im Menschen, nachgewiesen (Goodell et al. 1997).

Mit der Entwicklung weiterer Antikörper zur Charakterisierung von HSCs in den letzten zwanzig Jahren wurde deutlich, dass es sich bei HSCs um eine sehr heterogene Zellpopulation handelt. Die Entdeckung, dass HSCs keine oder nur geringe Mengen an linienspezifischen Oberflächenmolekülen (Lin) exprimieren, war eine wichtige Voraussetzung für die weitere Charakterisierung von hämatopoetischen Stammzellen (Muller-Sieburg et al. 1986). Linienspezifische Oberflächenmarker werden demnach erst auf weiter ausdifferenzierten Vorläufern von T-, B- und dendritischen Zellen sowie natürlichen Killerzellen, Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert. Murine HSCs exprimieren das Stammzellantigen Sca-1, Thy-1 (*T-cell antigen*) sowie den Tyrosinkinaserzeptor c-Kit (Spangrude et al. 1988, Ikuta & Weissman 1992). In der Maus werden alle HSCs in der c-Kit⁺ (K), Thy-1.1^{lo} (T), Lin^{-lo} (L) und Sca-1^{hi} (S) Population (KTLS-Zellen) zusammengefasst, die anhand von weiteren Markern (IL-7R α , Flk2, CD34) und des Selbsterneuerungspotentials in drei Subpopulationen (LT-HSCs, ST-HSCs und MPPs) untergliedert werden kann (Morrison & Weissman 1994). Die LT-HSCs sind in der Lin⁻-Population enthalten. Viele dieser Zellen exprimieren das CD34-Antigen nur schwach (Weissman et al. 2001). Neuerdings werden auch die SLAM-Rezeptoren CD48 und CD150 (*signalling lymphocyte activation molecule*) für die Charakterisierung von HSCs zur Hilfe genommen. LT-HSCs sind nach dieser Klassifizierung in der Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺CD48⁻CD150⁺CD34⁻-Population angereichert (Wilson et al. 2007).

Die Fähigkeit von HSCs, myeloablative Empfänger seriell zu rekonstituieren, ist das überhaupt strengste Kriterium zur Charakterisierung von HSCs. Für die Charakterisierung von murinen HSCs hat sich der kompetitive Repopulationsassay als Goldstandard durchgesetzt. Die Charakterisierung von humanen HSCs erweist sich als schwieriger, da diese funktionelle Eigenschaft der Stammzelle nicht experimentell überprüft werden kann. Mittlerweile werden für die Charakterisierung von humanen HSCs allerdings Xenotransplantationsassays in immundefizienten Mäusen (NOD/SCID) oder fetalen Schafen herangezogen (Bonet 2003). Für die *in vitro* Charakterisierung von HSCs und Vorläuferzellen werden LTC-IC-Assays (*long-term culture initiating cell*), CAFC-Assays (*cobblestone area-forming cells*) oder CFU-Assays (*colony-forming unit*) durchgeführt (de Wynter & Ploemacher 2001). Die Xenotransplantation von humanen HSCs in NOD/SCID-Mäuse stellt ein verlässliches Modell zur Identifizierung von primitiven HSCs dar, die als SRCs (*severe combined immunodeficient SCID-repopulating cell*) definiert werden (Dick et al. 1997). Phänotypisch sind diese Zellen in der CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Population angereichert, wohingegen die CD34⁺CD38⁺-Population Vorläufer mit geringem Repopulationspotential charakterisiert (Bhatia et al. 1997a & b). Die humane SRC ist im Vergleich zur murinen HSC sehr selten (Mensch 1/1000000, Maus 1/20000) und variiert in der Frequenz je nach Quelle (Nabelschnurblut > Knochenmark > mobilisierte HSCs). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass humane HSCs auch in der CD34-negativen Population anzusiedeln sind (Goodell et al. 1997, Bhatia et al. 1998, Zanjani et al. 2003). Das Glykoprotein CD133 wird mittlerweile auch zur Charakterisierung von HSCs herangezogen. CD133 wird auf allen CD34⁺CD38⁻-Zellen und auf einigen CD38-positiven Vorläufern exprimiert (Yin et al. 1997). Von den CD34⁻CD38⁻Lin⁻-Zellen exprimieren 0,2% CD133. Innerhalb dieser Population haben nur letztere SRC-Potential (Gallacher et al. 2000).

1.3 Die hämatopoetische Nische

Während der Embryogenese finden meistens symmetrische Zellteilungen statt. Dabei entstehen zwei identische Tochterzellen. Damit wird während der Entwicklung eines Organismus der Aufbau verschiedener Gewebe und Organe gewährleistet. Unter diesen Umständen und im Falle von Verletzungen sowie nach der Transplantation von HSCs teilen sich auch gewebespezifische Stammzellen symmetrisch (Reya et al. 2001, Wilson & Trumpp 2006). Im Gegensatz dazu bleibt die Anzahl an gewebespezifischen Stammzellen unter homöostatischen (*steady state*) Bedingungen im ausgereiften Organismus konstant (Kondo et al. 2003).

Eine Besonderheit der Stammzellen liegt in ihrer Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung. Dabei reproduziert sich die Stammzelle während des Teilungsprozesses nicht nur selbst, sondern bringt gleichzeitig eine Tochterzelle hervor, die in ihrer weiteren Entwicklung einer irreversiblen Differenzierung unterliegt. Während der *in vitro* Kultivierung jedoch teilen sich HSCs symmetrisch und produzieren zwei weiterdifferenzierte oder apoptotische Tochterzellen, so dass der Pool an HSCs depletiert wird (Lessard et al. 2004) (**Abb. 1.2**).

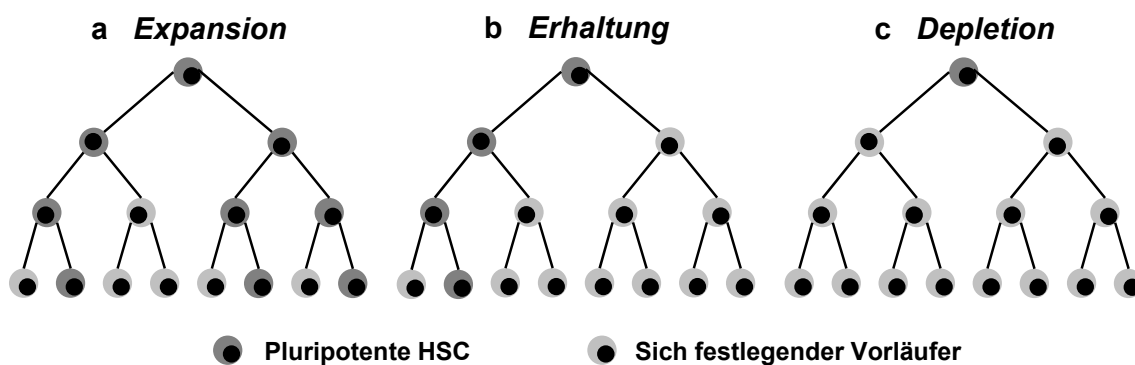


Abb. 1.2: Mögliche Schicksale von HSCs nach der Teilung

Die entstehenden Tochterzellen können entweder **a)** den HSC-Pool vergrößern oder **b)** zur Erhaltung beitragen, indem eine der Zellen ihre HSC-Eigenschaften beibehält oder **c)** durch das Einschalten eines Differenzierungsprogrammes oder Apoptose aus dem HSC-Pool ausscheiden. (Abb. abgewandelt nach Dick 2003).

Die Etablierung der Asymmetrie kann entweder vor (teilungsbedingte Asymmetrie) oder nach (umweltbedingte Asymmetrie) der Zellteilung erfolgen. Bei der teilungsbedingten Asymmetrie kommt es im Zytoplasma zur ungleichen Verteilung von Faktoren (mRNA und/oder Proteine), die über das weitere Schicksal einer Tochterzelle entscheiden. Während der Mitose wird die Teilungsebene so angeordnet, dass nur eine Tochterzelle die entscheidenden Faktoren bekommt (Wilson & Trumpp 2006). Bei der umweltbedingten Asymmetrie werden zwei identische Tochterzellen nach der Teilung verschiedenen externen Signalen in unterschiedlichen Mikromilieus ausgesetzt, die entweder ihr Selbsterneuerungspotential oder ihre Differenzierung fördern (Ohlstein et al. 2004).

Schofield brachte 1978 erstmals das Konzept einer so genannten Stammzellnische für das hämatopoetische System auf. Sie stellt die biologische, physikalische und chemische Beschaffenheit der unmittelbaren Mikroumgebung dar, die entscheidend zur Erhaltung des undifferenzierten Zustands der Stammzellen beiträgt. Diese Stammzellnische wird u.a. durch Subpopulationen von Gewebezellen und extrazellulären Substraten charakterisiert. Ähnliche Organisationsverbände wurden auch für Stammzellen der Epidermis, des Darmepithels, des Nervensystems und der Gonaden beschrieben (Spradling et al. 2001). Eine der wichtigsten Funktionen der Stammzellnischen ist, die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung zu regulieren. Die Fähigkeit von adulten Stammzellen sich selbst zu erneuern und zu differenzieren ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Zelldifferenzierung könnte zu einer Erschöpfung des Stammzellpools führen, während die unkontrollierte Selbsterneuerung von HSCs zu einem erhöhten Tumorgenesisrisiko führen würde.

Bisher konnten zwei Stammzellnischen im Knochenmark identifiziert werden, die Osteoblastennische und die vaskuläre Nische (Yin & Li 2006). Die Osteoblastennische befindet sich am trabekulären Endosteum (innere Schicht der Knochenhöhle, die mit dem Knochenmark in Kontakt tritt) und wird von spezialisierten Osteoblasten und CAR-Zellen (*CXCL12-abundant reticular cells*) sowie Stromafibroblasten gebildet (Moore & Lemischka 2006, Wilson & Trumpp 2006). Diese Zelltypen regulieren die Erhaltung von ruhenden LT-HSCs mittels

Parathyroidhormon/Notch- (Calvi et al. 2003), BMP- (*bone morphogenic protein*) (Zhang et al. 2003) und Tie2/Ang-1- (*protein receptor tyrosine kinase 2/angiopoietin 1*) (Arai et al. 2004) Interaktion und verankern die LT-HSCs über N-Cadherin mit SNO-Zellen (*spindle-shaped N-Cadherin⁺CD45⁻osteoblastic cell*) in der Nische (Zhang et al. 2003). Die vaskuläre Stammzellnische befindet sich im sinusoiden Epithelium der Mikrovaskulatur nahe der Blutzirkulation und wird von Endothelzellen und CAR-Zellen gebildet. Hier wird die Proliferation, Differenzierung und Migration von aktivierten HSCs gefördert (Wilson & Trumpp 2006).

1.4 Schwere kongenitale Neutropenien

Schwere kongenitale Neutropenien gehören zu einer Gruppe von hämatopoetischen Störungen, die durch eine schwere chronische Neutropenie (SCN) mit einem absoluten Neutrophilenwert (ANC) unter $0,5 \times 10^9/L$ und damit assoziierter systemischer bakterieller Infektion vom frühen Kindesalter an charakterisiert werden. Außerdem weisen die Patienten eine erhöhte Anfälligkeit zur Entwicklung von akuten Leukämien auf, so dass schwere kongenitale Neutropenien als präleukämischer Zustand beschrieben werden können (Rosenberg et al. 2006).

Bei schweren kongenitalen Neutropenien handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Verschiedene monogene Defekte führen zu einem gemeinsamen hämatologischen und klinischen Phänotyp. Charakteristisch ist der Entwicklungsstopp von Granulozyten auf der Stufe von Promyelozyten (Skokowa et al. 2007). Bei ungefähr 60% der Patienten tritt die Erkrankung sporadisch oder in einem autosomal dominanten Erbgang auf. In 40% der Fälle (ebenso wie bei der zyklischen Neutropenie) liegt eine heterozygote Mutation im *ELA2*-Gen (neutrophile Elastase) als genetische Ursache vor (Ancliff et al. 2002, Masullo et al. 2005).

Die molekulare Charakterisierung der autosomal rezessiv vererbten Defekte steht erst am Anfang. Als eine der molekularen Ursachen für die ursprünglich von Kostmann 1956 beschriebenen schweren kongenitalen Neutropenie konnte

kürzlich eine homozygot vorliegende Mutation in HAX1 (*HCLS1-associated protein X1*) identifiziert werden (Klein et al. 2007). Trotz aller Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Ursache dieser Knochenmarkserkrankungen gibt es bisher noch 50 Patienten, die keine der bisher entdeckten genetischen Defekte aufweisen.

Besonders schwierig erweist sich die molekulare Identifizierung der SCN-assoziierten Gene bei Patienten ohne großen Familienstammbaum, da in diesem Fall nicht auf konventionelle Kopplungsanalysen zurückgegriffen werden kann. Abhilfe könnten genetische Komplementationsstudien schaffen, zu denen jedoch große Mengen an hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen benötigt werden. Dies wird jedoch durch die Seltenheit der HSC im Knochenmark erschwert. Mittel und Wege zu finden, die primären Patientenzellen im Vorfeld *in vitro* zu expandieren, würde diese Barriere umgehen und somit zur Aufklärung von genetisch ungeklärten Neutropenien und möglicherweise auch der damit assoziierten Leukämien beitragen.

1.5 Strategien zur ex vivo Expansion von humanen HSCs

Die Balance zwischen Erhaltung, Expansion und Extinktion durch Differenzierung oder Apoptose werden in HSCs durch extrinsische und intrinsische Faktoren gesteuert. Eines der Hauptziele der Stammzellforschung ist die Identifizierung und Charakterisierung dieser Regulatoren, um die gewonnenen Erkenntnisse zur Expansion von HSCs für Klinik und Forschung zu nutzen.

Unter natürlichen Bedingungen expandieren hämatopoetische Stammzellen während der Embryonalentwicklung in der fetalen Leber und im adulten Knochenmark als Reaktion auf extrinsische Signale. Bis heute sind die Signalwege, die diesen Prozess kontrollieren, sowie die molekularen Mechanismen, die entscheiden, ob das Selbsterneuerungspotential während der Teilung einer HSC erhalten bleibt oder verloren geht, weitgehend unklar (Schiedlmeier et al. 2007). Mittlerweile häufen sich die Hinweise dafür, dass das

Schicksal einer HSC durch ein empfindliches Zusammenspiel von extrinsischen Signalen der Stammzellnische und intrinsischen genetischen Programmen der HSCs gesteuert wird.

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren wurden in unterschiedlichsten Kombinationen auf ihre Eignung zur HSC-Expansion überprüft (Devine et al. 2003, Heike & Nakahata 2002). Es handelt sich dabei um Signalmoleküle, welche die Proliferation an verschiedenen Stufen der hämatopoetischen Entwicklung induzieren. Viele dieser Zytokine werden lokal in der Stammzellnische von akzessorischen Zellen, wie z.B. Osteoblasten, Stroma- und Endothelzellen, gebildet. Die Entdeckung von neuen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren Mitte der 80er bis Anfang der 90er Jahre ermöglichte es, deren Fähigkeit zur Expansion von HSCs *in vitro* zu überprüfen (Zhu & Emerson 2002). Im kompetitiven Repopulationsassay erwies sich die Kombination von SCF (*stem cell factor*), Flt3-L (*fetal liver tyrosine kinase 3 ligand*), TPO (Thrombopoietin) und IL-6 (Interleukin-6) mit einer 4,2-fachen Expansion von SCRs am effizientesten (Ueda et al. 2000). Doch trotz intensiver Bemühungen, geeignete Zytokinkombinationen zur Stimulation der Zellteilung zu definieren, konnten nur minimale Erfolge erzielt werden. Dies liegt zum einen darin begründet, dass HSCs sich von Natur aus in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und zum anderen, dass Zytokine einen pleiotropen Effekt auf HSCs ausüben, der oftmals zur Induktion der Differenzierung statt zur Selbsterneuerung führt (Attar & Scadden 2004, Sauvageau et al. 2004). Meist verlieren die kultivierten Zellen während der *in vitro* Propagierung ihr Selbsterneuerungs- und Rekonstitutionspotentials (Mikkola & Orkin 2006).

Die Imitierung der hämatopoetischen Nische durch Kokultivierung von humanen HSCs mit MSCs (mesenchymale Stammzellen) erzielte auch nur minimale Erfolge. MSCs differenzieren zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Stromazellen und ahmen somit die hämatopoetische Nische *in vitro* nach (Robinson et al. 2006).

Mittels umfassender Transkriptionsanalysen und Untersuchungen im Mausmodell konnten kürzlich einige „Stammzellgene“, die u.a. die Erhaltung, Expansion und Differenzierung steuern, sowie extrinsische Signale, die mit der Stammzellnische ausgetauscht werden, identifiziert werden (Ramalho-Santos et

al. 2002, Ivanova et al. 2002, Sorrentino 2004). Extrinsische Signale der Osteoblastennische werden durch das Zusammenspiel von löslichen Liganden, Matrixinteraktion und Zell-Zell-Kontakt vermittelt, wohingegen intrinsische Signale mittels Transkriptionsfaktoren übersetzt werden (Sharma et al. 2006). Viele dieser Signalwege spielen auch bei der Embryogenese eine fundamentale Rolle.

Zu den intrinsischen Regulatoren gehören Mitglieder der Homöoboxfamilie v.a. HOXB4 (*homeobox B4*) (Antonchuk et al. 2002, Buske et al. 2002), Notch-1 (Varnum-Finney et al. 2000), Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*) (Lessard & Sauvageau 2003, Park et al. 2003), p21^{Cip1/Waf1} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*) (Cheng et al. 2001, Stier et al. 2003) und β -Catenin (Reya et al. 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NF- κ B (*nuclear transcription factor Y alpha*, DNA-bindende Untereinheit des trimären Transkriptionsfaktors NF- κ B) eine zentrale Rolle bei der Integration einiger dieser Signalkaskaden spielt. So wird in primitiven hämatopoetischen Zellen durch die Überexpression von NF- κ B die Transkription von HOXB4-Paralogen, Notch-1, LEF-1 (*lymphocyte enhancer factor 1*) und hTERT (*telomerase RNA component*) aktiviert. Die Überexpression von NF- κ B in hämatopoetischen Zellen förderte die Selbsterneuerung von HSCs *in vitro* und erhöhte deren Rekonstitutionspotential *in vivo* (Zhu et al. 2005).

Als externe Signalmoleküle konnten Mitglieder der Wnt- (Murdoch et al. 2003, Reya et al. 2003, Willert et al. 2003) und Shh-Familie (*sonic hedgehog*) (Bhardwaj et al. 2001) sowie Notch-Liganden (Varnum-Finney et al. 2000, Karanu et al. 2000, Ohishi et al. 2002) und Ang-1 (*angiopoietin 1*) (Zhang et al. 2006) identifiziert werden. Mittels retroviraler Überexpression, *antisense* Strategie oder Zugabe der Proteine ins Medium konnten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Expansion von HSCs erzielt werden (**s. Abb. 1.3**).

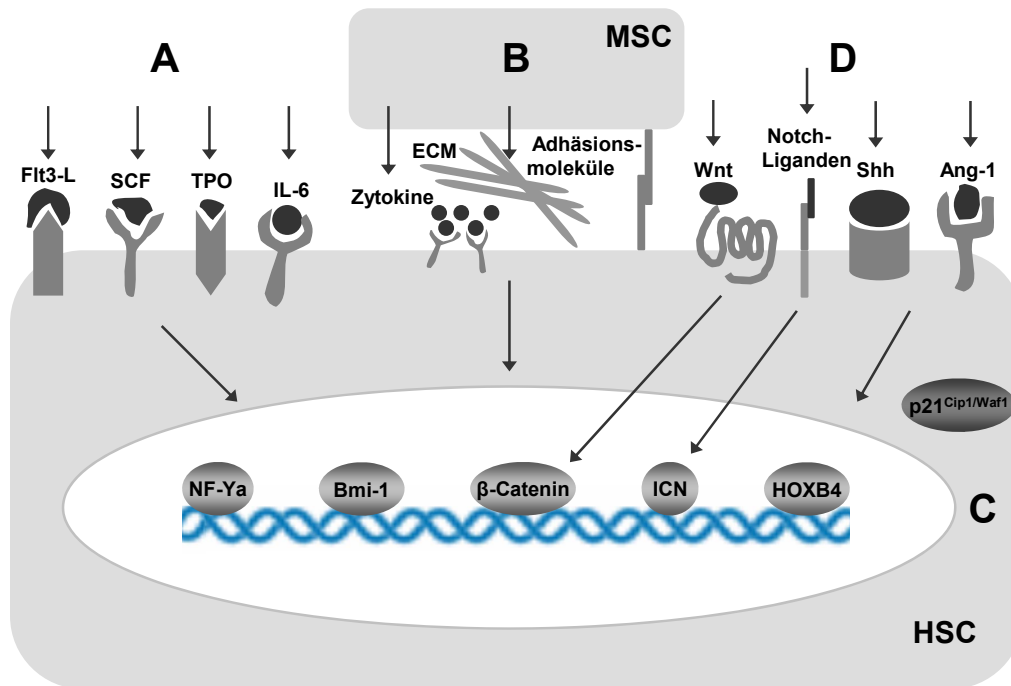


Abb. 1.3: Strategien zur ex vivo Expansion von hämatopoetischen Stammzellen

Bisher identifizierte Faktoren, die am geeignetsten für die *in vitro* Expansion von HSCs zu sein scheinen, lassen sich in drei Hauptkategorien unterteilen: Transkriptionsfaktoren, Signalmoleküle und Zellzyklusregulatoren. Es gibt mittlerweile Hinweise, dass durch die Modulation der Expression von Genen der verschiedenen Kategorien eine Expansion von murinen HSCs erzielt werden kann. Weniger Daten existieren jedoch hinsichtlich der Expansion von humanen HSCs, was u.a. an den weniger gut definierten Assaysystemen für humane hämatopoetische Stammzellen liegt. Frühere Ansätze konzentrierten sich auf die Supplementierung des Mediums mit Zytokinen (A) oder der Imitierung der Nische durch Kokultivierung von HSCs mit Stromazellen, die Zytokine, extrazelluläre Matrixproteine und Adhäsionsproteine bereitstellen (B). Fortschritte im Bereich des retroviralen Gentransfers sowie der *antisense* Strategie erlauben mittlerweile die Modulation der Expression von Transkriptionsfaktoren & Zellzyklusregulatoren (C). Signalkaskaden können auch extern durch Gabe der entsprechenden Signalmoleküle ins Medium stimuliert werden (D). (Abk.: Ang-1: Angiopoietin 1, Bmi-1: *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*, ECM: extrazelluläre Matrix, HOXB4: Homöobox B4, HSC: hämatopoetische Stammzelle, ICN: intrazelluläre Domäne von Notch, MSC: mesenchymale Stammzelle, NF-Ya: *nuclear transcription factor Y alpha*, p21^{Cip1/Waf1}: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*, Shh: *sonic hedgehog*), (Abgewandelt nach Rizo et al. 2006).

Die Generierung von humanen myeloiden Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien erweist sich jedoch trotz neuester Erkenntnisse der Stammzellbiologie als schwierig. Um über einen längeren Zeitraum stabile Linien zu etablieren bedarf es meist des Stimulus eines AML-assoziierten Fusionsproteins wie NUP98-NSD1 (*nucleoporin 98 kDA, nuclear receptor binding SET domain protein 1*) (Wang et al. 2007), MLL-ENL (*mixed lineage leukemia, eleven nineteen leukemia*) (Horton et al. 2005) oder TLS-ERG (*translocated in liposarcoma, Ets-related gene*) (Warner et al. 2005). Eine andere Möglichkeit stellt die gemeinsame Expression von hTERT (*telomerase reverse transkriptase*) und

HPV-E6/E7 (*human papilloma virus type 16, transforming protein E6, E7*) dar, um Seneszenz und Krise in den Zellen zu überwinden.

Eine eingehende Beschreibung der oben genannten Genfamilien und ihre Bedeutung für die Hämatopoese würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher beschränken sich die folgenden Abschnitte auf die nähere Darstellung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene.

1.6 β -Catenin

β -Catenin ist ein multifunktionales Protein der *armadillo repeat* Superfamilie, das eine entscheidende Rolle bei Adhärenzverbindungen (*adherens junctions*) und der kanonischen Wnt-Signalkaskade (Namenshybrid aus *wingless* und *int*) spielt. Es liegt in der Zelle überwiegend in Adhärenzverbindungen vor und nur ein kleiner dynamischer Pool an β -Catenin im Zytosol und im Nukleus sorgt für die Weiterleitung von Wnt-Signalen (Xu & Kimelman 2007). Wnt-Proteine spielen eine wesentliche Rolle in vielen biologischen Prozessen, wie z.B. der Embryonalentwicklung und der Erhaltung von Stammzellen (Moon et al. 2002). Mutationen in Genen von Mitgliedern der kanonischen Wnt-Signalkaskade tragen zur Tumorgenese bei und werden häufig in humanen Tumoren detektiert (Polakis 2000, Reya & Clevers 2005).

1.6.1 Allgemeine Funktion von β -Catenin

β -Catenin übernimmt in der Zelle unterschiedliche Funktionen. In Adhärenzverbindungen liegt β -Catenin membranassoziiert vor und fungiert als Strukturprotein. Es interagiert mit der intrazellulären Domäne des transmembranen E-Cadherins und verbindet den Adhärenzverbindungskomplex über α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett (McCrea et al. 1991). Dieser Komplex ist zur Erhaltung von Zellschichten notwendig und kann die Migration von Zellen beeinflussen (Jamora et al 2003). Innerhalb der kanonischen Wnt-Signalkaskade übernimmt β -Catenin als Transaktivator in Kooperation mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (*T-cell factor/lymphocyte enhancer factor*) der HMG-Box-Familie (*high mobility group*) genregulatorische Funktionen.

Die Mitglieder der Wnt-Familie kodieren sezernierte lipidmodifizierte Glykoproteine, von denen es im Menschen neunzehn Mitglieder gibt (s. *Wnt-Homepage*: <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>). Durch Bindung an Rezeptoren der Frizzled-Familie (*seven-transmembrane receptors*) und Korezeptoren der LRP-Familie (*low density lipoprotein receptor related protein*) erfolgt über eine Signalkaskade die Aktivierung von β -Catenin (Bhanot et al. 1996, Pinson et al. 2000) (**Abb. 1.4**).

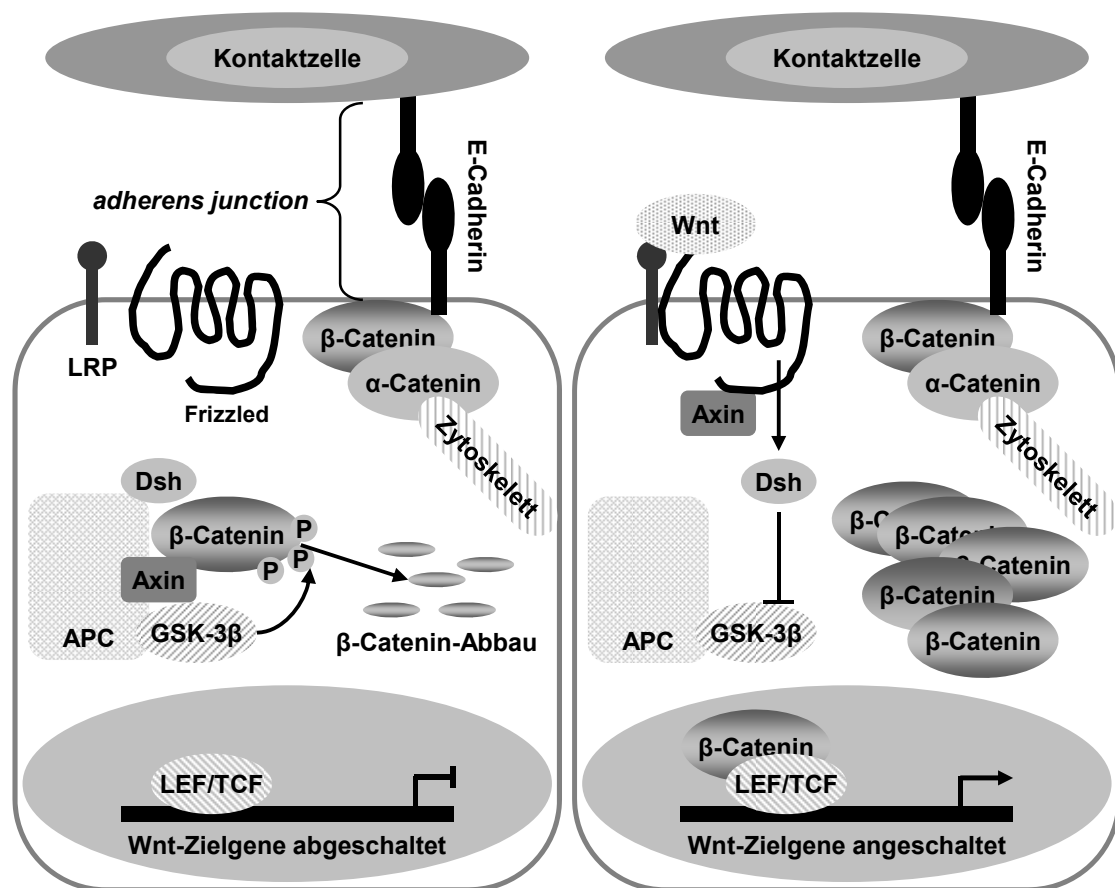


Abb. 1.4: Die kanonische Wnt-Signalkaskade

In Abwesenheit eines Wnt-Signals (links) liegt β -Catenin in einem Komplex mit Axin, APC und GSK3- β vor und wird mittels Phosphorylierung (P) für den proteasomalen Abbau kenntlich gemacht. β -Catenin existiert ebenfalls als E-Cadherin-gebundene Form und reguliert die Zelladhäsion. Durch ein Wnt-Signal (rechts) kommt es zur Stabilisierung von β -Catenin und zu dessen Translokation in den Kern, wo es zusammen mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren die Transkription der Zielgene transaktiviert. (Abk.: APC: *adenomatous polyposis coli*, Dsh: *Dishevelled*, GSK-3 β : *glycogen synthase kinase 3 β* , LEF/TCF: *T cell factor/lymphocyte enhancer factor*, LRP: *low-density lipoprotein receptor-related protein*), (Abb. modifiziert nach Reya & Clevers 2005).

In Abwesenheit von stimulierenden Wnt-Signalen liegt β -Catenin destabilisiert in einem Multiproteinkomplex aus Axin, APC (*adenomatous polyposis coli*) und GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) vor. Die Phosphorylierung mittels

GSK-3 β initiiert die Ubiquitylierung von β -Catenin und führt zu dessen Abbau durch Proteasomen (Huelsenken & Birchmeier 2001).

Die Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren induziert die Inaktivierung des Multiproteinkomplex durch Dishevelled. Es erfolgt die Stabilisierung von β -Catenin und dessen Transport in den Zellkern (Bienz & Clevers 2000). Für den Transport von β -Catenin in den Kern wird ein Komplex aus den nukleären Proteinen Pygopus (Pygo) und Legless (Lgs) benötigt. Dieser vermittelt zum einen über die NLS-Sequenz (nukleäres Lokalisationssignal) von Lgs den Transport von β -Catenin in den Kern und zum anderen wird β -Catenin durch das konstitutiv im Kern befindliche Pygo dort verankert (Townsend et al. 2004).

β -Catenin interagiert mit verschiedenen Mitgliedern der TCF/LEF-Transkriptionsfaktorfamilie und rekrutiert Chromatin-modifizierende und Chromatin-remodulierende Koaktivatorkomplexe für die Gewebe- und entwicklungsspezifische Transkription der Zielgene (Hecht et al. 2000, Barker et al. 2001, Widelitz 2004). In Abwesenheit von Wnt-Signalen rekrutieren TCF/LEF-Proteine den Korepressor Groucho zum *enhancer* des Zielgens und sorgen so für dessen Repression (Cavallo et al. 1998).

β -Catenin reguliert eine Vielzahl von Genen, die wiederum unterschiedliche Signalwege (Differenzierung, Proliferation, Apoptose) aktivieren können. In Stammzellen zählen zu den Wnt-gesteuerten Genen u.a. solche, die am Zellzyklus beteiligt sind (z.B. c-Myc, Cyclin D), wohingegen bei der Embryonalentwicklung das Spektrum der Wnt-regulierten Gene vom Zelltyp und dem Alter des Embryos abhängt (He et al. 1998, Lickert et al. 2000, Xu & Kimelman 2007). β -Catenin ist auch in der Lage, direkt mit Repressoren und Koaktivatoren, wie z.B. SOX3 und SOX17 (*SRY-box 3, 17*), Smads (*mothers against DPP*) sowie Steroidhormonrezeptoren, zu interagieren (Widelitz 2004).

1.6.2 Die Rolle von β -Catenin in HSCs

Die Wnt-Signalkaskade reguliert das Verhalten von Stammzellen in einer Vielzahl von Organen, wie z.B. das der embryonalen (Sato et al. 2004), neuralen (Zechner et al. 2003), epidermalen (Huelsenken et al. 2001), intestinalen (Korinek et al. 1998) und hämatopoetischen Stammzellen (Reya et al. 2003). Die Entscheidung von HSCs, sich selbst zu erneuern oder zu differenzieren,

wird durch ein komplexes Zusammenspiel von intrinsischen Signalen und Stimuli der Stammzellnische gesteuert (Reya & Clevers 2005).

Wnt-Proteine werden von HSCs selbst als auch von dem Mikromilieu der Nische synthetisiert. So konnte gezeigt werden, dass im humanen Knochenmark Wnt-2B, Wnt-5A und Wnt-10B exprimiert werden, wohingegen die CD34⁺Lin⁻-Population, die für HSCs und frühe Vorläufer angereichert ist, Wnt-5A produziert. Im murinen Knochenmark wurde ebenfalls die Expression von Wnt-3A, Wnt-5A und Wnt-10B nachgewiesen (Reya et al. 2000). In murinen HSCs konnte mittels Expressionsanalysen die Expression von TCF/LEF-Familienmitgliedern nachgewiesen werden, was indirekt einen Hinweis auf die Verwendung der Wnt-Signalkaskade gibt (Reya et al. 2003).

Die Ergebnisse mehrerer Studien deuten darauf hin, dass die Wnt-Signalkaskade direkten Einfluss auf die Selbsterneuerung von HSCs und Vorläuferzellen nimmt. So wurde *in vitro* gezeigt, dass das Wachstum muriner Vorläuferzellen nach Kultivierung in Wnt-haltigem Medium gefördert und Differenzierungsvorgänge in ihnen unterdrückt werden (Austin et al. 1997). Die Kultivierung von humanen Vorläuferzellen auf Stromazellen unter Zugabe von Wnt-5A förderte die Expansion von undifferenzierten Vorläufern *in vitro* (Van Den Berg et al. 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Wnt-5A-produzierende Stromazelllinien das Wachstum von HSCs fördern (Hackney et al. 2002). Die Kokultivierung von humanen CD34-positiven Zellen mit Wnt-transduzierten Knochenmarkstromazellen führte ebenfalls zu einem Anstieg von myeloiden Vorläufern (Van den Berg et al. 1998). Im NOD/SCID-Mausmodell führte die *in vivo* Verabreichung von Wnt-5A zu einer gesteigerten Rekonstitution durch humane HSCs (Murdoch et al. 2003). Außerdem wiesen murine HSCs, die mit aufgereinigten Wnt-Proteinen inkubiert wurden, verstärkte Selbsterneuerungskapazitäten *in vitro* auf (Willert et al. 2003).

Eine Erhöhung des Selbsterneuerungspotential von β -Catenin-transduzierten (konstitutiv aktiv) HSCs konnte mittels Rekonstitution von letal bestrahlten Mäusen gezeigt werden (Reya et al. 2003). Umgekehrt wurde mittels retroviraler Überexpression des Wnt-Inhibitors Axin gezeigt, dass die Proliferation von HSCs *in vitro* inhibiert und die Rekonstitutionsfähigkeit *in vivo* herabgesetzt wird (Reya et al. 2003, Willert et al. 2003).

Zusammenfassend deuten diese Daten daraufhin, dass die Wnt-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung von HSCs spielt. Die durch Wnt induzierte Selbsterneuerung könnte zum Teil durch Zyklone wie Ccnd1 und Ccnd2 (Cyclin D1, D2) sowie c-Myc vermittelt werden, deren Expression als Reaktion auf Wnt-3A in HSCs nachgewiesen werden konnte (Duncan et al. 2005).

Es wird immer deutlicher, dass die Selbsterneuerung von HSCs durch ein komplexes Netzwerk von hierarchisch geordneten Signalwegen gesteuert wird, an dessen Spitze vermutlich die Wnt-Signalkaskade steht (Reya et al. 2003). Kürzlich wurde eine Verbindung zwischen der Wnt- und Notch-Signalkaskade hergestellt. Notch ist ein Transmembranrezeptor, dessen intrazelluläre Domäne (ICN) nach Rezeptor-Liganden-Interaktion abgespalten wird und als Transkriptionsfaktor fungiert. Die Aktivierung der Notch-Signalkaskade führt zur Inhibierung von Differenzierungsprozessen in HSCs und sorgt dafür, dass die Balance zwischen Selbsterneuerung und Linienspezifizierung erhalten bleibt (Jacobsen 2005). Die duale Rolle von β -Catenin als strukturelles Element von Adhärenzverbindungen und als Transkriptionsfaktor könnte ein gemeinsamer Mechanismus zur Regulation der Selbsterneuerung von HSCs innerhalb der Nische sein, wobei Notch-Signale für die Inhibierung von Differenzierungsprozessen sorgen (Nelson & Nusse 2004).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wnt-Signalkaskade die Expression von HOXB4 (*homeobox B4*) induziert, ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls die Expansion von hämatopoetischen Stammzellen fördert (Antonchuk et al. 2002). Des Weiteren bestehen Verknüpfungen zu Signalkaskaden bzw. deren Signalmolekülen, die ebenfalls in den Zusammenhang der Stammzellregulation gebracht wurden, wie z.B. Smad-4 (*mothers against DPP homolog 4*, TGF- β -Signalkaskade, *transforming growth factor β*), FGF (*fibroblast growth factor*) und Shh (*sonic hedgehog*) (Nelson & Nusse 2004, De Strooper & Annaert 2001).

Die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade scheint ebenfalls eine Eigenschaft von translokationsassoziierten akuten myeloischen Leukämien, wie z.B. der Translokation t(8;21), zu sein (Müller-Tidow et al. 2004).

1.7 Homöobox-Proteine

Die Homöobox-Proteinfamilie umfasst eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die als gemeinsames Motiv eine Homöobox-Domäne (HD) aufweisen. Diese besteht aus einundsechzig Aminosäuren, die ein Helix *turn* Helix Motiv ausbilden, über welches die DNA-Interaktion erfolgt (Gehring et al. 1994). Insgesamt unterteilt man die HD-Familie in zwei Klassen. Zur Klasse eins gehören die gruppierten HD-Gene (HOX), welche die bekanntesten Vertreter der HD-Familie darstellen, wohingegen zur zweiten Klasse ungruppierte Gene gehören, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen (Owens & Hawley 2002).

HOX-Proteine sind zentrale Regulatoren der Embryonal- und Organentwicklung und wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* beschrieben. Mutationen in Genen von Mitgliedern dieser Familie führten zu einem kompletten Austausch von Körpersegmenten, weshalb sie als homöotische Transformationen bezeichnet wurden (Warren & Carroll 1995).

1.7.1 Allgemeine Funktion von Homöobox-Proteinen

In Vertebraten wurden vier Gruppen von insgesamt neununddreißig HOX-Genen mit neun bis elf Mitgliedern auf unterschiedlichen Chromosomen (7p15, 17p21, 12q13 und 2q31) lokalisiert. Diese gruppierten Gene sind für ihre Rolle bei der embryonalen Körpersegmentierung bekannt geworden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Gruppen durch Duplikation und Divergenz eines ursprünglichen Gens entstanden sind (Grier et al. 2005).

Die meisten Homöobox-Gene liegen jedoch außerhalb der HOX-Gruppen und sind nicht an homöotischen Transformationen beteiligt. Sie werden als ungruppierte Homöobox-Gene der zweiten Klasse zugeordnet. Eine Gruppe von ungruppierten HD-Proteinen fungiert als Kofaktoren für die HOX-gesteuerte Transkription. Dazu zählen PBX-1 (*pre B-cell leukemia transcription factor 1*) und Meis-1, die Mitglieder der TALE-Familie (*three amino acid loop extension*) sind. Die Proteine bilden einen Komplex, der sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Expression der Zielgene einwirken kann. Dies hängt von weiteren Koaktivatoren oder Repressoren, wie z.B. CBP/p300 (*cAMP response*

element binding protein, *E1A-binding protein*), Histondeacetylasen oder NcoR/SMRT (*nuclear corepressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), ab (Saleh et al. 2000, Lu et al. 2003).

1.7.2 Die Rolle von HOX-Proteinen in HSCs

Mitglieder der HOX-Proteinfamilie spielen eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen (Buske & Humphries 2000). HSCs und hämatopoetische Vorläuferzellen exprimieren HOX-Gene in einem charakteristischen Muster, das vom Differenzierungsstatus und der Linienspezifität der Zellen abhängt. Die 3'-Gene der A- und B-Gruppen werden in frühen Vorläuferzellen stark exprimiert. Mit der Festlegung auf die erythrozytäre oder myeloide Liniendifferenzierung wird die Expression herunterreguliert und einige 5'-Gene exprimiert (Sauvageau et al. 1994, Lawrence et al. 1995).

Mittels retroviraler Überexpression von HOX-Genen *in vitro* und *in vivo* sowie durch *knock out* Mausmodelle konnte die Rolle einer Vielzahl von HOX-Genen in der Hämatopoese definiert werden. HOXA5 induziert die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in die myelomonozytische Reihe und inhibiert die Erythropoese (Crooks et al. 1999, Bjornsson et al. 2001), während HOXB6 die Differenzierung der erythrozytären Linie reguliert (Zimmermann & Rich 1997). Mittels Gentransfer von HOXA9 konnten immortalisierte Linien mit granulozytärem und monozytärem Differenzierungspotential generiert werden (Calvo et al. 2000). Die Überexpression von HOXA10 in murinen HSCs führte zu einer gestörten Entwicklung der myeloiden und B-Zell-Reihe, sowie zur Expansion von Megakaryozytenvorläufern und letztendlich zur Entwicklung einer myeloiden Leukämie (Thorsteindottir et al. 1997). Die serielle Transplantation von HOXB4-transduzierten HSCs bewirkte einen fünfzigfachen Anstieg der transplantierbaren totipotenten HSCs in primären und sekundären Empfängertieren (Sauvageau et al. 1995). Die Fähigkeit von HOXB4, die Selbsterneuerung von HSCs zu fördern, wurde *in vitro* und *in vivo* von mehreren Gruppen bestätigt (Antonchuk et al. 2002, Amsellem et al. 2003, Krosi et al. 2003, Buske et al. 2002). HOXB7 förderte die Proliferation von HSCs sowie die Differenzierung von myeloiden Vorläufern (Care et al. 1999).

Die Expression von HOXC4-mRNA konnte in HSCs und während der lymphoiden Differenzierung nachgewiesen werden, wohingegen HOXC6 in frühen und späten Vorläuferzellen der lymphoiden Linie exprimiert wird. HOXC5 wird von neoplastischen Zelllinien und Zellen von non-Hodgkin's-Lymphoma-Patienten exprimiert, konnte jedoch nicht in CD34-positiven Knochenmarkzellen nachgewiesen werden (Bijl et al. 1996).

Mitglieder der HD-Familie beider Klassen sind häufig Fusionspartner in Leukämie-assoziierten Translokationen. Diese und andere Studien implizieren, dass HOX-Proteine eine direkte Rolle bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen spielen und Zellen mittels Überexpression oder Abwesenheit dieser Transkriptionsfaktoren transformiert werden können (Owens & Hawley 2002).

