

**HOXB4-vermittelte Herstellung und Expansion  
muriner hämatopoetischer Stammzellen *in vitro*,  
zur dauerhaften Rekonstitution  
immunkompetenter Mäuse**

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

genehmigte Dissertation  
von

**Dipl.-Biol. Dietrich Armin Lesinski**

geboren am 21.02.1979 in Blankenburg (Harz)

2011

Referent: Prof. Dr. med. Christopher Baum  
Korreferent: Prof. Dr. rer. biol. hum. Roland Jacobs  
Tag der Promotion: 30. 06 .2011

**Meiner Oma Ilse**

Danke, für die vielen Jahre der irdischen Unterstützung  
und Deinen nun fortwährenden himmlischen Beistand





Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,  
wieder wegzuwerfen.  
Albert Einstein

Die Forschungsarbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Abteilung für Experimentelle Hämatologie (Leitung Prof. Christopher Baum) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Das Projekt ist eingegliedert in die Arbeitsgruppe Differenzierung des Exzellenzclusters Rebirth (From **R**egenerative **B**iology to **R**econstructive **T**herapy)

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und gekennzeichneten Quellen benutzt wurden. Ich versichere weiterhin, dass alle zu Hilfe gezogenen Institutionen benannt worden sind.

Diese Arbeit wurde weder als Masterarbeit, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht, noch irgendeiner anderen Hochschule als Dissertation vorgelegt.

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1	Embryonale und induziert pluripotente Stammzellen (ESZ & iPS)	6
3.2	Die Hämatopoese der Maus	9
3.2.1	Primitive und definitive Hämatopoese <i>in vivo</i>	9
3.2.2	Hämatopoetische Stammzellen (HSZ)	11
3.2.3	Nachbildung der murinen, embryonalen Hämatopoese <i>in vitro</i>	16
3.3	Zytokine und andere Faktoren in der Kultur von ESZ und den von ihnen abgeleiteten hämatopoetischen Zellen (ESZ-HZ)	17
3.3.1	Unterschiedliche Zytokincocktails zur <i>in vitro</i> Expansion von ESZ-HZ	18
3.3.2	Interleukin-3 (IL3)	19
3.3.3	Interleukin-6 (IL6)	19
3.3.4	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (IGF-1)	20
3.3.5	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-2 (IGF-2)	21
3.3.6	Insulinähnlichen Wachstumsfaktor bindendes Protein-2 (IGFBP-2)	21
3.3.7	Stammzellfaktor (SCF)	22
3.3.8	Thrombopoietin (TPO)	23
3.3.9	Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF)	23
3.3.10	Angiopoietinähnlicher Faktor-5 (Angptl5)	24
3.3.11	<i>FMS</i> ähnliche Tyrosinkinase-3-Ligand (Flt3L)	25
3.3.12	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)	25
3.3.13	Activin A	26
3.3.14	Knochenmorphogenes Protein-4 (BMP4)	27
3.3.15	Leukämie inhibierender Faktor (LIF)	27
3.3.16	Dexamethason (DEX)	28
3.3.17	Heparin	29
3.4	HOX-Transkriptionsfaktoren	29
3.4.1	<i>HOXB4</i>	30
3.5	Immunsystem und Transplantation	33
3.5.1	Natürliche Killerzellen (NKZ) der Maus	34
3.5.2	Der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I (MHC-I)	36
3.5.3	Das murine Cytomegalievirus (mCMV) und sein MHC-I-Mimetikum m144	38
3.6	Genetische Manipulation mittels retroviraler Vektoren	39