1.7.3 Die Rolle von HOX11 in HSCs

HOX11 (Synonyme: TCL3, TLX1) ist ein Onkogen der NK-Homöobox-Familie, die sich früh in der Evolution von den anderen HOX-Gruppen abgetrennt hat und sich auf Chromosom 10 befindet (Pollard et al. 2000). Es spielt eine wichtige Rolle in der Gewebe- und Organentwicklung. Es ist essentiell für die Entwicklung der Milz, da *Hox11^{-/-}*-Mäuse asplenisch sind. Es vermittelt u.a. das Überleben der Milzvorläuferzellen (Roberts et al. 1994, Dear et al. 1995).

HOX11 wurde ursprünglich als Translokation t(10;14) und t(7;10) in 7-10% der Patienten mit pädiatrischer T-ALL (*T-cell acute lymphoblastic leukemia*) identifiziert (Kennedy et al. 1991). Durch die Translokation wird das intakte *HOX11*-Gen unter den regulatorischen Einfluss der *TCR δ* oder *TCR β* -Gene (*T-cell receptor delta*, *T-cell receptor beta*) gestellt, so dass es in Thymozyten überexprimiert wird und den Grundstein für eine maligne Transformation legt (Salvati et al. 1995).

Konstitutive Überexpression von HOX11 in murinen Knochenmarkzellen führt *in vitro* zur Immortalisierung von hämatopoetischen Vorläufern, die ein erhöhtes Proliferationspotential und einen Differenzierungsblock aufweisen (Hawley et al. 1994). *In vivo* führt die Überexpression von HOX11 nach sieben bis zwölf Monaten zur Entwicklung von prä-T-Zell-Tumoren. Die lange Latenzzeit spricht

dafür, dass für die Ausbildung eines malignen Phänotyps weitere Mutationen nötig sind (Hawley et al. 1997).

Die Expression von HOX11 unter dem regulatorischen Einfluss des IgH μ -Promotors in transgenen Mäusen führte zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen nach einer Latenzperiode von zwanzig Monaten (Hough et al. 1998). Die *in vitro* Differenzierung von HOX11-transduzierten murinen ESCs (*embryonic stem cells*) führte zur Etablierung von immortalisierten Linien mit hämatopoetischen Differenzierungspotential (Keller et al. 1998).

Insgesamt deuten diese Studien daraufhin, dass HOX11 durch die unregulierte Expression von Genen, die an der hämatopoetischen Differenzierung beteiligt sind, seine transformierende Wirkung ausübt. HOX11 enthält ein partielles Hep-Motiv (zu finden in H2.0, *engrailed* und *paired* HD-Proteinen), das die Repression von Genen vermitteln kann und ein Pentapeptidmotiv (FPWME) für die Interaktion mit PBX-Proteinen (Owens & Hawley 2002). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass für die transformierende Eigenschaft von HOX11 die Interaktion mit TALE-Kofaktoren (z.B. PBX2 und Meis1b) benötigt wird (Allen et al. 2000). HOX11 könnte seine transformierende Wirkung entweder durch die *de novo* Expression von *down stream* Zielgenen oder mittels Wettbewerb um Bindungsstellen anderer HOX-Transkriptionsfaktoren ausüben.

In HOX11-immortalisierten hämatopoetischen Vorläuferzelllinien konnte die Interaktion von HOX11 mit CTF1 (*CCAAT-box binding transcriptionfactor 1*) nachgewiesen werden. Letzterer ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der über TF2B (*transcription factor 2B*) mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert. Durch diese Interaktion wäre es möglich, dass HOX11 direkten Einfluss auf die Aktivierung und Reprimierung von Genen nehmen könnte (Zhang et al. 1999). In HOX11-transduzierten NIH3T3-Zellen konnte das *Aldh1*-Gen (*aldehyde dehydrogenase 1*) als potentiell Zielgen identifiziert werden, wobei dessen Rolle bei der Leukämieentstehung ungeklärt bleibt, da es in HOX11-positiver T-ALL nicht exprimiert wird (Greene et al. 1999).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HOX11 PP1 und PP2A (*serine/threonine protein phosphatases 1, 2A*) inhibiert und so den G₂/M-Zellzykluskontrollpunkt unterbricht. Die Interaktion mit PP1 und PP2A erfolgt ohne DNA-Bindung und weist somit auf einen DNA-unabhängigen

transformierenden Mechanismus von HOX11 hin (Kawabe et al. 1997). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass HOX11 mittels Inhibierung der PP1/PP2A-Phosphataseaktivität in die G₁/S-Phase des Zellzyklus, bedingt durch Hyperphosphorylierung und somit Inhibierung von Rb (*retinoblastom*), eingreift (Riz & Hawley 2005).

Mittels konditioneller Immortalisierung von erythrozytären Vorläuferzelllinien konnte gezeigt werden, dass HOX11 die CBP/p300-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-1 (*GATA binding protein 1*) inhibiert. Dieser ist essentiell für die erythrozytäre Reifung, so dass durch dessen Ausfall das Differenzierungsprogramm der Zellen blockiert wird. CBP und p300 (*cAMP response element binding protein, E1A-binding protein*) sind globale Koaktivatoren bei der Transkription. Sie interagieren mit über 300 verschiedenen Proteinen. Die funktionelle Modulation dieser Faktoren könnte ein allgemeiner Mechanismus zur Blockierung von Differenzierungsvorgängen bei der Transformation von Zellen sein. So wurde die Interaktion mit CBP7/p300 u.a. auch für das Leukämie-assoziierte Fusionsprotein AML1-ETO nachgewiesen (Riz et al. 2006).

Insgesamt sprechen diese Beobachtungen dafür, dass HOX11 mittels DNA-abhängigen und unabhängigen Mechanismen seine transformierende Eigenschaft ausübt und dass diese vom zellulären Kontext und der Verfügbarkeit von Kofaktoren abhängt.

1.8 AML1-ETO

Bei AML1-ETO handelt es sich um ein Fusionsprotein, das durch die Translokation t(8;21) entstanden ist. Diese stellt eine der häufigsten karyotypischen Veränderungen in der akuten myeloiden Leukämie (AML) dar, die durch die Proliferation von undifferenzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen gekennzeichnet ist. Nach der FAB-Klassifikation (*french american british*) von 1981, die eine Unterteilung der AML in verschiedene Subtypen anhand von morphologischen, Enzym-histochemischen und immunologischen Kriterien ermöglicht, wird die t(8;21) dem Typ M2 zugeordnet.

Der Typ M2 zeichnet sich durch eine granulozytäre Leukämie mit Ausreifung von mindestens 10% der leukämischen Zellen zu Promyelozyten, Myelozyten oder weiter differenzierten Zellen aus (Tenen 2003). Durch die Translokation entsteht ein chimäres Gen, das die 5'-Region des *AML1*-Genes (*acute myelogenous leukemia*, Chromosom 21) und nahezu das gesamte *ETO*-Gen („*eight twenty one*“, Chromosom 8) enthält (Erickson et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, dass CD34⁺CD38⁻-Zellen von Patienten mit AML-FAB-M2 NOD/SCID-Mäuse rekonstituieren konnten, woraus geschlossen wurde, dass sich die t(8;21) in HSCs ereignet (Lapidot et al. 1994).

1.8.1 Allgemeine Funktion von AML1

AML1 (*acute myelogenous leukemia 1*, Synonyme: RUNX1, CBF α 2, PEBP2 α B) gehört zu einer Klasse von Transkriptionsfaktoren, die durch die hoch konservierte *runt* Homologiedomäne (RHD) gekennzeichnet ist, über welche die Interaktion mit der DNA erfolgt. (Speck & Gilliland 2002). Diese Domäne wurde erstmals in dem Protein Runt identifiziert, welches die embryonale Segmentierung in *Drosophila melanogaster* steuert (Zhang et al. 1996).

AML1 übernimmt entscheidende regulatorische Funktionen in der frühen Hämatopoese und ist eins der häufigsten Ziele von Leukämie-assoziierten Translokationen. Zusätzlich zu der RHD weisen die Mitglieder dieser Familie eine C-terminale Transaktivierungsdomäne auf, durch welche die Rekrutierung von Korepressoren und Koaktivatoren erfolgen kann (Peterson & Zhang 2004). AML1 kodiert für die Alpha-Untereinheit des Transkriptionsfaktors CBF (*core binding factor*). Dieser ist ein Heterodimer, bestehend aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. Die Interaktion der DNA sowie die Dimerisierung erfolgt über die RHD der Alpha-Untereinheit. AML1 stellt eines von mehreren Genen dar, das für die Alpha-Untereinheit von CBF kodiert. Die Beta-Untereinheit fungiert als Kofaktor, indem sie die Affinität der Alpha-Untereinheit zur DNA erhöht, weist aber selbst keine DNA-Bindung auf. Sie wird stets nur von einem Gen, *CBF β* (*core binding factor beta*), kodiert (Zhang et al. 1997).

Der AML1/CBF β -Komplex ist einer der wichtigsten Regulatoren der fetalen „definitiven“ Hämatopoese. Der Verlust von AML1 oder CBF β resultiert in embryonaler Sterblichkeit bedingt durch Ausbleiben der „definitiven“

Hämatopoese in der fetalen Leber (Wang et al. 1996). Im AML1^{+/-}-Mausmodell führte die Haploinsuffizienz zu einer Reduktion der LT-HSCs und induzierte eine Zunahme an reiferen Vorläuferzellen (Sun & Downing 2004). Das Heterodimer aktiviert die Transkription von Genen mit *enhancer core motifs* (TGT/cGGY), die in vielen Genen für die lymphoide und myeloide Entwicklung gefunden wurden. So ist AML1 an der Regulation von Genen beteiligt, welche die hämatopoetische Differenzierung steuern, wie z.B. IL-3 (Interleukin-3), granulozytäre Myeloperoxidase (Okuda et al. 1996), TNF α (*tumor nekrosis faktor α*) (Downing 1999), M-CSF-Rezeptor (*macrophage colony stimulating factor receptor*) (Zhang et al. 1996), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) (Frank et al 1995) und neutrophile Elastase (Nuchprayoon et al. 1994). Zur Ausübung seiner regulatorischen Funktion benötigt AML1 andere Koaktivatoren, so kann z.B. der IL-3-Promotor nur im Zusammenspiel mit MEF (*myeloid ELF1 like faktor*) und der Enhancer der granulozytären Myeloperoxidase nur in Kombination mit c-Myb (*avian myeloblastosis viral oncogen homolog*) transaktiviert werden (Britos-Bray & Friedmann 1997).

1.8.2 Allgemeine Funktion von ETO

Das *Eto*-Gen („*eight twenty one*“, Synonym: MTG-8, *myeloid translocation gene*) gehört zur Familie der ETO-Proteine, die ETO2 (MTG16) und MTGR1 (*myeloid translocation gene related protein 1*) umfasst. Es handelt sich um nukleäre Korepressoren, die durch vier hochkonservierte NHR-Domänen (*nervy homology regions*) gekennzeichnet sind. Diese weisen große Sequenzhomologien mit dem Protein Nervy auf, das eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung bei *Drosophila melanogaster* spielt (Feinstein et al. 1995). Die Mitglieder dieser Familie sind über die NHR-Domänen in der Lage, Korepressorkomplexe (z.B. NcoR/SMART, *nuclear receptor corepressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*) zu rekrutieren (Lutterbach et al. 1998). Bisher ist jedoch wenig über die normale Funktion von ETO bekannt. ETO wurde erstmals im Zusammenhang mit der t(8;21)-Translokation entdeckt.

1.8.3 Eigenschaften des Fusionsproteins AML1-ETO

Das chimäre AML1-ETO-Protein enthält den N-Terminus von AML1 mit der DNA-bindenden RHD-Domäne (Aminosäure 1-177, ohne die Transaktivierungsdomäne) und nahezu den gesamten ETO-Anteil (Aminosäure 30-604). Da AML1-ETO^{+/+}-Mäuse denselben Phänotyp wie AML1^{-/-}- und CBFβ^{-/-}-Mäuse aufweisen (embryonale Sterblichkeit zwischen Tag 12,5 und 13,5 durch Abwesenheit der „definitiven“ Hämatopoese in der fetalen Leber) (Yergau et al. 1997, Okuda et al. 1998) wird angenommen, dass AML1-ETO die normale Funktion von AML1 als dominant negativer Inhibitor beeinträchtigt (Speck & Gilliland 2002).

Wahrscheinlich interagiert das Fusionsprotein über die DNA-bindende RHD-Domäne (AML1-Anteil) mit den AML1-regulierten Genen und rekrutiert mittels der NHR-Domäne (C-terminaler ETO-Anteil) Repressoren und inhibiert somit die Transkription der Zielgene (konstitutives Repressormodell) (Wildonger & Mann 2005) (**Abb 1.5**).

Durch die Translokation werden insgesamt drei *hits* generiert. Es entsteht eine Haploinsuffizienz für das *AML1*- und das *ETO*-Gen, als auch eine Akquirierung von neuen Eigenschaften durch die entstandene Fusion (Nimer & Moore 2004). Generell erfolgt die Expression von AML1-ETO zusammen mit dem Wildtyp AML1b- oder AML1c-Protein. Eine Tetramerisierung von AML1-ETO hat jedoch eine gesteigerte DNA-Affinität zur Folge, so dass das Fusionsprotein einen kompetitiven Vorteil gegenüber dem Wildtyp AML1 erlangt (Liu et al. 2006).

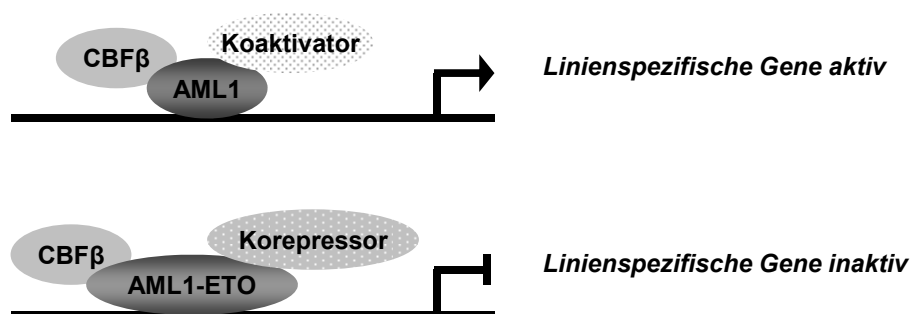


Abb. 1.5: Auswirkung der Fusion von AML1 mit ETO

Das Fusionsprotein interagiert über den AML1-Anteil mit den regulatorischen Elementen von linienspezifischen Genen und rekrutiert über den ETO-Anteil Korepressoren, so dass die Transkription dieser Gene unterdrückt und damit die Differenzierung der Zellen inhibiert wird.

Das AML1-ETO-Protein übt seine Wirkung aus, indem es mit Transkriptionsfaktoren interferiert, welche die Differenzierung oder Selbsterneuerung von HSCs regulieren. Dies kann über verschiedene Mechanismen erfolgen.

Zum einen kann durch das Fusionsprotein die AML1-abhängige Aktivierung von Genen, die für die myeloide Entwicklung verantwortlich sind, blockiert werden. In transienten Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass AML1-ETO Promotoren mit putativen Bindungsstellen für AML1 (z.B. der GM-CSF-Promotor) reprimiert (Hug et al. 2002).

Zum anderen ist es in der Lage, aktivierende Effekte von C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein α*), PU.1 (*spleen focus forming virus proviral integration oncogene, SPI1*) oder MEF (*myeloid ELF1 like factor*) zu inhibieren. C/EBP α gehört zu den Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie und spielt eine entscheidende Rolle bei der granulozytären Differenzierung. C/EBP $\alpha^{-/-}$ -Mäuse sind nicht in der Lage, reife Granulozyten zu bilden. AML1-ETO scheint indirekt die C/EBP α -Expression mittels Inhibierung der Autoregulation des CEBPA-Promotors zu blockieren und so die granulozytäre Differenzierung zu beeinträchtigen (Pabst et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor PU.1 spielt eine Schlüsselrolle bei der myeloiden Entwicklung, denn PU.1 $^{-/-}$ -Mäuse sind vollständig in der myeloiden Differenzierung blockiert. AML1-ETO interagiert mit PU.1 und blockiert dabei die Bindungsstelle für den Koaktivator c-Jun (*v-Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*, abgeleitet von „ju-nana“, japanisch siebzehn, Transkriptionsfaktorfamilie AP-1), so dass PU.1 seine normale Funktion als Transaktivator nicht mehr ausüben kann (Vangala et al. 2003).

Des Weiteren ist AML1-ETO auch in der Lage, die Expression von Genen zu aktivieren. Müller-Tidow et al. zeigten 2004, dass AML1-ETO die Transkription von Plakoglobin (γ -Catenin) aktivieren und so Einfluss auf den Wnt-Signalweg nehmen kann. Außerdem kann AML1-ETO die Transkription von TRKA (*tyrosine receptor kinase A*) aktivieren und so Einfluss auf die NGF-Signalkaskade (*nerv growth factor*) nehmen (Mulloy et al. 2005).

Erstaunlicherweise ist AML1-ETO durch Verlangsamung des Übertritts von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus in der Lage, die Proliferation von Zellen zu inhibieren (Burel et al. 2001, Mulloy et al. 2002). Diese gegenteilige Wirkung

könnte erklären, weshalb AML1-ETO allein nicht ausreicht, um in Mäusen eine Leukämien zu induzieren (Okuda et al. 1998, Rhoades et al. 2000). Andererseits könnte es auch bedeuten, dass AML1-ETO gegensätzliche Effekte auf primitive und bereits festgelegte Vorläufer ausübt (Mulloy et al. 2002).

1.8.4 Die Rolle von AML1-ETO in HSCs

In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass AML1-ETO die Selbsterneuerung von HSCs und frühen Vorläufern unterstützt. Möglicherweise geschieht dies durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung, z.B. durch Bevorzugung der symmetrischen gegenüber der asymmetrischen Zellteilung. So könnte sich der Pool an Zellen vergrößern, in dem anschließend weitere genetische oder epigenetische Ereignisse stattfinden (Nimer & Moore 2004).

Im Gegensatz zu AML1- oder CBF β -defizienten Embryonen enthielt die fetale Leber von AML1-ETO^{+/+}-Embryonen hämatopoietische Vorläuferzellen, die ein erhöhtes Selbsterneuerungspotential *in vitro* aufwiesen. Dieses Phänomen konnte ebenfalls durch retroviralen Gentransfer von AML1-ETO in murine Knochenmarkszellen nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass AML1-ETO nicht nur in der Lage ist, die biologische Aktivität von AML1 zu neutralisieren, sondern zusätzlich die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu induzieren (Okuda et al. 1998).

Um die embryonale Sterblichkeit im AML1-ETO^{+/+}-Mausmodell zu umgehen, entwickelten einige Gruppen induzierbare Modelle, bei denen die Expression des Fusionsproteins erst nach der kritischen Phase erfolgt. In einem Tetrazyklin-induzierbaren murinen System konnte *in vivo* keine abnormale Hämatopoese festgestellt und keine Tendenz zur Entwicklung von Leukämien nachgewiesen werden. *In vitro* allerdings wiesen die Zellen einen Block in der myeloiden Differenzierung auf, der durch die Unterdrückung der AML1-ETO-Expression mittels Tetrazyklin wieder aufgehoben werden konnte (Rhoades et al. 2000). In einem weiteren induzierbaren Modell, bei dem die Expression von AML1-ETO von dem myeloiden Promotor des humanen *MRP8*-Gens (*myeloid related protein 8*) kontrolliert wurde, konnte *in vivo* ebenfalls keine Störung der Hämatopoese festgestellt werden. Die Behandlung der Mäuse mit dem DNA-

alkylierenden Wirkstoff ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) führte bei 55% der Tiere zu einer AML. Die Gruppe um Yuan et al. 2001 folgerte daraus, dass die Expression von AML1-ETO allein nicht zur Etablierung einer AML ausreicht, sondern weitere Mutationen dazu erforderlich sind.

Der Effekt von AML1-ETO auf humane hämatopoetische Stamm- bzw. Vorläuferzellen wurde durch retroviralen Gentransfer in mobilisierte HSCs und Nabelschnurblutstammzellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass AML1-ETO einen negativen Effekt auf die Proliferation von späten Vorläuferzellen ausübt, jedoch die Selbsterneuerung von frühen Vorläuferzellen fördert (Mulloy et al. 2002). Die generierten pluripotenten Zytokin-abhängigen Linien konnten bis zu acht Monate *in vitro* kultiviert werden, waren jedoch nicht in der Lage, in NOD/SCID-Mäusen eine Leukämie zu induzieren (Mulloy et al. 2003). Durch gezielte Expression von AML1-ETO in HSCs mittels des HSC-spezifischen Sca-1-Promotors (*stem cell antigen 1*) konnte die Gruppe um Fenske et al. 2004 zeigen, dass AML1-ETO die Expansion von myeloiden Vorläufern fördert. Dabei greift AML1-ETO möglicherweise auf die Selbsterneuerung von HSCs über den Wnt-Signalweg ein (Müller-Tidow et al. 2004).

Letztendlich scheint AML1-ETO allein jedoch nicht in der Lage zu sein, eine AML zu verursachen. Zwar liefert es die nötigen Signale zur Selbsterneuerung bzw. Proliferation von HSCs und frühen Vorläuferzellen, aber zusätzlich dazu scheinen noch kooperierende Ereignisse, welche die Proliferation und Differenzierung von HSCs beeinflussen, nötig zu sein. Im Falle der t(8;21)-Translokation konnte bei 8% der Betroffenen aktivierende Mutationen im *FLT3*-Gen (*fms-like tyrosine kinase 3*) identifiziert werden. Das *FLT3*-Gen kodiert den Rezeptor für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor FLT3-L, der über nach geschaltete Signalwege die Proliferation von pluripotenten HSCs und frühen Vorläufern reguliert (Kottaridis et al. 2001). Weiterhin wurden aktivierende Punktmutationen im *c-kit*-Tyrosinkinase-Rezeptor-Gen (Care et al. 2003), im *M-CSFR*-Gen (*macrophage colony stimulating factor receptor*) und im *TrkA*- und *TrkC*-Gen (*tropomyosin receptor kinase A, C*) lokalisiert (Reuther et al. 2000, Abu-Duhier et al. 2003). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass in der Regel mindestens zwei genetische Veränderungen zusammen kooperieren müssen, um eine Leukämie zu induzieren. Dabei sind Transkriptionsfaktoren

betroffen, die eine Rolle bei der hämatopoetischen Differenzierung spielen und Signalmoleküle, die Einfluss auf die Proliferation von Zellen nehmen (Gilliland & Tallman 2002). Allerdings gewann kürzlich auch die Hypothese der „*single hit* Leukämogenese“ wieder an Bedeutung, als Barabé et al. 2007 zeigen konnten, dass die Expression des *MLL-ENL*-Fusionsgens (*mixed lineage leukemia, eleven nineteen leukemia*) in humanen HSCs ausreichte, um nach Transplantation in immundefizienten Mäusen eine Leukämie zu induzieren.

1.9 Das Phänomen der replikativen Seneszenz und die humane Telomerase

Als replikative Seneszenz wird der irreversible Verlust der Teilungsfähigkeit menschlicher und tierischer Zellen bezeichnet. Dieses Phänomen wurde erstmals 1965 von Hayflick beschrieben und wird deshalb auch „Hayflicklimit“ genannt. Es handelt sich dabei um die zelluläre Reaktion auf eine Vielzahl schädlicher oder potentiell onkogener Stimuli. Der Verlust der Teilungsfähigkeit ist mit morphologischen, zellphysiologischen und biochemischen Veränderungen verbunden. Senescente Zellen sind in der G1-Phase des Zellzyklus irreversibel arretiert, vergrößern ihren Umfang, weisen eine erhöhte lysosomale Biogenese auf und exprimieren SA-bGal (*senescent associated β -galactosidase*) (Itahana et al. 2001). Ausgelöst wird dieser Mechanismus hauptsächlich durch die replikative Verkürzung der Chromosomenenden, den Telomeren.

Telomere sind nicht-kodierende repetitive Hexanukleotidsequenzen, die zusammen mit Telomer-assoziierten Proteinen, wie z.B. TRF1 und TRF2 (*telomeric repeat binding factor 1, 2*) sowie POT1 (*protection of telomeres 1*), die Enden von Chromosomen vor Degradierung, Rekombination und Fusion schützen (Blackburn 2001, Cong et al. 2002). Das Telomer eines Säugetierchromosoms besteht schätzungsweise aus 1000 bis 2000 Wiederholungen der Sequenz TTA GGG (de Lange et al. 1990) und endet am 3'-Ende in einem Einzelstrang aus 150 bis 300 Basen, dem sogenannten 3'-Überhang (Blackburn 2001). Die Länge der Wiederholungen hängt von der

Gewebeart, dem Alter des Spenders und der replikativen Vergangenheit der Zelle ab und weist Chromosomen-spezifische Unterschiede auf (Martens et al. 1998).

Elektronenmikroskopische Studien legen nahe, dass die Telomerenden durch Rückfaltung und Invasion des Einzelstranges in den Doppelstrang eine komplexe Struktur ausbilden, die als T-Loop bezeichnet wird und als „Schutzkappe“ fungiert (Munoz-Jordan et al. 2001). Aufgrund des „Endreplikationsproblems“ verkürzen sich in somatischen Zellen die Telomere mit jeder Zellteilung (**Abb. 1.6 A**).

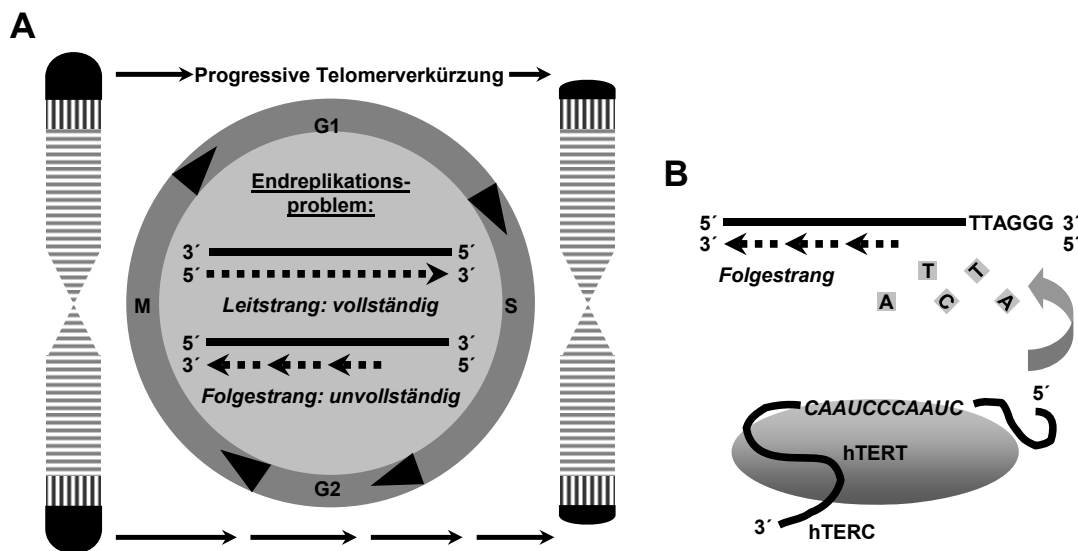


Abb. 1.6: Das „Endreplikationsproblem“ führt zur kontinuierlichen Verkürzung der Telomere in jedem Zellzyklus

A: Während der Replikation wird der Folgestrang diskontinuierlich mittels kurzer Okazakifragmente synthetisiert, die anschließend zu einem kontinuierlichen Strang ligiert werden. Zur Synthese eines jeden Fragmentes wird ein Primer benötigt. Die Lücke zwischen dem Chromosomenende und dem letzten Okazakifragment kann nicht geschlossen werden, da es keinen Ansatzpunkt für einen Primer gibt. **B:** Die Telomerase benutzt ihre RNA-Komponente (hTRC) als Matrize zur Synthese von Telomer-DNA am Folgestrang und sorgt somit zur Aufrechterhaltung der Telomerlänge. (Abb. abgewandelt nach Dahse et al. 1997 und Meyerson 2000).

Der replikationsabhängige Verlust von Telomersequenzen wurde von Harley als Modell der mitotischen Uhr beschrieben, bei dem die Telomerlänge ein Maß für die Anzahl der bereits vollzogenen Zellteilungen einer Zelle darstellt (Harley 1991). Erreicht ein (oder mehrere) Chromosomenende(n) eine kritische Minimallänge von 4 bis 7 kb, wird über p53 (*protein 53*) oder pRb (*retinoblastoma protein*) ein Teilungsstopp induziert (Serrano et al. 1997). Die kurzen Telomere, die den seneszenten Zustand induzieren, ähneln einem DNA-Doppelstrangbruch, so dass p53 kritische Telomerlängen über denselben

Mechanismus erkennt, wie bei der DNA-Schädigung (Lansdorp 2000). Die Begrenzung der zellulären Lebenszeit wird auch als Tumorsuppressormechanismus verstanden. Eine nicht-replikative Seneszenz kann jedoch auch durch oxidativen Stress (Robles & Adami 1998), Mitogene, wie z.B. H-Ras (*v-Ras harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) (Serrano et al. 1997), Behandlung mit DNA-methylierenden Substanzen (Holliday 1986) sowie γ -Bestrahlung (Di Leonardo et al. 1994) eingeleitet werden.

1.9.1 Allgemeine Funktion der Telomerase

Die Verlängerung der Telomerenden erfolgt durch das Ribonukleoprotein Telomerase. Diese ist eine spezialisierte reverse Transkriptase, bestehend aus einer katalytischen Proteineinheit (hTERT, *telomerase reverse transkriptase*, Synonym: TCS1, *telomerase catalytic subunit 1*) und einer RNA-Komponente (hTERC, *telomerase RNA component*, Synonym: TRC3: *telomerase RNA candidate 3*), die als Vorlage für die Synthese von 3'-Telomer-DNA dient (Blackburn 2001) (**Abb. 1.6 B**). Daneben sind zahlreiche Proteine an dem Zusammenbau und Funktion der Telomerase (z.B. HSP90, *heat shock 90 kDa protein*, und DKC1, Dyskerin) beteiligt (Cong et al. 2002).

In den meisten Geweben kann hTERC nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von hTERT eng mit der Telomeraseaktivität korreliert. Die Einführung von hTERT in Telomerase-negative Zellen reicht aus, um die Telomeraseaktivität zu rekonstituieren, weshalb davon ausgegangen wird, dass hTERT der limitierende Faktor der Telomerase ist (Meyerson et al. 1997). Die Telomeraseaktivität ist auf wenige Gewebe beschränkt. Die meisten somatischen Zellen weisen keine Telomeraseaktivität auf, dagegen ist in Keimbahnzellen, embryonalen Zellen, aktivierten T- und B-Zellen sowie Keimzentren lymphatischer Organe eine hohe Aktivität des Enzyms nachweisbar, die mit einer Aufrechterhaltung der Telomere verbunden ist (Allsopp et al. 1992, Kim et al. 1994). Des Weiteren konnte in Stammzellen und proliferierenden Hautepithelzellen Telomeraseaktivität detektiert werden (Collins & Mitchell 2002).

In somatischen Zellen verkürzen sich die Telomerenden pro Zellteilung um 50 bis 100 bp (Allsopp et al. 1992). Dabei variieren die Telomerlänge und die

Verkürzungsrate der Chromosomen innerhalb einer Zelle sowie zwischen verschiedenen Zelltypen und unterschiedlichen Individuen stark (Landsorp et al. 1996). Die meisten Tumorzellen können durch Reaktivierung der Telomerase ihre Telomere stabilisieren (Greider 1998). Die Überexpression der katalytischen Untereinheit hTERT in humanen Fibroblasten und Epithelzellen führt zur Verlängerung der Telomere und erhöht das Proliferationsvermögen der Zellen (Bodnar et al. 1992, Bodnar et al. 1998, MacKenzie et al. 2000). In seltenen Fällen können Zellen ohne Telomeraseaktivität mittels homologer Rekombination von Telomeren-DNA-Abschnitten (ALT-Mechanismus, *alternate telomere maintenance*) ihr replikatives Potential aufrechterhalten (Reddel et al. 2001).

1.9.2 Die Rolle der Telomerase in HSCs

Die Verkürzung der Telomere während der Replikation könnte einen limitierenden Faktor für das Selbsterneuerungspotential von hämatopoetischen Stammzellen darstellen (Kondo et al. 2003). Die nach einer Zellteilung entstehenden Tochterzellen werden fortschreitend in ihrem proliferativen Potential, zum Teil aufgrund von Telomererosion, eingeschränkt. Dies wiederum führt letztendlich zur replikativen Seneszenz, einem Phänomen das *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden kann (Gammaitoni et al. 2004).

Mittlerweile häufen sich die experimentellen Hinweise, dass hämatopoetische Stammzellen einem replikativen Alterungsprozess unterliegen. So konnte gezeigt werden, dass die serielle Transplantation im Mausmodell auf fünf bis sieben aufeinanderfolgende Empfänger begrenzt und mit einer Abnahme der Telomerlänge von HSCs verbunden ist (Allsopp et al. 2001, Allsopp et al. 2003, Baerlocher et al. 2003, Chen et al. 1999). Telomerase-defiziente murine HSCs sind in ihrer Fähigkeit zur seriellen Transplantation eingeschränkt (Allsopp & Weissman 2002). Die Abnahme des proliferativen Potentials von humanen HSCs während der Entwicklung und des Alterns weist ebenfalls darauf hin, dass hämatopoetische Zellen der replikativen Seneszenz unterliegen (Landsorp et al. 1993, Marley et al. 1999). Eine Verkürzung der Telomere im hämatopoetischen System des Menschen wurde in kultivierten HPCs und deren Nachkommen sowie in Blutleukozyten während der natürlichen Alterung

nachgewiesen (Engelhardt et al. 1997, Iwama et al. 1998, Vaziri et al. 1994). Nabelschnurblutstammzellen weisen sehr lange Telomere auf und verfügen über ein größeres Proliferationspotential als Stammzellen, die aus dem Knochenmark von älteren Spendern isoliert wurden (Lansdorp et al. 1993). In Empfängern von Knochenmarkstransplantaten konnte eine beschleunigte Telomerverkürzung nachgewiesen werden, die wahrscheinlich auf eine erhöhte Hämatopoese während der Rekonstitutionsphase zurückzuführen ist (Engelhardt et al. 1998, Notaro et al. 1997).

Die Aktivität der Telomerase scheint mit der Selbsterneuerungskapazität von HSCs zu korrelieren und wird mit beginnender Reifung zu multipotenten Vorläufern reduziert (Morrison et al. 1996). In primitiven ruhenden CD34⁺CD38⁻-HSCs, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, ist die Telomeraseaktivität runterreguliert. Mit Eintritt der HSCs in den Zellzyklus, z.B. durch Stimulation mit IL-3, wird die Telomeraseaktivität induziert, in proliferierenden CD34⁺CD38⁺-Vorläufern aufrechterhalten und in terminal differenzierten Zellen wieder reprimiert (Yui et al. 1998, Engelhardt et al. 1997). Telomerlängenuntersuchungen in hämatopoetischen Subpopulationen haben gezeigt, dass die Zellen mit dem größten proliferativen Potential auch die längsten Telomere besitzen (Van Ziffle et al. 2003). Allerdings fallen die zur Selbsterneuerung fähigen HSCs nicht unter die CD34-positiven Zellen mit der höchsten Telomeraseaktivität (Järas et al. 2006).

Trotz des Vorhandenseins von Telomeraseaktivität verkürzen sich die Telomere von HSCs während der Zellteilung, was darauf hin deutet, dass die vorhandene Telomeraseaktivität nicht ausreicht, um der Telomerverkürzung entgegen zu wirken (Brummendorf et al. 2001, Allsopp et al. 2001, Notaro et al. 1997). Der Telomerverlust von CD34-positiven Zellen ist mit durchschnittlich 35 bp pro Zellteilung niedriger als der von nicht-regenerativen somatischen Zellen (50 bis 100 bp pro Zellteilung). Somit reicht die Telomeraseaktivität zwar nicht aus, den replikationsbedingten Telomerverlust zu verhindern, sie kann ihn aber verzögern (Vaziri et al. 1994). Während der *ex vivo* Kultivierung von CD34-positiven Zellen wurde trotz Telomeraseaktivität innerhalb von vier Wochen ein durchschnittlicher Verlust von 1 bis 2 kb Telomer-DNA nachgewiesen. Die Telomeraseaktivität zeigte sich in den ersten beiden Wochen am stärksten und wurde anschließend, verbunden mit einer verminderten Proliferation der Zellen,

schwächer (Engelhardt et al. 1997). Letztendlich scheint für eine erfolgreiche *ex vivo* Expansion von HSCs die Manipulation der Telomerase und damit der Telomere von großer Bedeutung zu sein.

1.10 Zielsetzung

Bei kongenitalen Knochenmarkserkrankungen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Stammzelldefekten, deren Charakterisierung erst am Anfang steht. Trotz erheblichen Fortschritts in der molekularen Aufklärung dieser Erkrankung konnten bis heute nicht alle krankheitsassoziierten Gene identifiziert werden. Die Erforschung der molekularen Ursachen dieser Störungen wird durch die Seltenheit der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark erschwert. Die Generierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien ermöglicht die Umgehung dieser Einschränkungen sowie die Unabhängigkeit von den primären Zellen der Patienten. Fortschritte im Bereich der Mikroarraytechnik sowie des stabilen Gentransfers mittels Retroviren führten zur Identifizierung von potentiellen „Stammzellgenen“, welche die Expansion von HSCs fördern und gleichzeitig deren Differenzierung unterdrücken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, β -Catenin(Δ) (konstitutiv aktiv), HOX11 und AML1-ETO komparativ auf ihre Eignung zur Expansion von humanen HSCs bzw. HPCs zu überprüfen. Die durch die potentiellen „Stammzellgene“ hervorgerufene Expansion der Zellen sollte reversibel gestaltet werden. Zum einen, um zu zeigen, dass der zu beobachtende Effekt spezifisch auf das Zielgen zurückzuführen ist und zum anderen, um bei der späteren Analyse des Patientenmaterials auszuschließen, dass die expandierenden Elemente einen Einfluss auf den der Erkrankung zugrunde liegenden Mechanismus ausüben. Eine reversible Expansion der Zellen sollte durch die Flankierung der Zielgene mit LoxP-Sequenzen und einer nachfolgenden Exzision dieser Elemente mittels der Cre-Rekombinase erreicht werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese Gene in Kombination mit hTERT (katalytische Untereinheit der

Telomerase) eine Expansion der Zellen über den Seneszenzpunkt hinaus ermöglichen.

Dazu sollten zunächst die retroviralen Konstrukte für eine konstitutive sowie für eine konditionale Expansion der Zielzellen generiert und in herkömmlichen Zelllinien charakterisiert werden. Anschließend sollten die β -Catenin(Δ)-, HOX11- und AML1-ETO-kodierenden retroviralen Konstrukte vergleichend auf ihre Fähigkeit hin überprüft werden, humane CD34-positive Knochenmarkzellen zu expandieren. Parallel dazu wurden die entsprechenden Konstrukte in Kombination mit hTERT verifiziert. Des Weiteren sollte der Einfluss der Zielgene auf das Differenzierungspotential der Zellen untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten eingesetzt werden, um Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien von Normal Spendern und Patienten mit ungeklärten Störungen der Hämatopoese zu generieren. Diese sollten phänotypisch charakterisiert und auf ihr Differenzierungspotential überprüft werden. Die etablierte Technologie soll als Basis zur Entwicklung neuer Strategien für die Identifizierung von Neutropenie-assoziierten Genen dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Chemikalien, Reagenzien und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) in Analysequalität bezogen. Verbrauchsmaterialien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Nürtingen) und Nunc (Wiesbaden) erworben. Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden *short protocols in molecular biology* (Ausubel et al. 1999) oder *molecular cloning* (Sambrook et al. 1989) entnommen.

2.1.1 Retrovirales Vektorsystem

Retrovirale Vektoren sind derzeit die am besten charakterisierten Vektorsysteme, die zum Gentransfer in HSCs und HPCs eingesetzt werden. Der Lebenszyklus dieser Viren bringt es mit sich, dass sie ihr Genom mit hoher Effizienz stabil ins Wirtsgenom integrieren, so dass mit jeder Zellteilung eine Weitergabe des eingeschleusten Materials an die Tochterzellen gewährleistet wird. Die meisten dieser Vektoren sind vom Moloney-Mausleukämievirus (MoMLV) aus der Familie der Retroviren abgeleitet. Dieser gehört zum C-Typ-Virus der Unterfamilie der Onkoviren.

Ein Viruspartikel besteht aus zwei gepaarten einzelsträngigen RNA-Molekülen, die mit Proteinen (reverse Transkriptase, Integrase und Protease) und tRNA zu einem Ribonukleoproteinkomplex (RNP) verpackt sind. Dieser ist mit einer Kapsidhülle und einer Lipiddoppelmembran, die aus Bestandteilen der Wirtszelle und dem virusspezifischen Hüllprotein (Env) besteht, umhüllt. Die Hüllproteine sind für das Wirtsspektrum des Retrovirus verantwortlich. Nach Rezeptorbindung fusioniert die Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle und das Kapsid-umhüllte RNP wird ins Zytoplasma entlassen. Das virale Genom wird mittels der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und gelangt als Präintegrationskomplex in den Zellkern, wo es mittels der Integrase stabil ins Wirtsgenom inseriert wird.

Die relativ simple Genomstruktur von C-Typ-Retroviren ermöglicht die einfache Konstruktion von replikationsdefekten retroviralen Vektorsystemen. Das Grundprinzip aller retroviralen Vektoren basiert darauf, dass aus dem Wildtypgenom alle viralen Strukturgene (*gag/pro*, *pol*, *env*) entfernt und durch fremde Gene ersetzt werden können. Die cis-wirkenden regulatorischen

Elemente (LTRs, Psi und PPT) bleiben erhalten (**Abb. 2.1 A**). Die viralen Proteine, die zur Bildung von infektiösen Partikeln notwendig sind, werden dabei in trans zur Verfügung gestellt (**s. 2.2.2.1**). Die gebildeten Partikel können einmalig eine Zelle infizieren und in deren Genom integrieren, da sie jedoch der genetischen Information der Strukturgene beraubt sind, bleiben sie replikationsinkompetent. Die Vektoren können Zellen infizieren und sich als Provirus in das Genom der Zelle integrieren, eine erneute Bildung von Virionen kann jedoch nicht erfolgen.

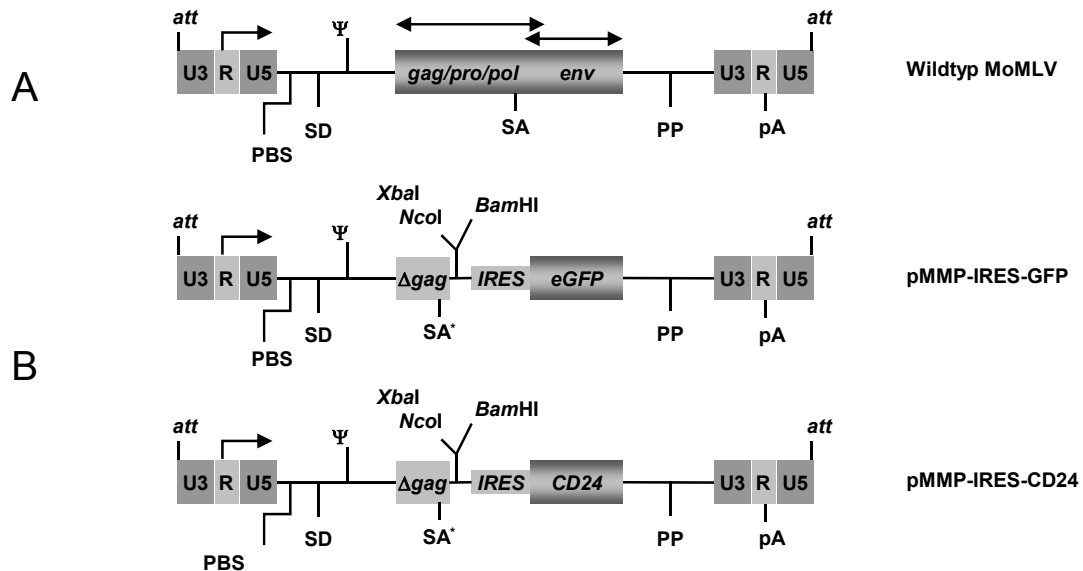


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des MoMLV-Genoms sowie der abgeleiteten Konstrukte als provirale Form nach retroviraler Integration in das Wirtsgenom

A: Wildtyp MoMLV: Die LTRs (*long terminal repeats*) werden in drei funktionelle Abschnitte (U3, R, U5) unterteilt. Durch einen als „Promotorausschluss“ (*promotor exclusion*) bezeichneten Vorgang besitzt die 5'-LTR Promotor- und Enhancerfunktion (der Pfeil symbolisiert den Transkriptionsstart). Die 3'-LTR stellt den Transkriptionsterminator (pA) dar. In der 5'-R-Region ist das Signal für die Capstruktur untergebracht, die 3'-R-Region enthält das Polyadenylierungssignal. Weitere cis-wirkende Elemente, wie die Primerbindungsstelle (PBS), der Polypurintrakt (PPT) und das Verpackungssignal Psi (ψ) sind in der Nähe der LTRs untergebracht. Die PBS spielt eine wichtige Rolle bei der reversen Transkription des einzelsträngigen RNA-Genoms in DNA nach Infektion der Zielzelle. Beim Wildtyp MoMLV-Virus ist eine zelluläre tRNA^{Pro} mit der PBS hybridisiert und initiiert mittels des freien Hydroxylendes (3'-OH) die Synthese des Minus-DNA-Stranges. Der Polypurintrakt dient als Primer für die Synthese des Plus-DNA-Stranges. Das Verpackungssignal (ψ) spielt eine wichtige Rolle bei der Verpackung des neu gebildeten RNA-Genoms in virale Partikel. Es bildet eine stark gefaltete Sekundärstruktur aus, die für die Dimerisierung mit einer zweiten RNA und der Kapsidbildung benötigt wird. Die Integrationssignale (*att*) werden für die anschließende Insertion in das Wirtsgenom benötigt. *Gag/pro* kodieren die Kapsidproteine und die virale Protease, die für die Prozessierung der viralen Polyproteine zuständig ist. *Pol* kodiert einen Multienzymkomplex aus reverser Transkriptase und Integrase. *Env* sorgt für die Bildung des Hüllglykoproteins, das die spezifische Anheftung des Virus an den Wirtsrezeptor vermittelt und damit den Tropismus des Virus bestimmt. Aufgrund der Spleißdonor- und Spleißakzeptorsequenzen (SD/SA) können zwei verschieden lange RNA-Moleküle gebildet werden. Die *full length* mRNA wird zum einen als Transkript zur Translation der Gag-Pro-Pol-Polyproteine verwendet und zum anderen mittels des Verpackungssignals Ψ in die neu gebildeten Viruskapside verpackt. Über die gespleißte RNA wird das Env-Hüllprotein gebildet. **B:** Retrovirale Konstrukte: Es wurden zwei auf pMMP-basierende Vektoren eingesetzt. Bei dem Vektor pMMP-IRES-GFP (oben) folgt auf die IRES (*internal ribosomal entry site*) der fluoreszierende Marker eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), bei dem Vektor pMMP-IRES-CD24 (unten) folgt auf die IRES das murine Oberflächenmolekül CD24 (*heat stable antigen*). Für die Insertion des Zielgens stehen die Schnittstellen *XbaI*, *NcoI* und *BamHI* zur Verfügung. In beiden Vektoren ist eine trunkierte Sequenz (Δ) von *gag* mit einer kryptischen SA-Sequenz (SA') vorhanden. Durch alternatives Spleißen wird das komplexe Verpackungssignal Psi (ψ) entfernt, was letztendlich zu einer gesteigerten Zielgenexpression führt.

Die in dieser Arbeit konstruierten Vektoren leiten sich von dem auf MoMLV-basierenden Vektor pMMP ab (Klein et al. 2000). Die MoMLV-LTRs (*long terminal repeats*) wurden bei diesem Vektor durch MPSV-LTRs (*myeloproliferative sarcoma virus*) ausgetauscht, da in einer Vielzahl von Zellen, einschließlich embryonaler und hämatopoetischer Stammzellen, diese LTRs das Zielgen besser exprimieren (Stocking et al. 1985). Das Verpackungssignal Psi, eine trunkierte Sequenz von *gag* (Gruppen-spezifisches Antigen, das Startkodon ist zu einem Stopkodon mutiert), sowie die SD- und SA-Sequenzen (*splice donor*, *splice acceptor*) stammen von MoMLV. Bei der Spleißakzeptorsequenz handelt es sich jedoch nicht um die SA-Sequenz des *env*-Genproduktes, sondern um eine kryptische SA-Sequenz in *gag*. Die Primerbindungsstelle (PBS) für tRNA^{Pro} wurde gegen eine PBS für tRNA^{Gln} ausgetauscht, da erstere hohe Sequenzhomologien mit der Bindungsstelle für einen transkriptionellen Repressor aufweist (Kempler et al. 1993). Zur Propagierung in Bakterien enthält der Vektor den Ori Col-E1, sowie das Beta-Lactamase-Gen *bla*, das eine Ampizillinresistenz vermittelt.

Für die hier dargestellten Experimente wurden zwei weiterentwickelte pMMP-Derivate benutzt (**Abb. 2.1 B**). Um die Expression der Zielgene in eukaryotischen Systemen überprüfen zu können, wurde der Vektor *down stream* der Einbringungsstelle der Zielgene mit einem IRES-Element (*internal ribosomal entry sites*) des Encephalomyocarditisvirus versehen, worauf entweder ein Fluoreszenzmarker (eGFP, *enhanced green fluorescent protein*, nachfolgend als GFP bezeichnet) oder ein muriner verkürzter Oberflächenmarker (CD24, *heatstable antigen*) folgt. Diese Anordnung ermöglicht die Bildung eines bicistronischen Transkripts vom LTR-Promotor aus und erlaubt durch das IRES-Element eine interne Initiierung der Translation und somit die Expression zweier Gene von einem Transkript. Die Expression der Marker lässt dementsprechend auf die Expression der Zielgene schließen.

2.1.1.1 Generierung der konstitutiven Vektoren

Die cDNA der potentiell expandierenden Zielgene [β -Catenin(Δ) und HOX11] sollte in pMMP-IRES-GFP (**MIG**) eingefügt werden, so dass transduzierte Zellen über die Expression von GFP identifiziert und sortiert werden konnten. Das GFP-Protein stammt aus der Tiefseequelle *Aequorea victoria* und unterscheidet sich durch 2 Punktmutationen, die u.a. zu einer erhöhten Fluoreszenz und Photostabilität geführt haben, vom Ursprungsgen. Für die verbesserte Expression in humanen Zellen wurde durch das Einbringen von 190 stillen Mutationen die Kodonnutzung optimiert (Limon 1997). Um die Zielproteine von zellinternen Proteinen unterscheiden zu können, wurden die cDNAs mit einem C-terminalen c-Myc *tag* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) ausgestattet. Die cDNA von AML1-ETO lag bereits inkloniert in dem retroviralen Vektor pMIGR1-IRES-GFP vor, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe J.C. Mulloy (Cincinnati Children's Hospital, USA) zur Verfügung gestellt wurde (Mulloy et al. 2002). Bei diesem Vektor handelt es sich ebenfalls um einen MoMLV-Abkömmling mit großer Übereinstimmung zu MIG, weshalb die cDNA nicht in MIG überführt wurde.

Als eine der zu beantwortenden Fragen galt der Einfluss von hTERT in Kombination mit den zu untersuchenden Zielgenen [β -Catenin(Δ), HOX11 bzw. AML1-ETO] auf die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von Stamm- bzw. Vorläuferzellen. Dazu musste eine Identifizierung von doppelt-positiven Zellen gewährleistet werden. Daher sollte die cDNA von hTERT in pMMP-IRES-CD24 (**MI24**) überführt werden. Bei dem murinen CD24-Marker handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, bei dem die zytoplasmatische Domäne deletiert ist, so dass keine Signale ins Innere der Zelle geleitet werden können (Kume et al. 2000). Eine Identifizierung und Sortierung transduzierter Zellen wird mittels eines PE-markierten anti-Maus-CD24-Antikörpers möglich.

Für die Insertion von Zielgenen *up stream* der IRES der Vektoren steht nur eine begrenzte Anzahl von Schnittstellen zur Auswahl. Das 5'-Ende einer cDNA kann mittels einer *XbaI*-Schnittstelle, die Teil der Kozaksequenz ist, oder einer *NcoI*-Schnittstelle inseriert werden. Für das 3'-Ende steht eine *BamHI*-Schnittstelle zur Verfügung.

2.1.1.1.1 pMMP- β -Catenin(Δ)-c-Myc-IRES-GFP

Die cDNA von β -Catenin(Δ), inkloniert in pCI-Neo-(Δ) β -Catenin-XI, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe G. Brabant (Medizinische Hochschule, Hannover) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um die cDNA von konstitutiv aktivem β -Catenin, bei der die GSK-3 β -Phosphorylierungsstelle (Aminosäure 33, Exon 3) von Serin zu Thyrosin mutiert ist. Der AS-Austausch bewahrt das Protein letztendlich vor der Erkennung und damit dem Abbau durch das Ubiquitylierungssystem der Zelle. Um die Fehlerrate bei der PCR so gering wie möglich zu halten, wurde auf die Amplifikation der gesamten Sequenz (2346 bp) verzichtet und Teilfragmente vom 5'- und 3'-Ende der cDNA amplifiziert. Vom 5'-Ende wurde ein PCR-Produkt mittels des Primerpaares BCat-F-*NcoI* und BCat-R-*XhoI* erstellt, das durch den Forwardprimer eine *NcoI*-Schnittstelle (beinhaltet das Startkodon) am 5'-Ende erhielt. Die interne *NcoI*-Schnittstelle an Position 38 bp der cDNA wurde über den Forwardprimer deletiert (stille Mutation: GCC \rightarrow GCA, Alanin). Der Reversprimer wurde so gewählt, dass er sich auf der einmalig bei Position 266 bp auftretenden *XhoI*-Schnittstelle der β -Catenin(Δ)-cDNA anlagert. Vom 3'-Ende wurde ein PCR-Produkt mittels des Primerpaares BCat-F-*BsWI* und BCat-R-myc-*BamHI* amplifiziert. Der Forwardprimer wurde so gelegt, dass er die einmalig in der cDNA vorkommende *BsWI*-Schnittstelle an Position 1648 bp mit einschloss. Über den Reversprimer wurde das c-Myc *tag*, das Stopkodon sowie eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Die PCR-Produkte wurden in pCR-Topo2.1 subkloniert (pTopo- β Cat-5' und pTopo- β Cat-3') und sequenziert. Das 5'-Fragment wurde mit *NcoI/XhoI* aus pTopo- β Cat-5', der Mittelteil aus pCI-Neo-(Δ) β -Catenin-XI mit *XhoI/BsWI* sowie das 3'-Fragment mit *BsWI/BamHI* aus pTopo- β Cat-3' gewonnen und in den mit *NcoI/BamHI* geöffneten pMMP-IRES-GFP (**MIG**) inseriert, woraus pMMP- β -Catenin(Δ)-c-Myc-IRES-GFP (**MBCcIG**) resultierte.

2.1.1.1.2 pMMP-HOX11-c-Myc-IRES-GFP

Die cDNA für HOX11 wurde aus genomischer DNA der Zelllinie NIH3T3-HOX11 gewonnen (s. 2.2.2). Die cDNA von 993 bp wurde mittels der Primer HOX-F-*NcoI* und HOX-R-myc-*BamHI* amplifiziert. Durch den Forwardprimer wurde eine *NcoI*-Schnittstelle (beinhaltet das Startkodon) am 5'-Ende eingeführt. Mittels des Reversprimers wurde die cDNA am 3'-Ende mit einem c-Myc tag, einem Stopkodon sowie einer *BamHI*-Schnittstelle versehen. Das PCR-Produkt wurde in pCR-Topo2.1 subkloniert (pTopo-HOX11-c-Myc) und sequenziert. Die cDNA wurde sodann mit *NcoI/BamHI* exzisiert und über diese Schnittstellen in **MIG** kloniert, woraus pMMP-HOX11-c-Myc-IRES-GFP (**MHXcIG**) resultierte.

2.1.1.1.3 pMMP-hTERT-c-Myc-IRES-CD24

Die cDNA für hTERT wurde dankenswerterweise von R.A. Weinberg (Whitehead Institut for Biomedical Research, Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt. Sie lag inseriert in den retroviralen Vektor pBabe-Hygro vor. Da keine elektronischen Sequenzen für dieses Konstrukt vorlagen, wurde die cDNA wie in Counter et al. 1998 beschrieben mit *EcoRI* und *Sall* herausgeschnitten und in den gut definierten Vektor pUC19 (Invitrogen, Karlsruhe) subkloniert. Um die PCR-vermittelte Fehlerrate so gering wie möglich zu halten, wurde die 3399 bp lange cDNA nur partiell amplifiziert. Vom 5'-Ende wurde ein PCR-Produkt mittels des Primerpaares hTERT-F-*XbaI* und hTERT-R-*MluI* erstellt, das durch den Forwardprimer eine *XbaI*-Schnittstelle, die Kozaksequenz sowie das Startkodon am 5'-Ende erhielt. Der Reversprimer wurde so gewählt, dass er sich auf der einmalig bei Position 784 bp auftretenden *MluI*-Schnittstelle der hTERT-cDNA anlagert. Vom 3'-Ende wurde ein Amplifikat mittels der Primer hTERT-F-*SacII* und hTERT-R-myc-*BgIII* hergestellt. Dabei wurde der Forwardprimer so gewählt, dass er sich an die *SacII*-Schnittstelle an Position 2883 bp der cDNA anlagert. Über den Reversprimer wurde das c-Myc tag, das Stopkodon und eine *BgIII*-Schnittstelle eingeführt. Die PCR-Produkte wurden in pCR-Topo2.1 subkloniert (pTopo-hTERT-5' und pTopo-hTERT-3') und sequenziert. Das 5'-Fragment wurde mit *XbaI/MluI* aus pTopo-hTERT-5', der Mittelteil aus pUC19-hTERT mit *MluI/SacII* sowie das 3'-Fragment mit *SacII/BgIII* aus pTopo-hTERT-3' gewonnen. Die Insertion mittels *XbaI* in pMMP-IRES-CD24 (**MI24**) erforderte die Zerteilung des Vektors in ein kleines *EagI/XbaI*-Fragment von 1094 bp und ein großes *EagI/BamHI*-Fragment von 6042 bp. Dies war aufgrund der 4 vorhandenen Schnittstellen für *XbaI* im Vektor nötig. Durch die Ligation der beschriebenen Fragmente resultierte pMMP-hTERT-cMyc-IRES-CD24 (**MhTcl24**).

2.1.1.2 Generierung der konditionalen Vektoren

Eine reversible Expansion der Zellen sollte mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems des *E.coli*-Phagen P1 erreicht werden. Bei Cre handelt es sich um eine Rekombinase, welche die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Fragmenten zwischen zwei spezifischen Erkennungssequenzen, den LoxP-Sequenzen, katalysiert. Eine LoxP-Sequenz setzt sich aus zwei invertierten

Wiederholungen von 13 bp, die eine asymmetrische Kernsequenz von 8 bp flankieren, zusammen. Die Kernsequenz ist für die Direktionalität der Rekombination ausschlaggebend. Je zwei Cre-Moleküle lagern sich an eine LoxP-Sequenz an, assoziieren mit einem anderen LoxP-Cre-Dimer und leiten die homologe Rekombination innerhalb der Kernsequenz ein. Je nach Orientierung der LoxP-Sequenzen zueinander kommt es entweder zur Deletion oder zur Invertierung der dazwischen liegenden Sequenzen.

Die hier dargestellte Strategie zur Generierung der "gefloxten" Konstrukte ist an die Veröffentlichung von Westermann und Leboulch von 1996 angelehnt (**Abb. 2.2 A**).

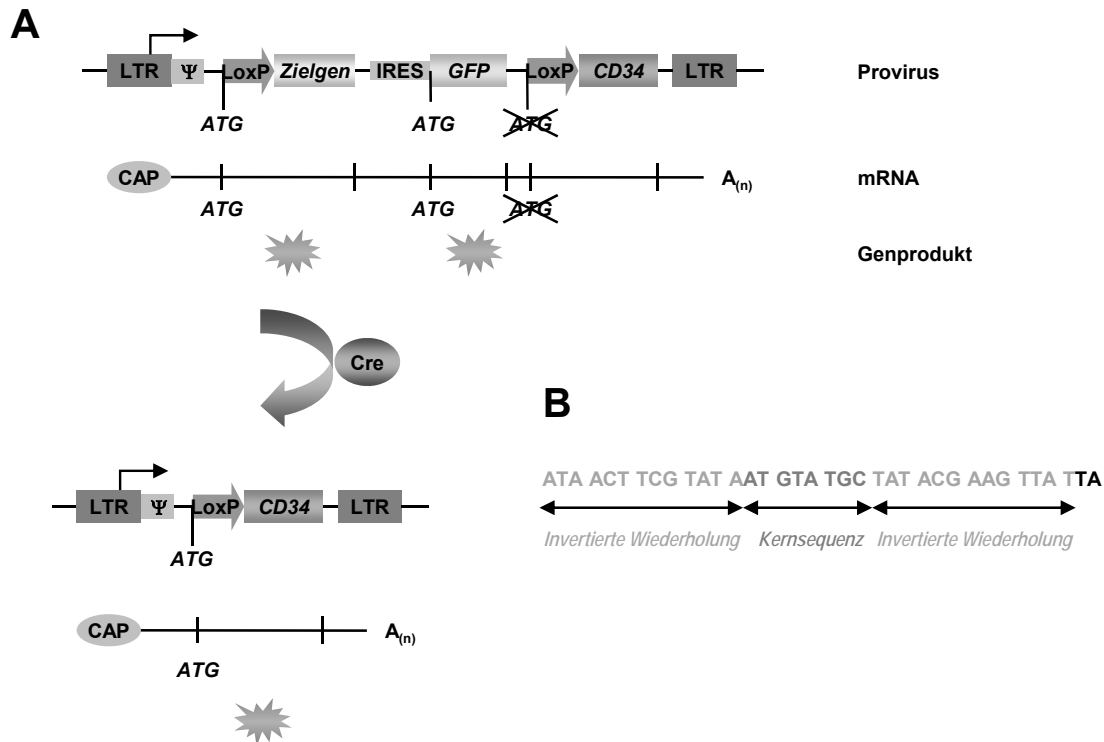


Abb. 2.2: Das Cre/LoxP-System des Bakteriophagen P1

A: Schematische Darstellung der Cre-vermittelten Rekombination. In Cre-negativen Zellen kann nur die Expression des Zielgens und des GFP-Markers erfolgen, da der darauffolgende CD34-Marker ohne Startkodon konstruiert wurde. Durch Zugabe der Cre-Rekombinase erfolgt die Rekombination der LoxP-Sequenz des Zielgens mit der des CD34-Markers, woraufhin letzterer das Startkodon des Zielgens erhält und exprimiert werden kann. Das Zielgen und der GFP-Marker hingegen werden durch diesen Vorgang deletiert. **B:** LoxP-Sequenz: Eine LoxP-Sequenz besteht aus 34 bp und setzt sich aus zwei invertierten Wiederholungen von 13 bp und einer Kernsequenz von 8 bp zusammen. Bei der gewählten Strategie, die sich an der von Westermann und Leboulch (1996) orientiert, ist die LoxP-Sequenz Teil des Leserasters und wird letztendlich translatiert. Um eine Verschiebung des Leserasters der entsprechenden cDNA zu verhindern, wurde die Wildtypsequenz um zwei Basen erweitert. (Abk.: LTR: *long terminal repeat*, Ψ : Verpackungssignal, ATG: Startkodon, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, GFP: Fluoreszenzmarker, *green fluorescent protein*, hier: *enhanced*, CD34: muriner Oberflächenmarker, CAP: 5'-CAP-Struktur, $A_{(n)}$: Poly(A)-Schwanz).

Als Ausgangskonstrukt wurde MIG gewählt. Die 34 bp lange LoxP-Sequenz wurde am 3'-Ende um zwei Basen erweitert, um das Leseraster der entsprechenden cDNA nicht zu verschieben. Die Basen wurden so gewählt, dass das letzte Triplet die neutrale Aminosäure Leucin (Kodon TTA) kodiert (**Abb. 2.2 B**). Die Zielgene wurden am 5'-Ende mit einer LoxP-Sequenz versehen. *Down stream* des GFP-Markers wurde ein zweiter Marker, ein verkürztes murines CD34-Oberflächenmolekül (Fehse et al. 2000) mit voran geschalteter LoxP-Sequenz, platziert. Dieser

zweite Marker wurde ohne Startkodon konstruiert. Diese Konfiguration erlaubt die Expression der Zielgene und des GFP-Markers in Cre-negativen Zellen. Da die beiden LoxP-Sequenzen in gleicher Orientierung angeordnet worden sind, erfolgt nach Zugabe der Cre-Rekombinase die Deletion des Zielgens und des GFP-Markers. Durch diesen Vorgang wird das Gen für den CD34-Marker *in frame* vor das Startkodon des Zielgens geschaltet, so dass die Expression des CD34-Markers eine erfolgte Rekombination signalisiert.

Da die permanente Expression von Cre zu genomischer Instabilität bei eukaryotischen Zellen führt, wurde ein sich selbst-deletierender Cre-kodierender Retrovirus (pMMP-HR-Cre-GFP) eingesetzt (Silver & Livingston 2001), der freundlicherweise von D.M. Livingston (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School Boston, USA) bereitgestellt wurde.

2.1.1.2.1 pMMP-IRES-GFP-xCD34

Die cDNA des trunkierten CD34-Moleküls wurde, inseriert in den Vektor SF11, freundlicherweise von der Arbeitsgruppe C. Baum (Medizinische Hochschule, Hannover) zur Verfügung gestellt. Bei dem Marker ist die zytoplasmatische Domäne deletiert, so dass keine Signalübertragung erfolgen kann (Fehse et al. 2000). Die cDNA wurde mittels der Primer xCD34-F-*BspEI* und xCD34-R-*BspEI* ohne Startkodon amplifiziert. Durch den Forwardprimer wurde eine *BspEI*-Schnittstelle und darauf folgend eine LoxP-Sequenz eingeführt. An das 3'-Ende wurde durch den Reversprimer das Stopkodon und eine *BspEI*-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in pCR-Topo-2.1 subkloniert (pTopo-xCD34) und sequenziert. Die cDNA wurde dann mit *BspEI* exzisiert und über diese Schnittstelle in **MIG** kloniert, woraus **pMMP-IRES-GFP-xCD34 (MIGx34)** resultierte.

2.1.1.2.2 pMMP-x β -Catenin(Δ)-c-Myc-IRES-GFP-xCD34

Um die Fehlerrate bei der PCR so gering wie möglich zu halten, wurde nur ein Teilfragment des 5'-Endes der β -Catenin(Δ)-cDNA amplifiziert. Als Vorlage für die PCR diente pTopo- β Cat-5' (**s. 2.1.1.1.1**). Das Teilfragment wurde mit den Primern xBCat-F-*BspHI* und xBCat-R-*XhoI* amplifiziert. Durch den 5'-Primer wurde eine *BspHI*-Schnittstelle (beinhaltet das Startkodon) und darauf folgend eine LoxP-Sequenz vor das Teilfragment eingeführt. Das Fragment wurde in pCR-Topo2.1 subkloniert (pTopo-2.1-A) und sequenziert. Das 5'-Fragment wurde mit *BspHI/XhoI* aus pTopo-2.1-A und das 3'-Fragment mit *XhoI/BamHI* aus **MBCcIG (s. 2.1.1.1.1)** gewonnen und in den mit *NcoI/BamHI* geöffneten **MIGx34 (s. 2.1.2.2)** inseriert, woraus **pMMP-x β -Catenin(Δ)-c-Myc-IRES-GFP-xCD34 (MxBCcIGx34)** resultierte.

2.1.1.2.3 pMMP-xHOX11-c-Myc-IRES-GFP-xCD34

Als Vorlage für die PCR diente pTopo-HOX11-c-Myc (**s. 2.1.1.1.2**). Die cDNA wurde mit dem Primerpaar xHOX-F-*BspHI*/HOX-R-myc-*BamHI* amplifiziert. Mittels des Forwardprimers wurde eine *BspHI*-Schnittstelle (beinhaltet das Startkodon) und eine LoxP-Sequenz am 5'-Ende eingeführt. Über den Reversprimer wurde das 3'-Ende mit einem c-Myc *tag*, dem Stopkodon und einer *BamHI*-Schnittstelle versehen. Das PCR-Produkt wurde in pCR-Topo2.1 subkloniert

(pTopo-xHOX11-c-Myc) und sequenziert. Die cDNA wurde sodann mit *BspHI/BamHI* exzisiert und in den über *NcoI/BamHI* geöffneten Vektor **MIGx34** (s. 2.1.2.2) inseriert, woraus pMMP-xHOX11-c-Myc-IRES-GFP-xCD34 (**MxHXclGx34**) resultierte.

2.1.2 Arbeiten mit *E.coli*-Bakterien

Zur Transformation sowie zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm XL10-Gold (Stratagene, Heidelberg) verwendet. **Genotyp:** Tet^r Δ(*mcrA*) 183, Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173, *endA1 sup E44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]

2.1.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von *E.coli*-Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium [1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl] oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agarplatten [15 g Bactoagar in 1 L LB-Medium] kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/mL) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine stationär gewachsene Bakterienkultur mit 30% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

2.1.2.2 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli*-Bakterien

Eine Bakterienkolonie wurde von einer Masterplatte in 10 mL PsiB-Medium (5 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Trypton, 5 g/L MgSO₄) überführt und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 mL PsiB-Medium mit 1 mL der Kultur angeimpft und inkubiert, bis die Kultur eine OD₅₀₀ (optische Dichte) von 0,8 erreicht hatte. Sodann wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 867xg und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 mL eiskaltem Tfb1 [30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8] resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 867xg und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 mL Tfb2 [10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% (v/v) Glycerin] resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden aliquotiert und durch Überführen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.1.2.3 Transformation von kompetenten *E.coli*-Bakterien

Es wurden 2 bis 10 µL des Ligationsansatzes (s. 2.1.7.3) in ein Reaktionsgefäß mit 50 µL chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen (s. 2.1.2.2) transferiert, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz für genau 120 sek auf 42°C erwärmt, die Mischung daraufhin sofort auf Eis gestellt und für 2 min inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 200 µL LB-Medium (s. 2.1.2.1) versetzt und bei 37°C und 200 upm für 1 Std inkubiert. Die Inkubation im Medium stellte sicher, dass sich die Plasmide in ihrem Wirt etablieren und ihre Eigenschaften phänotypisch ausprägen konnten. Der Ansatz wurde

anschließend auf selektiven LB-Agarplatten (**s. 2.1.2.1**) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen an Plasmid-DNA (10-100 µg) mittels alkalischer Lyse von Bakterienkulturen gewonnen. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 12000xg durchgeführt. Es wurden 1,5 mL einer Übernachtskultur für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µL Lösung 1 [50 mM Glukose, 25 mM TrisHCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)] resuspendiert. Danach wurde 200 µL Lösung 2 [0,2 N NaOH, 1% (v/v) SDS] hinzugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Sodann erfolgte die Zugabe von 150 µL Lösung 3 [5 M Potassium Acetat, 11,5% (v/v) Eisessig] und das Mischen mittels Vortexen. Das Lysat wurde 5 min auf Eis inkubiert und danach für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen an Phenol-Chloroform versehen. Es erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation. Sodann wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 2 Volumen Ethanol präzipitiert. Es wurde für 2 min inkubiert und anschließend für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min zentrifugiert, bei 50°C getrocknet und in 50 µL ddH₂O+RNase (20 µg/mL) resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.1.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Für die Transfektion (**s. 2.2.2.1**) von 293T-Zellen und 293GPG-Zellen wurde die Plasmid-DNA mittels des Qiagen-Plasmid-Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.1.3 Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten

Für Klonierungen wurden Restriktionsanalysegemische (**s. 2.1.7.1**) sowie PCR-Produkte (**s. 2.1.5**) stets in einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert, bevor sie in Ligationsreaktionen (**s. 2.1.7.3**) eingesetzt wurden.

2.1.3.1 Horizontale Gelelektrophorese

Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückrats kann ein DNA-Gemisch durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach der Größe aufgetrennt werden. Dabei wandern lineare doppelsträngige DNA-Moleküle mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, durch die Gelmatrix. Abhängig von der zu erwartenden Größe wurden die DNA-Moleküle in 0,8 bis 2,5%igen (w/v) horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer [40 mM Tris Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0), eingestellt mit Eisessig]. Die Agarose (LE-Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf) wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle in dem Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen des Gemischs auf ca. 50°C wurde dieses mit

2 µg/mL Ethidiumbromid (AppliChem, Darmstadt) versetzt. Zur Probenaufreinigung wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit TAE überschichtet, die Proben zum Beschweren mit 1/5 Vol 6%igem (v/v) Probenauftragspuffer [0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin, 100 mM EDTA (pH 8,0)] versetzt und aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden DNA-Marker (1-kb-DNA-Leiter, 100-bp-DNA-Leiter, beides von peQLab, Erlangen) eingesetzt. Die angelegte Spannung betrug 13 V/cm, die Laufzeit variierte zwischen 30 bis 45 min. Die Detektion der Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht mit dem Bio-Imaging-System von Syngene (VWR International, Langenfeld).

2.1.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick™-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Isolierung wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.4 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des EZNA®-Tissue-DNA-Mini-Kit, (peQLab, Erlangen) nach Herstellerangaben. Die Qualität der DNA wurde mittels Gelelektrophorese (**s. 2.1.3.1**) überprüft. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.5 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden (Mullis et al. 1986). Die Reaktion gliedert sich in drei Schritte. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA denaturiert. Die nun vorliegenden Einzelstränge dienen als Matrize zur Synthese neuer DNA. In der darauffolgenden Anlagerungsphase lagern sich die synthetischen Oligonukleotidprimer bei ihrer spezifischen Hybridisierungstemperatur an die komplementären Sequenzen der DNA. Anschließend erfolgt die Neusynthese der DNA mittels der thermostabilen Taq-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, welche die vier Deoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an das 3'-OH-Ende der Oligonukleotidprimer heftet. Durch Wiederholung der Zyklen aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz.

Die Synthesen der verwendeten Oligonukleotidprimer wurden bei der Firma ThermoElektron (Ulm, Deutschland) in Auftrag gegeben. Oligonukleotide größer 35 bp wurden SDS-Gel-aufgereinigt bestellt. Zur Amplifikation von DNA mittels PCR wurden standardmäßig Reaktionsansätze von 20 µL Endvolumen mit dem Expand-HiFi-PCR-System (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Ansatz wurden 50 ng DNA, je 5 nmol

Oligonukleotidprimer und je 2 mM dNTPs verwendet. Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Als Negativkontrolle wurde statt DNA ddH₂O in die Reaktion eingesetzt.

Standard-PCR-Programm:

Programm	Zyklus	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	5 min	94°C
Denaturierung	35	1 min	94°C
Anlagerung		1 min	54-64°C*
Verlängerung		1 min	72°C
Finale Verlängerung	1	10 min	72°C
Abkühlung		∞	4°C

*Die Anlagerungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotidprimer

PCR-Programm zur Einbringung eines c-Myc tags oder einer LoxP-Sequenz über das Primerpaar (Primer > 35 bp):

Programm	Zyklus	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	5 min	94°C
Denaturierung	10	1 min	94°C
Anlagerung		1 min	54-64°C*
Verlängerung		1 min	72°C
Denaturierung	20	1 min	94°C
Anlagerung/Verlängerung		1,5 min	72°C
Finale Verlängerung	1	10 min	72°C
Abkühlung		∞	4°C

*Die Anlagerungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotidprimer. Sie wurde auf die Sequenz bezogen, die mit der zu amplifizierenden cDNA komplementär war.

Nach der Auftrennung und Isolierung aus Agarosegelen (**s. 2.1.3**) wurden PCR-Produkte stets in den Vektor pCR-Topo2.1 subkloniert (**s. 2.1.7.3**) und mittels Sequenzierung (MWG, Ebersberg) auf PCR-bedingte Mutationen überprüft.

Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
BCat-F-NcoI	CCA TGG CTA CTC AAG CTG ATT TGA TGG AGT TGG ACA TGG CAA TG
BCat-R-XhoI	CTC GAG TCA TTG CAT ACT GTC CAT C
BCat-F-BsWI	CGT ACG TCC ATG GGT GGG ACA CAG CAG CAA TTT GTG GAG GGG GTC CGC ATG GAA GAA ATA GTT GAA GGT TGT A
BCat-R-myc-BamHI	GGA TCC TTA CAG GTC CTC CTC GCT GAT CAG CTT CTG CTC CAG GTC AGT ATC AAA CCA GGC CAG
HOX-F-NcoI	CCA TGG AGC ACC TGG GTC CGC ACC ACC TCC ACC CGG GTC ACG CAG AGC CCA TTA GCT TCG GCA T
HOX-R-myc-BamHI	GGA TCC TCA CAG GTC CTC CTC GCT GAT CAG CTT CTG CTC CTC GCA GGC CGA CGC CAC CG
hTERT-F-XbaI	TCT AGA CTG CCA TGC CGC GCG CTC CCC GCT
hTERT-R-MluI	ACG CGT CCT GCC CGG GTG GGC CCA G
hTERT-F-SacII	CCG CGG CTT CAA GGC TGG GAG GAA CAT GCG TCG CAA ACT CTT TGG GGT CTT AGA TCT TCA CAG GTC CTC CTC GCT GAT CAG CTT CTG CTC GTC CAG GAT GGT CTT GAA GTC
hTERT-R-myc-BglII	
xBCat-F-BspHI	TCA TGA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT TAG CTA CTC AAG CTG ATT TGA TGG AGT
xBCat-R-XhoI	CTC GAG TCA TTG CAT ACT GTC CAT CAA TAT CAG CTA CTT GTT CTT GAG T
xCD34-F-BspEI	TCC GGA GGC CGG CCA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT TAC AGG TCC ACA GGG ACA CGC G
xCD34-R-BspEI	TCC GGA GCG GCC GCT CAA GGT TCC AGC TCC AGC CTT TCT CCT GTA G
xHOX-F-BspHI	CAT GTC ATG ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TTA GAG CAC CTG GGT CCG CAC CAC CTC CAC CCG GGT CA

2.1.6 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion einer mit ddH₂O verdünnten Probe bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht etwa 50 µg/mL DNA. Der Quotient der Extinktion bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Präparation und sollte für wässrige Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dieser Wert wird durch Verunreinigungen mit Protein oder Phenol deutlich verringert.

2.1.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Die verwendeten Restriktionsenzyme sowie die antarktische Phosphatase stammten von New England Biolabs (Frankfurt). Die T4-DNA-Ligase wurde von Roche (Mannheim) bezogen.

2.1.7.1 Restriktionsanalysen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA wurden 1 bis 2 µg DNA in 30 µL Gesamtvolumen mit dem für das Enzym vom Hersteller empfohlenen Puffer, 2 Einheiten Enzym und bei der an das Restriktionsenzym angepassten Temperatur mindestens für 2 Std oder aber ü.N. inkubiert. Für präparative Ansätze wurden 2 bis 6 µg DNA in 50 µL Gesamtvolumen mit 5 bis 10 Einheiten Enzym verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden in einem Agarosegel (**s. 2.1.3.1**) aufgetrennt und gegebenenfalls isoliert (**s. 2.1.3.2**).

2.1.7.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1 µg geextrahierte Vektor-DNA (**s. 2.1.3**) wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µL mit 5 Einheiten antarktische Phosphatase in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer für 60 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch eine fünfminütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.1.7.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert die T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. Die Ligation wurde mit 50 ng geschnittener Vektor-DNA, einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss der zu klonierenden DNA-Fragmente und 1 Einheit T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer in einem Volumen von 10 µL durchgeführt. Der Ansatz wurde ü.N. bei 4°C inkubiert und anschließend für die Transformation (**s. 2.1.2.3**) von *E.coli* verwendet. PCR-Produkte (**s. 2.1.5**) wurden mit Hilfe des Topo-TA-Cloning-Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben subkloniert.

2.2 Zellbiologische Methoden

Die für die Handhabung der Zellen benötigten Medien, Zusätze und Reagenzien wurden alle, sofern nicht anders vermerkt, von Gibco (Invitrogen, Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (FormaScientific, Labotect, Göttingen) bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch an Sterilbänken (HERASafe, Kendro, Heraeus, Hanau) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Zur Lagerung von Zellen wurden diese in Einfriermedium [90% (v/v) hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS), 10% (v/v) DMSO] aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und langsam auf -80°C gekühlt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Revitalisierung wurden die eingefrorenen Zellen zügig auf 37°C im Wasserbad erwärmt, zweimal im zehnfachen Volumen an phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und in dem entsprechenden Medium ausgesät. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte in einer Megafuge1.0R (Heraeus, Hanau) bei 176xg für 5 min bei RT. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Tote Zellen wurden mittels Anfärbung mit 0,2%iger Trypanblaulösung von der Zählung ausgeschlossen. Trypanblau ist nicht membrangängig und wird nur von Zellen, deren Membranintegrität beeinträchtigt ist (hauptsächlich tote Zellen), aufgenommen.

2.2.2 Arbeiten mit konventionellen Zelllinien

Als Grundmedium für die Kultivierung von adhärenenten Zelllinien wurde *Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L Glukose verwendet, das mit 10% (v/v) hitzeinaktivierten FKS, 2 mM L-Glutamin und 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin angereichert wurde. Zum Ablösen der Zellen von Zellkulturflaschen wurden diese vorsichtig mit PBS gespült, anschließend vollständig mit Trypsin-EDTA-Lösung benetzt und für 3 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sodann wurden die Zellen in PBS aufgenommen, zentrifugiert und in der benötigten Dichte ausgesät.

293T-Zellen. 293T-Zellen sind von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 (*human embryonic kidney 293*) abgeleitet, die aus Adenovirus-Type-5-transformierten embryonalen Nierenzellen etabliert wurde. Zusätzlich exprimieren erstere stabil das große Tumorantigen von SV40 (*simian virus 40*), wodurch Plasmide mit einem SV40-Replikationsursprung besser abgelesen werden können (DuBridg et al. 1987). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe C. Baum (Medizinische Hochschule, Hannover) zur Verfügung gestellt. Die

Zellen zeichnen sich durch semiadhärentes Wachstum und gute Transfizierbarkeit aus und wurden zur Produktion von RD114-pseudotypisierten viralen Partikeln eingesetzt (**s. 2.2.2.1**). Für die Produktion von retroviralen Partikeln wurde das Medium mit 10 mM HEPES versetzt.

293GPG-Zellen. Bei der verwendeten 293GPG-Zelllinie handelt es sich um eine aus HEK293-Zellen (s.o.) abgeleitete retrovirale Verpackungszelllinie, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe R.C. Mulligan (Children's Hospital Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen exprimieren konstitutiv die cDNA des Gag-Pol-Polyproteins des murinen Leukämievirus (MLV) und induzierbar das Hüllprotein G (Glykoprotein) des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) (Ory et al. 1996). Gag-Pol wurde mit einem Neomycinresistenzvermittelnden Vektor kotransfiziert. VSV-G wurde zusammen mit einem Puromycinresistenzvermittelnden Vektor in die Zellen eingeführt. Die Expression des VSV-G-Proteins ist toxisch für 293-Zellen, deshalb ist die cDNA des Glykoproteins mit einem Tetrazyklin-regulierbaren Promotor versehen, so dass die Expression während der Propagierungsphase durch Gabe von Tetrazyklin (1 µg/mL) abgeschaltet werden kann (*tet off* System). Zur kontinuierlichen Selektion der Zellen wurde das Medium mit 2 µg/mL Puromycin und 0,3 mg/mL Neomycin versehen. Für die Produktion von retroviralen Partikeln wurden die Zellen dementsprechend in Medium ohne Tetrazyklin und mit 10 mM HEPES zur Stabilisierung der viralen Partikel kultiviert.

HT1080-Zellen. Die Zelllinie wurde aus einer Fibrosarkombiopsie eines kaukasischen Mannes etabliert (Rasheed et al. 1974) und wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe C. Baum (Medizinische Hochschule, Hannover) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde zur Titration von VSV-G- und RD114-pseudotypisierten viralen Partikeln eingesetzt (**s. 2.2.2.1**).

NIH3T3-HOX11-Zellen. Die Zelllinie leitet sich von der murinen embryonalen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 ab (Green & Todaro 1967). Zusätzlich exprimieren die Zellen humanes HOX11. Sie wurde uns freundlicherweise von K. Humphries (Terry Fox Laboratory, Kanada) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde zur Isolierung der HOX11-cDNA mittels PCR eingesetzt.

MEF-hTERT^{-/-}-Zellen. Bei den Zellen handelt es sich um eine Primärkultur von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) aus hTERT^{-/-}-Mäusen. Sie wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe L. Rudolph (Medizinische Hochschule, Hannover) bereitgestellt. Da die meisten immortalisierten Zelllinien hTERT (RNA-Komponente der Telomerase) und hTERT (katalytische Untereinheit der Telomerase) exprimieren und somit Telomerase-positiv sind, wurde dieses System zur funktionalen Charakterisierung des hTERT-kodierenden Vektors pMhTcl24 herangezogen. Die ektopisch eingebrachte katalytische Untereinheit hTERT kann in einem hTERT^{-/-}-Hintergrund mit der zellinternen RNA-Untereinheit hTERTC eine funktionale Telomerase bilden und im TRAP-Assay (**s. 2.3.2**) auf ihre Funktion überprüft werden.

2.2.2.1 Herstellung retroviraler Überstände

Bei den Retroviren unterscheidet man die cis-Elemente [5'-LTR, 3'-LTR, Verpackungssequenz Psi, Primerbindungsstelle] von den trans-Elementen [*gag* (Kapsidproteine), *pol-pro* (Multienzymkomplex) und *env* (Hüllproteine)]. Die trans-Elemente können auf dem viralen Genom durch Fremdgene ersetzt werden. Zur Herstellung von retroviralen Partikeln müssen die trans-Elemente von außen beigesteuert werden. Verpackungszelllinien wie z.B. 293GPG-Zellen enthalten bereits die genetische Information für diese Elemente, jedoch ohne Verpackungssignal, um die Bildung von replikationskompetenten Partikeln zu verhindern. Sie können jedoch auch durch eine Transfektion zusammen mit dem Zielplasmid in ein entsprechendes Zellsystem überführt werden. In den Zellen werden die RNA-Transkripte des Konstruktes durch die in trans beigesteuerten *gag*-, *pro*-, *pol*- und *env*-Genprodukte verpackt und bilden infektiöse Viruspartikel, die in das Medium abgegeben werden.