3.7	Zielsetzungen dieser Arbeit	41
<b>4.</b>	<b>Materialien</b>	<b>43</b>
4.1	Versuchstiere	43
4.2	Chemikalien	43
4.3	Enzyme und biologische Substanzen	44
	4.3.1 Antikörper	46
	4.3.2 Primer	48
	4.3.3 Zytokine	50
4.4	Zelllinien	51
4.5	Zellkultumediten und Zusätze	51
4.6	Radioaktive Substanzen	52
4.7	<i>Escherichia coli (E.coli)</i> Stämme	52
4.8	Plasmide	53
4.9	Stammlösungen, Puffer und Kits	53
4.10	Verbrauchsmaterialien	55
4.11	Geräte	56
4.12	Software	58
<b>5.</b>	<b>Methoden</b>	<b>60</b>
5.1	Tierversuche	60
	5.1.1 Haltung und Zucht	60
	5.1.2 Bestrahlung von Versuchstieren	60
	5.1.3 Gewinnung von Kompetitorzellen (inkl. Depletion Sca-1+ Zellen)	61
	5.1.4 Transplantation und Verlaufskontrolle	61
	5.1.5 Zwischen- und Endanalysen	62
5.2	Zellkultur	63
	5.2.1 Kultur muriner embryonaler Stammzellen (ESZ)	63
	5.2.2 Transduktion von ESZ mit retroviralen Partikeln	63
	5.2.3 Zellsortierung am Durchflusszytometer	64
	5.2.4 Expansion von ESZ-Einzelzellklonen	64
	5.2.5 Hämatopoetische „Embryoid Body“- (EB) Differenzierung von ESZ	65
	5.2.6 Kultur und Expansion ESZ-abgeleiteter hämatopoetischer Zellen (ESZ-HZ)	66
	5.2.7 Generierung und Kultivierung von murinen induziert pluripotenten Stammzell-Klonen (iPS)	68

5.2.8	Herstellung von murinem Leukämie inhibierenden Faktor (mLIF) als konditionierter Zellkulturüberstand	68
5.2.9	Zentrifugation von Zellen auf Objektträger (Shandon-Cytospin)	69
5.2.10	May-Grünwald-GIEMSA-Färbung	69
5.2.11	Hämatopoetischer Kolonieformierungsassay (CFU-Assay)	69
5.2.12	Durchflusszytometrische Analysen (FACS)	70
5.3	Herstellung von retroviralen Partikeln	71
5.3.1	Transfektion von 293T-Verpackungszellen per Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation	71
5.3.2	Ernte der Viruspartikel	72
5.3.3	Aufkonzentration der virushaltigen Zellkulturüberstände	72
5.3.4	Titration der virushaltigen Zellkulturüberstände	73
5.4	Natürliche Killerzellen (NKZ)-Toxizitätsassay	73
5.4.1	Gewinnung primärer NKZ aus Mausmilzen	73
5.4.2	Expansion und Aktivierung der primären NKZ	74
5.4.3	<sup>51</sup> Cr- Freisetzungsassay	74
5.5	Molekularbiologische Arbeiten	75
5.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	75
5.5.2	Quantitative PCR	76
5.5.3	Ligationsvermittelte PCR (LM-PCR)	77
5.5.4	Klonierungen	77
5.5.5	Die Klonierung von SRS11-SF m144fusmCherry.PRE im Detail	77
5.5.6	Southern Blot	81
5.5.7	Sequenzierungen	83
5.5.8	Transformation von <i>E.coli</i>	84
5.5.9	Präparation genomischer DNA (gDNS)	84
5.5.10	Präparation von Metaphasechromosomen	84
5.5.11	Spektrale Karyotypisierung (SKY)	85
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>87</b>
6.1	Charakterisierung des konstitutiv HOXB4 exprimierenden embryonalen Stammzell-Klons 8 als Ausgangszelllinie für die hämatopoetische Differenzierung	87
6.2	Generierung ESZ-abgeleiteter hämatopoetischer Zellen (ESZ-HZ) unter Serumbedingungen	92
6.2.1	STD-SF-Zytokinbedingungen expandieren ESZ-HZ robuster als STIF-A5-SF-Bedingungen	94