Das Hüllprotein bestimmt das Wirtsspektrum eines Retrovirus. Die Spezifität basiert auf der Wechselwirkung der Hüllproteine mit ihren korrespondierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Durch die Verwendung verschiedener Hüllproteine können die retroviralen Vektorpartikel so modifiziert werden, dass sich ihre Art- und Gewebespezifität ändert. Die Verpackung eines viralen Kapsids in eine Virushülle, die nicht der natürlichen Hülle des Virus entspricht, bezeichnet man auch als Pseudotypisierung. Das G-Protein des vesikulären Stomatitisvirus (VSV-G) bindet an Phospholipidkomponenten der Zellmembran und benötigt keine spezifischen Rezeptoren für den Zelleintritt. Die Viruspartikel werden mittels Membranfusion in die Zelle aufgenommen. Aufgrund dieses Mechanismus kann ein sehr breites Spektrum an Zellen verschiedener Spezies und Funktionen infiziert werden (Yee et al. 1994). Für die Infektion von humanen hämatopoetischen Stammzellen eignen sich besonders RD114-pseudotypisierte Retroviren. Bei RD114 handelt es sich um das Hüllprotein des feline endogenen Virus RD114, das an Rezeptoren (Rdr, Transporter für neutrale Aminosäuren) bindet, die sehr stark von primitiven hämatopoetischen Zellpopulationen exprimiert werden. Moderate Transduktionseffizienzen können mit GALV-pseudotypisierten Partikeln erzielt werden. Das Hüllprotein des Gibbonaffenleukämievirus verschafft den viralen Partikeln durch Bindung an Natrium-abhängigen Phosphattransportern (Glvr) Eintritt in die Wirtszelle (Lucas et al. 2005).

VSVG-pseudotypisierte Retroviren. In mittlere Zellkulturflaschen gesäte und zu 80% konfluent gewachsene 293GPG-Zellen wurden für 24 Std mit einem Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitat {600 µL 41 µg/mL Plasmid-DNA in Low-TE-Puffer [1 mM TrisHCL (pH 7,5), 0,05 mM EDTA (pH 8)], 147 µL 2 mM CaCl und 600 µL 2x HBS [0,3 M NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄·x2H₂O]} inkubiert. Nach 24 und 48 Std wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit Medium ohne Tetrazyklin versorgt. Die Sammlung der Überstände erfolgte nach 72, 96, 120, 144 und 168 Std post Transfektion. Die Überstände wurden mittels Filtration durch einen 0,22 µm Filter (Millex-HV, Millipore, Schwalbach) von Zelltrümmern gereinigt. Nach dem Aliquotieren wurden die Überstände bei -80°C gelagert.

RD114- und GALV-pseudotypisierte Retroviren. Einen Tag vor der Transfektion wurden 5×10^6 293T-Zellen in mittlere Zellkulturflaschen gesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einem Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitat {500 μ L 16 μ g/mL Zielplasmid-DNA, 24 μ g/mL Verpackungsplasmid M57 (retroviraler Verpackungsvektor, der retrovirales *gag-pol* unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert), 4 μ g/mL Hüllplasmid phCMV-RD114 (retroviraler Verpackungsvektor, der das Hüllprotein des felines endogenen Retrovirus RD114 unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert) oder phCMV-GALVenv (retroviraler Verpackungsvektor, der das Hüllprotein des Gibbonaffenleukämievirus, GALV, unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert) in Low-TE-Puffer [1 mM TrisHCL (pH 7,5), 0,05 mM EDTA (pH 8)], 50 μ L 2 mM CaCl und 500 μ L 2x HBS [0,3 M NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O]} inkubiert. Das Verpackungsplasmid und die Hüllplasmide wurden von der Arbeitsgruppe C. Baum (Medizinische Hochschule, Hannover) zur Verfügung gestellt. Nach 12 und 24 Std wurde jeweils das Medium gewechselt. Die Sammlung der Überstände erfolgte nach 36 und 48 Std post Transfektion. Die Überstände wurden mittels Filtration durch einen 0,22 μ m Filter (Millex-HV, Millipore, Schwalbach) von Zelltrümmern gereinigt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte stets bei -80°C .

2.2.2.2 Titration von viralen Überständen

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurden die Zielzellen immer mit der gleichen Mengen an Viruspartikeln infiziert. Dazu musste der Titer jedes viralen Überstandes bestimmt werden. Er ist ein Maß für die Anzahl der infektiösen Viren pro mL (transduzierende Einheiten/mL, TE/mL). Zur Bestimmung des Titers einer Virenproduktion wurden einen Tag vor der Transduktion 5×10^4 HT1080-Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, die Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der retroviralen Überstände in Anwesenheit von 8 μ g/mL Polybren infiziert und ü.N. inkubiert. Die Titration wurde stets als Doppelbestimmung durchgeführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 Std nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.4). Der Titer einer Virenproduktion wurde nach folgender Formel berechnet:

$$TE/mL = [\text{Zellzahl am Tag der Infektion} * \frac{\text{Anteil der positiven Zellen}}{100}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

* Unter Berücksichtigung der Zellproliferation zwischen Aussäen und Transduktion und einer angenommenen Verdopplungszeit von 24 Std wurde stets mit einer Zellzahl von 10^5 kalkuliert.

2.2.2.3 Konzentrierung von retroviralen Überständen

Für einen Teil der Versuche wurden höhere Titer als die der regulär produzierten Überstände benötigt. VSV-G- sowie RD114-pseudotypisierte Viren sind hinreichend stabil und können mittels Zentrifugation konzentriert werden. Zur Konzentrierung der retroviralen Partikel wurden mehrere Überstände gleicher Viren vereint, gefiltert (s.o) und anschließend für 3 Std bei 14000xg und 4°C in einer Sorvall-RC5Bplus-Zentrifuge (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet vorsichtig mit etwa einem zehntel des vorherigen Volumens überschichtet und ü.N. bei 4°C inkubiert. Das Medium wurde entsprechend den Bedürfnissen der Zellen, für die das Virus bestimmt war, ausgewählt. Am nächsten Tag erfolgte das Aliquotieren des Konzentrats. Die retroviralen Partikel wurden stets bei –80°C gelagert.

2.2.2.4 Transduktion von Zelllinien

Einen Tag vor der Transduktion wurden die Zellen in mittlere Flaschen oder 6-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den retroviralen Überständen in Anwesenheit von 8 µg/mL Polybren infiziert und ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 Std nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.4).

2.2.3 Arbeiten mit hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

Gesamtknochenmark von Normalspendern wurde freundlicherweise von der KMT-Station (Knochenmarktransplantation) der Medizinischen Hochschule (Hannover) nach Einwilligung des Spenders bereitgestellt. Dabei handelte es sich ausschließlich um die nach einer erfolgten Transplantation in den KMT-Beuteln zurückgebliebene Zellsuspension. CD34-positive Zellen aus peripherem Blut von G-CSF-mobilisierten Spendern wurden freundlicherweise von der Firma Cytonet (Hannover) bereitgestellt. Die für die Stimulation bzw. Kultivierung verwendeten Zytokine [IL-3, IL-6, TPO, SCF, Flt3-L (Tebu-Bio, Offenbach) und EPO (Boehringer, Mannheim)] wurden in lyophilisierter Form ohne stabilisierende Proteinzusätze geliefert. Zur Rekonstitution wurde das Lyophilisat in sterilem PBS+0,5%BSA aufgenommen, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert. Die beiden Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF sind als Arzneimittel im klinischen Einsatz und wurden als verwendungsfertige Lösung (GM-CSF) bzw. als Lyophilisat (G-CSF) geliefert (beides bezogen von Amgen, München). Die Handhabung der beiden Arzneimittel erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise.

2.2.3.1 Isolation von CD34-positiven Knochenmarkzellen

CD34-positive Knochenmarkzellen wurden aus Gesamtknochenmarksproben von Normalspendern gewonnen. Alle Zentrifugationsschritte fanden, falls nicht anders angegeben, bei 176xg und 4°C statt. Die Knochenmarkzellen wurden durch vorsichtiges Spülen des KMT-

Beutels mit PBS gewonnen und über einen 30%igen Ficollgradienten (Amersham, Braunschweig) aufgereinigt. Dazu wurden die Proben bei 375xg 30 min bei RT durch ein Ficollkissen zentrifugiert, um die Erythrozyten und Granulozyten abzutrennen. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und mit PBS gewaschen. Um Erythrozytenrückstände aus der Zellpopulation zu eliminieren, erfolgte eine osmotische Lyse des Zellpellets mittels 10 mL ddH₂O. Der isotone Zustand wurde durch Zugabe von 5 mL 2,7%iger NaCl-Lösung wieder hergestellt. Die Zellen wurden noch einmal gewaschen. Die Isolierung der CD34-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe des Direkt-CD34-Progenitor-Zell-Isolation-Kits (Miltenyi, Bergisch Gladbach). Die Isolation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen erfolgt hierbei durch positive Selektion von CD34-exprimierenden Zellen. Diese werden mittels eines monoklonalen Mausantikörpers gegen humanes CD34, der an definierte paramagnetische Partikel gekoppelt ist, markiert und magnetisch separiert. Die einzelnen Versuchsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die magnetische Separation der Zellen wurde ein VarioMACS-Trennsystem (Miltenyi, Bergisch Gladbach) verwendet. Der Reinheitsgrad der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (**s. 2.2.4**) bestimmt. Die Zellen wurden entweder eingefroren (**s. 2.2.1**) oder gleich in einem Zytokincocktail stimuliert (**s. 2.2.3.2**).

2.2.3.2 Retroviraler Gentransfer in CD34-positive Knochenmarkzellen

Da die meisten hämatopoetischen Stammzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus sind und sich die Zellen für die retrovirale Transduktion in Teilung befinden müssen, erfolgte zuerst die Stimulation der Zellen mittels Zytokine. Es wurden 1x10⁵ bis 3x10⁵ CD34-positive Zellen für 24 bis 72 Std in 500 µL Stemspan (Serum-freies Expansionsmedium, StemCell, St. Katharinen) mit 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin in Gegenwart von 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL Flt3-L, 20 ng/mL TPO, 20 ng/mL IL-6 und 20 ng/mL IL-3 in einer 24-Lochplatte stimuliert.

Für die Stimulation und die sich anschließende Transduktion wurden die Platten vorher mit Retronektin (rekombinantes Fibronektinfragment CH-296, TaKaRa, Cambrex, Verviers, Belgien) beschichtet. Retronektin stimuliert u.a. die Proliferation und unterbindet Differenzierungsvorgänge als auch Apoptose in den Zellen (Yokota et al. 1998). Des Weiteren besitzt es Bindungsstellen für Oberflächenmoleküle von hämatopoetischer Zellen und Viruspartikel, so dass durch die entstehende räumliche Nähe die Infektion erleichtert wird (Fehse et al. 1998). Die Beschichtung der 24-Lochplatten erfolgte mit 10 µg/cm² Retronektin mittels einer Inkubation von 2 Std bei RT oder ü.N. bei 4°C. Danach wurde die Lösung entfernt, mit 2 mL PBS+2%BSA für 30 min bei RT geblockt und anschließend einmal mit 2 mL PBS+2,5%HEPES (v/v) gewaschen. Die Waschlösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch entfernt.

1 mL der entsprechenden RD114-typisierten retroviralen Überstände wurde auf eine Retronektin-beschichtete 24-Lochplatte überführt und für 15 min bei 13000xg und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig entfernt. Das Beladen der 24-Lochplatte wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden prior stimulierte CD34-positive

Zellen (s.o.) vorsichtig auf die Viren-beschichtete Platte überführt und ü.N. im Brutschrank inkubiert. Der gesamte Vorgang wurde für weitere zwei Tage wiederholt. Die Analyse und Sortierung der Zellen erfolgte 48 Std nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie (**s. 2.2.4**).

2.2.3.3 Langzeitexpansion von transduzierten Zellen

Für Langzeitstudien wurden sortierte Zellen (**s. 2.2.4**) in *Iscove's-modified-Dulbecco's-Medium* (IMDM), versetzt mit 20% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 20 ng/mL SCF, 20 ng/mL Flt3-L, 20 ng/mL TPO, 20 ng/mL IL-3, 20 ng/mL IL-6 und 6 Einheiten/mL EPO, kultiviert. Nach Bedarf wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt, indem die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt wurde. Einmal wöchentlich wurde die Hälfte der Kultur zur Quantifizierung und weiterer Analyse entnommen und die verbliebene Kultur mit frischem Medium versorgt. Die -fache Expansion der Zellen wurde angelehnt an Summers et al. 2004 wie folgt berechnet:

$$\text{-fache Expansion} = \frac{A \times 2^n}{B}$$

*A = Anzahl der Zellen im halben Kulturvolumen, n = Woche, $A \times 2^n$ = theoretische Gesamtmenge der Zellen,
B = initiale Zellmenge zum Kulturstart*

2.2.3.4 Kolonieassay von hämatopoetischen Vorläufern

Mit dem Kolonieassay kann die Koloniebildungsfähigkeit von hämatopoetischen Vorläuferzellen überprüft werden. Eine reduzierte Koloniebildung oder das Fehlen bzw. die Vermehrung einzelner Zelltypen gibt Hinweise über die Wirkung der untersuchten Zielgene auf die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufern. Das semisolid Medium wird mit Zytokinen versetzt, welche die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen induzieren. Aus einer Vorläuferzelle bildet sich während der Inkubationsperiode eine Kolonie von Tochterzellen, da die Migration der Zellen im viskosen Medium eingeschränkt ist. Je nach Wahl der Zytokine können die entstandenen Kolonien mittels Lichtmikroskopie morphologisch identifiziert und quantifiziert werden. Die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) erfolgte mittels Methocult-H4230 (Stemcell, St. Katharinen) nach Herstellerangaben. Es wurden 3×10^4 sortierte Zellen (**s. 2.2.4**) in 300 μ L IMDM+0,5%BSA aufgenommen, mit 0,6 mL Zytokincocktail [G-CSF (30 ng/mL), GM-CSF (30 ng/mL), EPO (6 Einheiten/mL), IL-3 (20 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), TPO (20 ng/mL), Flt3-L (10 ng/mL) und SCF (20 ng/mL) in IMDM mit 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin] versetzt und luftblasenfrei mit 2,1 mL Methylcellulose vermischt. Je zwei Schälchen (35x10 mm, mit Gitter, Nunc, Wiesbaden) wurden mit 1 mL der Suspension befüllt. Die Schalen wurden zusammen mit einem Wasserschälchen (35x10 mm, Nunc, Wiesbaden) zur Luftbefeuchtung in Petrischalen transferiert und inkubiert. Die Kolonien wurden nach 14 Tagen mit einem Inversmikroskop (IM35, Zeiss, Oberkochen) ausgezählt.

2.2.3.5 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die Panoptische Färbung nach Pappenheim wird hauptsächlich als Routinefärbung zur Beurteilung von Blutbildern und Knochenmarkaspiraten durchgeführt. Der Zellkern und das Zytoplasma der Blutzellen werden durch basische (z.B. Methyleneblau) und saure Farbstoffe (z.B. Eosin) unterschiedlich angefärbt, wodurch eine Differenzierung der Zellen möglich wird (Kerne rötlich violett, Plasma der Lympho- und Monozyten bläulich, Plasma der Granulozyten zartrosa). Es wurden 5×10^4 bis 2×10^5 Zellen/mL in einem Volumen von 0,5 mL in eine Probenkammer mit fixiertem Objektträger und einem Papierfilter pipettiert. Danach wurden die Zellen in einer Zytospinzentrifuge (Cytospin3, Shandon, Frankfurt) für 5 min bei 200xg sedimentiert. Nach dem Trocknen der Präparate erfolgte die Färbung der Zellen. Der Objektträger wurde für 5 min in May-Grünwald-Färbelösung inkubiert und danach mit ddH₂O gespült. Anschließend erfolgte eine fünfzehnminütige Inkubation in einer 5%igen Giemsa-Färbelösung. Nach erneutem Spülen mit ddH₂O wurden die Objektträger ü.N. getrocknet und am nächsten Tag mit Eukit (O.Kindler, Freiburg) fixiert. Danach wurde das Präparat mikroskopisch ausgewertet und bildgebend dokumentiert (Olympus BX41, Olympus, Hamburg).

2.2.3.6 konventionelle Bänderungsanalyse

Mit Hilfe dieser zytologischen Methode können strukturelle Chromosomenveränderungen, wie z.B. Translokationen oder numerische Chromosomenabberationen, festgestellt werden. Die R-Bänder von Metaphasechromosomen wurden hier mit dem Farbstoff Chromomycin-A3 markiert. Aufgrund der charakteristischen Verteilung der R-Bänder auf einem Chromosom können die einzelnen Chromosomen unterschieden und ein Karyogramm erstellt werden. Die zytogenetische Analyse der Zellen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe B. Schlegelberger (Medizinische Hochschule, Hannover), wie unter Schlegelberger et al. 1999 beschrieben, durchgeführt. In Kürze wurden die Metaphasechromosomen der Zellen durch eine 6 bis 24 stündige Inkubation mit Colcemid arretiert. Sodann erfolgte eine Inkubation in 0,075 M KCl für 20 min bei 37°C. Danach wurden die Zellen mit einem Methanol-Essigsäuregemisch (3:1) bei RT fixiert, auf einen Objektträger überführt und in Ethanol dehydriert. Danach wurden die Zellen mit Chromomycin-A3 inkubiert, anschließend mit Methylgrün gegengefärbt und in Glycerin eingeschlossen. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops. Es wurden 8 bis 10 Metaphasen pro Zelllinie ausgewertet.

2.2.3.7 Phagozytoseassay

Die Aufnahme von festen Partikeln in eine Zelle über Endozytose wird als Phagozytose bezeichnet. Zu den phagozytierenden Zellen zählen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und unreife, dendritische Zellen. Die Phagozytoseaktivität kann durch die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Partikeln und sich anschließender durchflusszytometrischer Analyse einer Zellpopulation bestimmt werden. Die zu untersuchenden Zellen wurden einmal mit PBS+10%FKS gewaschen, in einem Verhältnis von 1:100 mit Texasred-markierten *E.coli*-Bakterien (Molecular Probes, Göttingen) vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur

Überprüfung von unspezifischen Bindungen der markierten Bakterien an die Zellmembran wurde eine Kontrollprobe bei 4°C parallel inkubiert. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit 0,1% (v/v) Trypanblau gequantscht und bis zur FACS-Analyse (s. 2.2.4) auf Eis gelagert.

2.2.3.8 Differenzierung von neutrophilen Granulozyten

Die Differenzierung von mobilisierten CD34-positiven Zellen bzw. AML1-ETO-transduzierten Zellen wurde angelehnt an das Protokoll von Hino et al. 2000 durchgeführt. Es wurden zwischen 0,1 bis 7×10^6 Zellen für eine Woche in *Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium* (RPMI) mit 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin sowie 10% (v/v) FKS in Gegenwart von 5 ng/mL SCF, 5 ng/mL IL-3, 5 ng/mL GM-CSF und 10 ng/mL G-CSF in einer 6-Lochplatte stimuliert. Nach Bedarf wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt, indem die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt wurde. Nach einer Woche wurden die Zellen in RPMI mit 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin sowie 10% (v/v) FKS in Gegenwart von 5 ng/mL GM-CSF und 10 ng/mL G-CSF weiter kultiviert. Die Zellen wurden nach zwei bis drei Wochen mittels panoptischer Färbung (s. 2.2.3.5), FACS-Analyse (s. 2.2.4) und Zellzahlbestimmung evaluiert.

2.2.4 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen

Mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) können Einzellzellen einer Suspension anhand von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften analysiert und isoliert werden. Die Methode basiert auf der Emission von optischen Signalen einer an einem Laserstrahl vorbeigeleiteten Zelle. In einer Lösung befindliche Zellen werden hierbei durch eine Kapillare in ein Fluidsystem gesaugt, perlschnurartig aufgereiht und an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Dabei emittiert die Zelle Streulicht sowie nach Markierung mit fluoreszierenden Partikeln (z.B. Antikörper, GFP, Texasred-markierte Bakterien) Fluoreszenzimpulse, woraus unterschiedliche Eigenschaften der Zelle abgeleitet werden können. Das Vorwärtsstreulicht FSc (*forward scatter*) wird durch die Beugung des Lichtes hervorgerufen und gibt Auskunft über die Größe einer Zelle. Das Seitwärtsstreulicht SSc (*side scatter*) entsteht durch die Brechung des Lichtes und ist ein Maß für die Granularität einer Zelle. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe erhöht werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen sowohl analysiert als auch mittels eines speziellen FACS-Gerätes nach den gewünschten Merkmalen sortiert werden.

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen erfolgte mit einem FACS-CANTO (Becton Dickinson, Heidelberg) und der FlowJo-Software (Tree Star Inc, Ashland, USA). Der Nachweis mittels Transduktion eingebrachter Markergene erfolgte 48 Std nach der Infektion der Zellen mit Virusüberständen. Zum Nachweis der GFP-Expression wurden die Zellen geerntet und zweimal

mit PBS+2%FKS gewaschen und analysiert. Als Negativkontrolle wurden untransduzierte Zellen verwendet. Für die Detektion von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS+2%FKS mit humanem IgG (Miltenyi, Bergisch Gladbach) zum Blockieren der FcR-Rezeptoren für 10 min auf Eis inkubiert, mit PBS+2%FKS gewaschen und danach mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern für 20 min auf Eis inkubiert. Die verschiedenen Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Zellen wurden ebenfalls mit der entsprechenden Isotypenkontrolle gefärbt. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Analyse der Zellen. Für einige Experimente wurden die Zellen mittels eines Moflo-Zellsortierers (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) sortiert. Die Sortierung der Zellen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe M. Ballmaier (Medizinische Hochschule, Hannover) durchgeführt. Die Analyse von Texasred-markierten Zellen (Absorption: 586 nm, Emission: 605 nm, s. 2.2.3.7) wurde ebenfalls an dem Moflo-Zellsortierer durchgeführt, da dieser mit dem zur Anregung des Fluorochrom benötigten Kryptonlaser ausgestattet ist.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Name	Klon	Isotyp	Reaktivität	Konjugat	Firma	Ab/Em [nm]	Exprimiert auf
CD11b	ICRF44	Maus IgG _{1κ}	Mensch	PE	Pharmingen (Heidelberg)	565/578	Aktivierte Lymphozyten Monozyten Granulozyten NK-Zellen
CD14	UCHM1	Maus IgG	Mensch	APC	Serotec (München)	650/660	Monozyten Makrophagen Einige DCs Schwach auf Granulozyten
CD24	M1/69	Ratte IgG _{2bκ}	Maus	PE	Pharmingen (Heidelberg)	565/578	In dieser Arbeit: Markermolekül (s. 2.1.1.1)
CD33	WM53	Maus IgG _{1κ}	Mensch	PE	Pharmingen (Heidelberg)	565/578	Myeloide Vorläufer Monozyten Granulozyten Aktivierte T-Zellen Mastzellen
CD34	8G12	Maus IgG _{1κ}	Mensch	PE-Cy7	BD (Heidelberg)	565/778	Unreife Vorläufer Kolonie-bildende Einheiten
CD34	RAM34	Ratte IgG _{2aκ}	Maus	PE	Pharmingen (Heidelberg)	565/578	In dieser Arbeit: Markermolekül (s. 2.1.1.2)
CD235a (GlyA)	GA-R2	Maus IgG _{2bκ}	Mensch	PE	Pharmingen (Heidelberg)	565/578	Erythroide Vorläufer Erythrozyten

(Abk.: Ab: Absorption, APC: Allophycocyanin, Em: Emission, GlyA: Glycophorin A, PE: Phycoerythrin, PE-Cy7: Phycoerythrincyan 7)

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Westernblotanalysen

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer [10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Na-Deoxycholate, 0,1% SDS], das sich nach der Größe der Zellkulturflasche richtete, lysiert. Zusätzlich wurde 70 $\mu\text{L/mL}$ Proteaseinhibitorcocktail [(104 mM AEBSF, 0,08 mM Aprotinin, 2 mM Leupeptin, 4 mM Bestatin, 1,5 mM Pepstatin A, 1,4 mM E-64) Sigma, Taufkirchen], frisch hinzugegeben. Das Lysat wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zum Abtrennen von unlöslichen Zellbestandteilen wie Zellkerne und Zytoskelett für 20 min bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden mit Hilfe des Bradfordreagenz (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers in Doppelbestimmungen quantifiziert. Als Standard wurde eine Rinderserumalbuminkonzentrationsreihe (1500 bis 2500 $\mu\text{g/mL}$) eingesetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Die Auftrennung und Analyse der molekularen Massen der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS-Gel unter Verwendung des Biorad-Elektrophorese-Systems (Biorad, München). Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 8 bis 15%ige SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli gegossen (Laemmli 1970). Es wurden Lysate mit 30 bis 50 μg Protein aufgetrennt. Diese wurden mit 6x Lämmli-puffer [4% SDS, 20% Glycerin, 100 mM TrisHCl, 10 mM DTT, 0,2% Bromphenolblau, 2% 2-Mercaptoethanol] vermischt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei RT und konstant 140 V in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Elektrotansferverfahrens auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe) übertragen. Der Transfer erfolgte je nach Größe des zu untersuchenden Proteins für 0,45 bis 1,5 Std bei konstanter Stromstärke von 2,5 mA/cm^2 und 4°C in Transferpuffer [50 mM TrisHCl, 0,196 M Glycin (pH 8,3), 20% Methanol]. Der vollständige Transfer der Proteine wurde mittels einer zweiminütigen Inkubation der Membran in Ponceaulösung [0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure] überprüft. Danach wurde die Membran 2 Std bei RT in Blockingpuffer [PBS, 0,1% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Milchpulver] geschwenkt, um unspezifische Proteinbindstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper [gegen humanes c-Myc, Maus IgG₁, 1:250, (Pharmingen, Heidelberg)] in PBS-T [PBS, 0,1% (v/v) Tween 20] bei 4°C inkubiert. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers wurde die Membran viermal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper [HRP-konjugierter, polyklonaler Ziege gegen Maus Antikörper, 1:8000, (Pharmingen, Heidelberg)] erfolgte 2 Std bei RT in PBS-T. Anschließend wurde erneut viermal mit PBS-T gewaschen. Die Immunfärbung erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem (Amersham, Freiburg) nach Angaben

des Herstellers und wurde mit einem Phosphoimager (Fuji Image, Japan) analysiert. Nach der Analyse wurde die Membran mit einem GAPDH-Antikörper [gegen humanes GAPDH, Maus IgG₁, 1:10000, (Santa Cruz, Heidelberg)] reanalysiert. Dazu wurden vorher die gebundenen Antikörper durch eine fünfzehnminütige Inkubation in Ablösungspuffer [0,06 M Tris (pH 6,8), 2% (v/v) SDS, 0,01% (v/v) 2-Mercaptoethanol] bei 50°C durch leichtes Schütteln entfernt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurde die Membran viermal mit PBS-T gewaschen und in Blockingpuffer (s.o.) inkubiert. Die sich anschließenden Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.3.2 TRAP-Assay

Die Telomeraseaktivität wurde mit dem Trapeze-Telomerase-Detektions-Kit (Chemikon, Hofheim) nach Herstellerangaben mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe L. Rudolph (Medizinische Hochschule, Hannover) bestimmt. Das Verfahren basiert auf dem TRAP-Assay (*telomeric repeat amplification protocol*). Dabei fungiert ein mit γ -³²P-ATP markiertes TS-Oligonukleotid als Substrat für die Telomerase-vermittelte Addition von TTAGGG-Wiederholungen. Es entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen Fragmenten, die mittels PCR amplifiziert werden. Nach Auftrennung des Gemischs in einem SDS-Gel werden die Telomeraseprodukte als typisches Leitermuster erkennbar. Die Visualisierung erfolgte mittels eines Röntgenfilms.

2.4 Statistische Auswertung von Datensätzen

Die statistische Auswertung von Datenreihen erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2000. Die in Diagrammen dargestellten Werte ergeben sich aus den Mittelwerten der Datenreihen mit den Mittelabweichungen als Fehlerbalken. Signifikanzen zwischen Datenreihen wurden mit Hilfe des t-Tests (zweiseitig) ermittelt. Irrtumswahrscheinlichkeiten $p \leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO komparativ auf ihre Fähigkeit überprüft werden, hämatopoetische Stammzellen (HSCs) bzw. Vorläuferzellen (HPCs) zu expandieren. Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese Gene in Kombination mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) eine Expansion der Zellen über den Seneszenzpunkt hinaus ermöglichen. Dazu mussten im Vorfeld retrovirale Vektoren der Zielgene generiert und in herkömmlichen Zelllinien auf ihre Funktionalität getestet werden. Nach der funktionellen Charakterisierung erfolgte die komparative Analyse der Gene in HSCs bzw. HPCs mittels Langzeitexpansionskultur, Kolonieassay, Immunophänotypisierung und panoptischer Färbung nach Pappenheim. Anschließend wurde das wirksamste Konstrukt eingesetzt, um aus CD34-positiven Knochenmarkzellen HSC- bzw. HPC-Zelllinien zu generieren. Die Zelllinien wurden ebenfalls mittels der genannten Parameter sowie konventioneller Bänderungsanalyse charakterisiert und auf ihre Differenzierungsfähigkeit überprüft.

3.1 Charakterisierung der generierten retroviralen Vektoren in herkömmlichen Zelllinien

Für die komparativen Analysen von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO (ohne und mit hTERT) in HSCs bzw. HPCs wurden konventionelle konstitutiv exprimierende retrovirale Vektoren der ersten Generation eingesetzt (konstitutive Vektoren). Die Expandierung von HSCs bzw. HPCs mit dem wirksamsten Zielgen sollte jedoch zusätzlich reversibel gestaltet werden, um bei der späteren Analyse des Patientenmaterials auszuschließen, dass das

expandierende genetische Element einen Einfluss auf den der Erkrankung zugrunde liegenden Mechanismus ausübt. Eine reversible Expansion der HSCs bzw. HPCs sollte durch das Flankieren des Zielgens mit LoxP-Sequenzen und einer nachfolgenden Exzision dieser Elemente mittels der Cre-Rekombinase erreicht werden (konditionale Vektoren).

3.1.1 Charakterisierung der retroviralen Vektoren für die konstitutive Expression der Zielgene

Die während dieser Arbeit verwendeten Vektoren für die konstitutive Expression der Zielgene [β -Catenin(Δ), HOX11, AML1-ETO und hTERT] sind in **Abb. 3.1** schematisch dargestellt.

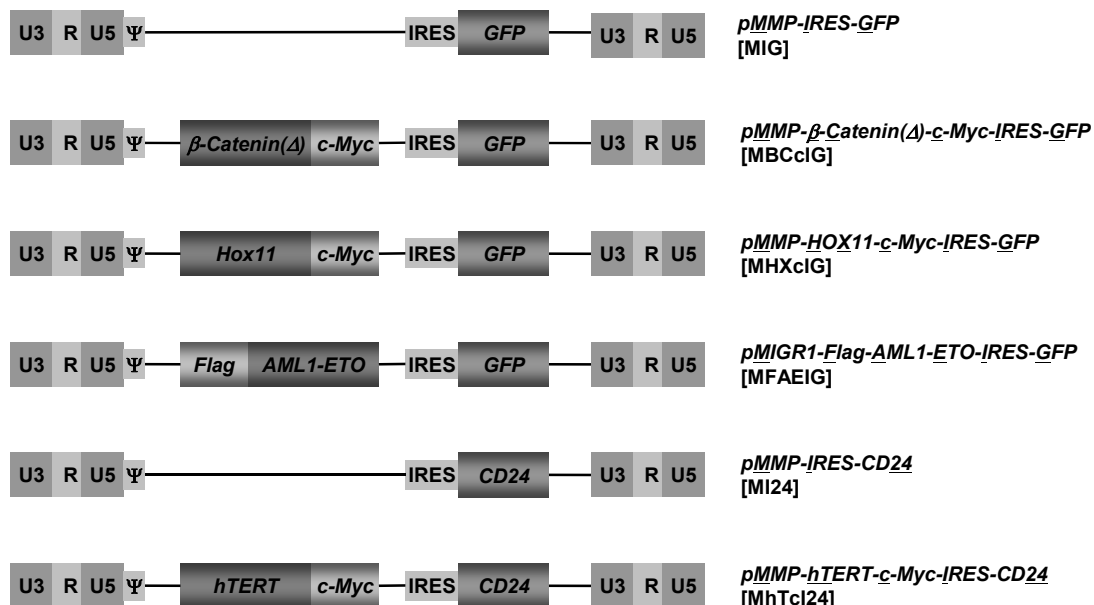


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der konstitutiven Vektoren

Die in dieser Arbeit konstruierten retroviralen Vektoren leiten sich bis auf eine Ausnahme (**s. 2.1.1.1**) von dem weiterentwickelten MoMLV-Vektor pMMP ab (Klein et al. 2000). Um die Expression der Zielgene in eukaryotischen Systemen überprüfen zu können, wurde der Vektor *down stream* der Einbringungsstelle der Zielgene mit dem IRES-Element des Encephalomyocarditis Virus versehen, worauf entweder der Fluoreszenzmarker GFP oder der murine Oberflächenmarker CD24 folgt. Diese Anordnung ermöglicht die Bildung eines bicistronischen Transkripts vom LTR-Promotor aus und erlaubt durch das IRES-Element eine interne Initiierung der Translation. Die Expression der Marker lässt dementsprechend auf die Expression der Zielgene schließen. Ein C-terminales c-Myc tag ermöglicht die Unterscheidung der ektopisch eingebrachten Proteine von zellinternen Proteinen. (Abk.: CD24: *heatstable antigen*, GFP: *green fluorescent protein* – hier: *enhanced*, IRES: *internal ribosomal entry site*, LTR: *long terminal repeat*, MoMLV: Moloney-Mausleukämievirus).

Eine ausführliche Beschreibung zur Klonierung der retroviralen Vektoren ist unter Abschnitt **2.1.1.1** zu finden. Die in den folgenden Abschnitten angeführten Abkürzungen für die verwendeten Konstrukte sind in Klammern indiziert.

3.1.1.1 Bildung von RD114-pseudotypisierten Retroviren aus den generierten konstitutiven Vektoren

Die retroviralen Vektoren MBCclG, MHXclG und MhTcl24 wurden wie unter **2.1.1.1.1** bis **2.1.1.1.3** beschrieben kloniert. Um festzustellen, ob aus den generierten Konstrukten funktionstüchtige Retroviren produziert werden können, wurde die Bildung und Verpackung der retroviralen Genome überprüft. Dazu wurden HT1080-Zellen mit RD114-pseudotypisierten Überständen von MBCclG, MHXclG und MhTcl24 infiziert. Als Positivkontrollen dienten die Überstände von MIG, MI24 sowie MFAEIG. Die Konstruktion von MFAEIG war nicht Teil dieser Arbeit (**s. 2.1.1.1**). Die Zellen wurden 2 Tage später durchflusszytometrisch analysiert. Für den Nachweis der Genexpression wurde zum einen der zytoplasmatische Marker GFP (*green fluorescent protein*, hier: *enhanced*) verwendet sowie der murine Zelloberflächenmarker CD24 (*cluster of differentiation 24, heat stable antigen*). Die Expression dieser Gene gestattet die Analyse als auch die Sortierung transduzierter Zellen mittels Durchflusszytometrie. Wie aus **Abb. 3.2** hervorgeht, konnte eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität gegenüber untransduzierten Zellen für alle Konstrukte nachgewiesen werden. Hieraus lässt sich folgern, dass die generierten Vektoren in funktionstüchtige Retroviren verpackt werden können.

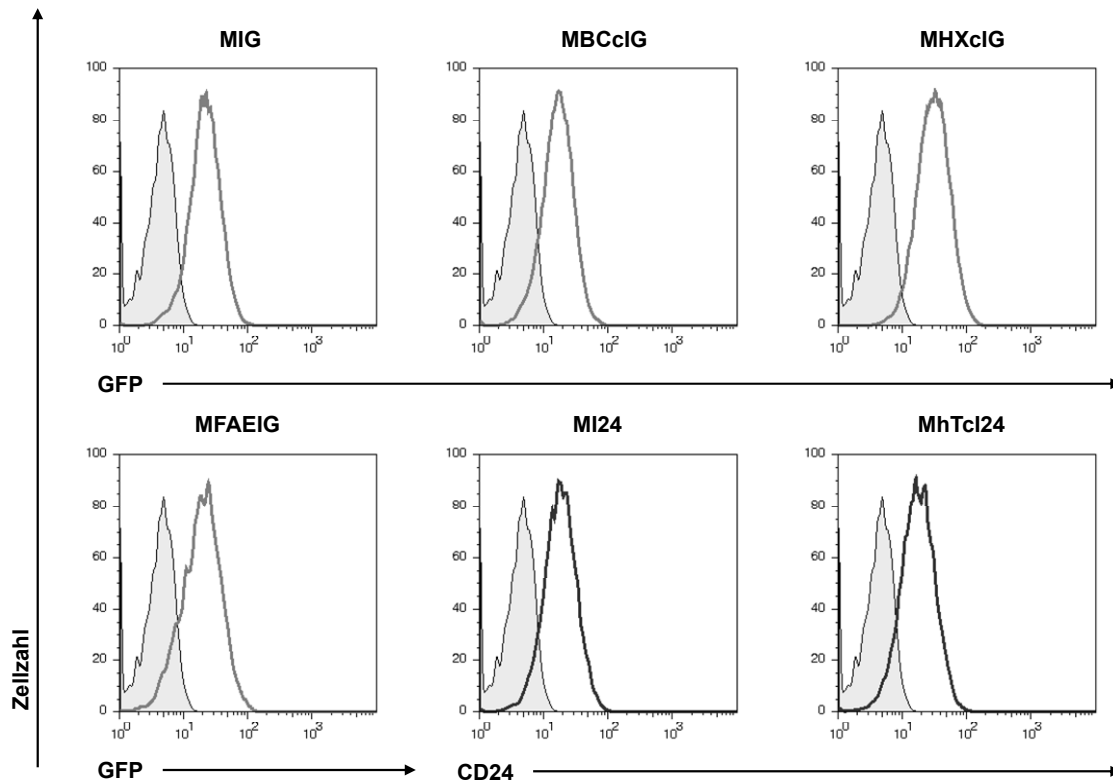


Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Analyse von transduzierten HT1080-Zellen (konstitutive Vektoren)

HT1080-Zellen wurden mit den Überständen der entsprechenden Konstrukte infiziert und zwei Tage später auf die Expression von GFP bzw. CD24 mittels FACS-Analyse überprüft. MI24- und MhTcl24-transduzierte Zellen wurden vorher mit einem PE-markierten anti-Maus-CD24-Antikörper gefärbt. (grau unterlegte Linie: untransduzierte Zellen bzw. Isotypkontrolle, hellgraue und graue Linie: transduzierte Zellen).

3.1.1.2 Nachweis der ektopischen β -Catenin(Δ)-, HOX11- und hTERT-Expression mittels Westernblotanalysen

Um zu überprüfen, ob zusammen mit dem Marker auch die *up stream* im Vektor eingefügte cDNA von β -Catenin(Δ), HOX11 bzw. hTERT exprimiert wird, wurden Westernblotanalysen durchgeführt. HT1080-Zellen wurden mit den retroviralen Überständen von MIG, MBCcIG, MHXcIG, MI24 und MhTl24 infiziert und 48 Std später auf die Expression der Markergene mittels FACS-Analyse überprüft. Danach wurden Proteinlysate von den Zellen hergestellt und im Westernblot mit anschließender ECL-Detektion analysiert. Die Zelllysate aus MIG- und MI24-transduzierten Zellen dienen als Negativkontrollen. Das C-terminale c-Myc *tag* ermöglichte eine Unterscheidung der retroviral exprimierten Proteine von endogenen Proteinen der HT1080-Zellen. Wie der **Abb. 3.3** zu entnehmen ist, konnte β -Catenin(Δ) als 88 kDa großes Protein und

HOX11 als 34 kDa großes Protein detektiert werden. Dies entspricht den erwarteten Größen. Die als Kontrolle verwendeten MIG-transduzierten HT1080-Zellen zeigten hingegen kein Signal. Das Vorhandensein der Banden bei den entsprechenden Größen lässt auf die korrekte Expression der konstruierten cDNAs schließen. Die Reanalyse des Blots mit einem GAPDH-Antikörper demonstrierte, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden. Für hTERT konnte hingegen trotz verschiedener Optimierungsstrategien kein Signal (127 kDa) detektiert werden. Der Expressionsnachweis der konstruierten cDNA konnte jedoch durch einen funktionellen Telomeraseaktivitätstest (**s. 3.1.1.3**) erbracht werden. Der Expressionsnachweis von AML1-ETO hätte über das N-terminale Flag *tag* erfolgen können. Da uns jedoch dieser Antikörper nicht zur Verfügung stand und es sich um einen bereits charakterisierten Vektor handelte (**s. 2.1.1.1**), wurde auf einen Nachweis der Proteinexpression verzichtet.

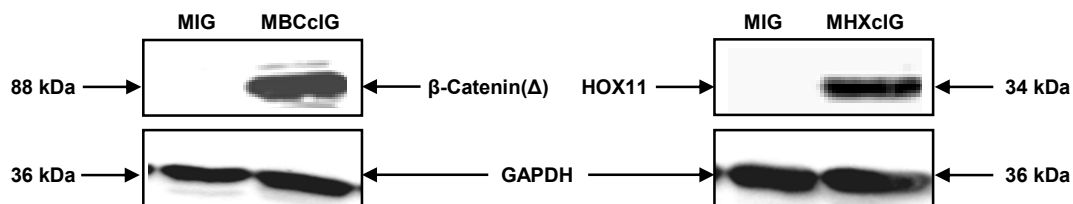


Abb. 3.3: Nachweis von β -Catenin(Δ) bzw. HOX11 in MBCcIG- bzw. MHXcIG-transduzierten HT1080-Zellen

Je 40 μ g Zellextrakt wurde in einem 8%igen [β -Catenin(Δ)] bzw. 10%igen [HOX11] SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Als primärer Antikörper wurde ein anti-human-c-Myc-Antikörper (1:250) verwendet. Nach der Detektion wurde der Blot mit einem anti-human-GAPDH-Antikörper (1:10000) reanalysiert.

3.1.1.3 Validierung der Funktionalität von hTERT im TRAP-Assay

Die Funktionalität der generierten katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) wurde mit Hilfe des TRAP-Assays (*telomeric repeat amplification protokoll*) überprüft. Da die meisten herkömmlichen Zelllinien Telomerase-positiv sind, wurden für diesen Versuch embryonale Fibroblasten von hTERT^{-/-}-Mäusen (MEF-Zellen) verwendet. Die Zellen wurden mit VSV-G-pseudotypisierten Partikeln von MI24 und MhTcl24 infiziert und 48 Std später durchflusszytometrisch überprüft (**Abb. 3.4 A**).

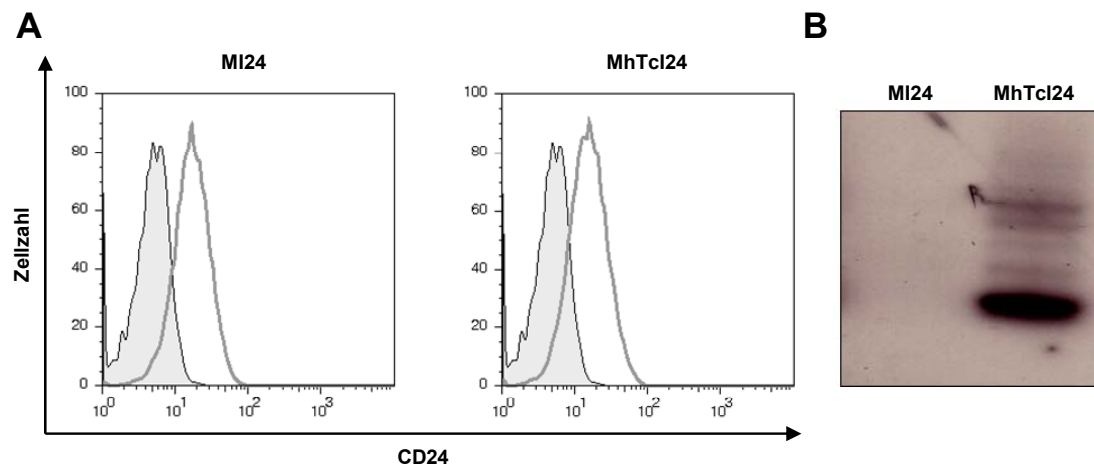


Abb. 3.4: Funktionelle Überprüfung von MhTcl24

A: FACS-Analyse von transduzierten MEF-Zellen. MEF-Zellen (murine embryonale Fibroblasten) von $hTERT^{-/-}$ -Mäusen wurden mit VSV-G-pseudotypisierten MI24- oder MhTcl24-Überständen infiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit einem PE-markierten anti-Maus-CD24-Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. (grau unterlegte Linie: Isotypkontrolle, graue Linie: transduzierte Zellen). **B:** Telomeraseaktivitätstest mittels TRAP-Assay. Telomeraseaktivität von MI24-transduzierten Zellen im Vergleich zu MhTcl24-transduzierten Zellen (zellulärer Hintergrund: MEF-Zellen von $hTERT^{-/-}$ -Mäusen).

Sodann erfolgte die Telomeraseaktivitätsbestimmung der Zellen mit Hilfe des TRAP-Assays (**Abb. 3.4 B**). Die Analyse zeigt, dass nur bei MhTcl24-transduzierten Zellen das charakteristische Leiternmuster der Telomeraseprodukte detektiert werden konnte, wohingegen bei den als Negativkontrolle verwendeten MI24-transduzierten Zellen kein Signal nachgewiesen werden konnte. Damit konnte von der Funktionalität des generierten MhTcl24-Konstruktes ausgegangen werden.

3.1.2 Charakterisierung der retroviralen Vektoren für die konditionale Expression der Zielgene

Ursprünglich sollte die durch β -Catenin(Δ), HOX11 oder AML1-ETO hervorgerufene Expansion der Zellen reversibel gestaltet werden. Eine reversible Expansion der Zellen sollte mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems des *E.coli*-Phagen P1 erreicht werden (**s. 2.1.1.2**). Die in dieser Arbeit konstruierten Vektoren für die konditionale Expression der Zielgene sind in **Abb. 3.5** schematisch dargestellt.

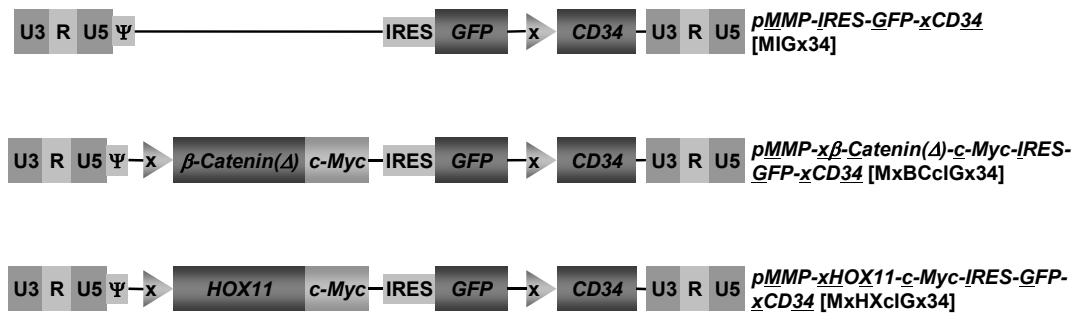


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der konditionalen Vektoren

Die konditionalen Vektoren leiten sich wie die konstitutiven Vektoren von dem MoMLV-Vektor pMMP ab. Das Zielgen ist am 5'-Ende mit einer LoxP-Sequenz (x) und am 3'-Ende mit einem c-Myc tag versehen. Darauf folgt eine IRES und der Fluoreszenzmarker GFP. *Down stream* des GFP-Markers folgt der murine Oberflächenmarker CD34 mit voran geschalteter LoxP-Sequenz (x). Dieser zweite Marker wurde ohne Startkodon konstruiert. Diese Konfiguration erlaubt die Expression der Zielgene und des GFP-Markers in Cre-negativen Zellen. In Cre-positiven Zellen katalysiert die Cre-Rekombinase die Rekombination der 2 LoxP-Sequenzen. Durch diesen Vorgang wird die Zielgen-IRES-GFP-Kassette deletiert und das Gen für den CD34-Marker *in frame* vor das Startkodon des Zielgens geschaltet, so dass die Expression des CD34-Markers eine erfolgreiche Rekombination signalisiert (s. 2.1.1.2).

Zu Beginn der Klonierungsarbeiten stand die cDNA für AML1-ETO nicht zur Verfügung, so dass für die vorläufigen Funktionsanalysen nur die konditionalen Vektoren für β-Catenin(Δ) und HOX11 konstruiert wurden. Eine ausführliche Beschreibung zur Klonierung der retroviralen Vektoren ist unter Abschnitt 2.1.1.2 zu finden. Die im Text verwendeten Abkürzungen für die konditionalen Vektoren sind in Klammern indiziert.

3.1.4.1 Bildung von RD114-pseudotypisierten Retroviren aus den generierten konditionalen Vektoren

Die retroviralen Konstrukte MIGx34, MxBCclGx34 und MxHXclGx34 wurden wie unter 2.1.1.2.1 bis 2.1.1.2.3 beschrieben kloniert. Um zu klären, ob aus den „geflochten“ Konstrukten funktionstüchtige Retroviren gebildet werden können, wurde der Zusammenbau und die Verpackung des retroviralen Genoms überprüft. Dazu wurden HT1080-Zellen mit den Überständen von MIGx34, MxBCclGx34 und MxHXclGx34 infiziert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Experiment zeigt, dass für alle Konstrukte eine Fluoreszenzverschiebung im Vergleich zu den untransduzierten Kontrollen nachweisbar war (Abb. 3.6). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die rekombinanten Vektorgenome in infektiöse Partikel verpackt und damit Zielzellen infiziert werden können.

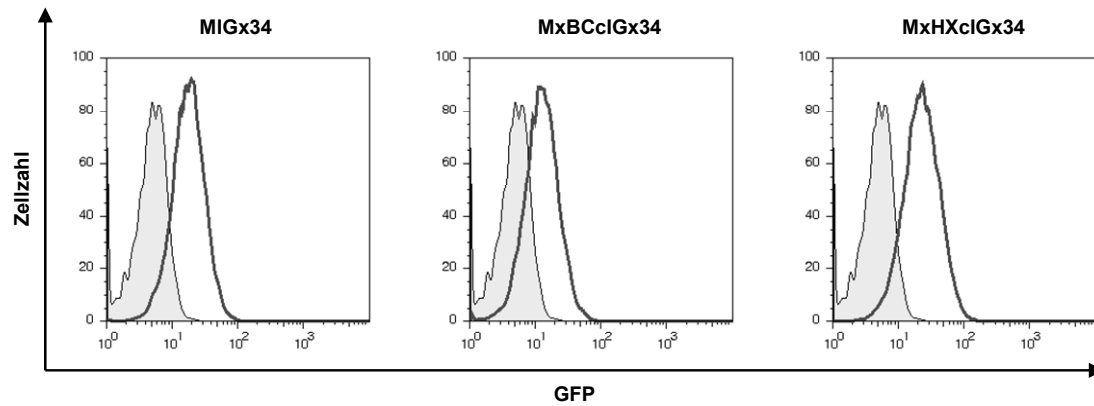


Abb. 3.6: Durchflusszytometrische Analyse von transduzierten HT1080-Zellen (konditionale Vektoren)

HT1080-Zellen wurden mit Überständen von MIGx34, MxBCclGx34 und MxHXclGx34 infiziert und zwei Tage später mittels Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Expression untersucht. (grau unterlegte Linie: untransduzierte Zellen, dunkelgraue Linie: transduzierte Zellen).

3.1.4.2 Überprüfung der ektopischen α -Catenin(Δ)- und α HOX11-Expression mittels Westernblotanalysen

Um zu überprüfen, ob auch die mit einer LoXP-Sequenz versehene cDNA von β -Catenin(Δ) bzw. HOX11 mit dem Marker koexprimiert wird, wurden Westernblotanalysen durchgeführt. HT1080-Zellen wurden mit Überständen von MIGx34, MxBCclGx34 und MxHXclGx34 transduziert und 48 Std später auf die Expression des GFP-Markers mittels FACS-Analyse überprüft. Danach erfolgte die Analyse der Zelllysate im Westernblot mit anschließender ECL-Detektion. Auch bei diesen Konstrukten ermöglichte ein C-terminales c-Myc tag die Unterscheidung der ektopisch eingebrachten Proteine von zellinternen Proteinen. MIGx34-transduzierte Zellen dienen als Negativkontrolle. Wie aus **Abb. 3.7** hervor geht, konnte α -Catenin(Δ) als ein 88 kDa großes Protein und α HOX11 als ein 34 kDa großes Protein detektiert werden, so dass von einer korrekten Expression der cDNAs in den Zellen ausgegangen werden konnte. Bei der MIGx34-transduzierten Kontrolle konnte hingegen wie erwartet kein Signal detektiert werden. Die Reanalyse des Blots mit einem GAPDH-Antikörper veranschaulichte, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden.

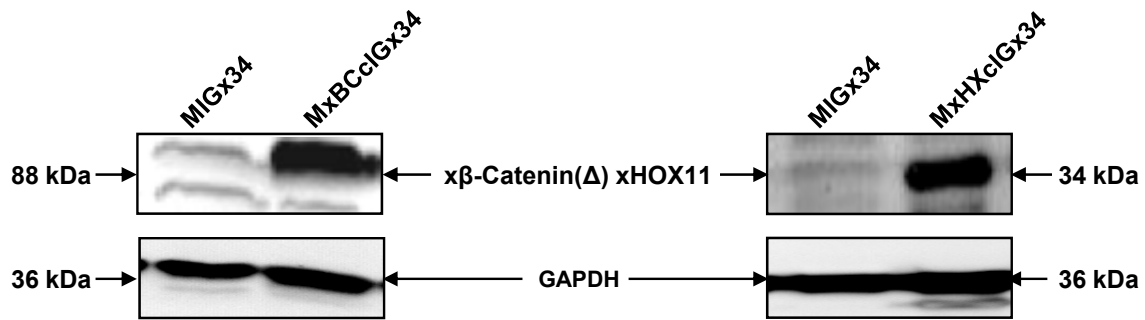


Abb. 3.7: Westernblot zum Nachweis von $x\beta$ -Catenin(Δ) bzw. $xHOX11$ in $MxBCclGx34$ - bzw. $MxHXclGx34$ -transduzierten HT1080-Zellen

Es wurde je 40 μ g Zellextrakt in einem 8%igen [$x\beta$ -Catenin(Δ)] bzw. 10%igen [$xHOX11$] SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Als primärer Antikörper wurde ein anti-human-c-Myc-Antikörper (1:250) eingesetzt. Für die Reanalyse des Blots wurde ein anti-human-GAPDH-Antikörper (1:10000) verwendet.

3.1.4.3 Nachweis der Cre-vermittelten Exzision der Zielgen-IRES-GFP-Kassette mittels FACS-Analyse

Zum Nachweis der Cre-vermittelten Deletion der Zielgen-IRES-GFP-Kassette wurden HT1080-Zellen mit RD114-pseudotypisierten Partikeln von MIGx34, MxBCclGx34 und MxHXclGx34 infiziert. Zwei Tage später wurden die GFP-positiven Zellen mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer sortiert. Um jeweils eine möglichst homogene Zellpopulation mit gleicher Expressionsstärke zu erhalten, wurden die intermediär GFP-exprimierenden Zellen sortiert. Die Zellen wurden zur Regenerierung 2 Tage kultiviert, auf ihre Reinheit mittels FACS überprüft und mit dem RD114-pseudotypisierten Cre-kodierenden Retrovirus pMMP-HR-Cre-GFP infiziert. Da die permanente Expression von Cre eine genomische Instabilität bei eukaryotischen Zellen hervorruft, wurde ein sich selbst-deletierender Cre-kodierender Retrovirus eingesetzt (Silver & Livingston 2001). MIGx34-transduzierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Der Nachweis der sequenzspezifischen Rekombination erfolgte durch die durchflusszytometrische Detektion des murinen Zelloberflächenmarkers CD34 (*cluster of differentiation 34*). Wie aus **Abb. 3.8** hervorgeht, konnte in MxBCclGx34- und MxHXclGx34-transduzierten Zellen die Expression des CD34-Markers nachgewiesen werden (oben), wohingegen die GFP-Expression drastisch abgenommen hatte (unten). In den MIGx34-transduzierten Kontrollzellen konnte hingegen keine CD34-Expression nachgewiesen und keine Verminderung der GFP-Expression detektiert werden. Insgesamt lässt

sich festhalten, dass in MxBcClGx34- und MxHXcIGx34-transduzierten Zellen mittels ektopischer Expression der Cre-Rekombinase eine Deletion der „geflochten“ Zielgen-IRES-GFP-Kassette induziert werden konnte, die sich durch die Expression des zweiten Markers CD34 nachweisen ließ, so dass von der Funktionalität der generierten Konstrukte ausgegangen werden konnte.

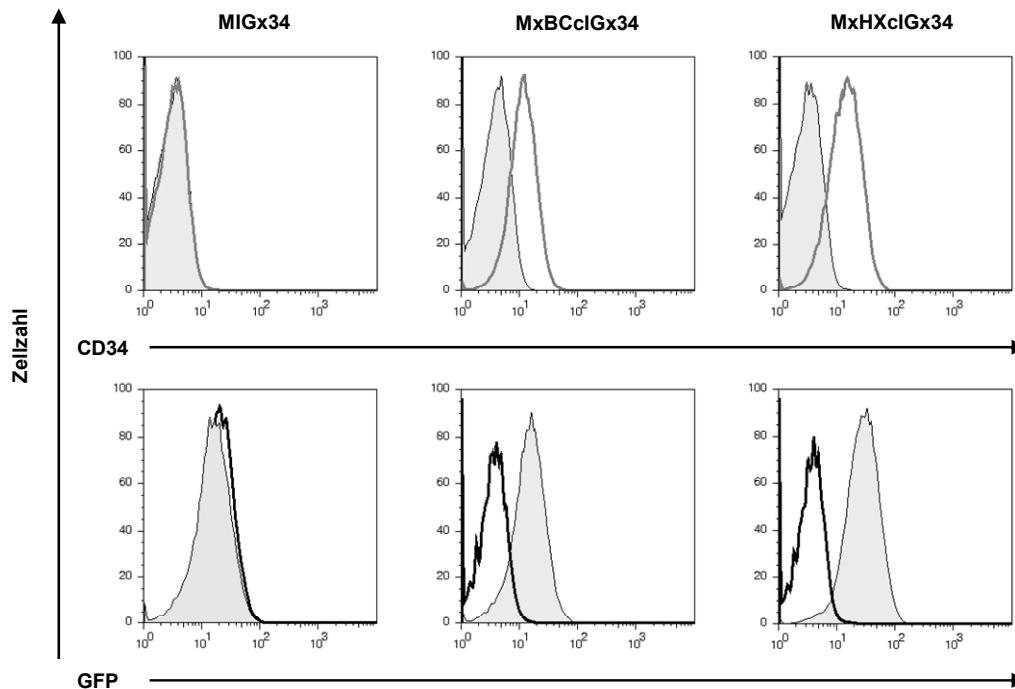


Abb. 3.8: Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination mittels FACS-Analyse

Mit MIGx34, MxBcClGx34 und MxHXcIGx34 transduzierte und nach GFP-sortierte HT1080-Zellen wurden mit den Überständen des Cre-kodierenden Retrovirus pMMP-HR-Cre-GFP infiziert und drei Tage später auf die Expression des GFP- und CD34-Markers überprüft. Dafür wurden die Zellen mit einem PE-markierten anti-Maus-CD34-Antikörper (1: 100) gefärbt und anschließend mittels FACS analysiert. (grau unterlegte Linie: Cre-negative Zellen, graue und schwarze Linie: Cre-positive Zellen).

3.1.3 Transduktion von CD34-positiven Knochenmarkzellen mit RD114-pseudotypisierten Überständen der generierten Vektoren

Im Anschluss an die Charakterisierung der retroviralen Vektoren in herkömmlichen Zelllinien wurde die Transduzierbarkeit von CD34-positiven Knochenmarkzellen mit den Überständen von MIG, MBCcIG, MHXcIG, MFAEIG, MhTcl24 (konstitutive Vektoren) sowie MIGx34, MxBcClGx34 und MxHXcIGx34 (konditionale Vektoren) evaluiert. Die retroviralen Vektoren wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) zwischen 5 und 50 eingesetzt.

Die Transduktionseffizienz wurde durch die durchflusszytometrische Quantifizierung von GFP- bzw. CD24-positiven Zellen bestimmt. Mit den Überständen der konstitutiven Vektoren konnten 15 bis 60% der Zielzellen infiziert werden, wohingegen mit den Überständen der konditionalen Vektoren nur ein Minimum an Zellen (1-4%) transduziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Trotz verschiedener Strategien zur Optimierung der Transduktionseffizienz konnte der Anteil an infizierten Zielzellen nicht erhöht werden. Deshalb wurde vorerst von der reversiblen Expansion der HSCs bzw. HPCs mittels der konditionalen Vektoren Abstand genommen.

3.2 Charakterisierung der Zielgene in hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- (HSCs) bzw. Vorläuferzellen (HPCs) zu untersuchen und sie auf ihre Eignung zur Etablierung von Zelllinien zu überprüfen. Die Wirkung der Gene auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen wurde zwar von einigen Gruppen in murinen (Reya et al. 2003, Hawley et al. 1994) und humanen (Mulloy et al. 2002) Zellen beschrieben, eine komparative Analyse der Zielgene in humanen HSCs und HPCs wurde jedoch noch nie in der Form durchgeführt. Die Einbeziehung von hTERT zur Überwindung des Seneszenzpunktes der Zellen stellte ebenfalls einen in dieser Kombination noch nicht überprüften Faktor dar.

Um Aufschluss über die Wirkung der Gene auf die Proliferation und Differenzierung von HSCs bzw. HPCs zu erlangen, wurden CD34-positive Knochenmarkzellen mit RD114-pseudotypisierten Überständen von MIG, MBCclG, MHXclG und MFAEIG jeweils in Kombination mit MhTcl24 transduziert. Die GFP-positiven (nachfolgend als GFP-Kontrolle, β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO bezeichnet) sowie die GFP- und CD24-positiven Zellen (im Anschluss als GFP+hTERT-Kontrolle, β -Catenin(Δ)+hTERT, HOX11+hTERT und AML1-ETO+hTERT bezeichnet) wurden

durchflusszytometrisch sortiert und wie unter **3.2.1** und **3.2.2** beschrieben parallel weiter analysiert. Der Versuchsablauf ist schematisch in **Abb. 3.9** dargestellt.

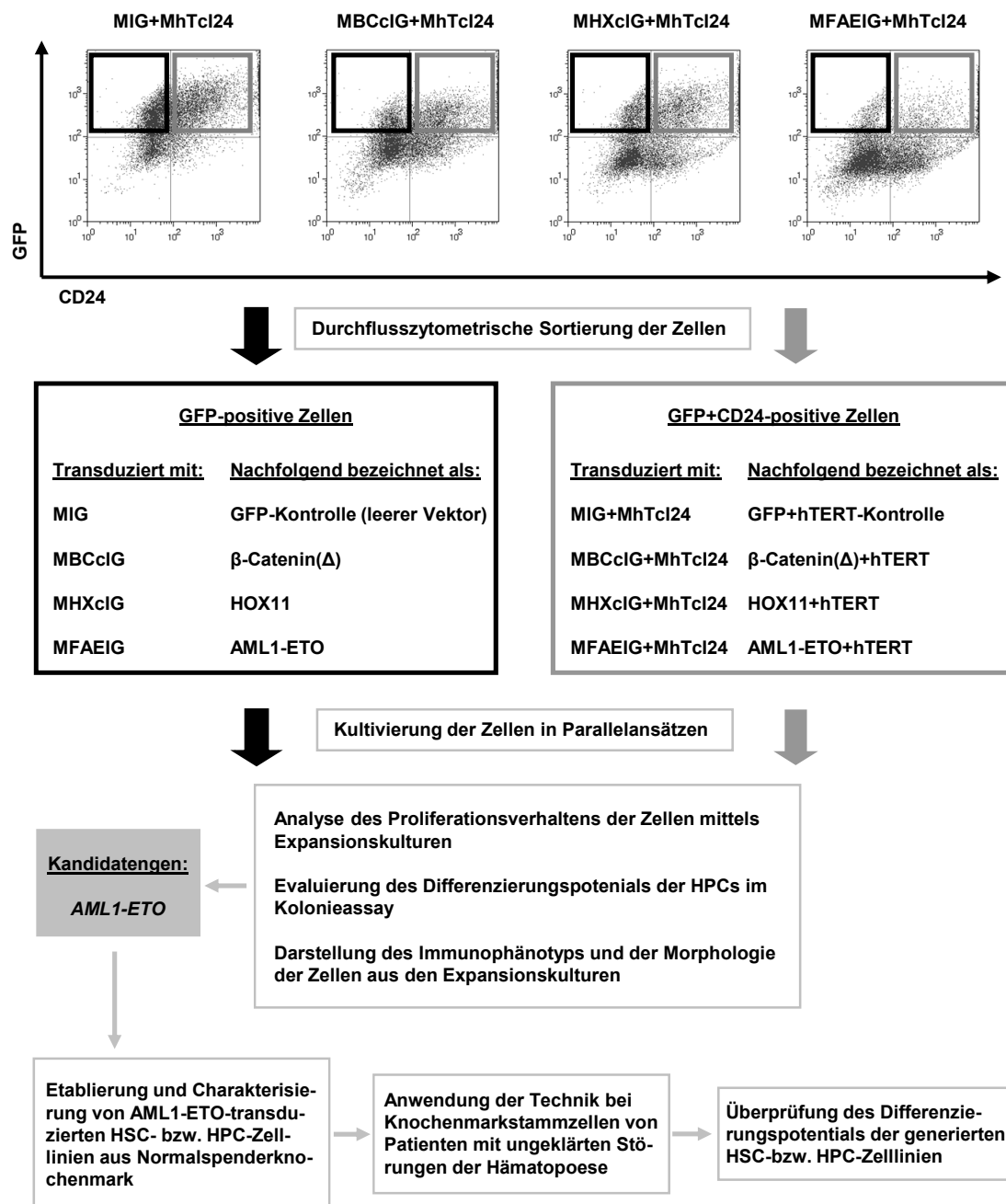


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur komparativen Analyse von sortierten GFP- bzw. GFP+CD24-positiven HSCs bzw. HPCs

CD34-positive Knochenmarkszellen wurden mit den retroviralen Überständen von MIG, MBCcIG, MHXcIG bzw. MFAEIG in Kombination mit MhTcl24 infiziert. Die Zellpopulationen wurden durchflusszytometrisch in Abhängigkeit von der GFP- und der CD24-Expression in vier Subpopulationen unterteilt. Es wurden die GFP-positiven Zellen (schwarzes Quadrat) sowie die GFP+CD24-positiven Zellen (graues Quadrat) ausgewählt und sortiert. Die Zellen wurden im Vorfeld mit einem PE-markierten anti-Maus-CD24-Antikörper gefärbt. Die sich anschließenden Versuche sind schematisch dargestellt.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Normalspenderknochenmark und der daraus resultierenden geringen Zellzahl, konnten Experimente, die eine hohe Ausgangszellzahl erforderten, nicht in Duplikaten durchgeführt werden. In diesen Fällen werden unabhängige Experimente von Zellen verschiedener Spender repräsentativ gezeigt. Das CD34-Molekül hat sich in der Vergangenheit als ein für die Klinik und Forschung verlässlicher Marker zur Isolierung von humanen HSCs erwiesen. Ein großer Anteil an HPCs exprimieren dieses Molekül jedoch auch. In dieser Arbeit wurden CD34-positive Zellen nicht in ihren Subpopulationen untersucht. Daher kann im Folgenden keine Unterscheidung zwischen CD34-positiven HSCs und HPCs getroffen werden.

3.2.1 Biologische Wirkung der Zielgene auf Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

3.2.1.1 Langzeitexpansion von transduzierten CD34-positiven Knochenmarkzellen

Um die Wirkung von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf die Proliferation von humanen HSCs bzw. HPCs zu untersuchen, wurden GFP-positive Zellen (**s. 3.2**) in einem Medium mit Zytokinen expandiert und einmal wöchentlich quantifiziert. β -Catenin(Δ)- und AML1-ETO-Zellen zeigten sich in der frühen Kultivierungsphase im Vergleich zur GFP-Kontrolle in ihrer Expansion eingeschränkt, wohingegen HOX11-Zellen stärker expandierten (**Abb. 3.10 A**). AML1-ETO- und HOX11-Zellen behielten ihre Fähigkeit zur Proliferation nach 5 Wochen Kultivierung bei, wohingegen die GFP-Kontrollzellen ihre Proliferation nach 5 Wochen einstellten. Die β -Catenin(Δ)-Zellen hingegen zeichneten sich während der gesamten Kultivierungsperiode durch ein vermindertes Wachstum aus (**Abb. 3.10 B**).

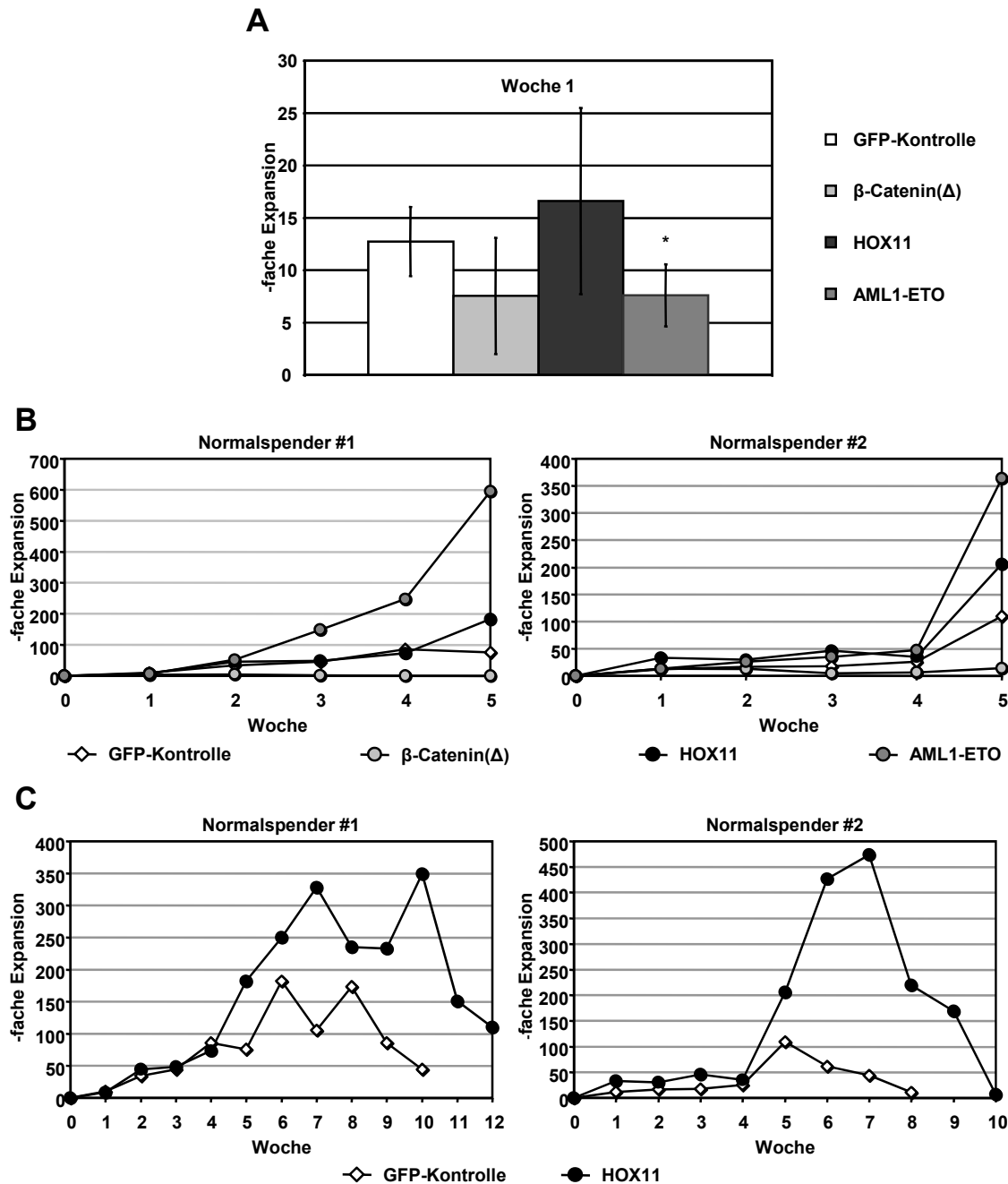


Abb. 3.10: Einfluss von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf die Proliferation von HSCs bzw. HPCs

A: Komparative Analyse der Expansion nach 1 Woche Kultivierung. Sortierte GFP-positive Zellen (s. 3.2) wurden in Flüssigkulturen überführt, mittels Trypanblau quantifiziert und demipuliert. Der Quotient aus Gesamtzellzahl (Woche x) zur initial eingesetzten Zellzahl ergibt die -fache Expansion. Die Daten stellen Mittelwerte aus 4 bis 6 unabhängigen Experimenten dar. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (*student's t-test*, $p < 0,05$). **B:** Komparative Analyse der Expansion im zeitlichen Verlauf. Sortierte GFP-positive Zellen wurden in Flüssigkulturen überführt, wöchentlich mittels Trypanblau quantifiziert und demipuliert. Der Quotient aus Gesamtzellzahl (Woche x) zur initial eingesetzten Zellzahl ergibt die -fache Expansion. Dargestellt sind zwei repräsentative Experimente ($n=1$). **C:** Analyse des Expansionsverhaltens von HOX11-Zellen im Vergleich zu den GFP-Kontrollen. Dargestellt sind zwei repräsentative Experimente ($n=1$).

In vier Experimenten mit verschiedenen Normalspendern (n=3) zeigten sich die β -Catenin(Δ)-Zellen in ihrer Proliferation eingeschränkt und starben durchschnittlich nach 5 Wochen in Flüssigkultur (Experimente=4, Normalspender=3, SD=0,9) wohingegen die GFP-Kontrollzellen durchschnittlich für 8 Wochen kultiviert werden konnten (Experimente=6, Normalspender=4, SD=0,8). HOX11-Zellen hingegen proliferierten länger als die GFP-Kontrollen und überlebten diese durchschnittlich um 2 Wochen (Experimente=6, Normalspender=4, SD=1,1) (**Abb. 3.10 C**). Insgesamt konnte durch die Expression von HOX11 durchschnittlich eine $5,2 \times 10^2$ -fache Vermehrung der Ausgangszellzahl erzielt werden (GFP-Kontrolle: $1,9 \times 10^2$ -fache Vermehrung). AML1-ETO-Zellen hingegen waren bis zu 27 Wochen in der Lage, kontinuierlich zu proliferieren. Eine ausführliche Beschreibung dieses Teilergebnisses erfolgt unter Abschnitt **3.3.1**. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich nur die ektopische Expression von AML1-ETO als ein wirksames Mittel zur Expansion von HSCs bzw. HPCs erwies.

3.2.1.2 Effekte der Zielgene auf hämatopoetische Vorläuferzellen

Der frühe Einfluss von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf die Differenzierung von humanen Vorläuferzellen wurde im Kolonieassay untersucht. Dieser Assay ermöglicht die selektive Identifizierung multipotenter und festgelegter Vorläufer anhand ihrer Fähigkeit, mittels Zytokinstimulation in einem semisoliden Medium verschiedene Kolonietypen zu bilden. Hierzu wurden ebenfalls nach GFP-sortierte Zellen (**s. 3.2**) in einem halbfesten Medium auf Methylcellulosebasis unter Zugabe einer definierten Zytokinkombination kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonietypen CFU-E (Erythrozytenkolonien), CFU-G (Granulozytenkolonien) und CFU-M (Monozyten-/Makrophagenkolonien) morphologisch mittels Lichtmikroskopie charakterisiert und quantifiziert. Wie aus **Abb. 3.11** hervorgeht, bildeten β -Catenin(Δ)- und AML1-ETO-Zellen weniger Kolonien als die GFP-Kontrollzellen.

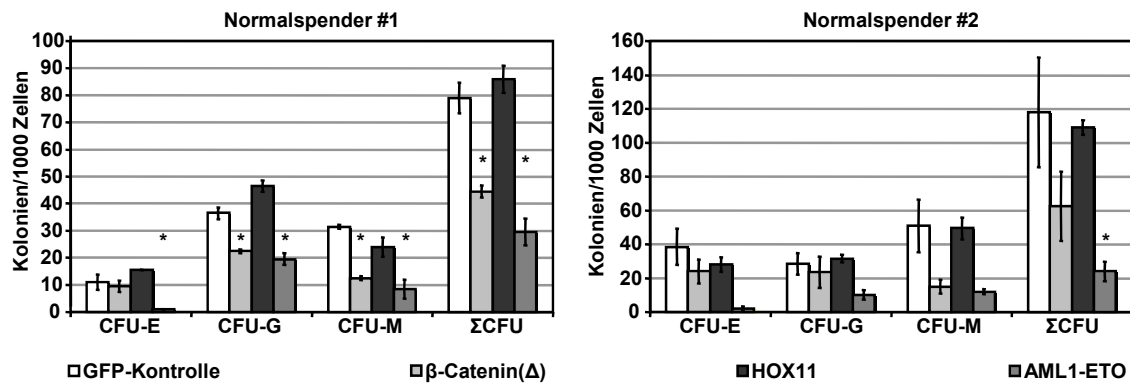


Abb. 3.11: Komparative Analyse des Differenzierungspotentials von sortierten GFP-positiven Zellen im Kolonieassay

Sortierte GFP-positive Zellen (s. 3.2) wurden in einem halbfesten Medium auf Methylcellulosebasis unter Zugabe einer definierten Zytokinkombination (IL-3, IL-6, SCF, Flt3-L, TPO, G-CSF, GM-CSF und EPO) kultiviert. Nach 2 Wochen wurden die Kolonietypen CFU-E, CFU-G und CFU-M lichtmikroskopisch quantifiziert. Die Daten stellen Mittelwerte aus zwei Experimenten dar. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (*student's t-test*, $p < 0,05$). (Abk.: CFU-E: *colony forming unit erythrocyte*, CFU-G: *colony forming unit granulocyte*, CFU-M: *colony forming unit monocyte*).

Bei β -Catenin(Δ)-Zellen war dieser Effekt besonders bei dem monozytären Vorläufer (CFU-M) zu beobachten. AML1-ETO-Zellen bildeten dagegen insgesamt weniger Kolonien der untersuchten Einheiten. Sowohl erythrozytäre, granulozytäre als auch monozytäre Kolonietypen waren im Vergleich zur GFP-Kontrolle stark reduziert. Außerdem zeichneten sich die Kolonien durch eine geringere Größe als die Kolonien der GFP-Kontrolle aus (Daten nicht gezeigt). Die Gesamtkoloniezahl und Verteilung der Kolonietypen von HOX11-Zellen hingegen waren vergleichbar mit den GFP-Kontrollzellen.

Der komparative Vergleich von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO im Kolonieassay führte somit zu dem Ergebnis, dass sich die Expression von β -Catenin(Δ) und AML1-ETO negativ auf die Differenzierung von Vorläuferzellen auswirkte. Dabei zeigte sich dieser Effekt bei β -Catenin(Δ) besonders bei dem monozytären Vorläufer, wohingegen sich die Expression von AML1-ETO negativ auf alle untersuchten Vorläufer auswirkte. Die verminderte Koloniegröße von AML1-ETO-Zellen weist auf eine reduzierte Proliferationsfähigkeit der Vorläuferzellen hin. Im Gegensatz dazu wurde durch die Expression von HOX11 das Differenzierungspotential der Vorläuferzellen unter den gewählten Bedingungen nicht eingeschränkt.

3.2.1.3 Phänotypische Charakterisierung der Langzeitkulturen

Um Aufschluss über den langfristigen Einfluss von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf HSCs bzw. HPCs zu erhalten, wurden die nach GFP-sortierten Zellen wie unter **3.2.1.1** beschrieben expandiert und immunophänotypisch mittels FACS-Analyse sowie morphologisch mittels panoptischer Färbung nach Pappenheim analysiert. Die GFP-Kontrollzellen verdeutlichen, dass im Verlauf der *in vitro* Kultivierung unter den gewählten Kulturbedingungen Differenzierungsvorgänge in CD34-positiven Zellen eingeleitet wurden. Dies spiegelte sich in der Abnahme von CD34-positiven Zellen sowie in dem Vorhandensein von Zellen, die Differenzierungsmarker (CD11b, CD14, GlyA) exprimierten, wieder.

Im Vergleich zu den GFP-Kontrollen war bei β -Catenin(Δ)-Zellen der Anteil an CD34-positiven Zellen nach 2 Wochen in Flüssigkultur vermindert. Ebenso war der Anteil an Zellen herabgesetzt, die den monozytären Differenzierungsmarker CD14 exprimierten (**Abb. 3.12 A**). Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die β -Catenin(Δ)-Kulturen hauptsächlich neutrophile Granulozyten (2- bis 4-fach segmentierter, dunkelvioletter Kern und durchscheinendes Granula) enthielten, wohingegen die Kulturen der GFP-Kontrolle aus neutrophilen Granulozyten und einem höheren Anteil an Monozyten/Makrophagen (taubengrau-blaues Zytoplasma mit Vakuolen, polymorpher Kern, aufgelockertes Chromatin) bestanden (**Abb. 3.12 C**). AML1-ETO-Zellen zeichneten sich durch einen geringeren Anteil an Zellen aus, die den myeloiden Marker CD11b (Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) und CD14 (Monozyten/Makrophagen) exprimierten. Der Anteil an differenzierten CD11b-positiven Zellen blieb auch nach 6 Wochen Kultivierung herabgesetzt, wohingegen über die Hälfte der GFP-Kontrollzellen positiv für diesen Marker waren (**Abb. 3.12 A & B**). Morphologisch konnten die AML1-ETO-Zellen als unreife myeloide Vorläuferzellen (großer runder Kern, schmaler Zytoplasmasaum und Nukleolen) charakterisiert werden (**Abb. 3.12 C**). Der Immunphänotyp der HOX11-Zellen zeichnete sich nicht durch große Abweichungen von den GFP-Kontrollzellen aus (**Abb. 3.12 A**). Auffallend war jedoch der leicht verminderte Anteil an differenzierten CD11b-positiven Zellen nach 6 Wochen Kultivierung (**Abb. 3.12 B**). Nach 9 Wochen Kultivierung konnten ausschließlich Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden, die

jedoch im Vergleich zu der GFP-Kontrolle weniger stark ausdifferenziert waren (**Abb. 3.12 C**).

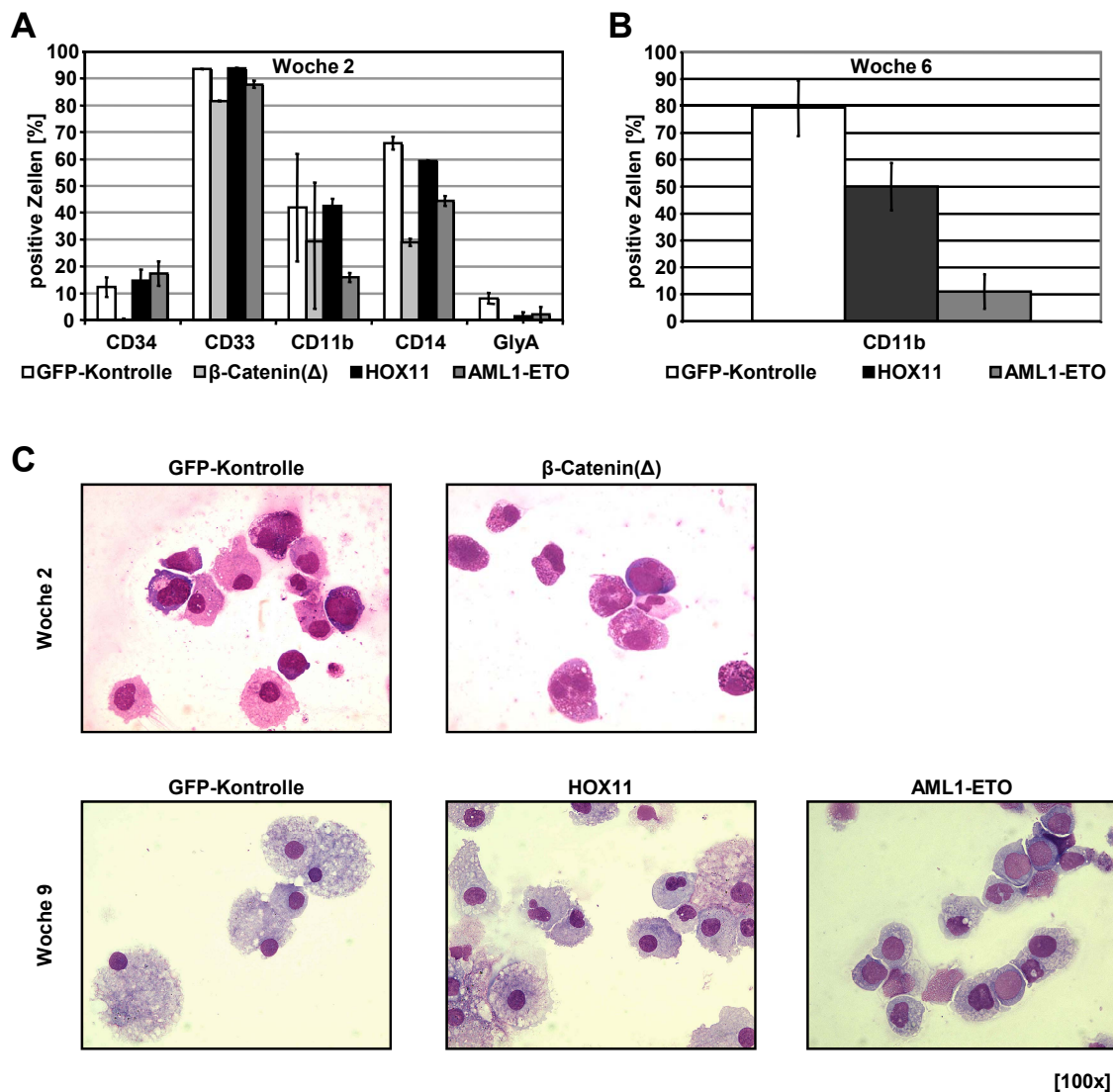


Abb. 3.12: Phänotypische Analyse von sortierten GFP-positiven Zellen mittels FACS und Lichtmikroskopie

A: Prozentualer Anteil von HSCs und HPCs (CD34⁺, CD33⁺), myeloiden (CD11b⁺, CD14⁺) sowie erythrozytären (GlyA⁺) Zellen nach 2 Wochen Kultivierung (n=2). **B:** Repräsentative Darstellung des prozentualen Anteils von myeloiden CD11b-positiven Zellen nach 6 Wochen Kultivierung (n=3). **C:** Panoptische Färbung von β -Catenin(Δ)-, HOX11- und AML1-ETO-Zellen im Vergleich zu den GFP-Kontrollen nach 2 bzw. 9 Wochen Kultivierung.