6.2.2	Transplantierte ESZ-HZ der STD-SF und STIF-A5-SF-Expansionen erzielen Multiliniengraftment in Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäusen	98
6.2.3	Sekundäre Transplantation (sek.Tx)	101
6.3	Neugestaltung des Differenzierungs- und Expansionsverfahrens	102
6.3.1	Die serumfreie EB-Differenzierung forciert die hämatopoetische Entwicklung stärker als die EB-Differenzierung unter Serum	102
6.3.2	Die Kultivierung der ESZ-HZ auf Stromazellen unter normoxischen Bedingungen führt nur in einer aufeinanderfolgenden Kokultivierung mit AFT024 und OP9 zu einer verstärkten HSPZ-Expansion	108
6.3.3	ESZ-HZ Expansionsen unter reduziertem Sauerstoffniveau (5% [v/v]) führen zu einer veränderten HPSZ-Frequenz	115
6.3.4	Verlängerte Expansionsphasen sind trotz verschiedenster Zytokin- und Kulturbedingungen nur bedingt HSPZ-proliferationsfördernd	119
6.4	Induziert pluripotente Stammzellen (iPS) lassen sich serumfrei EB-differenzieren und mittels STFV-S expandieren	126
6.5	Überwindung der NKZ-vermittelten Transplantatabstoßung	129
6.5.1	Klonierung eines MHC-I-Mimetikum-Expressionsvektors	129
6.5.2	ESZ aber nicht ESZ-HZ sind NKZ-Ziel <i>in vitro</i>	131
6.5.3	ESZ-HZ sind immunkompetent, sie exprimieren MHC-I	133
6.6	Transplantierte ESZ-HZ repopulieren immunkompetente Rezipienten	134
6.7	Generierung von Tet-on regulierbaren HOXB4-ESZ-Klonen	146
6.7.1	All-in-one Vector	146
6.7.2	Retrovirale Transduktion	147
6.7.3	Einzelzellsortierung, Expansion und Klonstatistik	149
6.7.4	Integrationsstellenanalyse	152
6.8	HOXB4 wird während der EB-Differenzierung nicht benötigt, ist aber für die hämatopoetische Entwicklung in der Expansionsphase essentiell	153
<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>158</b>
7.1	ESZ-HSPZ sind immunphänotypisch CD41 <sup>hi</sup> ckit <sup>+</sup> CD34-	159
7.2	Die serumfreie, zytokingesteuerte EB-Differenzierung forciert die hämatopoetische Entwicklung	160
7.3	Die Frequenz der ESZ-HSPZ ist modulierbar durch die Kombination von Expansionssystem, Expansionsdauer und gewähltem Sauerstoffpartialdruck	162

7.4	ESZ-HZ werden nicht von natürlichen Killerzellen (NKZ) abgestoßen, und vermitteln in immunkompetenten Rezipienten eine dauerhafte Multiliniien-Repopulation	165
7.5	Die HOXB4-Überexpression wird im EB nicht benötigt, ist aber für die ESZ-HZ-Expansion essentiell	169
7.6	Hämatopoetisch differenzierte iPS als neue Quelle für Zelltherapien?	170
7.7	Ausblick	171
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>174</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>200</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis	200
9.2	Curriculum vitae	204
9.3	Publikationsliste	205
9.4	Danksagung	206

## 1. Zusammenfassung

Pluripotente Stammzellen, wie z.B. embryonale Stammzellen (ESZ), besitzen die einzigartige Fähigkeit sich in jede der ca. 200 Zelltypen des Säugerorganismus entwickeln zu können. Damit fanden sie auch Verwendung für die *in vitro*-Herstellung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (ESZ-HSPZ). Die ähnliche Kinetik und hämatopoetischen Charakteristika der *in vitro*- und *in vivo*-Entwicklung ermöglichten einen detaillierten Einblick in die embryonale Hämatopoese *in vivo*. Die Generierung von induziert pluripotenten Stammzellen (iPS) und deren gerichtete hämatopoetische Entwicklung *in vitro*, bietet nun die außergewöhnliche Möglichkeit *in vitro* generierte hämatopoetische Stammzellen (HSZ) für eine auf den einzelnen Patienten zugeschnittene Zell- und Gentherapie einzusetzen. Jedoch müssen die Protokolle für die *in vitro*-Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Langzeit-multilinenrepopulierenden HSZ (LT-HSZ) sowie deren Expansion weiter verbessert werden, um signifikante Zahlen transplantationsfähiger LT-HSZ zu generieren. Auch die Verwendung des humanen Homöobox-Transkriptionsfaktors HOXB4, dessen ektopische Expression die Generierung Langzeit-repopulierender HSZ aus pluripotenten Stammzellen unterstützt, und murinen HSZ *in vivo* und *in vitro* einen deutlichen Wachstumsvorteil verleiht, führte bisher nur zu niedrigen HSZ-Frequenzen. Eine Reifung zu knochenmarkähnlichen Stammzellen konnte bisher auch noch nicht erreicht werden.

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, die Identität der HSPZ in der Mischung der ESZ-abgeleiteten hämatopoetischen Zellen zu eruieren. Des Weiteren sollte die Ausbeute und der Reifegrad der ESZ-HSPZ in einem möglichst stroma- und serumfreien Kultursystem *in vitro* erhöht werden. Mittels derart generierter ESZ-HSPZ sollten dann letal bestrahlte immunkompetente Empfängermäuse dauerhaft hämatopoetisch rekonstituiert werden. Durch die Verwendung einer Tet-regulierbaren HOXB4-Expression in Einzelzellklonen wollten wir zusätzlich die Frage klären, zu welchem Zeitpunkt der *in vitro*-Differenzierung HOXB4 für die Unterstützung der hämatopoetischen Entwicklung benötigt wird. Wir haben detailliert die Oberflächenmarker die mit der hämatopoetischen Entwicklung assoziiert sind untersucht und konnten die kürzlich von der Arbeitsgruppe um George Daley publizierte CD41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> Subpopulation als die ESZ-HSPZ-Fraktion bestätigen. Ihre Frequenz korrelierte mit dem erreichten Langzeit-chimärismus im Peripherblut der 129S6/SvEvTac-Empfängermäuse. Es wurde mehrfach in der Literatur beschrieben, dass ESZ-Derivate, wie beispielsweise die ESZ-HZ, nach einer Transplantation in immunkompetente Empfänger von natürlichen Killerzellen (NKZ) abgestoßen werden. Als Ursache für diese Abstoßung wurde die geringe oder gänzlich fehlende MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche der ESZ-HZ eruiert. Wir konnten hingegen zeigen, dass ESZ-HZ aus unseren verbesserten Differenzierungs- und Expansionsprotokollen vollständig MHC-I-kompetent sind und daher weder *in vitro* von aktivierten NKZ lysiert noch *in vivo* abgestoßen werden. Die schrittweise zytokingesteuerte



„Embryoid-Body“ (EB)-Differenzierung unter reduziertem Sauerstoffniveau (5% [v/v]) forcierte die hämatopoetische Entwicklung. Die Expansion dissoziierter EB-Zellen auf OP9-Stromazellen unter reduziertem Sauerstoffniveau führte zu einer Stammzellfrequenz von mindestens einer LT-HSZ in  $1 \times 10^5$  ESZ-HZ bzw. in 8330 CD41hi ckit+ CD34- Zellen. Diese Frequenzen konnten in einer stromafreien Suspensionskultur, allein unter den Zytokinbedingungen der Kokultur, weiter gesteigert werden. Die erfolgreiche Übertragung dieser Expansionskondition in serumfreie Bedingungen resultierte in einer weiter gesteigerten HSPZ-Frequenz und einer bisher unerreichten Ausreifung der gesamten Kultur. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass HOXB4 während der EB-Differenzierung nicht nur nicht benötigt wird, sondern dass sogar ein posttranskriptioneller Gegenregulationsmechanismus aktiviert wurde. Die Induktion der HOXB4-Expression, zwei Tage nach der EB-Dissoziation (ESZ-HZ d2), erzielte in der Expansion eine vergleichbare hämatopoetische Entwicklung der ESZ-HZ wie zeitiger induzierte Ansätze. Um eine optimale Generierung der ESZ-HSPZ zu gewährleisten sollte die HOXB4-Expression allerdings an EB d5 induziert werden.

Zusammengenommen haben wir serum- und stromafreie Differenzierungs- und Expansionsbedingungen etabliert, die es ermöglichen transplantationsrelevante Mengen an LT-HSZ aus pluripotenten Stammzellen zu generieren. Diese LZ-HSZ sind überdies in der Lage immunkompetente Mäuse dauerhaft in allen Linien zu rekonstituieren. Damit könnten unsere Protokolle zur Entwicklung effizienterer und sicherer Zell- und Gentherapieprotokolle beitragen.