3.2.2 Effekte der Zielgene in Kombination mit hTERT auf Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

3.2.2.1 Langzeitexpansion von transduzierten CD34-positiven Knochenmarkzellen

Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Expression von hTERT den Zellen einen proliferativen Vorteil verschaffen kann, wurden GFP-positive sowie GFP- und CD24-positive Zellen (**s. 3.2**) in einem Medium mit Zytokinen expandiert und einmal wöchentlich quantifiziert. Die hTERT-positiven Kontrollen (GFP+hTERT) zeigten eine verminderte Expansion und stellten vor den GFP-Kontrollen die Proliferation ein (**Abb. 3.13**). Kennzeichnend war die Verkürzung der Kultivierbarkeit der GFP+hTERT-Kontrollen von 8 auf 6 Wochen (Experimente=6, Normalspender=4, SD=1,9). β -Catenin(Δ)-Zellen in Kombination mit hTERT (β -Catenin(Δ)+hTERT) erwiesen sich ebenso in ihrer Proliferation eingeschränkt wie hTERT-negative β -Catenin(Δ)-Zellen. Die Zellen konnten ebenfalls nur für 5 Wochen kultiviert werden (Experimente=6, Normalspender=4, SD=0,8). HOX11-Zellen in Kombination mit hTERT (HOX11+hTERT) proliferierten stärker als die GFP+hTERT-Kontrollen, zeigten sich jedoch im Vergleich zu den hTERT-negativen HOX11-Zellen in ihrer Proliferation eingeschränkt. Eine Erhöhung der Lebensdauer konnte für die HOX11+hTERT-Zellen nicht beobachtet werden (Lebensdauer: 6 Wochen, SD=1,8). AML1-ETO+hTERT-Zellen zeigten sich hingegen viel stärker als die GFP+hTERT-Kontrollen in ihrer Proliferation eingeschränkt. Bei 3 von 4 angelegten Kulturen starben die Zellen 1 Woche vor den GFP+hTERT-Kontrollzellen (SD=0,6). Die Zellen einer Kultur hingegen proliferierten kontinuierlich 18 Wochen lang. Die Proliferation war im Vergleich zu den entsprechenden hTERT-negativen AML1-ETO-Zellen stark eingeschränkt (Woche 18: AML1-ETO+hTERT: $3,3 \times 10^3$ -fache Expansion, AML1-ETO: $1,8 \times 10^8$ -fache Expansion, Daten nicht gezeigt).

Aus den Resultaten geht hervor, dass hTERT-positive Zellen stark in ihrer Proliferation beeinträchtigt waren. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Koexpression von hTERT mit β -Catenin(Δ), HOX11 oder AML1-ETO keine

Verlängerung der Lebensspanne der Zellen bewirkt, sondern deren Proliferationsvermögen einschränkt. Somit erscheint die ektopische Expression von hTERT ein ungeeignetes Mittel zur Expansion von humanen HSCs bzw. HPCs zu sein.

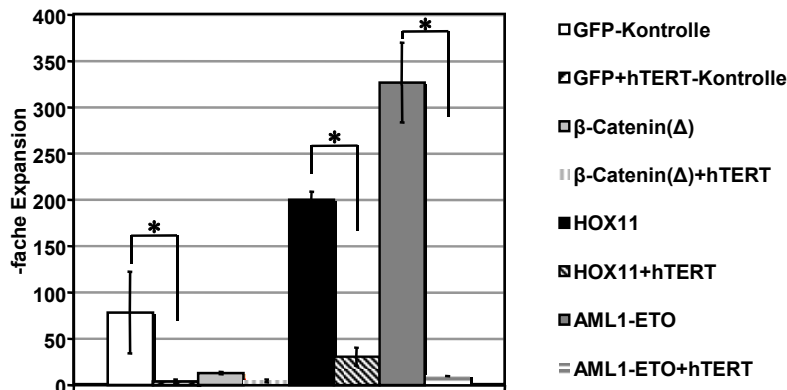


Abb. 3.13: Einfluss von hTERT in Kombination mit β -Catenin(Δ), HOX11 oder AML1-ETO auf die Proliferation von HSCs bzw. HPCs

Komparative Analyse der Expansion von β -Catenin(Δ), HOX11 oder AML1-ETO ohne oder in Kombination mit hTERT nach 5 Wochen Kultivierung. Sortierte GFP- bzw. GFP- und CD24-positive Zellen (s. 3.2) wurden in Flüssigkulturen überführt und quantifiziert. Der Quotient aus Gesamtzellzahl (Woche x) zur initial eingesetzten Zellzahl ergibt die -fache Expansion. Die Daten stellen Mittelwerte aus 4 bis 6 unabhängigen Experimenten dar. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen gegenüber den entsprechenden hTERT-negativen Zellen (*student's t-test*, $p < 0,05$).

3.2.2.2 Effekte der Zielgene in Kombination mit hTERT auf hämatopoetische Vorläuferzellen

Der Einfluss von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO in Kombination mit hTERT auf die Differenzierung von humanen Vorläuferzellen wurde im Kolonieassay untersucht. Dazu wurden GFP-positive sowie GFP- und CD24-positive Zellen durchflusszytometrisch sortiert (s. 3.2) und in einem halbfesten Medium auf Methylcellulosebasis unter Zugabe einer definierten Zytokinkombination kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonietypen CFU-E, CFU-G und CFU-M quantifiziert.

Die hTERT-positiven Kontrollen (GFP+hTERT) bildeten im Vergleich zu den hTERT-negativen Kontrollzellen (GFP) weniger Kolonien. Die Verminderung zeigte sich sowohl bei den granulozytären Kolonien (CFU-G) als auch bei den monozytären Kolonien (CFU-M) (**Abb. 3.14**).

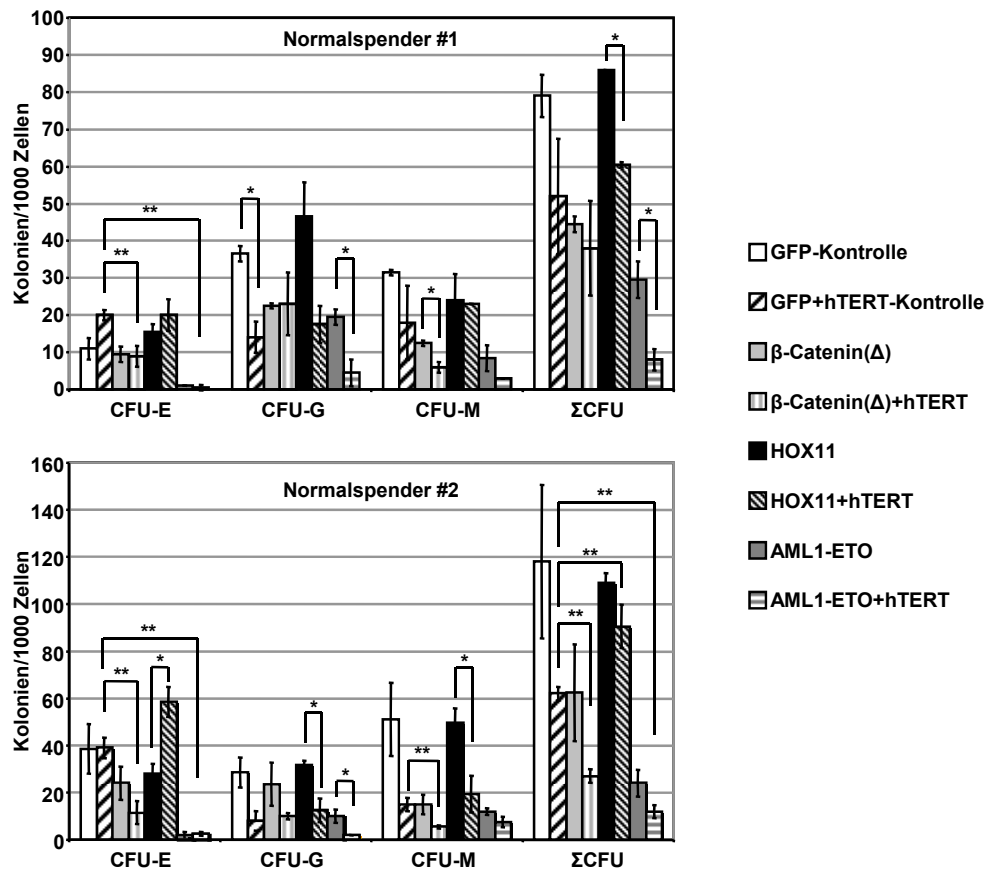


Abb. 3.14: Komparative Analyse des Differenzierungspotentials von sortierten GFP-positiven Zellen im Vergleich zu GFP- und CD24-positiven Zellen im Kolonieassay

CD34-positive Knochenmarkzellen wurden mit den entsprechenden Retroviren transduziert, nach GFP- und GFP- und CD24-Expression sortiert und in einem halbfesten Medium auf Methylcellulosebasis unter Zugabe einer definierten Zytokinkombination kultiviert. Nach 2 Wochen wurden die Kolonietypen CFU-E, CFU-G und CFU-M lichtmikroskopisch quantifiziert. Dargestellt sind zwei repräsentative Experimente mit $n=2$. Die Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Abweichungen (*student's t-test*, $p < 0,05$, *=signifikanter Unterschied zwischen GFP- und GFP+CD24-positiven Zellen, **=signifikanter Unterschied zwischen GFP+hTERT-Kontrollzellen und Zielgen+hTERT-Zellen). (Abk.: CFU-E: colony forming unit erythrocyte, CFU-G: colony forming unit granulocyte, CFU-M: colony forming unit monocyte).

Die für β -Catenin(Δ)-Zellen beobachtete Herabsetzung des monozytären Vorläufers (CFU-M) trat bei β -Catenin-(Δ)+hTERT-Zellen verstärkt auf. Für HOX11+hTERT-Zellen konnte ein mit den GFP+hTERT-Kontrollen vergleichbares Differenzierungspotential dokumentiert werden, das sich jedoch im Vergleich zu den hTERT-negativen HOX11-Zellen v.a. bei den granulozytären Vorläufern eingeschränkt zeigte. Der generell inhibierende Einfluss von AML1-ETO auf die Differenzierung von erythrozytären (CFU-E), granulozytären (CFU-G) sowie monozytären (CFU-M) Vorläufern wurde ebenfalls durch die Expression von hTERT verstärkt. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sich die zusätzliche Expression von hTERT negativ

auf die Differenzierung von monozytären und granulozytären Vorläuferzellen auswirkte, was mit einer verminderten Anzahl Kolonie-bildender Zellen im Vergleich zu den hTERT-negativen Zellen einherging.

3.2.2.3 Phänotypische Charakterisierung der Langzeitkulturen

Der langfristige Einfluss von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO in Kombination mit hTERT auf HSCs bzw. HPCs wurde mittels durchflusszytometrischer und lichtmikroskopischer Analysen von in Flüssigkultur expandierten GFP-positiven sowie GFP- und CD24-positiver Zellen (**s. 3.2.2.1**) untersucht. Die folgende Darstellung bezieht sich jeweils auf Zellen, die mit einem potentiell expandierenden Zielgen transduziert sind im Vergleich zu Zellen, die mit dem potentiell expandierenden Zielgen und hTERT transduziert sind. Die FACS-Analyse der Zellen ergab, dass in den hTERT-positiven Kulturen generell ein geringerer Anteil an Zellen vorhanden war, die den HSC-Marker CD34 exprimierten (**Abb. 3.15 A**). Auszunehmen sind hierbei die β -Catenin(Δ)-Zellen bzw. β -Catenin(Δ)+hTERT-Zellen, da sich erstere an sich durch einen geringeren Anteil an CD34-positiven Zellen auszeichneten (**s. auch Abb. 3.12 A**).

Ebenso enthielten die hTERT-positiven Kulturen einen geringeren Anteil an Zellen, die den myeloiden Vorläufermarker CD33 exprimierten. Weiterhin konnten in den hTERT-positiven Kulturen weniger Zellen nachgewiesen werden, die positiv für die myeloiden Differenzierungsmarker CD11b und CD14 waren. Im Gegensatz zu den hTert-negativen Kulturen zeichneten sich die hTERT-positiven Kulturen jedoch durch einen erhöhten Anteil an Zellen aus, die den erythrozytären Marker Glycophorin A (GlyA) exprimierten.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung von hTERT-positiven Kulturen fiel auf, dass diese eine große Menge an apoptotischen Körperchen enthielten. Die morphologische Evaluierung der Zellen mittels panoptischer Färbung nach Pappenheim zeigte bei den GFP+hTERT-Kontrollen, β -Catenin(Δ)+hTERT- und HOX11+hTERT-Kulturen eine erhöhte Anzahl von erythrozytären Vorläuferzellen. Diese zeichnen sich durch ihre geringe Größe, blauem Zytoplasma und einem dunkelblauen, verdichteten Zellkern aus (**Abb. 3.15 B**).

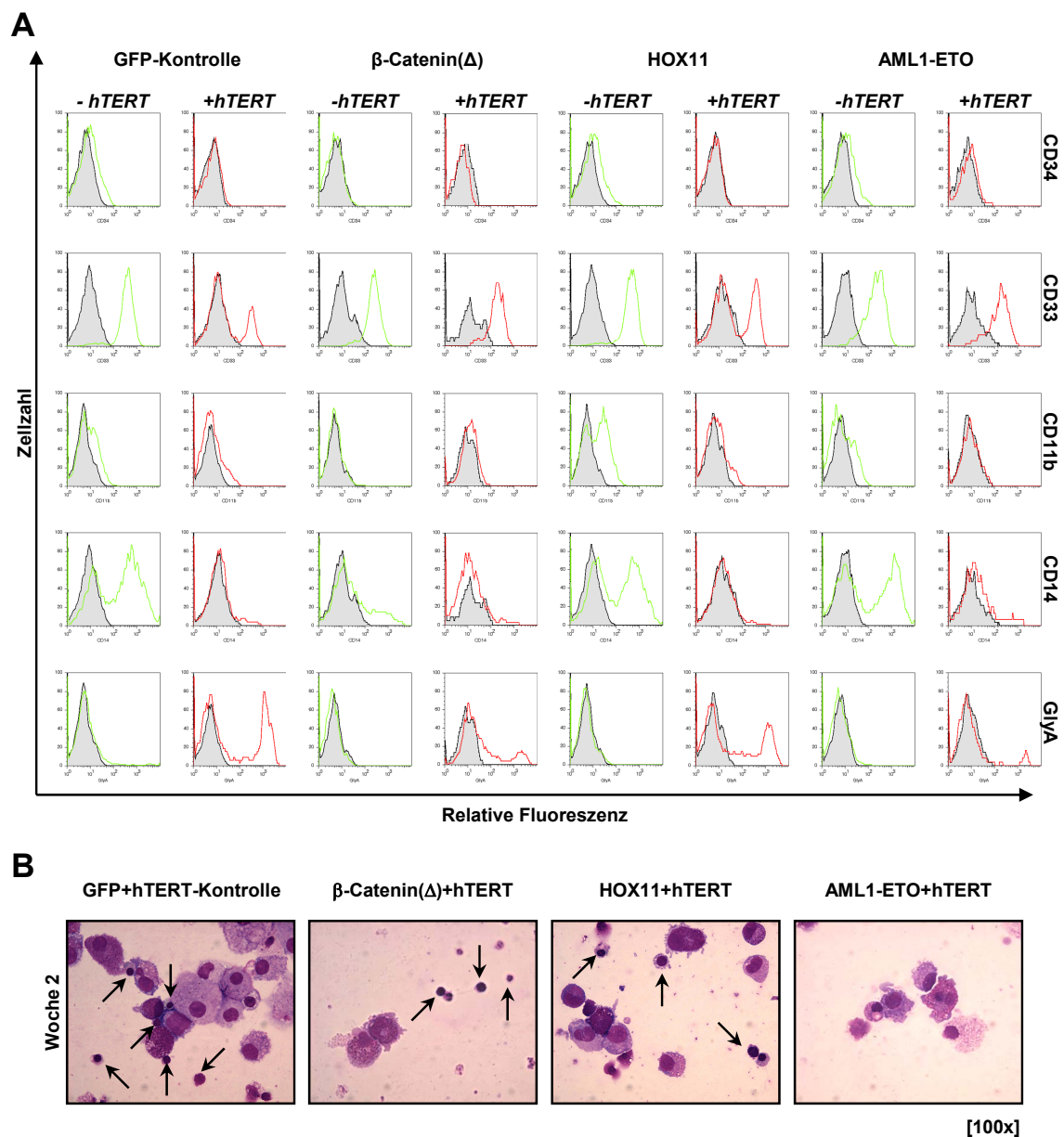


Abb. 3.15: Phänotypische Analyse von sortierten GFP+CD24-positiven Zellen mittels FACS und Lichtmikroskopie

A: Repräsentative FACS-Analyse von Stamm- bzw. Vorläuferzellen ($CD34^+$, $CD33^+$), myeloiden ($CD11b^+$, $CD14^+$) sowie erythrozytären ($GlyA^+$) Zellen von GFP-positiven Zellen (grüne Linie) im Vergleich zu GFP+CD24-positiven Zellen (rote Linie) nach 2 Wochen Kultivierung. (grau unterlegte Linie: Isotypkontrolle, grüne und rote Linie: gefärbte Zellen). **B:** Panoptische Färbung von GFP+CD24-positiven Zellen nach 2 Wochen Kultivierung. Pfeile weisen auf erythrozytäre Zellen hin.

3.3 Etablierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien

Zusammenfassend zeigten die komparativen Analysen, dass nur mittels ektopischer Expression von AML1-ETO eine starke Expandierung von humanen HSCs bzw. HPCs mit eingeschränktem Differenzierungspotential erzielt werden konnte. Die Expression von β -Catenin(Δ) wirkte sich negativ auf das Proliferations- und Differenzierungspotential von HSCs bzw. HPCs aus. Die Expression von HOX11 bewirkte durchschnittlich eine $5,2 \times 10^2$ -fache Vermehrung der Ausgangszellzahl (Kontrolle: $1,9 \times 10^2$). Dabei zeigte sich, dass die Zellen nicht in ihrem Differenzierungspotential durch die Expression von HOX11 eingeschränkt wurden. Eine Überwindung des Seneszenzpunktes der Zellen konnte durch die zusätzliche Expression von hTERT nicht erreicht werden, sondern bewirkte eine verminderte Proliferation der Zellen. Ebenso wurde das normale Differenzierungspotential von Vorläuferzellen durch die Expression von hTERT beeinträchtigt.

3.3.1 Etablierung und Charakterisierung von AML1-ETO-transduzierten Normalspenderzelllinien

Eine kontinuierliche Proliferation von bis zu 27 Wochen mit einer $2,2 \times 10^9$ -fachen Vermehrung der Ausgangszellzahl zeigte sich bei AML1-ETO-exprimierenden Zellen (**Abb. 3.16 A**). Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnten HSCs bzw. HPCs (CD34-, CD33-positiv) als auch reifere myeloide Zellen (CD11b-, CD14-positiv) jedoch keine erythrozytären Zellen (GlyA-positiv) in den Langzeitkulturen identifiziert werden (**Abb. 3.16 B**).

Die morphologische Evaluation der Kulturen mittels panoptischer Färbung nach Pappenheim bestätigte das Vorhandensein von unreifen myeloiden Vorläuferzellen, wohingegen in den Kulturen der GFP-Kontrollen terminal ausdifferenzierte Makrophagen dominierten (**Abb. 3.16 C**).

Die chromosomale Integrität der Zellen wurde mittels einer konventionellen Bänderungsanalyse überprüft. Die Karyotypisierung der Metaphasechromosomen von AML1-ETO-exprimierenden Zellen ergab ein unauffälliges diploides Chromosomenmuster ohne numerische und strukturelle

Veränderungen, so dass von der Stabilität des Chromosomensatzes während der Langzeitkultivierung ausgegangen werden konnte (**Abb. 3.16 D**).

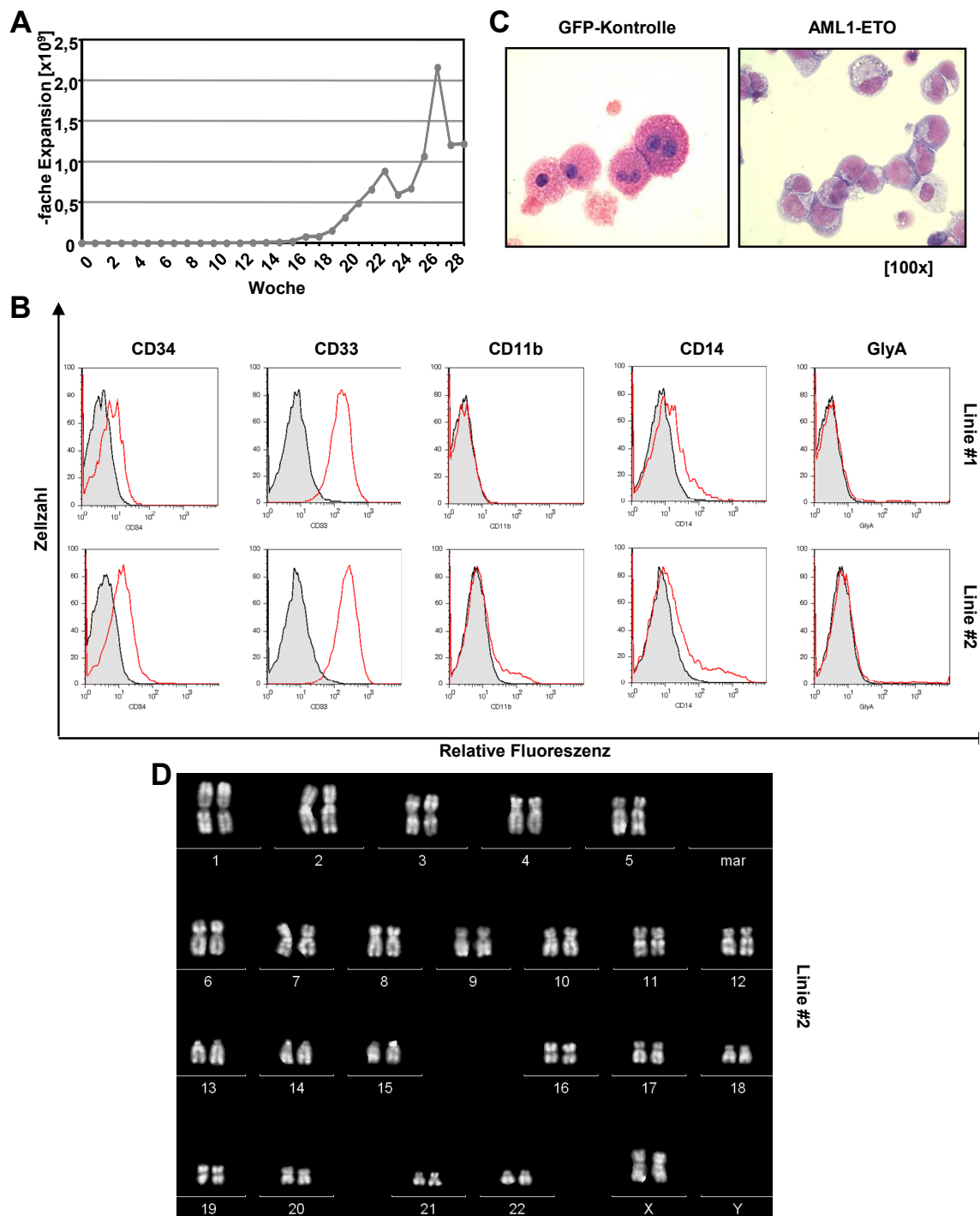


Abb. 3.16: Etablierung von HSC- bzw. HPC-Zelllinien aus MFAEIG-transduzierten Zellen
A: Repräsentatives Proliferationsprofil von AML1-ETO-Zellen in Flüssigkultur (n=1). **B:** Repräsentativer Immunophänotyp von zwei Linien nach 19 Wochen Kultivierung (graue unterlegte Linie: Isotypkontrolle, rote Linie: gefärbte Zellen). **C:** Panoptische Färbung nach 9 Wochen in Flüssigkultur (100-fache Vergrößerung). **D:** Repräsentative Bänderungsanalyse einer AML1-ETO-Zelllinie nach 19 Wochen Kultivierung.

Folglich erwies sich die ektopische Expression von AML1-ETO in HSCs bzw. HPCs als eine geeignete Methode zur Etablierung von myeloiden Langzeitkulturen.

3.4 Anwendung der Technologie bei Patienten mit genetisch unklaren Störungen der Hämatopoese

Die im Vorfeld gesammelten Erkenntnisse zur Generierung von HSCs- bzw. HPC-Zelllinien sollten nun an Zellen von Patienten mit genetisch unklaren Störungen der Hämatopoese angewendet werden. Die Wahl fiel auf zwei Patienten, die keine Mutationen in bereits identifizierten Neutropenie-assoziierten Genen aufwiesen.

3.4.1 Etablierung und Charakterisierung von AML1-ETO-transduzierten Patientenzelllinien

Zur Generierung der HSC- bzw. HPC-Zelllinien wurden CD34-positive Knochenmarkszellen von Normal Spendern und Patienten mit Überständen von MFAEIG infiziert, zwei Tage später nach GFP-exprimierenden Zellen sortiert und in einem Medium mit Zytokinen expandiert. Wie aus **Abb. 3.17 A** hervorgeht, konnten aus den Patientenzellen Langzeitkulturen etabliert werden, die vergleichbar zu den Normalspenderlinien expandierten.

Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab, dass ein kleiner Teil der Zellen den Stammzellmarker CD34 exprimierte und der Großteil der Kulturen aus unreifen myeloiden Vorläuferzellen (CD33-positiv) bestand, die in geringer Zahl zu reifen myeloiden Zellen (CD11b-, CD14-positiv) ausdifferenzierten. Erythrozytäre Zellen (GlyA-positiv) konnten nicht nachgewiesen werden (**Abb. 3.17 B**).

Der Immunphänotyp der Zelllinien wurde nach unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten (Woche 11, 13 und 15) überprüft. Die in **Abb. 3.17 B** repräsentativ dargestellten Markerprofile bewegen sich innerhalb normaler Parameter. Demnach konnte bei den Patientenlinien immunphänotypisch kein auffälliges Oberflächenexpressionsprofil beobachtet werden.

Die morphologische Evaluation der Zellen mittels panoptischer Färbung nach Pappenheim bestätigte ebenfalls, dass es sich bei den meisten Zellen um unreife myeloide Vorläuferzellen handelte, die durch einen großen runden Kern, Nukleolen im Chromatin und schmalen Zytoplasmasaum gekennzeichnet sind. Nur ein geringer Anteil der Kulturen war terminal ausdifferenziert (Daten nicht gezeigt).

Die Zelllinien wurden ebenfalls einer molekularzytogenetischen Analyse unterzogen. Die Zellen zeigten in allen Metaphasen einen normalen Chromosomensatz, so dass von der Integrität der Chromosomen während der Kultivierung ausgegangen werden konnte (**Abb. 3.17 C**).

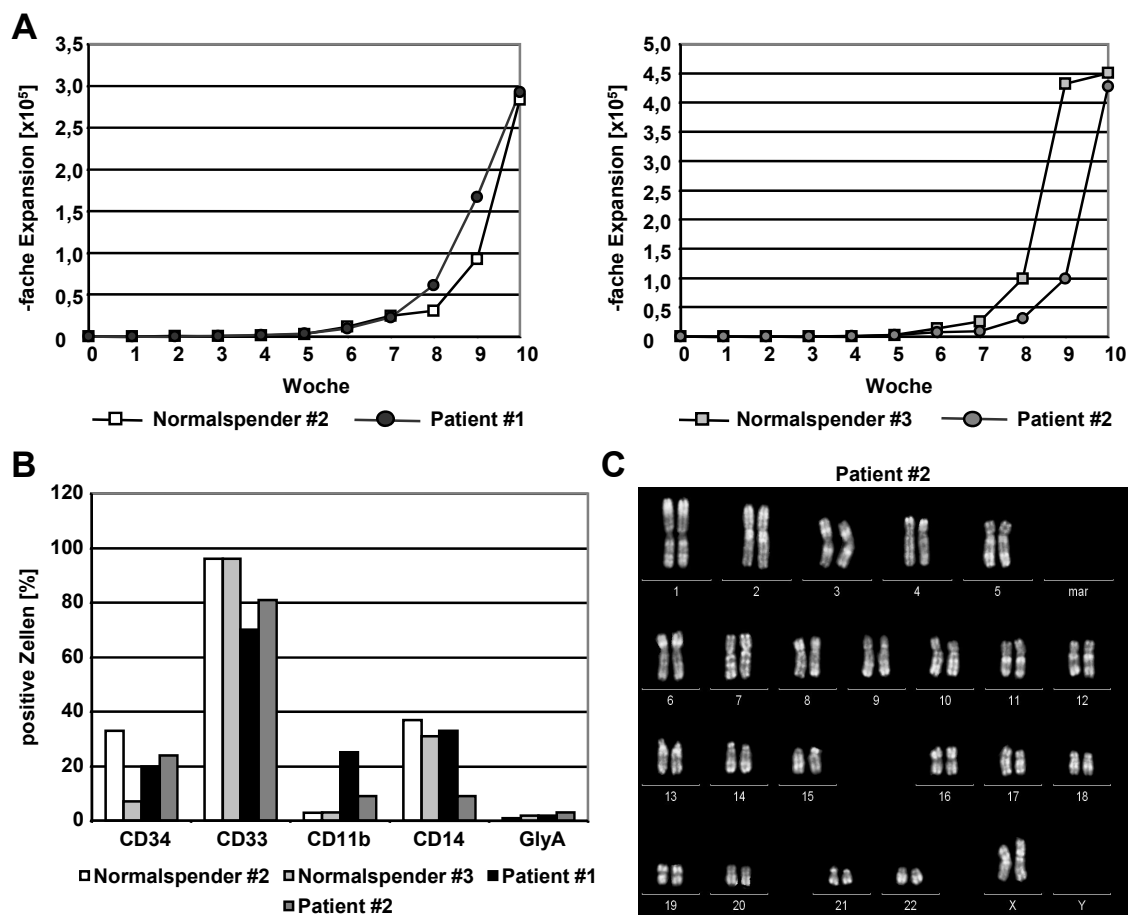


Abb. 3.17: Generierung von Patientenzelllinien

A: Expansion von MFAEIG-transduzierten Normalspender- und Patientenzellen. **B:** Repräsentative FACS-Analyse von Normalspenderlinien und Patientenlinien nach 13 Wochen Kultivierung. **C:** Repräsentative Bänderungsanalyse von Patient #2 nach 18 Wochen Kultivierung.

3.5 Evaluierung des Differenzierungspotentials der hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von AML1-ETO-Zellen zeigte, dass in der frühen Phase der Langzeitkultur die Proliferation der Zellen eingeschränkt war (**Abb. 3.10 A**). Außerdem bildeten die Vorläuferzellen im Kolonieassay kleinere Kolonien im Vergleich zur GFP-Kontrolle, was ebenfalls auf eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der Vorläuferzellen hindeutete (Daten nicht gezeigt). Weiterhin waren die Zellen generell in ihrer Fähigkeit zur Differenzierung eingeschränkt (**Abb. 3.11**). Insgesamt wiesen diese Beobachtungen darauf hin, dass sich die Expression von AML1-ETO negativ auf die Proliferation und Differenzierung von bereits festgelegten Vorläufern auswirkte. Im Gegensatz dazu proliferierten AML1-ETO-Zellen ab Woche 4 in Langzeitkultur stärker als die GFP-Kontrollen (**Abb. 3.10 B**) und behielten ihre Fähigkeit zur Proliferation bis zu 27 Wochen in Flüssigkultur bei (**Abb. 3.16 A**). Die phänotypische Analyse der Zellen ergab, dass die Langzeitkulturen den Prozess der Hämatopoese widerspiegeln, der durch die kontinuierliche Proliferation von einem geringen Anteil an unreifen CD34-positiven Zellen vorangetrieben wird, die den Pool an reiferen Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (CD33-, CD11b-, CD14-positiv) auffüllen (**Abb. 3.16 B, Abb. 3.17 B**). In den generierten Kulturen stellten unreife Myeloblasten (CD33-positiv) den Hauptbestandteil der Zelllinien dar. Ausdifferenzierte myeloide Zellen (CD11b-, CD14-positiv) machten einen sehr geringen Anteil der Kulturen aus. Erythrozytäre Zellen (GlyA-positiv) konnten unter den gewählten Kulturbedingungen nicht nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die HSCs bzw. HPCs trotz kontinuierlicher AML1-ETO-Expression in der Lage waren, unter den entsprechenden Kulturbedingungen auszdifferenzieren.

3.5.1 Differenzierung von AML1-ETO-transduzierten Langzeitkulturen

Das Differenzierungsspektrum der Zellen aus den Langzeitkulturen wurde als erstes im Kolonieassay analysiert. Dazu wurden Zellen von Normalspender-

und Patientenlinien unterschiedlicher Kultivierungsstadien (10-22 Wochen) sowie mobilisierte CD34-positive Zellen von einem Normalspender (Positivkontrolle) in ein halbfestes Medium auf Methylcellulosebasis unter Zugabe einer definierten Zytokinkombination überführt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonietypen CFU-E, CFU-G und CFU-M quantifiziert. Wie aus **Abb. 3.18 A** hervorgeht, besaßen AML1-ETO-Zellen das Potential in monozytäre (CFU-M) und granulozytäre (CFU-G) Zellen zu differenzieren. Die Kolonietypen (Kolonien/17000 Zellen) waren jedoch im Vergleich zur Kontrolle (mobilisierte CD34-positive Zellen, Kolonien/1000 Zellen) sehr stark herabgesetzt und bestanden aus weniger Zellen (<30 Zellen/Kolonie, Daten nicht gezeigt). Erythrozytäre Kolonien (CFU-E) konnten nur für Patient #1 nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit der Differenzierungsfähigkeit der Zellen von dem Alter bzw. der vorausgegangenen Kultivierungsdauer der Linien konnte nicht festgestellt werden.

Die phänotypische Langzeitanalyse der Linien hatte ergeben, dass in den Kulturen Zellen vorhanden waren (9-37%), die den Monozyten/Makrophagen-Marker CD14 exprimierten (**Abb. 3.16 B, Abb. 3.17 B**). Es stellte sich dementsprechend die Frage, ob die ausgereiften Zellen in der Lage waren, ihre Effektorfunktion *in vitro* auszuüben. Um dies näher zu untersuchen, wurden Zellen zweier Linien nach 10 Wochen Kultivierung im Phagozytoseassay überprüft. Der Anteil an phagozytotischen Zellen, gemessen an der Aufnahme von Texas-Red-markierten *E.colis* pro Zelle, entsprach dabei nahezu dem Anteil der CD14-positiven Zellen der Kulturen (Daten nicht gezeigt). Demnach waren die ausgereiften CD14-positiven Zellen der Kulturen in der Lage, ihre Effektorfunktion auszuüben.

Besonderes Interesse galt jedoch der Differenzierung der Zellen in neutrophile Granulozyten. Phänotypische Charakteristika von SCN-Patienten sind u.a. eine geringe Anzahl von Neutrophilen im peripheren Blut sowie ein Reifungsstopp der Vorstufen (Promyelozytenstadium) im Knochenmark. Durch eine therapeutische Gabe von G-CSF/GM-CSF kann jedoch die Anzahl der Neutrophilen im Blut bei den meisten Patienten erhöht werden. Um die Fähigkeit der Zelllinien zu überprüfen, funktionelle neutrophile Granulozyten zu generieren, wurden Zellen verschiedener Kultivierungsstadien (10 bis 22 Wochen) und mobilisierte CD34-positive Zellen von einem Normalspender (Positivkontrolle) in ein

Differenzierungsmedium oder in das übliche Expansionsmedium überführt und für 2 bis 3 Wochen kultiviert. Die Induktion der Differenzierung mittels der Zytokine G-CSF und GM-CSF führte bei den AML1-ETO-positiven Zellen zu einem profunden Proliferationsarrest, der von einer starken Abnahme der Zellzahl bis hin zum vollständigen Tod der Kultur begleitet wurde (**Abb. 3.18 B**).

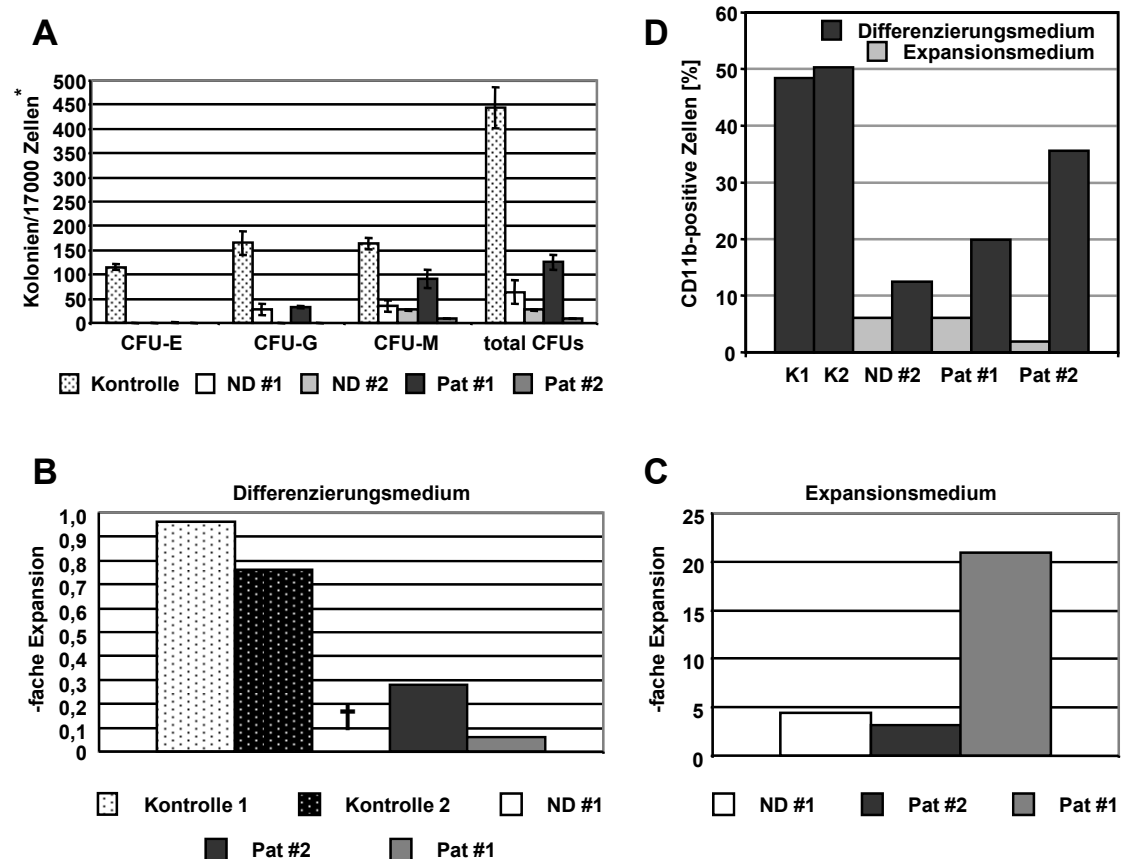


Abb. 3.18: Evaluierung des Differenzierungspotentials der Zelllinien

A: Repräsentative Analyse von Zellen aus MFAEIG-transduzierten Langzeitkulturen im Kolonieassay. Repräsentatives Experiment, n=2. (*Kontrolle: mobilisierte CD34-positive Zellen, Kolonien/1000 Zellen). **B:** Differenzierung von MFAEIG-transduzierten Zellen aus Langzeitkulturen in neutrophile Granulozyten. Repräsentatives Experiment, n=1. †: Viabilität der Kultur <1%, gemessen mittels Propidiumiodidfärbung. **C:** Proliferation der Parallelkulturen in Expansionsmedium. **D:** Durchflusszytometrische Analyse der unter **B** und **C** beschriebenen Zellen (K: Kontrolle, ND: Normalspender, Pat: Patient).

Im Gegensatz dazu stellten dieselben Linien, die im üblichen Expansionsmedium als Kontrollen kultiviert worden waren, ihre Proliferation nicht ein und expandierten innerhalb der 3 Wochen (**Abb. 3.18 C**). Nach 3 Wochen Kultivierung in Differenzierungsmedium konnte ein leichter Anstieg von Zellen nachgewiesen werden, die den Granulozyten/Monozyten-Marker CD11b exprimierten (**Abb. 3.18 D**). Insgesamt zeichnet es sich ab, dass mittels

ektopischer AML1-ETO-Expression generierte HSC- bzw. HPC-Zelllinien stark in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt sind und dementsprechend nicht im größeren Maßstab differenziert werden können.

4 Diskussion

Hämatopoetische Stammzellen stellen heutzutage die am besten charakterisierten gewebespezifischen Stammzellen dar. Trotz des immensen Fortschritts in der Stammzellforschung bleiben jedoch die intrinsischen Mechanismen, die zur Selbsterneuerung der Zellen beitragen, weitestgehend unklar. Nach wie vor ist die Charakterisierung der für die Selbsterneuerung verantwortlichen Faktoren ein Hauptziel der Stammzellforschung, um die erlangten Erkenntnisse zur Expansion von HSCs für Klinik und Forschung zu nutzen.

In dieser Arbeit wurden erstmals β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf ihre Eignung zur Expansion von humanen HSCs bzw. HPCs komparativ überprüft. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob die zusätzliche Expression von hTERT in Kombination mit den Zielgenen eine Expansion der Zellen über den Seneszenzpunkt hinaus ermöglicht. Die Untersuchung der verschiedenen Zielgene lieferte Erkenntnisse, die nicht nur Aufschluss über deren Eignung zur Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen geben, sondern auch neue Einblicke in die Funktion dieser Gene innerhalb der Hämatopoese ermöglichen.

4.1 Das Cre/LoxP-System

Die Expansion der Zellen sollte anfänglich mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems des Bakteriophagen P1 reversibel gestaltet werden. Zum einen, um zu zeigen, dass der zu beobachtende Effekt spezifisch auf das Zielgen zurückzuführen ist und zum anderen, um bei der späteren Analyse des Patientenmaterials auszuschließen, dass die expandierenden Elemente einen Einfluss auf den der Erkrankung zugrunde liegenden Mechanismus ausüben. Außerdem sollte die

Möglichkeit bestehen, inhibierende Einflüsse der Zielgene (z.B. AML1-ETO) auf das Differenzierungspotential der Zellen gezielt wieder abzuschalten, um eine expandierte Zellpopulation in den gewünschten Zelltyp differenzieren zu können.

Eine reversible Expansion der Zellen sollte durch die Flankierung der Zielgene mit LoxP-Sequenzen und einer nachfolgenden Exzision dieser Elemente mittels der Cre-Rekombinase erreicht werden. Die Durchführung dieses Vorhabens erwies sich jedoch als schwierig. Die Flankierung der Zielgene mit LoxP-Sequenzen wurde exemplarisch für β -Catenin(Δ) und HOX11 vorgenommen. Insgesamt bewirkte das Einbringen der LoxP-Sequenzen und des murinen CD34-Markers eine Verminderung des Titers von RD114-pseudotypisierten Retroviren. In herkömmlichen Retroviren können Informationen bis zu 10 kb verpackt werden (Coffin et al. 1997). Die Länge des RNA-Genoms der konstruierten Vektoren liegt zwischen 5,6 kb und 8,0 kb (MIGx34: 5,6 kb, MxBCcIGx34: 8,0 kb, MxHXcIGx34: 6,6 kb), somit kann die Größe der generierten Konstrukte und damit verbundene Probleme bei dem zellulären Zusammenbau der viralen Partikel als Ursache für die niedrigen Titer ausgeschlossen werden.

Da ein vergleichbares System noch nicht für den verwendeten Vektor beschrieben wurde, können die Gründe für die geringen Virentiter nur vermutet werden. Es wäre denkbar, dass die palindromischen LoxP-Sequenzen miteinander interferieren und über die Bildung von Sekundärstrukturen das Verpackungssignal des RNA-Genoms verdecken oder aber, dass sie Einfluss auf den sterischen Zusammenbau der viralen Partikel nehmen (Kommunikation Medizinische Hochschule, Hannover).