**Schlüsselwörter:** HOXB4, *in vitro* Differenzierung, embryonale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, LT-HSZ, HSPZ, ESZ-HSZ, iPS, immunkompetente Mäuse, stromafrei, serumfrei, transiente Expression, Tet-System

## 2. Abstract

Pluripotent stem cells, such as embryonic stem cells (ESCs), possess the unique capacity to form every one of the more than 200 different cell types of the mammalian body. Their use in the *in vitro* generation of hematopoietic stem- and progenitor cells provides detailed insight into embryonic hematopoieses, *in vivo*, due to the similar kinetics and hallmarks of hematopoietic development *in vivo* and *in vitro*. Induction of pluripotent stem cells and their directed hematopoietic development *in vitro*, holds great promise for future patient-tailored gene- and cell therapy. However, protocols for the generation of multilineage, long-term repopulating hematopoietic stem cells (LT-HSCs) in differentiating embryoid bodies (EBs) and their subsequent expansion up to numbers sufficient for transplantation need to be substantially improved. Despite use of ectopic expression of the human homeodomain transcription factor HOXB4, which supports the *in vitro* generation of long-term repopulating HSCs from pluripotent ESCs, and mediates a competitive growth advantage to mouse HSCs *in vitro* and *in vivo*, the HSC frequency is very low. Also complete development to a bone marrow corresponding type of HSC has not yet been achieved. In this study we aimed to identify the stem- and progenitor cells (HSPC) within the mixture of differentiated ESC progenies, enhance their maturation and frequency, ideally in a serum- and co-culture independent manner, in order to reconstitute lethally irradiated immunocompetent recipients long-term. Using a tet-on-based regulable HOXB4 expression system in single cell clones, we also addressed the question in which time frame HOXB4 expression is needed to promote *in vitro* hematopoietic development. We carefully followed the expression of surface markers known to be associated with hematopoiesis *in vivo*, and could confirm that the CD41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> subpopulation contains the HSPC activity as previously published by the group of George Daley. The size of this subpopulation correlated with long-term peripheral blood chimerism in recipient mice. So far it has been reported that ESC derived HSPCs are rejected by NK cells after transplantation in immunocompetent mice, due to strongly reduced or absent MHC class-I expression, supporting the notion that these cells have not completely matured to an adult type of HSCs *in vitro*. However, we have shown that HSPCs generated by our improved differentiation- and expansion protocols are fully MHC class-I competent, and are therefore neither lysed by activated NK cells *in vitro* nor rejected *in vivo*. Stepwise serum-free EB-differentiation in low oxygen (5% [v/v]) strongly directed developing EBs towards the hematopoietic lineage. Expansion of dissociated EB-cells on OP9 stromal cells under low oxygen resulted in at least one LT-HSC in  $1 \times 10^5$  ESC-HC or 8330 CD41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> cells. Frequencies were further enhanced in stromal-free culture using co-cultivation cytokine conditions alone. The successful translation to stromal-free culture and serum-free conditions resulted in even higher HSPC content and maturation of the whole culture. Additionally, we showed that HOXB4-overexpression is not required during EB-differentiation. We in fact documented the

posttranscriptional downregulation of HOXB4/GFP-expression in fully viable ESC-HC-culture. Sufficient hematopoietic development was still achieved by activation of HOXB4-overexpression two days after EB-dissociation, but strongest *in vitro* HSPC activity was achieved by inducing overexpression at EB d5.

In summary, we have established serum- and stromal-free conditions allowing for the generation of significant numbers of mature LT-HSCs from pluripotent stem cells, which are capable of engrafting fully immunocompetent recipient mice long term. Thus, our results may contribute to the development of more efficient and safer cell- and gene therapy protocols.

**Keywords:** HOXB4, *in vitro* differentiation, embryonic stem cells, hematopoietic stem cells, LT-HSC, HPSC, ESC-HSC, iPS, multilineage engraftment, immunocompetent mice, feeder free, serum free, stromal free, transient expression, tet-system

### 3. Einleitung

Aufgrund der großen Zahl hämatopoetischer Störungen und Erkrankungen, wie z.B. Leukämien, Anämien sowie angeborenen Immunschwächen sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) in den Fokus der klinischen Forschung gelangt. Zwei Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen sind dabei von besonderem Interesse. 1. ihre Fähigkeit der lebenslangen Selbsterneuerung und 2. ihre Fähigkeit jeden Blutzelltyp bilden zu können und damit die Möglichkeit das gesamte Blut und den zellulären Anteil des Immunsystems neu bilden zu können. Zurzeit ist die allogene Stammzelltransplantation die einzige Möglichkeit das hämatopoetische System eines Patienten langfristig wieder herzustellen. Doch gewebeverträgliche Stammzellspender sind rar, daher ist die Forschung bemüht alternative Quellen zu erschließen. Die Transplantation aufgereinigter Nabelschnurblutstammzellen ist so eine neue Quelle, doch auch hier sind sowohl die Anzahl der zur Verfügung stehenden Transplantate gering, als auch die in ihnen enthaltenen Stammzellen. Die Steigerung des Stammzellgehalts *in vitro* in diesen Transplantaten soll deren Effizienz erhöhen. Am unabhängigsten wären solche Therapien aber, wenn man HSZ effizient vollständig *in vitro* generieren könnte. Solche aus pluripotenten Stammzellen differenzierten HSZ bringen noch weitere Vorteile mit. Die Korrektur krankheitsursächlicher Einzelgenedefekte beispielsweise, könnte bereits im pluripotenten Ausgangsmaterial vorgenommen werden. Diese pluripotenten Stammzellen waren bisher die vom ethischen Standpunkt her kritischen, embryonalen Stammzellen. Doch mit der erfolgreichen Rückverwandlung von differenzierten Körperzellen zu induziert pluripotenten Stammzellen stehen erstmals ohne die Verwendung von Embryonen pluripotente Stammzellen zur Verfügung. Ihr weiterer großer Vorteil liegt darin, dass der Empfänger der *in vitro* generierten HSZ der Spender das Differenzierungsausgangsmaterials sein kann. Damit wäre eine 100%ige Gewebeverträglichkeit gesichert, die eine lebenslange Immunsuppression unnötig machen würde. Große Fortschritte sind auf dem Bereich der *in vitro* Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu hämatopoetischen Stammzellen erreicht worden. Diese Forschungen haben bereits zu einem detaillierten Verständnis der embryonalen und adulten Hämatopoese beigetragen sowie Einblicke in die Entstehung und Entwicklung pathologischer Zustände ermöglicht. Dennoch sind weitere Verbesserungen nötig, bevor solche *in vitro* generierten HSZ in der regenerativen Medizin eingesetzt werden können.