Insgesamt erwies sich das generierte System in herkömmlichen Zelllinien jedoch als funktionell, da der Nachweis der Cre-vermittelten Exzision der "geflochten" Kasette durch die Expression des murinen CD34-Markers erbracht werden konnte. Es konnte jedoch nur ein sehr geringer Anteil an CD34-positiven Knochenmarkzellen infiziert und sortiert werden. Die Ausbeute an infizierten Zellen für sich anschließende Analysen wurde bei der Transduktion mit MxBCcIGx34 zusätzlich vermindert, da β -Catenin(Δ) einen negativen Einfluss auf die Proliferation der Zielzellen ausübte, was sich erst im nachhinein zeigte.

Das Problem konnte trotz Aufkonzentrierung der RD114-pseudotypisierten Viren mittels Ultrazentrifugation nicht behoben werden. Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an infizierten Zellen wäre, dass es sich bei dem Großteil der Retroviren um defekte Partikel handelte, die zwar über ihr Hüllprotein Zellen infizieren können, jedoch kein funktionales Genom besitzen. Diese defekten Partikel wären dann im Stande, die Rezeptoren auf den HSCs abzusättigen, so dass nur ein sehr kleiner Anteil an funktionstüchtigen Partikeln die Zellen infizieren kann (Kommunikation Medizinische Hochschule, Hannover).

Die Pseudotypisierung der "geflochten" Konstrukte mit dem Hüllprotein des Gibbonaffenleukämievirus (GALV) wurde ebenfalls alternativ überprüft (Daten nicht gezeigt), bewirkte jedoch keine Verbesserung des Virentiters und der Transduktionseffizienz der Zielzellen. Für die komparative Analyse wurde deshalb vorerst von der konditionalen Expression der Zielgene abgesehen.

4.2 Einfluss der Zielgene auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

Die komparativen Analysen haben ergeben, dass nur mittels AML1-ETO humane hämatopoetische Stamm- bzw. Vorläuferzellen im größeren Umfang expandiert werden konnten, die jedoch stark in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt waren. Die Expression von β -Catenin(Δ) hingegen schränkte sowohl das Proliferationsvermögen als auch das Differenzierungspotential der Zellen ein. Mittels HOX11 konnte eine Vermehrung der Zellzahl im Vergleich zur GFP-Kontrolle erreicht werden. Die Zellen zeigten keine Auffälligkeiten in ihrem Differenzierungspotential. Die Etablierung von Vorläuferzelllinien war jedoch nicht möglich. Im folgenden Abschnitt werden die dargelegten Ergebnisse ausführlich diskutiert.

4.2.1 β -Catenin(Δ)

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade an der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist und Komponenten des Signalweges zur Vermehrung von Stammzellen *in vitro* und *in vivo* beitragen (Austin et al. 1997, Willert et al. 2003, Reya et al. 2003, Reya & Willert 2003). Bisher gab es jedoch keine Studie, welche die Eignung von konstitutiv aktivem β -Catenin [β -Catenin(Δ)] zur Langzeitexpansion von humanen CD34-positiven Knochenmarkzellen überprüft hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine konstitutive Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch den intrazellulären Vermittler β -Catenin zu einer Einschränkung der Proliferation als auch zur Blockade von Differenzierungsprogrammen in humanen HSCs bzw. HPCs führen kann. Die β -Catenin(Δ)-transduzierten Zellen zeichneten sich während der Langzeitkultivierung durch eine verminderte Proliferation sowie durch ein verfrühtes Ende der Kulturperiode aus. Phänotypisch konnten die Kulturen durch einen verminderten Anteil an CD14-positiven Monozyten charakterisiert werden. Die morphologische Untersuchung der Kulturen zeigte, dass es sich bei den meisten Zellen um neutrophile Granulozyten handelte. Tatsächlich besitzen neutrophile Granulozyten im Vergleich zu Lymphozyten und Monozyten *in vivo* und *in vitro* nur eine sehr kurze Lebensdauer, was die verkürzte Kultivierungsperiode der Zellen erklären könnte (Dransfield et al. 1994). Der monozytäre und der granulozytäre Vorläufer entwickeln sich aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem GMP (Granulozyten-Monozyten-Vorläufer, **s. 1.1**). Im Kolonieassay wurde im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte Anzahl an granulozytären Kolonien detektiert, was daraufhin weist, dass β -Catenin(Δ) die Linienfestlegung des GMP nicht beeinflusst. Vielmehr deutet der reduzierte Anteil an monozytären Kolonien auf eine Schwächung bzw. Inhibierung der Proliferation und Ausreifung des monozytären Vorläufers hin. Damit könnte die eingeschränkte Expansion der Zellen in Flüssigkultur auf die Abwesenheit von proliferierenden monozytären Vorläufern zurückgeführt werden, die einen großen Anteil der GFP-Kontrollkulturen ausmachten.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass β -Catenin(Δ) auch die Proliferation und Ausreifung des granulozytären Vorläufers beeinflusst, da im

Kolonieassay Variationen in Abhängigkeit vom Spender auftraten. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die konstitutive Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch den Vermittler β -Catenin insgesamt innerhalb der Hämatopoese zur Einschränkung von Proliferation und Differenzierung reiferer Vorläufer und Stammzellen führt, was jedoch anhand der durchgeführten Experimente nicht geklärt werden kann. Dieses Ergebnis erscheint kontrovers zu bisher veröffentlichten Studien, die im Mausmodell *in vivo* und *in vitro* eine entscheidende Rolle für die Wnt-Signalkaskade bei der Selbsterneuerung und Expansion von hämatopoetischen Stammzellen aufzeigen konnten (Austin et al. 1997, Van den Berg et al. 1998, Reya et al. 2003, Willert et al. 2003, Rattis et al. 2004, Baba et al. 2006).

Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass der intrazelluläre Vermittler der Wnt-Signalkaskade β -Catenin möglicherweise konzentrationsabhängig auf die Zielzellen einwirkt und zusätzlich dazu auch noch zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung der Zellen aktiv ist. *In vivo* unterliegt β -Catenin einer strengen Regulation. Die kontinuierliche Expression der cDNA mittels des retroviralen LTR-Promotors sowie die Verwendung der konstitutiv aktiven Form von β -Catenin bewirken eine hohe Konzentration an aktivem Protein in der Zelle. Tatsächlich wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt in hämatopoetischen Stammzellen auch für den Transkriptionsfaktor HOXB4 (*homeobox B4*) und den Notch-Liganden Delta-1 (*drosophila delta homolog 1*) beschrieben. Brun et al. konnten 2003 zeigen, dass eine sehr hohe Konzentration an ektopisch eingebrachtem HOXB4 in humanen CD34-positiven Nabelschnurblutzellen deren Differenzierung in die myeloide Reihe dirigiert. Im Gegensatz dazu führten moderate Konzentrationen in humanen und murinen HSCs zu einer verstärkten Selbsterneuerung der Zellen (Antonchuk et al. 2002, Buske et al. 2002). Ebenso hatten geringe Konzentrationen des Notch-Liganden Delta-1 einen positiven Effekt auf die Bildung von humanen CD34-positiven Nabelschnurblutzellen, wohingegen hohe Konzentrationen die lymphoide Differenzierung der Zellen förderten (Delaney et al. 2005).

Es wäre ebenfalls denkbar, dass durch die Überexpression von β -Catenin(Δ) eine Absättigung seiner Interaktionspartnern erfolgt, so dass diese Faktoren nicht mehr für andere genregulatorische Aufgaben zur Verfügung stehen und

als Konsequenz daraus Proliferations- und Differenzierungsprozesse indirekt inhibiert werden.

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die kanonische Wnt-Signalkaskade die Selbsterneuerung von Stammzellen unter bestimmten entwicklungsabhängigen Bedingungen beeinflusst. Neueste Studien konnten zeigen, dass die Überaktivierung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade auch gegenteilige Effekte haben kann.

In einem induzierbaren Mausmodell führte die Expression von stabilem β -Catenin zum Versagen des hämatopoetischen Systems, was u.a auf eine Differenzierungsblockade in HPCs zurückgeführt werden konnte. Des Weiteren führte die Expression der stabilen Form von β -Catenin zu einer verstärkten Proliferation von ST-HSCs (*short term haematopoietic stem cell*) und zur Abschaltung typischer „Stammzellgene“, wie z.B. HOXB4, Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*) und p21^{Cip1/Waf1} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*) sowie zu einem beeinträchtigten Rekonstitutionspotential der Zellen (Kirstetter et al. 2006). In einem anderen induzierbaren Mausmodell führte die Expression von konstitutiv aktivem β -Catenin durch forcierte Zellteilung zur Stammzellerschöpfung sowie zu einem Reifungsstopp der Zellen (Scheller et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit zeichneten sich die β -Catenin(Δ)-transduzierten Zellen der Expansionskulturen im Vergleich zu den Kontrollkulturen durch einen geringeren Anteil an CD34-positiven Zellen aus. Dies deutet ebenfalls auf einen vorzeitigen Verlust von CD34-positiven HSCs bzw. HPCs hin. Eine erhöhte Proliferation dieser Zellen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Es wäre allerdings möglich, dass das gewählte Zeitfenster zu weit gesteckt war und somit die Proliferation der Zellen in der ersten Kultivierungsphase versteckt stattfand. Dies würde jedoch bedeuten, dass die Zellen durch verstärkte Apoptose aus der Kultur ausgeschieden sind, da ein Anstieg der Zellzahl nicht detektiert werden konnte. Diese Vermutung bleibt spekulativ, zumal für humane β -Catenin-transduzierte CD34-positive Zellen eine erhöhte Apoptoseresistenz nachgewiesen wurde (Simon et al. 2005).

Zusammenfassend zeichnet sich ein sehr komplexes Bild hämatopoetischer Stammzellbiologie ab. Die Wnt-Signalkaskade ist in ein Netzwerk verschiedener Signalkaskaden, die in Zusammenhang mit der Selbsterneuerung von HSCs

gebracht wurden, eingebettet. Durch die Entkopplung dieser Kaskade aus diesem streng regulierten Geflecht könnten wichtige regulatorische Elemente zur Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps verloren gehen (Duncan et al. 2005, Nemeth et al. 2007).

Des Weiteren ist davon auszugehen, dass eine so wichtige Funktion, wie die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen, der strengen Kontrolle intrinsischer und extrinsischer Faktoren unterliegt. Bisher konnte nur über die äußere Stimulierung der Wnt-Signalkaskade durch die Liganden Wnt-1, Wnt-2B, Wnt5a und Wnt 10b eine moderate Expansion von humanen hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden (Van den Berg et al. 1998, Murdoch et al. 2003).

In Bcl-2-transgenen Mausstammzellen wurde mittels retroviraler Überexpression von β -Catenin (konstitutiv aktiv) eine Langzeitexpansion von hämatopoetischen Stammzellen mit Rekonstitutionspotential erzielt (Reya et al. 2003), wobei der Bcl-2-Hintergrund (*B-cell CLL/lymphoma 2*) des Modellsystems bei der Interpretation der Ergebnisse nicht zu vernachlässigen ist. Zwei weiteren Gruppen ist es ebenfalls gelungen, murine Stammzelllinien durch retrovirale Überexpression von β -Catenin (konstitutiv aktiv) zu generieren, die jedoch nicht in der Lage waren, Empfängertiere zu rekonstituieren (Baba et al. 2006, Templin et al. 2008). Bei diesen Studien ist allerdings zu berücksichtigen, dass intrinsische Unterschiede in den Mechanismen hämatopoetischer Zellen von Mäusen und Menschen bestehen, weshalb bei der Übertragung von Erkenntnissen aus dem murinen hämatopoetischen System auf das humane Vorsicht geboten sein sollte (Schwieger et al. 2004).

Des Weiteren sollten bei der Interpretation dieser Ergebnisse bedacht werden, dass langlebige Säugetiere und der Mensch im Vergleich zur Maus Schutzmechanismen entwickelt haben, um der Entartung von Zellen entgegen zu wirken. Die Induktion einer verstärkten Proliferation stellt eine Gefährdung der Stammzelle dar, da unter anderem unkontrollierte Wachstumssignale zur malignen Transformation von Zellen führen können. Der Nachweis von Mutationen in Komponenten der Wnt-Signalkaskade in soliden Tumoren und die bedeutende Rolle des Signalweges in Stammzellen sprechen dafür, dass dieser durch übermäßige Aktivierung auch zur Entstehung von Leukämien beitragen kann (Zhao et al. 2007). Tatsächlich wurde die Aktivierung von

β -Catenin in proliferativen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems nachgewiesen, deshalb ist anzunehmen, dass der über β -Catenin vermittelte Differenzierungsblock der myeloiden Abstammungslinie zusammen mit einer zusätzlichen genetischen Mutation in einem anderen Gen (*second hit*) zu einer Entartung von hämatopoetischen Zellen führen kann (Jamieson et al. 2004, Simon et al. 2005). In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass ein interner Schutzmechanismus die Proliferation von β -Catenin(Δ)-transduzierten Zellen verhindert und deren vorzeitiges Ausscheiden aus der Kultur bewirkt.

Es wird immer deutlicher, dass eine feinabgestimmte Regulierung der Wnt-Signalkaskade essentiell für die Hämatopoese und damit auch für die *in vitro* Expansion von HSCs ist. Daher scheint die Überexpression von β -Catenin(Δ) kein geeignetes Mittel zur Vermehrung von humanen HSCs zu sein.

4.2.2 HOX11

Homöobox-Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Entwicklung von Zellen des hämatopoetischen Systems (Buske & Humphries 2000). Die Überexpression von HOX11 initiiert die Immortalisierung von humanen CD4⁺CD8⁺-Vorläuferzellen und legt damit den Grundstein für eine akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie (Owens et al 2005). Aus murinen Knochenmarkzellen können durch retroviralen Gentransfer von HOX11 stabile Vorläuferzelllinien generiert werden (Hawley et al. 1994). Über die Eignung von HOX11, humane HSCs- bzw. HPCs zu expandieren, liegen bisher keine Studien vor.

Die Analyse von HOX11-transduzierten humanen HSCs hat gezeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor im gewählten zellulären Hintergrund nicht in der Lage war, eine starke Expansion der Zellen zu induzieren. Dabei ist jedoch festzustellen, dass die Lebensspanne der Zellen durchschnittlich um zwei Wochen verlängert wurde. Des Weiteren zeigten sich die Zellen unter den gewählten Bedingungen nicht in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt. Diese Ergebnisse weichen von den in Mauszellen generierten Daten ab. *In vitro* konnte eine transformierende Wirkung von HOX11 für hämatopoetische Vorläuferzellen, Dottersackzellen sowie aus embryonalen Stammzellen generierte Embryonalkörper nachgewiesen werden, die sich in ihrem

Differenzierungspotential eingeschränkt zeigten (Hawley et al. 1994 & 1997, Keller et al. 1998, Yu et al. 2002, Owens et al. 2003).

Die transformierende Eigenschaft von HOX11 konnte ebenfalls in eigenen *in vitro* Experimenten mit murinen Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺-Zellen, die mit demselben HOX11-Konstrukt wie die humanen Zellen transduziert wurden, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Inaktivierung der in die humanen Zellen eingebrachten HOX11-cDNA kann ausgeschlossen werden, da die Zellen während der gesamten Kultivierungsphase den Marker GFP exprimierten.

Somit weisen die Daten auf Spezies- und/oder Zelltyp-spezifische Unterschiede hin. Ähnliche Beobachtungen wurden für den Homöobox-Transkriptionsfaktor HOXB4 beschrieben. Die Überexpression von humanem HOXB4 in HSCs von Hunden und Mäusen führte zu deren Immortalisierung, wohingegen in HSCs von Menschen und Primaten keine Immortalisierung induziert wurde (Zhang et al. 2007).

Der zelluläre Kontext innerhalb einer Spezies spielt bei der Wirkung von HOX11 ebenfalls eine wichtige Rolle. So kann z.B. die Transkription von *Aldh1a1* (*aldehyde dehydrogenase 1 family, subfamily A1*) in murinen NIH3T3-Fibroblasten von HOX11 aktiviert werden und in murinen embryonalen Milzzellen reprimiert werden (Greene et al. 1998).

Letztendlich bleibt der Mechanismus, wie HOX11 seine transformierende Eigenschaft ausübt unklar. Für die Immortalisierung von murinen myeloiden sowie lymphoiden Vorläufern scheint die direkte Interaktion von HOX11 mit der DNA über die Homöodomäne im Zusammenspiel mit anderen Kofaktoren essentiell zu sein (Owens et al. 2003, Owens et al. 2005). Auf der anderen Seite gibt es immer mehr Hinweise, dass Homöobox-Transkriptionsfaktoren über DNA-unabhängige Mechanismen Einfluss auf das Schicksal von Zellen nehmen können. So sind sie in der Lage, die Differenzierung von Zellen indirekt über die Assoziation mit dem Kofaktor CBP (*acetyltransferase co-activator CREB-binding protein*) zu inhibieren. Riz et al. konnten 2007 zeigen, dass HOX11 die Funktion von CBP moduliert, indem es CBP bindet und zu reprimierten Chromatindomänen rekrutiert.

In HOX11-positiven T-ALL-Zelllinien (*T-cell acute lymphoblastic leukemia*) wurde gezeigt, dass HOX11 seine transformierende Wirkung über einen

weiteren DNA-unabhängigen Mechanismus mittels Inhibierung der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A ausüben kann. Durch die Inhibierung kommt es zur Umgehung der G₂/M- und G₁/S-Zellzykluskontrollpunkte, wodurch die Proliferation und genomische Instabilität der Zellen gefördert wird (Kawabe et al. 1997, Riz und Hawley 2005). Die Vielzahl an möglichen Szenarien, die sich aus der Interaktion von HOX11 mit CBP, Kofaktoren oder anderen Proteinen in unterschiedlichen Spezies sowie Zelltypen ergeben, könnte die kontroversen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklären.

Die anfänglich erhöhte Expansion der HOX11-transduzierten Zellen (Woche 1) weist daraufhin, dass HOX11 die Proliferation von HSCs bzw. HPCs verstärkt, jedoch ihre Differenzierung nicht unterbinden kann, aber verlangsamt. Untermuert wird diese Hypothese durch die morphologischen Daten, die zeigen, dass die Zellen im Vergleich zur Kontrolle weniger ausgereift waren.

Insgesamt konnte eine minimale Erhöhung der HSC- bzw. HPC-Zahl mittels retroviraler Überexpression von HOX11 erzielt werden. Die Zellen waren nicht in ihrer Differenzierungsfähigkeit in Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten eingeschränkt. Allerdings konnten sie ihr Selbsterneuerungspotential nicht aufrechterhalten und differenzierten in Langzeitkulturen aus. Der Differenzierungsprozess war jedoch im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt. Somit erweist sich die alleinige Überexpression von HOX11 nicht als geeignetes Mittel zur Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen.

4.2.3 AML1-ETO

Die Eignung des Fusionsproteins AML1-ETO, CD34-positive hämatopoetische Zellen zu expandieren, wurde bereits für humane Nabelschnurblutstammzellen und Zytokin-mobilisierte Blutvorläuferzellen gezeigt (Mulloy et al. 2002, Mulloy et al. 2003). Die Ergebnisse sollten für CD34-positive Knochenmarkzellen reproduziert werden.

Die Untersuchungen von AML1-ETO-transduzierten Zellen mittels Langzeitkultivierung haben eine verminderte Expansion der Zellen in der frühen Kultivierungsphase gezeigt. Außerdem wurde im Kolonieassay eine verminderte Koloniegröße festgestellt. Auf der anderen Seite führte die

Expression von AML1-ETO letztendlich zur Etablierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass AML1-ETO unterschiedliche Effekte auf Zellen des hämatopoetischen Systems in Abhängigkeit des Zellreifungsstatus ausübt.

Zu Beginn der Langzeitkultivierungsexperimente handelte es sich bei dem Grossteil der Zellen um in ihrer Differenzierung bereits festgelegte Vorläuferzellen, da viele der anfänglich eingesetzten CD34-positiven HSCs während der Zytokinstimulation und der viralen Transduktion ihren Stammzellcharakter verlieren und beginnen, sich zu Vorläuferzellen zu entwickeln (Mikkola & Orkin 2006). Dies lässt sich u.a. damit begründen, dass die zur Induktion der Zellteilung und für das Überleben der Zellen verwendeten Zytokine einen pleiotropen Effekt auf HSCs ausüben, der statt zur Selbsterneuerung auch zur Differenzierung der Zellen führen kann (Attar & Scadden 2004, Sauvageau et al. 2004). Des Weiteren geben späte Vorläufer eigene Signalmoleküle in die Langzeitkultur ab und forcieren damit die Differenzierung anderer Zellen.

Die verminderte Expansion der Zellen in der frühen Kultivierungsphase als auch die verminderte Größe der Kolonien im Kolonieassay deuten daraufhin, dass AML1-ETO die Proliferation von bereits festgelegten Vorläufern unterdrückt. Dieser negative Effekt auf die Proliferation von festgelegten Vorläufern wurde ebenfalls von Mulloy et al. 2002 beschrieben. Mittels der humanen myeloiden Zelllinie U937T-A/E, bei der die Expression von AML1-ETO induziert werden kann, wurde ebenfalls ein AML1-ETO-vermittelter G₁-Arrest sowie eine verminderte Bcl-2- (*B-cell CLL/lymphoma 2*), CDK4- (*cyclin dependent kinase 4*) und c-Myc-Expression (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) nachgewiesen (Burel et al. 2001). Im Gegensatz dazu förderte AML1-ETO die Expansion von HSCs und frühen Vorläufern, die wahrscheinlich am Anfangstadium der Kultivierung in der Minderheit vorlagen. Der langfristige Einfluss von AML1-ETO auf die Expansion von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen wird anschließend ausführlich behandelt (**s. 4.4**).

In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass die Wirkung von AML1-ETO in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Zellen zu betrachten ist. Ein möglicher Mechanismus, wie AML1-ETO die Proliferation von späten Vorläufern inhibieren könnte, wäre mittels einer Blockade des G₁/S-Überganges während

des Zellzyklus. In einem induzierbaren System konnten Lou et al. zeigen, dass die Inhibierung von AML1 (*acute myeloid leukemia 1*) durch die dominant negative Variante zu einer Blockade des G₁/S-Transits mit gleichzeitiger Abnahme des CDK4-Spiegels führte. AML1-ETO fungiert in den meisten Fällen als dominant negativer Inhibitor von AML1 (Speck & Gilliland 2002), somit könnte das Fusionsprotein wie das dominant negative AML1 den G₁/S-Übergang und damit die Proliferation von festgelegten Vorläufern, in Kooperation mit in dem zellulären Kontext vorhandenen anderen Proteinen, inhibieren.

Die Expression von AML1-ETO führte ebenfalls zu einer signifikanten Herabsetzung der Kolonieanzahl im Kolonieassay. Die phänotypische Analyse der Zellen aus der Langzeitkultivierung hat ebenfalls gezeigt, dass der Anteil an differenzierten Zellen in den Kulturen vermindert war.

Die Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials von Vorläuferzellen durch AML1-ETO wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. Mittels eines *tet off* Mausmodells konnten Rhoades et al. zeigen, dass hämatopoetische Vorläufer partiell in ihrer Differenzierung in reife myeloide Zellen blockiert waren und dass diese Blockade durch das Tetrazyklin-vermittelte Ausschalten von AML1-ETO überwunden werden konnte.

Eine verminderte Fähigkeit in verschiedene Linien des Blutes zu differenzieren, wurde auch für humane AML1-ETO-transduzierte Vorläuferzellen festgestellt (Mulloy et al. 2002). Die Gruppe um Tonks beschäftigte sich eingehend mit dem Einfluss von AML1-ETO auf die erythrozytäre Entwicklung (Tonks et al. 2003). Sie beobachteten ebenfalls eine stark verminderte Bildung von erythrozytären Kolonien, die im Vergleich zu Kontrolle eine geringere Anzahl an Zellen aufwiesen. Die Zellen zeigten sich während der frühen Kultivierungsphase in ihrer Proliferation eingeschränkt, was auf eine vorübergehende Blockade des Zellzyklus in der G₁-Phase zurückgeführt werden konnte. Während der späten Kultivierungsphase bestanden die Kulturen jedoch aus stark expandierenden erythroiden Vorläuferzellen. Eine herabgesetzte Bildung von granulozytären Kolonien durch die Überexpression von AML1-ETO in humanen CD34-positiven Zellen wurde ebenfalls von der gleichen Gruppe beschrieben (Tonks et al. 2004). Auch in diesen Versuchen konnten langfristig stark expandierende Vorläuferzellen generiert werden.

Zusammenfassend lässt dies den Schluss zu, dass AML1-ETO einen Entwicklungsarrest in unreifen Vorläuferzellen induziert und deren Expansion fördert. Außerdem hat die Expression von AML1-ETO gegenläufige Auswirkungen, die vom Differenzierungsstatus der Zellen abhängig sind.

4.3 Einfluss von hTERT in Kombination mit den Zielgenen auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen

In somatischen Zellen verkürzen sich die Telomere mit jeder Zellteilung bis eine kritische Länge erreicht ist. Die Verkürzung der Telomere in humanen Fibroblasten und Endothelzellen führt letztendlich zur Einleitung der replikativen Seneszenz, die durch einen irreversiblen Wachstumsstop gekennzeichnet ist (Allsopp et al. 1992). Mittels ektopischer Expression von hTERT kann die Telomerlänge und damit die Lebensspanne von Fibroblasten und Epithelzellen verlängert werden. Somit gibt die Telomerlänge Auskunft über die replikative Lebensspanne bestimmter Zelltypen (Bodnar et al. 1992, MacKenzie et al. 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zeigen, dass die replikative Lebensspanne von humanen HSCs bzw. HPCs mittels ektopischer Expression von hTERT nicht verlängert werden kann. Eine Ausnahme bilden die erythroiden Vorläuferzellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es grundlegende Unterschiede in der Telomerbiologie zwischen HSCs bzw. HPCs und differenzierten Gewebszellen, wie Fibroblasten und Epithelzellen, gibt.

Unterstützt werden diese Ergebnisse von anderen Studien, die zeigen, dass die Überexpression von hTERT in CD34-positiven Nabelschnurblutzellen keine signifikante Verlängerung der Telomere bewirkte und keinen Einfluss auf das Proliferationspotential der Zellen ausübte (Zimmermann et al. 2004, Wang et al. 2005, Akimov et al. 2005). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Selbsterneuerung bzw. Proliferation von HSCs bzw. HPCs nicht ausschließlich von der Expression einer Telomerase abhängen. Es ist davon auszugehen, dass die Komplexität der Entwicklungsprozesse einer Stammzelle dafür

verantwortlich ist, dass diese Zellen in der Telomerbiologie von dem für Fibroblasten und Epithelzellen gültigen Schema abweichen.

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zeigen, dass die Proliferation und Differenzierung von granulozytären und monozytären Vorläufern durch die ektopische Expression von hTERT stark beeinträchtigt wird. Kennzeichnend für die Überexpression von hTERT in humanen HSCs bzw. HPCs war die eingeschränkte Proliferation der Langzeitkulturen sowie die verkürzte Lebensspanne der Zellen im Vergleich zu den hTERT-negativen Zellen. Des Weiteren ergab die phänotypische Analyse eine verminderte Anzahl an CD34- (HSCs und HPCs) sowie CD33-positiven Zellen (HPCs). Der CD33-Marker wird besonders stark vom GMP (Granulozyten-Monozyten-Vorläufer) und seinen Nachkommen, den granulozytären und monozytären Vorläufern, exprimiert. Ferner wurde ein verminderter Anteil an CD11b-positiven (Monozytärer/granulozytärer Marker) sowie an CD14-positiven (monozytärer Marker) Zellen in den hTERT-positiven Kulturen nachgewiesen. Die Anzahl Kolonie-bildender Zellen war für den monozytären als auch den granulozytären Vorläufer stark herabgesetzt, was ebenfalls auf eine Beeinträchtigung dieser HPCs in der Ursprungspopulation hindeutet.

Dementsprechend könnte die verminderte Expansion der Zellen möglicherweise aus der eingeschränkten Proliferation und Ausreifung von granulozytären und monozytären Vorläufern resultieren. Ob die Proliferation und Differenzierung des gemeinsamen GMP-Vorläufers sowie anderer Vorläuferstufen und HSCs ebenfalls beeinträchtigt war, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht. Die Abwesenheit von CD34-positiven Zellen in den hTERT-transduzierten Kulturen nach zwei Wochen Expandierung deutet jedoch daraufhin.

Es wäre ebenfalls denkbar, dass die Überexpression von hTERT in bestimmten Zelluntergruppen zur Einleitung des programmierten Zelltods geführt hat, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter analysiert wurde. Wäre dies der Fall, könnte es sich um einen internen Schutzmechanismus dieser stark proliferierenden Zellen des hämatopoetischen Systems handeln (**s. auch 4.2.1**). Im Unterschied zu den granulozytären und monozytären Vorläuferzellen bewirkte die ektopische Expression von hTERT eine gesteigerte Proliferation von erythroiden Vorläufern. So zeichneten sich die Zellen der Langzeitkulturen

durch einen erhöhten Anteil an GlyA-positiven Zellen (erythrozytärer Marker) aus. Die lichtmikroskopische Evaluation zeigte ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Zellen erythroiden Ursprungs. Die Fraktion der erythroiden Kolonien im Kolonieassay war für GFP+hTERT- und HOX11+hTERT-Zellen nicht herabgesetzt, sondern im Abhängigkeit vom Spender sogar erhöht. Eine erhöhte Anzahl an erythroiden Kolonien wurde ebenfalls für hTERT-transduzierte Nabelschnurblutzellen dokumentiert (Zimmermann et al. 2004). Die verkürzte Lebensspanne der Zellen sowie die große Anzahl an apoptotischen Körperchen in den Langzeitkulturen weisen ebenfalls auf die erythrozytäre Reihe hin, die sich *in vitro* durch eine sehr kurze Kultivierbarkeit und erhöhte Apoptoseanfälligkeit auszeichnet (Schuller et al. 2007).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse auf, dass mittels ektopischer Expression von hTERT das replikative Potential von erythrozytären Vorläufern erhöht werden kann. Diese Annahme wird von einer Studie von Schuller et al. 2007 unterstützt. Sie zeigten, dass die Telomerlänge und die Telomeraseaktivität eng mit der Expansion von erythroiden Zellen aus Nabelschnurblut zusammen hängen. Die Proliferation von erythroiden Vorläufern korrelierte mit der Abnahme der Telomerlänge. Ein Zusammenhang zwischen der initialen Telomerlänge und der Expansion konnte hingegen für keine der myeloiden Linien hergestellt werden.

Die Fähigkeit von AML1-ETO, die Selbsterneuerung von HSCs und HPCs zu fördern wurde durch die zusätzliche Expression von hTERT inhibiert. AML1-ETO ist in der Lage, die Differenzierung von erythroiden HPCs zu unterdrücken (Tonks et al. 2002). Die eingeschränkte Proliferation sowie die stark verkürzte Lebensdauer der Zellen könnten als gegenläufige Effekte beider Proteine auf die Differenzierung und Proliferation von erythroiden HPCs verstanden werden. Eine mögliche Erklärung für das Auswachsen einer der AML1-ETO+hTERT-Populationen wäre, dass die Kultur aus HPCs mit einem höheren Differenzierungsgrad in die monozytäre/granulozytäre Linie entstanden ist, bei der entwicklungspezifische Faktoren die negative Wirkung von hTERT auf die Proliferation der Zellen abgeschwächt haben. Die Kultur zeichnete sich durch ein im Vergleich zu AML1-ETO-Zellen verringertes Proliferationspotential und durch eine verkürzte Kultivierungsphase von 18 Wochen aus, was zusätzlich dafür spricht, dass die Linie aus reiferen HPCs entstanden sein

könnte. Ebenfalls wäre es denkbar, dass ein Konzentrationsunterschied von AML1-ETO und hTERT zum Auswachsen der Kultur geführt hat. Da die Kombination der beiden Zielgene jedoch nur in einem Fall zu einer Verlängerung der Lebensspanne und dies auch nur stark vermindert im Vergleich zu AML1-ETO allein führte, wurde dies Phänomen nicht weiter untersucht.

Die Funktion der Telomerase wird in HSCs strenger als in anderen somatischen Zellen reguliert, wo die Überexpression von hTERT zur Erhaltung oder Verlängerung von Telomeren führt bzw. zusätzliche Zelltyp-spezifische Faktoren mit an diesem Prozess beteiligt sind (Zimmermann et al. 2004, Wang et al. 2005). Mittels eines zusätzlichen Wachstumsvorteils durch gemeinsame Überexpression von hTERT mit TLS-ERG (*translocated in liposarcoma, ETS related gene*, AML-assoziiertes Fusionsprotein) konnte ebenfalls keine Stabilisierung der Telomere in hämatopoetischen Zellen erreicht werden (Wang et al. 2005). Auf der anderen Seite führte die gemeinsame Expression von hTERT mit HPV16-E6/E7 (*human papilloma virus, viral early proteins 6, 7*) zur Telomerstabilisierung und Immortalisierung von myelo-erythroiden Mastzellvorläufern (Akimov et al. 2006). Diese gegensätzlichen Ergebnisse demonstrieren die Komplexität der Telomerasefunktion in hämatopoetischen Zellen und zeigen, dass noch eine Reihe von grundsätzlichen Fragen bezüglich der Aufgabe der Telomerase in hämatopoetischen Zellen ungeklärt sind.

Das Vorhandensein von Telomeraseaktivität in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Vergleich zu den meisten somatischen Zellen deutet auf eine wichtige Funktion dieses Enzyms im hämatopoetischen System hin. Obwohl die Expression der Telomerase den Prozess der Telomerverkürzung in diesen Zellen verzögert, kann der Telomerverlust nicht verhindert werden. Es beginnt sich abzuzeichnen, dass die Telomerase eine zusätzliche Funktion in hämatopoetischen Zellen haben könnte (Elwood 2004).

Zusammenfassend erweist sich die ektopische Expression von hTERT in Kombination mit den untersuchten Zielgenen β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO als kein geeignetes Mittel zur Expansion von HSCs bzw. HPCs. Ebenfalls verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Telomerase erst an einem späteren Zeitpunkt bei der Entartung von hämatopoetischen Zellen beteiligt ist

und im frühen Stadium wahrscheinlich keinen Einfluss auf die maligne Transformation nimmt.

4.4 Etablierung und Charakterisierung von hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien

Die akute myeloische Leukämie (AML) wird durch die unkontrollierte Proliferation myeloischer Vorläuferzellen (Myeloblasten) charakterisiert, die in ihrer Differenzierung blockiert sind. Zur Entwicklung einer AML bedarf es mindestens zwei genetischer Veränderungen, da Leukämie-assoziierte Fusionsproteine wie AML1-ETO im allgemeinen nicht in der Lage sind, eine AML in Mäusen zu induzieren (Rhoades et al. 2000). Durch die Expression von AML1-ETO in humanen CD34-positiven Knochenmarkzellen war es möglich, stabile präleukämische Zelllinien zu generieren, die bis zu 27 Wochen kontinuierlich proliferierten.

Akute myeloische Leukämien, bei denen eine t(8;21)-Translokation nachweisbar ist, werden von der WHO in die Untergruppe 2 eingeteilt. Kennzeichnend für diese Kategorie ist, dass die Blasten geringfügiges Ausreifungspotential besitzen (>10% ausreifende Granulopoese, <20% Promonozyten). Die generierten HSC- bzw. HPC-Zelllinien zeichneten sich durch einen geringen Anteil an unreifen Blasten (CD34 positiv) sowie weiter differenzierter Vorläufer (CD33 positiv) als auch einen kleinen Anteil an ausdifferenzierter myeloider Zellen (CD11b-, CD14 positiv) aus. Somit spiegelten die Zelllinien die Charakteristika des Subtyps 2 wieder. Auf welcher Entwicklungsstufe sich die Kultur-vorantreibenden Zellen befanden, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht. Aus anderen Studien geht allerdings hervor, dass es sich um sehr primitive hämatopoetische Zellen handelt, da sie in der Lage sind, NOD/SCID-Mäuse zu rekonstituieren (Mulloy et al. 2003).

Die Integration der Retroviren ins Genom und die sich anschließende Langzeitkultivierung der Zellen kann die zytogenetische Stabilität der Zelllinien beeinflussen. Gerade im Hinblick darauf, dass AML1-ETO zur Expansion von

Patientenzellen eingesetzt werden sollte, war die Stabilität der Linien von großer Bedeutung. Die generierten Zellen wiesen jedoch keine numerischen und strukturellen Veränderungen auf, so dass von der Beständigkeit des Chromosomensatzes während der Langzeitkultivierung ausgegangen werden konnte.

Insgesamt wirkte sich die Expression von AML1-ETO negativ auf die Differenzierung von Vorläuferzellen aus. Kolonien der erythrozytären, monozytären sowie granulozytären Reihe waren im Kolonieassay stark reduziert. In Flüssigkultur bewirkte die forcierte Differenzierungsinduktion in die granulozytäre Reihe eine Erhöhung des prozentualen Anteils an reiferen Zellen (CD11b-positiv), diese wurde jedoch von einem großen Zellverlust begleitet. Wie die Daten zeigen, war nur ein geringer Teil der Zellen durch Gabe von G-CSF und GM-CSF in der Lage, in reife Granulozyten zu differenzieren. Es wäre denkbar, dass der Entzug der Zytokine aus dem Expansionsmix (Flt3-L, SCF, TPO, IL-3, IL-6, EPO) bei den restlichen blockierten Zellen zur Einleitung der Apoptose geführt hat. Diese Annahme wird von den Ergebnissen von Mulloy et al. (2003) unterstützt, die zeigten, dass das Wachstum von AML1-ETO-transduzierten CD34-positiven Nabelschnurblutzellen abhängig von einem Mix aus HSC-wachstumsfördernden Zytokinen war. Von allen separat getesteten Zytokinen war nur IL-3 in der Lage, das Wachstum der Zellen allein zu unterstützen und dieses jedoch nur mit halbmaximaler Proliferation und Verlust der Langzeitselbsterneuerung.

AML1-ETO ist über die Inhibierung linienfestlegender Transkriptionsfaktoren wie PU.1 (*spleen focus forming virus proviral integration oncogene*) und C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein α*) in der Lage, die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu blockieren (Mc Kercher et al. 1996, Vangala et al. 2003, Pabst et al. 2001). Das Vorhandensein von ausgereiften myeloiden Zellen (CD11b-, CD14 positiv) lässt jedoch darauf schließen, dass der Differenzierungsblock nicht vollständig ist. In Zellen von C/EBP α ^{-/-}-Mäusen konnte der granulozytäre Reifungsstopp durch die Gabe von IL-3 und GM-CSF überwunden werden, weshalb durchaus die Möglichkeit bestand, dass der granulozytäre Differenzierungsblock in den generierten Zelllinien ebenfalls aufgehoben werden könnte (Collins et al. 2001, Zhang et al. 2002). Die generierten Zelllinien erwiesen sich jedoch unter den gewählten

Kulturbedingungen als resistent gegen die Induktion der granulozytären Differenzierung. Andere myeloide Zelllinien zeigten sich gleichermaßen in ihrem granulozytären, monozytären und erythrozytären Differenzierungspotential eingeschränkt (Ahn et al. 1998, Gelmetti et al. 1998, Kitabayashi et al. 1998, Kohzaki et al. 1999, Le et al. 1998, Westendorf et al. 1998, Burel et al. 2001). Letztendlich erwies sich das Fusionsprotein AML1-ETO als geeignetes Mittel zur Generierung von myeloiden Zelllinien aus CD34-positiven Knochenmarkzellen von Patienten mit schwerer kongenitaler Neutropenie. Durch die exponentielle Vermehrung der Zellen kann der Mangel an Untersuchungsmaterial umgangen und eine Aufklärung der genetischen Störung ermöglicht werden. Allerdings erweist sich das etablierte System hinsichtlich des Differenzierungspotentials der Zellen in neutrophile Granulozyten als eingeschränkt, so dass eine spezifische Untersuchung dieser Zellpopulation momentan nicht möglich ist. Umgangen werden könnte diese Limitierung durch eine induzierbare Expression von AML1-ETO. Nach einer initialen Vermehrung der Zellen könnte durch das Abschalten des Gens das Differenzierungsprogramm der Zellen mittels Zytokinstimulation angeschaltet werden.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieses Projektes wurden erstmals β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO komparativ auf ihre Fähigkeit hin untersucht, humane HSCs bzw. HPCs zu expandieren. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich nur AML1-ETO zur Expandierung von hämatopoetischen Zellen im größeren Umfang eignet. Die Ergebnisse demonstrieren außerdem, wie komplex die Biologie von HSCs geregelt ist und dass noch viel zum Verständnis der Regulationsmechanismen von HSCs beigetragen werden muss. So beeinflusst die permanente Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade durch stabilisiertes β -Catenin die natürliche HSC- bzw. HPC-Funktion negativ. Eine umfangreiche Bestimmung der optimalen Konzentration zur Expansion von HSCs erscheint zukünftig für β -Catenin sinnvoll zu sein. Mittels ektopischer Expression von

HOX11 konnte nur eine moderate Expansion mit verzögerter Ausreifung von myeloiden Vorläufern erzielt werden. Die Kombination der Zielgene mit hTERT schränkte das Proliferationspotential der Zellen, mit Ausnahme der erythrozytären Vorläufer, stark ein und weist somit auf entwicklungs- und zelltypabhängige Aufgaben der Telomerase im hämatopoetischen System hin. Die Erforschung von kongenitalen Knochenmarkserkrankungen wird durch die Seltenheit der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark erschwert. Die etablierte Methode zur Expansion von hämatopoetischen HSCs bzw. HPCs stellt eine wichtige Grundlage zur Untersuchung der molekularen Ursache dieser heterogenen Störung dar. Sie ermöglicht die Charakterisierung der Zellen auf genomischer sowie zellulärer Ebene und trägt somit zu einem besseren Verständnis der den Krankheiten zugrunde liegenden Mechanismen bei.

Gerade bei Patienten ohne großen familiären Hintergrund erweist sich die konventionelle Kopplungsanalyse zur Auffindung des betroffenen Gens als eingeschränkt. In diesen Fällen könnten genetische Komplementationsstudien mit den generierten Zelllinien durchgeführt werden, um die entsprechenden Gene zu identifizieren.

Die Untersuchung der bei dieser heterogenen Erkrankung betroffenen Zellpopulation, die neutrophilen Granulozyten, erweist sich in dem etablierten System jedoch als schwierig, da AML1-ETO u.a. seine Wirkung durch die Blockierung von Differenzierungsvorgängen ausübt. Dies erscheint insbesondere bei einer Minderheit von SCN-Patienten von Bedeutung, die nicht auf die Gabe von GM-CSF ansprechen (Zeidler et al. 2000). Da GM-CSF bei diesen Patienten keine Bildung von neutrophilen Granulozyten induziert, wäre es möglich, dass Gene innerhalb dieser Zytokinsignalkaskade betroffen sind. Eine Komplementation dieser Patientenzellen mit Komponenten des GM-CSF-Signalweges und nachfolgender Differenzierung könnten zur Identifizierung des Neutropenie-assoziierten Gens beitragen. Insofern bleibt eine induzierbare Expression von AML1-ETO erstrebenswert.

Eine Alternative zum Cre/LoxP-System stellen Tetrazyklin- oder Tamoxifen-regulierbare Systeme dar (Baron & Bujard 2000, Schiedlmeier et al. 2007). Von Vorteil ist hierbei, dass die Expression des Zielgens durch externe Gabe eines Inhibitors abgeschaltet werden kann. Das Cre/LoxP-System erfordert hingegen

einen weiteren Transduktionsschritt, wodurch sich in den Zellen das Risiko einer Mutagenese erhöht. Die reversible Expression von AML1-ETO sollte die Generierung von Patientenzelllinien ermöglichen und die Differenzierung der Zellen in neutrophile Granulozyten gestatten.

Zusammenfassend bilden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Basis für die Herstellung myeloider Zelllinien von Neutropeniepatienten und stellen somit ein wichtiges Fundament für sich anschließende Fragestellungen bezüglich der pathogenen Mechanismen dieser Erkrankung dar.

5 Literaturverzeichnis

Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Peake IR, Reilly JT. (2003). c-FMS mutational analysis in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 123: 749-750.

Ahn MY, Huang G, Bae SC, Wee HJ, Kim WY, Ito Y. (1998). Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of *Drosophila* seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1812-1817.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. (2000). A clonogenic myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-199.

Akimov SS, Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. (2005). Bypass of senescence, immortalization, and transformation of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 23: 1423-1433.

Allen TD, Zhu YX, Hawley TS, Hawley RG. (2000). TALE homeoproteins as HOX11-interacting partners in T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 39: 241-256.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10114-10118.

Allsopp RC, Chesier S, Weissman IL. (2001). Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193: 917-924.

Allsopp RC, Weissman IL. (2002). Replicative senescence of hematopoietic stem cells during serial transplantation: does telomere shortening play a role? *Oncogene* 21: 3270-3273.

Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, Weissman IL. (2003). Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102: 517-520.

Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, Dubart-Kupferschmitt A, Fichelson S. (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 9: 1423-1427.

Ancliff PJ, Gale RE, Watts MJ, Liesner R, Hann IM, Strobel S, Linch DC. (2002). Paternal mosaicism proves the pathogenic nature of mutations in neutrophil elastase in severe congenital neutropenia. *Blood* 100: 707-709.

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

Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. (2002). HoxB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109: 39-45.

- Arai F**, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118: 149-161.
- Austin TW**, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. (1997). A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* 89: 3624-3635.
- Ausubel FM**, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1999). Short protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons*, New York, 4. Edition.
- Baerlocher GM**, Roth A, Lansdorp PM. (2003). Telomeres in hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci* 996: 44-48.
- Barabé F**, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 316: 600-604.
- Barker N**, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -Catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 20: 4935-4943.
- Berenson RJ**, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID. (1988). Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81: 951-5.
- Bhanot P**, Brink M, Harryman Samos C, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 282: 225-230.
- Bhardwaj G**, Murdoch B, Wu D. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2: 178-180.
- Bhardwaj G**, Murdoch B, Wu D, Waker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. (2002). Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2: 172-180.
- Bhatia M**, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. (1997a). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5320-5325.
- Bhatia M**, Bonnet D, Kapp U, Wang JC, Murdoch B, Dick JE. (1997b). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 186: 619-624.
- Bhatia M**, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4: 1038-1045.
- Berenson RJ**, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID. (1988). Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81: 951-955.
- Bienz M**, Clevers H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320.
- Björnsson JM**, Andersson E, Lundström P, Larsson N, Xu X, Repetowska E, Humphries RK, Karlsson. (2001). Proliferation of primitive myeloid progenitors can be reversibly induced by HoxA10. *Blood* 98: 3301-3308.
- Blackburn EH**. (2001). Switching and signaling at the telomer. *Cell* 106: 661-673.
- Bodnar AG**, Oulette M, Frolkis M, Holt SH, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtensteiner S, Wright WE. (1998). Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.

- Bonnet D.** (2003). Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med* 3: 140-149.
- Bradford GB,** Williams B, Rossi R, Bertocello I. (1997). Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 25: 445-453.
- Britos-Bray M,** Friedman AD. (1997). Core binding factor cannot synergistically activate the myeloperoxidase proximal enhancer in immature myeloid cells without c-Myb. *Mol Cell Biol* 17: 5127-5135.
- Brown J,** Greaves MF, Molgaard HV. (1991). The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in hematopoietic cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 3: 75-84.
- Brümmendorf TH,** Rufer N, Baerlocher GM, Roosnek E, Lansdorp PM. (2001). Limited telomere shortening in hematopoietic stem cells after transplantation. *Ann NY Acad Sci* 938: 1-8.
- Brun AC,** Fan X, Björnsson JM, Humphries RK, Karlsson S. (2003). Enforced adenoviral vector-mediated expression of HOXB4 in human umbilical cord blood CD34+ cells promotes myeloid differentiation but not proliferation. *Mol Ther* 8: 618-628.
- Bryder D,** Rossi DJ, and Weissman IL. (2006). Hematopoietic stem cells – The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169: 338-346.
- Burel SA,** Harakawa N, Zhou L, Pabst T, Tenen DG, Zhang DE. (2001). Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol Cell Biol* 21: 5577-5590.
- Buske C,** Humphries RK. (2000). Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* 71: 301-308.
- Buske C,** Feuring-Buske M, Abramavich C, Spiekermann K, Eaves CJ, Coulombel L, Sauvageau G, Hogge DE, Humphries RK. (2002). Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 100: 862-868.
- Calvi LM,** Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846.
- Calvo KR,** Sykes DB, Pasillas M, Kamps MP. (2000). Hoxa9 immortalizes a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent promyelocyte capable of biphenotypic differentiation to neutrophils or macrophages, independent of enforced meis expression. *Mol Cell Biol* 20: 3274-3285.
- Care A,** Valtieri M, Mattia G, Meccia E, Masella B, Luchetti L, Felicetti F, Colombo MP, Peschle C. (1999). Enforced expression of HOXB7 promotes hematopoietic stem cell proliferation and myeloid progenitor differentiation. *Oncogene* 18: 1993-2001.
- Care RS,** Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Lowenberg B, Reilly JT. (2003). Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 121: 775-777.
- Cavallo RA,** Cox RT, Moline MM, Roose J, Plevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395: 604-608.
- Chen J,** Astle CM, Harrison DE. (1999). Development and aging of primitive hematopoietic stem cells in BALB/cBy mice. *Exp Hematol* 27: 928-935.

- Cheng T**, Shen H, Rodrigues N, Stier S, Scadden DT. (2001). Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27 (Kip1). *Blood* 98: 3643-3649.
- Cheshier S**, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3120-3125.
- Coffin JM**, Hughes SH, Varmus HE. (1997). Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Collins K**, Mitchell JR. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21: 564-579.
- Collins S**, Ulmer J, Purton L, Darlington G. (2001). Multipotent hematopoietic cell lines derived from C/EBP α (-/-) knockout mice display granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, granulocyte-colony-stimulating factor, and retinoic acid induced granulocytic differentiation. *Blood* 98: 2382-2388.
- Cong YS**, Wright WE, Shay JW. (2002). Human telomerase and its regulation. *MMBR* 66: 407-425.
- Counter CM**, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315-2320.
- Counter CM**, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, Sedivy J, Weinberg RA. (1998). Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14723-14728.
- Crooks GM**, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK, Kohn DB, Gasson JC. (1999). Constitutive HoxA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 94: 519-528.
- Dahse R**, Fiedler W, Ernst G. (1997). Telomere und Telomerase. *Pathologe* 18: 425-429.
- Dao MA**, Arevalo J, Nolta JA. (2003). Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* 101: 112-118.
- Delaney C**, Varnum-Finney B, Aoyama K, Brashem-Stein C, Bernstein ID. (2005). Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood* 106: 2693-2699.
- de Lange T**, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10: 518-527.
- de Strooper B**, Annaert W. (2001). Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. *J Cell Biol* 152: 17-20.
- de Wynter E**, Ploemacher RE. (2001). Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 15: 23-27.
- Dear TN**, Colledge WH, Carlton MB, Lavenir I, Larson T, Smith AJ, Warren AJ, Evans MJ, Sofroniew MV, Rabbitts TH. (1995). The Hox11 gene is essential for cell survival during spleen development. *Development* 121: 2909-2915.
- Devine SM**, Lazarus HM, Emerson SG. (2003). Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: Current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant* 31: 241-252.
- Dick JE**, Bhatia M, Gan O, Kapp U, Wang JC. (1997). Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells* 15: 199-203.

- Dick JE.** (2003). Self-renewal writ in blood. *Nature* 423: 231-233.
- Di Leonardo A,** Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8: 2540-2551.
- Downing JR.** (1999). The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br J Haematol* 106: 296-308.
- Dransfield I,** Buckle AM, Savill JS, Mcdowall A, Haslett C, Hogg N. (1994). Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc-gamma-RIII) expression. *J Immunol* 153: 1254-1263.
- DuBridge RB,** Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-387.
- Duncan AW,** Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6: 314-322.
- Elwood NJ.** (2004). Telomere biology of human hematopoietic stem cells. *Cancer Control* 11: 77-85.
- Elwood NJ,** Jiang XR, Chiu CP, Lebkowski JS, Smith CA. (2004). Enhanced long-term survival, but no increase in replicative capacity, following retroviral transduction of human cord blood CD34⁺ cells with human telomerase reverse transcriptase. *Haematologica* 89: 377-378.
- Engelhardt M,** Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MAS. (1997). Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 90: 182-193.
- Engelhardt M,** Ozkaynak MF, Drullinsky P, Sandoval C, Tugal O, Jayabose S, Moore MA. (1998). Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia* 12: 13-24.
- Erickson P,** Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondo S, Lasher R, Trujillo J, Rowley JD, Drabkin HA. (1992). Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 80: 1825-1831.
- Fehse B,** Schade UM, Li Z, Uhde A, Koch S, Goller B, Ruger R, Fehse N, Stockschrader M, Zander AR. (1998). High-efficiency retroviral vector-mediated gene transfer into human T lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 451: 375-378.
- Fehse B,** Richters A, Putimtseva-Scharf K, Klump H, Li Z, Ostertag W, Zander AR, Baum C. (2000). CD34 Splice Variant: An Attractive Marker for Selection of Gene-Modified Cells. *Mol Ther* 1: 448-456.
- Feinstein PG,** Kornfeld K, Hogness DS, Mann RS. (1995). Identification of Homeotic Target Genes in Drosophila melanogaster Including nrvy, a Proto-Oncogene Homologue. *Genetics* 140: 573-586.
- Fenske TS,** Pengue G, Mathews V, Hanson PT, Hamm SE, Riaz N, Graubert TA. (2004). Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15184-15189.
- Fina L,** Molgaard HV, Roberston D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417-2426.

- Frank R**, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD. (1995). The AML1-ETO protein blocks transactivation of GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* 11: 2667-2674.
- Gallacher L**, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95: 2813-2820.
- Gammaitoni L**, Weisel KC, Gunetti M, Wu KD, Bruno S, Pinelli S, Bonati A, Aglietta M, Moore MAS, Piacibello W. (2004). Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. *Blood* 103: 4440-4448.
- Gilliland DG**, Tallman MS. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1: 417-420.
- Glimm H**, Eaves CJ. (1999). Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* 94: 2161-2168.
- Goodell MA**, Brose K, Paradis G, Conner A, Mulligan RC. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806.
- Goodell MA**, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria MA, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3: 1337-1345.
- Green H**, Todaro GJ. (1967). The mammalian cell as differentiated microorganism. *Annu Rev Microbiol* 21: 573-600.
- Greene WK**, Bahn S, Masson N, Rabbitts TH. (1998). The T-cell oncogenic protein HOX11 activates Aldh1 expression in NIH3T3 cells but represses its expression in mouse spleen development. *Mol Cell Biol* 18: 7030-7037.
- Greider CW**. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 90-92.
- Grier DG**, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 205: 154-171.
- Hackney JA**, Charbord P, Brunk BP, Brunk BP, Stoeckert CJ, Lemischka IR, Moore KA. (2002). A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13061-13066.
- Harley CB**. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-282.
- Hawley RG**, Fong AZ, Lu M, Hawley TS. (1994). The HOX11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. *Oncogene* 9: 1-12.
- Hawley RG**, Fong AZ, Reis MD, Zhang N, Lu M, Hawley TS. (1997). Transforming function of the Hox11/TCL3 homeobox gene. *Cancer Res* 57: 337-345.
- Hayflick L**. (1965). The limited in vitro life-time of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.
- He TC**, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512.
- Healy L**, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. (1995). The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12240-12244.

- Hecht A**, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of β -Catenin in vertebrates. *EMBO J* 19: 1839-1850.
- Heike T**, Nakahata T. (2002). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochem Biophys Acta* 1592: 313-321.
- Hino M**, Suzuki K, Yamane T, Sakai N, Kubota H, Koh KR, Ohta K, Hato F, Kitagawa S, Tatsumi N. (2000). Ex vivo expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 109: 314-321.
- Hodgson GS**, Bradley TR. (1984). In vivo kinetics status of hematopoietic stem and progenitor cells as inferred from labeling with bromodeoxyuridine. *Exp Hematol* 12: 683-687.
- Holliday R**. (1986). Strong effects of 5-azacytidine on the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 166: 543-552.
- Horton SJ**, Grier DG, McGonigle GJ, Thompson A, Morrow M, De Silva I, Moulding DA, Kioussis D, Lappin TR, Brady HJ, Williams O. (2005). Continuous MLL-ENL expression is necessary to establish a "Hox Code" and maintain immortalization of hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res* 65: 9245-9252.
- Hough MR**, Reis MD, Singaraja R, Bryce DM, Kamel-Reid S, Dardick I, Breitman ML, Dube ID. (1998). A model for spontaneous B-lineage lymphomas in IgHmu-HOX11 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13853-13858.
- Huelsken J**, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. (2001). β -Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105: 533-545.
- Huelsken J**, Birchmeier W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11: 547-553.
- Hug BA**, Lee SYD, Kinsler EL, Zhang J, Lazar MA. (2002). Cooperative function of AML1-ETO corepressor recruitment domains in the expansion of primary bone marrow cells. *Cancer Res* 62: 2906-2912.
- Ikuta K**, Weissman IL. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit, but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1502-06.
- Itahana K**, Dimri G, Campisi J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 268: 2784-2791.
- Ivanova NB**, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 298: 601-604.
- Iwama H**, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW. (1998). Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 102: 397-402.
- Iwama A**, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H. (2004). Enhanced self-renewing of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21: 843-851.
- Jacobson SE**. (2005). Defining 'stemness': Notch and Wnt join forces? *Nat Immunol* 6: 234-236.
- Järas M**, Edqvist A, Rebetz J, Salford LG, Widegren B, Fan X. (2006). Human short-term repopulating cells have enhanced telomerase reverse transcriptase expression. *Blood* 108: 1084-1090.

Jamieson CHM, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. (2004). Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. *N Engl J Med* 351: 657-667.

Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. (2003). Links between signaltransduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422: 317-322.

Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, Bhatia M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192: 1365-1372.

Kawabe T, Muslin AJ, Korsmeyer SJ. (1997). HOX11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G₂/M cell-cycle checkpoint. *Nature* 385: 454-458.

Keller G, Wall C, Fong AZ, Hawley TS, Hawley RG. (1998). Overexpression of HOX11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential. *Blood* 92: 877-887.

Kempler G, Freitag B, Berwin B, Nanassy O, Barklis E. (1993). Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology* 193: 690-699.

Kennedy MA, Gonzalez-Sarmiento R, Kees UR, Lampert F, Dear N, Boehm T, Rabbitts TH. (1991). Hox11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8900-8904.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011–2015.

Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SEW, Nerlov C. (2006). Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol* 7: 1048-1056.

Kitabayashi I, Ida K, Morohoshi F, Yokoyama A, Mitsuhashi N, Shimizu K, Nomura N, Hayashi Y, Ohki M. (1998). The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8 (ETO/CDR) family, MTGR1. *Mol Cell Biol* 18: 846–858.

Klein C, Bueler H, Mulligan RC. (2000). Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J Exp Med* 191: 1699-708

Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schäffer AA, Rathinam C, Boztug K, Schwitzer B, Rezaei N, Bohn G, Melin M, Carlsson G, Fadeel B, Dahl N, Palmblad J, Henter JI, Zeidler C, Grimbacher B, Welte K. (2007). HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nature Genet* 39: 86-92.

Kohzaki H, Ito K, Huang G, Wee H J, Murakami Y, Ito Y. (1999). Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO (MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. *Oncogene* 18: 4055–4062.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitor in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-72.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21: 759-806.

Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19: 379-383.

- Krause DS**, Fackler MJ, Civin CI, May WS. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1-13.
- Krosi J**, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G. (2003). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 9: 1428-1432.
- Lansdorp PM**, Dragowska W, Mayani H. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 178: 787-791.
- Lansdorp PM**. (2000). Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* 118: 23-34.
- Lapidot T**, Sirad C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648.
- Lawrence HJ**, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C. (1995). Stage- and lineage-specific expression of the HOX10A homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Exp Hematol* 23: 1160-1166.
- Le XF**, Claxton D, Kornblau S, Fan YH, Mu ZM, Chang KS. (1998). Characterization of the ETO and AML1-ETO proteins involved in 8;21 translocation in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol* 60: 217-225.
- Lessard J**, Sauvageau G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423: 255-260.
- Lessard J**, Faubert A, Sauvageau G. (2004). Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene* 23: 7199-7209.
- Lickert H**, Domon C, Huls G, Wehrle C, Duluc I, Clevers H, Meyer BI, Freund JN, Kemler R. (2000). Wnt/ β -Catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* 127: 3805-3813.
- Limón A**, Briones J, Puig T, Carmona M, Fornas O, Cancelas JA, Nadal M, García J, Rueda F, Barquinero J. (1997). High-Titer Retroviral Vectors Containing the Enhanced Green Fluorescent Protein Gene for Efficient Expression in Hematopoietic Cells. *Blood* 90: 3316-3321.
- Liu Y**, Cheney MD, Gaudet JJ, Chruszcz, Lukasiak SM, Sugiyama D, Lary J, Cole J, Dauter Z, Minor W, Speck NA, Bushweller JH. (2006). The tetramer structure of the neryv homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cell* 9: 249-260.
- Lou J**, Cao W, Bernardin F, Ayyanathan K, Rauscher IF, Friedman AD. (2000). Exogenous cdk4 overcomes reduced cdk4 RNA and inhibition of G1 progression in hematopoietic cells expressing a dominant-negative CBF: a model for overcoming inhibition of proliferation by CBF oncoproteins. *Oncogene* 19: 2695-2703.
- Lucas ML**, Seidel NE, Porada CD, Quigley JG, Anderson SM, Malech HE, Abkowitz JL. (2005). Improved transduction of human sheep repopulating cells by retrovirus vectors pseudotyped with feline leukemia virus type C or RD114 envelopes. *Blood* 106: 51-58.
- Lutterbach B**, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, Hiebert SW. (1998). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol Cell Biol* 18: 7176-7184.
- MacKenzie KL**, Franco S, May C, Sadelain M, Moore MA. (2000). Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. *Exp Cell Res* 259: 336-350.

- Marley SB**, Lewis JL, Davidson RJ, Roberts IAG, Dokal I, Goldman JM. (1999). Evidence for a continuous decline in haematopoietic cell function from birth: application to evaluating bone marrow failure in children. *Br J Haematol* 106: 162-166.
- Martens UM**, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM. (1998). Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18: 76-80.
- Masullo P**, Druhan LJ, Bunnell BA, Hunter MG, Robinson JM, Marsh CB, Avalos BR. (2005). Aberrant subcellular targeting of the G185R neutrophil elastase mutant associated with severe congenital neutropenia induces premature apoptosis of differentiating promyelocytes. *Blood* 10: 3397-3404.
- Masutomi K**, Possemato R, Wong JMY, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *PNAS* 102: 8222-8227.
- McCrea PD**, Turck CW, Gumbiner B. (1991). A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254: 1359-1361.
- McKercher SR**, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15: 5647-5658.
- Meyerson M**, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90: 785-795.
- Meyerson M**. (2000). Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 18: 2626-2634.
- Mikkola HKA**, Orkin SH. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133: 3733-3744.
- Moon RT**, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. (2002). The promise and perils of Wnt signalling through β -catenin. *Science* 296: 1644-1646.
- Moore KA**, Lemischka IR. (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880-1885.
- Morrison SJ**, Weissman IL. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1: 661-73.
- Morrison SJ**, Prowse KR, Ho P, Weissman IL. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5: 207-16.
- Morrison SJ**, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124: 1929-39.
- Müller-Tidow C**, Steffen B, Cauvet T, Tickenbrock L, Ji P, Diederichs S, Sargin B, Köhler G, Stelljes M, Puccetti E, Ruthardt M, deVos S, Hiebert SW, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H. (2004). Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 24: 2890-2904.
- Muller-Sieburg C**, Whitlock CA, Weissman IL. (1986). Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1^{lo} hematopoietic stem cell. *Cell* 44: 653-62.
- Mullis K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273.

- Mulloy JC**, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD. (2002). The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 99: 15-23.
- Mulloy JC**, Cammenga J, Berguido FJ, Wu K, Zhou P, Comenzo RL, Jhanwar S, Moore MA, Nimer SD. (2003). Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34⁺ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood* 102: 4369-4376.
- Mulloy JC**, Jankovic V, Wunderlich M, Delwel R, Cammenga J, Krejci O, Zhao H, Valk PJM, Lowenberg B, Nimer SD. (2005). AML1-ETO fusion protein up-regulates TRKA mRNA expression in human CD34⁺ cells, allowing nerve growth factor-induced expansion. *PNAS* 102: 4016-4021.
- Munoz-Jordan JL**, Cross GA, de Lange T, Griffith JD. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J* 20: 579-588.
- Murdoch B**, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, Moon RT, Bhatia M. (2003). Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3422-3427.
- Nelson WJ**, Nusse R. (2004). Convergence of Wnt, β -Catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-1487.
- Nimer SD**, Moore MAS. (2004). Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. *Oncogene* 23: 4249-4254.
- Notaro R**, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. (1997). In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13782-85.
- Nuchprayoon L**, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD. (1994). PEBP2/CBF, the murine homolog of human myeloid AML1 and PEBP2 β /CBF β protooncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* 14: 5558-5568.
- Ohishi K**, Varnum-Finney B, Bernstein ID. (2002). Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest* 110: 1165-1174.
- Ohlstein B**, Kai T, Decotto E, Spradling A. (2004). The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol* 16: 693-699.
- Okuda T**, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84: 321-330.
- Okuda T**, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H and Downing JR. (1998). Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 91: 3134-3143.
- Ory DS**, Neugeboren BA, Mulligan RC. (1996). A Stable Human-Derived Packaging Cell Line for Production of High Titer Retrovirus/Vesicular Stomatitis Virus G Pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11400-11406.
- Osawa M**, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic cell. *Science* 273: 242-245.
- Owens BM**, Hawley RG. (2002). HOX and Non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 20: 364-379.

- Owens BM**, Zhu YX, Suen TC, Wang PX, Greenblatt JF, Goss PE, Hawley RG. (2003). Specific homeodomain-DNA interactions are required for HOX11-mediated transformation. *Blood* 101: 4966-4974.
- Owens BM**, Hawley TS, Spain LM, Kerkel KA, Hawley RG. (2005). TLX1/HOX11-mediated disruption of primary thymocyte differentiation prior to the CD4+CD8+ double-positive stage. *BJH* 132: 216-229.
- Pabst T**, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. (2001). AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7: 444-451.
- Park IK**, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 302-305.
- Passegue E**, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* 202: 1599-1611.
- Peterson LF**, Zhang DE. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene* 23: 4255-4262.
- Pinson KI**, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407: 535-538.
- Polakis P**. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851.
- Pollard SL**, Holland PW. (2000). Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr Biol* 10: 1059-1062.
- Ramalho-Santos M**, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298: 597-600.
- Rasheed S**, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33: 1027-1033.
- Reddel RR**, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR. (2001). Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 155: 194-200.
- Reuther GW**, Lambert QT, Caligiuri MA, Der CJ. (2000). Identification and Characterization of an Activating TrkA Deletion Mutation in Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cell Biol* 20, 8655-8666.
- Reya T**, O'Riordan M, Okamura R, Devaney K, Willert R, Nusse R, Grosschedl. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13: 15-24.
- Reya T**, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
- Reya T**. (2003). Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent Prog Horm Res* 58: 283-295.
- Reya T**, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409-414.
- Reya T**, Clevers H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843-50.

Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu LQ, Little M. T, Tenen DG, Zhang DE. (2000). Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood* 96: 2108-2115.

Riz I, Hawley RG. (2005). G₁/S transcriptional networks modulated by the HOX11/TLX1 oncogene of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 24: 5561-5575.

Riz I, Akimov SS, Eaker SS, Baxter KK, Lee HJ, Marino-Ramirez L, Landsman D, Hawley TS, Hawley RG. (2007). TLX1/HOX11-induced hematopoietic differentiation blockade. *Oncogene* 26: 4115-4123.

Rizo A, Vellenga E, de Haan G, Schuringa JJ. (2006). Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Hum Mol Genet* 15: 210-219.

Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ. (1994). Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature* 368: 747-749.

Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagge F, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R, Shpall EJ. (2006). Superior ex vivo cord blood TNC and hematopoietic progenitor cell expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 132.

Robles SJ, Adami GR. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16: 1113-1123.

Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, Fier C, Freedman M, Kannourakis G, Kinsey S, Schwinzer B, Zeidler C, Welte K, Dale DC, Severe Chronic Neutropenia International Registry. (2006). The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood* 107:4628-35

Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9194-9199.

Salvati PD, Ranford PR, Ford J, Kees UR. (1995). HOX11 expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with T-cell phenotype. *Oncogene* 11: 1333-1338.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 2. Edition.

Sato T, Laver JH, Ogawa M. (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 94: 2548-2554.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10: 55-63.

Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. (2004). In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23: 7223-7232.

Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nat Immunol* 7: 1037-1047.

Schiedlmeier B, Santos AC, Ribeiro A, Moncaut N, Lesinski D, Auer H, Kornacker K, Ostertag W, Baum C, Mallo M, Klump H. (2007). HOXB4's road map to stem cell expansion. *PNAS* 104: 16952-16957.

- Schlegelberger B**, Metzke S, Harder S, Zuhlke-Jenisch R, Zhang Y, Siebert R. (1999). Classical and molecular cytogenetics of tumor cells, in Wegner R-D (ed): Diagnostic Cytogenetics. *Springer Verlag*, Berlin: 151-185.
- Schofield R**. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4: 7-25.
- Schuller CE**, Jankowski K, MacKenzie KL. (2007). Telomere length of cord blood-derived CD34⁺ progenitors predicts erythroid proliferative potential. *Leukemia* 21: 983-991.
- Schwieger M**, Lohler J, Fischer M, Herwig U, Tenen DG, Stocking C. (2004). A dominant-negative mutant of C/EBPalpha, associated with acute myeloid leukemias, inhibits differentiation of myeloid and erythroid progenitors of man but not mouse. *Blood* 103: 2744-2752.
- Serrano M**, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation on p53 and p16^{INK4}. *Cell* 88: 593-602.
- Sharma S**, Gurudutta GU, Satija NK, Pati S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, Singh VK, Tripathi RP. (2006). Stem cell c-Kit and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation. *Stem Cells & Devel* 15: 755-778.
- Siena S**, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni AM. (1991). Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 77: 400-409.
- Silver P**, Livingston DM. (2001). Self-Excising Retroviral Vectors Encoding the Cre Rekombinase Overcome Cre-Mediated Cellular Toxicity. *Molecular Cell* 8. 233-243.
- Siminovitch L**, McCulloch EA, Till JE. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* 62: 327-336.
- Simmons DL**, Satterwaite AB, Tenen DG, Seed BJ. (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 148: 267-271.
- Simon M**, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. (2005). Constitutive activation of the Wnt/b-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 24: 2410–2420.
- Skokowa J**, Germeshausen M, Zeidler C, Welte K. (2007). Severe congenital neutropenia: inheritance and pathophysiology. *Curr Opin Hematol* 14: 22-28.
- Spangrude GJ**, Heimfeld S, Weissman IL. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241: 58-62.
- Speck NA**, Gilliland DG. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2: 502-513.
- Spradling A**, Drummond-Barbosa D, Kai T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98-104.
- Stier S**, Cheng T, Domlowski D, Carlesso N, Scadden DT. (2002). Notch-1 activation increases HSC self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99: 2369-2378.
- Stier S**, Cheng T, Forkert R, Lutz C, Dombkowski DM, Zhang JL, Scadden DT. (2003). Ex vivo targeting of p21Cip1/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 102: 1260-1266.

Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. (2004). AC133+G0 Cells from Cord Blood Show a High Incidence of Long-Term Culture-Initiating Cells and a Capacity for More Than 100 Million-Fold Amplification of Colony-Forming Cells In Vitro. *Stem Cells* 22: 704-715.

Sun W, Downing JR. (2004). Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs, while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* 104: 3565-3572.

Suzuki A, Andrew D, Gonzalo J, Fukumoto M, Spellberg J, Hashiyama M, Takimoto H, Gerwin N, Webb I, Molineux G, Amakawa G, Tada Y, Wakeham A, Brown J, McNiece I, Ley K, Butcher EC, Suda T, Gutierrez-Ramos JC, Mak TW. (1996). CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein. *Blood* 87:3550-3562.

Templin C, Kotlarz D, Rathinam C, Rudolph C, Schätzlein S, Ramireddy K, Rudolph KL, Schlegelberger B, Klein C, Drexler H. (2008). Establishment of immortalized multipotent hematopoietic progenitor cell lines by retroviral-mediated gene transfer of β -catenin. *Exp Hematol* 36: 204-215.

Tenen DG. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3: 89-101.

Thorsteindottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK. (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 17: 495-505.

Tonks A, Pearn L, Tonks AJ, Pearce L, Hoy T, Phillips S, Fisher J, Dowing JR, Burnett AK, Darley RL. (2003). The AML1-ETO fusion gene promotes extensive self-renewal of human primary erythroid cells. *Blood* 101: 624-632.

Tonks A, Tonks AJ, Pearn L, Pearce L, Hoy T, Couzens S, Fisher J, Burnett AK, Darley RL. (2004). Expression of AML1-ETO in human myelomonocytic cells selectively inhibits granulocytic differentiation and promotes their self-renewal. *Leukemia* 18: 1238-1245.

Townsley FM, Cliffe A, Bienz M. (2004). Pygopus and Legless target Armadillo/ β -Catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* 6: 626-633.

Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K, Nakahata T. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 105: 1013-1021.

Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. (2003). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukaemia. *Blood* 101: 270-277.

Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. (1998). Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood* 92: 3189-3202.

Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. (2005). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* 101: 270-277.

Van Ziffle JA, Baerlocher GM, Lansdorp PM. (2003). Telomere length in subpopulations of human hematopoietic cells. *Stem Cells* 21: 654-660.

- Varnum-Finney B**, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 6: 1278-1281.
- Vaziri H**, Dragowska W, Allsop RC, Thomas TE, Harley CB, Landsorp PM. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9857-9860.
- Verbeek S**, Izon D, Hofhuis F, Robanus-Maandag E, te Riele H, van de Wetering M, Oosterwegel M, Wilson A, MacDonald HR, Clevers H. (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374: 70-74.
- Wang GG**, Cai L, Pasillas MP, Kamps MS. (2007). NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol* 9: 804-812.
- Wang JCY**, Warner JK, Erdmann N, Lansdorp PM, Harrington, Dick JE. (2005). Dissociation of telomerase activity and telomere length maintenance in primitive human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14398-14403.
- Wang Q**, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3444-3449.
- Warner JK**, Wang JC, Takenaka K, Doulatov S, McKenzie JL, Harrington L, Dick JE. (2005). Direct evidence for cooperating genetic events in leukemic transformation of normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 19: 1794-1805.
- Warren R**, Carroll S. (1995). Homeotic genes and diversification of the insect body plan. *Curr Opin Genet Dev* 5: 459-465.
- Weissman IL**, Anderson DJ, Gage F. (2001). Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 387-403.
- Westendorf JJ**, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, Hiebert SW. (1998). The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP- α , inhibits C/EBP- α -dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 18: 322-333.
- Westermann KA**, Leboulch P. (1996). Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8971-8976.
- Widelitz R**. (2004). Regulating the regulators: routing the Wnt- β -Catenin-Lef signals. *J Invest Dermatol* 123: 8-10.
- Wildonger J**, Mann RS. (2005). The t(8; 21) translocation converts AML1 into a constitutive transcriptional repressor. *Development* 132: 2263-72.
- Willert K**, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, Nusse R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423: 448-452.
- Wilson A**, Trumpp A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6: 93-106.
- Wilson A**, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, MacDonald HR, Trumpp A. (2007). Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann NY Acad Sci* 1106: 64-75.
- Xu W**, Kimelman D. (2007). Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 120: 3337-3344.

- Yee JK**, Friedmann T, Burns JC. (1994). Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43: 99-112.
- Yergeau DA**, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marin-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang DE. (1997). Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet* 15: 303-306.
- Yin AH**, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012.
- Yu WM**, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. (2002). Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* 100: 3828-3831.
- Yuan Y**, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10398-10403.
- Yokota T**, Oritani K, Mitsui H, Aoyama K, Ishikawa J, Sugahara H, Matsumura I, Tsai S, Tomiyama Y, Kanakura Y, Matsuzawa Y. (1998). Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains. *Blood* 91: 3263-3272.
- Yui J**, Chiu CP, Lansdorp PM. (1998). Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood* 91: 3255-3262.
- Zanjani ED**, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. (1998). Human bone marrow CD34-cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol* 26: 353-360.
- Zanjani ED**, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. (2003). Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 31: 406-412.
- Zechner D**, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, Birchmeier W, Birchmeier C. (2003). β -Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* 258: 406-418.
- Zhang CC**, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, Lodish HF. (2006). Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12: 240-245.
- Zhang DE**, Hohaus S, Voso MT, Chen HM, Smith LT, Hetherington CJ, Tenen DG. (1996). Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr Top Microbiol Immunol* 211: 137-147.
- Zhang J**, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-841.
- Zhang N**, Shen W, Hawley RG, Lu M. (1999). Hox11 interacts with CTF1 and mediates hematopoietic precursor immortalization. *Oncogene* 18: 2273-2279.
- Zhang P**, Nelson E, Radomska H, Iwasaki-Arai J, Akashi K, Friedman AD, Tenen DG. (2002). Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood* 99: 4406-4412.
- Zhang XB**, Schwartz JL, Humphries R, Kiem HP. (2007). Effects of HOXB4 overexpression on ex vivo expansion and immortalization of hematopoietic cells from different species. *Stem Cells* 25: 2074-2081.

Zhang YW, Bae SC; Huang G, Fu YX, Lu J, Ahn MY, Kanno Y, Kanno T, Ito Y. (1997). A novel transcript encoding an N-terminally truncated AML1/PEBP2-alpha-B protein interferes with transactivation and blocks granulocytic differentiation of 32Dcl3 myeloid cells. *Mol Cell Biol* 17: 4133-4145.

Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, Lagoo A, Reya T. (2007). Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell* 12: 528-541.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. (2001). 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* 7: 1028-1034.

Zhu J, Emerson SG. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21: 3295-3313.

Zhu J, Zhang Y, Joe GJ, Pompetti R, Emerson SG. (2005). NF- κ B activates multiple hematopoietic stem cell (HSC) regulatory genes and promotes HSC self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11728-11733.

Zimmermann F, Rich IN. (1997). Mammalian homeobox B6 expression can be correlated with erythropoietin production sites and erythropoiesis during development, but not with hematopoietic or nonhematopoietic stem cell populations. *Blood* 89: 2723-2735.

Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmüller U, Martens UM. (2004). Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 22: 741-74.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Vereinfachte schematische Darstellung der Hämatopoese im Knochenmark.....	9
Abb. 1.2	Mögliche Schicksale von HSCs nach der Teilung.....	15
Abb. 1.3	Strategien zur <i>ex vivo</i> Expansion von hämatopoetischen Stammzellen.....	21
Abb. 1.4	Die kanonische Wnt-Signalkaskade.....	23
Abb. 1.5	Auswirkung der Fusion von AML1 mit ETO.....	34
Abb. 1.6	Telomerverlängerung durch das Ribonukleoprotein Telomerase.....	39
Abb. 2.1	Schematische Darstellung des MoMLV-Genoms sowie der abgeleiteten Konstrukte als provirale Form nach retroviraler Integration in das Wirtsgenom.....	46
Abb. 2.2	Das Cre/LoxP-System des Bakteriophagen P1.....	50
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der konstitutiven Vektoren.....	71
Abb. 3.2	Durchflusszytometrische Analyse von transduzierten HT1080-Zellen (konstitutive Vektoren).....	73
Abb. 3.3	Nachweis von β -Catenin(Δ) bzw. HOX11 in MBCclG- bzw. MHXclG-transduzierten HT1080-Zellen.....	74
Abb. 3.4	Funktionelle Überprüfung von MhTcl24.....	75
Abb. 3.5	Schematische Darstellung der konditionalen Vektoren.....	76
Abb. 3.6	Durchflusszytometrische Analyse von transduzierten HT1080-Zellen (konditionale Vektoren).....	77
Abb. 3.7	Westernblot zum Nachweis von x β -Catenin(Δ) bzw. xHOX11 in MxBCClGx34- bzw. MxHXclGx34-transduzierten HT1080-Zellen.....	78
Abb. 3.8	Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination mittels FACS-Analyse.....	79
Abb. 3.9	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur komparativen Analyse von sortierten GFP- bzw. GFP+CD24-positiven HSCs bzw. HPCs.....	81
Abb. 3.10	Einfluss von β -Catenin(Δ), HOX11 und AML1-ETO auf die Proliferation von HSCs bzw. HPCs.....	83
Abb. 3.11	Komparative Analyse des Differenzierungspotentials von sortierten GFP-positiven Zellen im Kolonieassay.....	85
Abb. 3.12	Phänotypische Analyse von sortierten GFP-positiven Zellen mittels FACS und Lichtmikroskopie.....	87
Abb. 3.13	Einfluss von hTERT in Kombination mit β -Catenin(Δ), HOX11 oder AML1-ETO auf die Proliferation von HSCs bzw. HPCs.....	89
Abb. 3.14	Komparative Analyse des Differenzierungspotentials von sortierten GFP-positiven Zellen im Vergleich zu GFP- und CD24-positiven Zellen im Kolonieassay.....	90
Abb. 3.15	Phänotypische Analyse von sortierten GFP+CD24-positiven Zellen mittels FACS und Lichtmikroskopie.....	92
Abb. 3.16	Etablierung von HSC- bzw. HPC-Zelllinien aus MFAEIG-transduzierten Zellen.....	94
Abb. 3.17	Generierung von Patientenzelllinien.....	96
Abb. 3.18	Evaluierung des Differenzierungspotentials der Zelllinien.....	99

7 Abkürzungsverzeichnis

Δ	delta (hier: mutiert, konstitutiv aktive Form von β-Catenin)
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AML	akute myeloische Leukämie
AML1-ETO	Fusionsprotein aus AML1 (<i>acute myelogenous leukemia 1</i>) und ETO („ <i>eight twenty one</i> “)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
c-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> (hier: verkürzte Form/tag, Markierung zum Nachweis von ektopisch eingebrachten Proteinen)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	Zelloberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CFU	Kolonie-bildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CLP	gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	gemeinsame myeloide Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
Da	Dalton (relative Molmasse)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
Flt3-L	<i>fetal liver tyrosine kinase 3 ligand</i>
FKS	fetales Kälberserum
FSc	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm
G418	Neomycin
GALV	Hüllprotein des Gibbonaffenleukämievirus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein (hier: <i>enhanced</i>)
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GMP	Vorläuferzelle von Granulozyten und Monozyten (<i>granulocyte monocyte progenitor</i>)
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HOX	Homöobox
HPC	hämatopoetische Vorläuferzelle (<i>hematopoietic progenitor cell</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSC	hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
hTert	humane Telomerase reverse Transkriptase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
κ	Kappa
kb	Kilobasen
KAc	Kaliumacetat
KCL	Kaliumchlorid
L	Liter
LB	Luria-Bertani
Lin	Linien-spezifische Oberflächenmarker

LoxP	34 bp lange Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (<i>locus of x-ing over</i>)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LT-HSC	Langzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle (<i>long term HSC</i>)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
M	Mol pro Liter
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MnCl ₂	Manganchlorid
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MoMLV	Moloney-Mausleukämievirus
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPP	multipotente Vorläuferzelle
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NOD/SCID	<i>nonobese diabetic/severe combined immunodeficient</i>
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	potentia hydrogenium = pH-Wert
pMMP	Plasmid - Moloney-Mausleukämievirus - Myeloproliferativer Sarcomavirus - Primerbindungsstelle
RD114	Hüllprotein des feline endogenen Retrovirus RD114
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SCN	schwere chronische Neutropenie
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sek	Sekunden
s.o.	siehe oben
SSc	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
Std	Stunden
ST-HSC	Kurzzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle (<i>short term HSC</i>)
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TrisHCl	Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VSV-G	Hüllprotein des vesikulären Stomatitisvirus (<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>)
v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
w/w	Masse pro (Gesamt-) Masse
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
Wnt	Namenshybrid aus <i>wingless</i> und <i>int</i> (Synonym: <i>wingless related MMTV integration site</i>)
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

8.1 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Christoph Klein für die Überantwortung des hochaktuellen Forschungsthemas, für die Betreuung dieser Arbeit und für die Erstellung des Gutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferates, das Anfertigen des Gutachtens und die Vertretung meiner Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Walter Müller für seine Hilfsbereitschaft bei den letzten bürokratischen Schritten zur Erlangung des Dr. rer. nat. und für die Teilnahme an meiner Disputation bedanken.

Mein verbindlicher Dank gilt Christina Reimer und Dr. Matthias Ballmaier für das unermüdliche Sortieren von Zellen, die Bereitstellung von Antikörpern und die Rettung in der Not durch Hervorzaubern von Normalspenderknochenmark.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Janet Kaffanke, Dr. Gesa Walsemann und Dr. Frank Sacher für das geduldige und konstruktive Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit bedanken.

Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Schlegelberger für die Durchführung der Chromosomenanalysen, der Arbeitsgruppe Rudolph für die tatkräftige Unterstützung beim TRAP-Assay und der Arbeitsgruppe Baum für die Bereitstellung von Plasmiden & Zellen.

Gedankt sei an dieser Stelle auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des K10s, die mein Leben durch eine Fülle an interessanten Erfahrungen bereichert haben. Vor allem Jana Diestelhorst, Dr. Georg Bohn, Melanie Drenker, Daniel Kotlarz, Anna-Katherina Gatzke, Inga Probst, Dr. Jens Klockgether und Dr. Lutz Wiehlmann haben durch ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihrer Sicht der Dinge zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen.

Für den frühmorgendlichen Shuttleservice, die vielen aufbauenden Worte und ihren unverwechselbaren Humor möchte ich mich bei Inga Sandrock ganz herzlich bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während der letzten Jahre danken.

8.2 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben:

Name: Gesine Köhne

Geburtstag: 20. Juli 1974

Geburtsort: Celle

Adresse: Wittekindstraße 27, 30449 Hannover

Ausbildung:

Juli 1994	Erhalt der allgemeinen Hochschulreife Hermann Billung Gymnasium, Celle
Oktober 1994 - Juni 1995	Studium im Fachbereich Biologie Phillipps-Universität, Marburg
Oktober 1995 - Juni 2001	Studium im Fachbereich Biologie Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
September 1998 - Juni 1999	Auslandsstudium (DAAD) Northeastern University, Boston, MA, USA
Oktober 2000 - Juni 2001	Diplomarbeit AdnaGen AG, Hannover <i>Thema: „Etablierung einer Methode zur VDR-Genotypisierung – Bestimmung einer genetisch bedingten Osteoporose-Prädisposition“</i>
19. Juli 2001	Erhalt des Hochschulgrades „Diplom-Biologin“ Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
Juli 2001 bis Juli 2008	Promotionsstudiengang im Fachbereich Biologie Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
Juli 2001 bis Juli 2008	Anfertigung der Promotionsarbeit Medizinische Hochschule, Hannover Klinik für Kinderheilkunde Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie Prof. Dr. Karl Welte, AG Prof. Dr. Christoph Klein <i>Thema: „Komparative Analyse von definierten genetischen Elementen zur Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen“</i>

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation mit dem Titel „**Komparative Analyse von definierten genetischen Elementen zur Expansion von humanen hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen**“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 29. Mai 2008

Gesine Köhne