### 3.1 Embryonale und induziert pluripotente Stammzellen (ESZ & iPS)

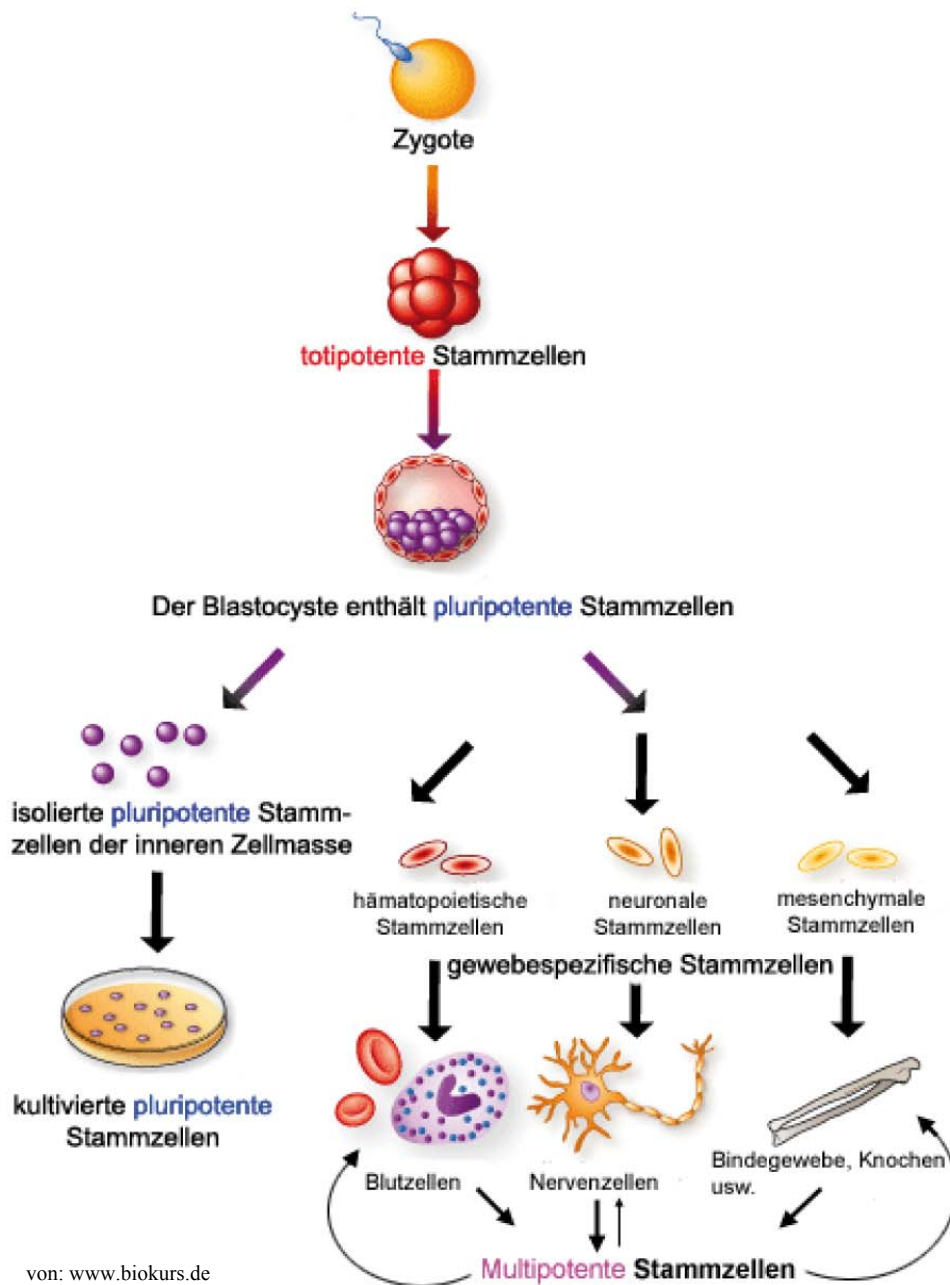
Embryonale Stammzellen (ESZ) entstammen der inneren Zellmasse von Blastozysten (Beddington und Robertson, 1989) (Abb. 3.1 A). Bereits vor ca. 30 Jahren wurden die ersten murinen ESZ isoliert und kultiviert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981; Doetschman *et al.*, 1985), 1998 die ersten humanen ESZ von James Thomson (Thomson *et al.*, 1998). Die mittlerweile große Anzahl an verschiedenen ESZ-Linien werden für die unterschiedlichsten Projekte der Grundlagenforschung verwendet. Denn so wie sich der pluripotente Anteil der inneren Zellmasse in alle Gewebe der drei Keimblätter entwickeln kann, besitzen auch die *in vitro* kultivierten ESZ diese einzigartige Fähigkeit (Bradley *et al.*, 1984; Rohwedel *et al.*, 2001; Wobus, 2001; Bishop *et al.*, 2002). ESZ lassen sich selbst in Keimzellen differenzieren (Hubner *et al.*, 2003), ausgenommen des extraembryonalen Gewebes, sie sind daher alleine nicht in der Lage einen neuen Embryo zu bilden. Allerdings sind gerade murine ESZ relativ leicht genetisch modifizierbar und werden daher nicht nur für *in vitro*-Studien (Nishikawa *et al.*, 2007) sondern auch zur Generierung von transgenen Mäusen (Kock-Out-, Knock-In Mäusen) verwendet (Thomas und Capecchi, 1987), mittels derer sich beispielweise die Embryonalentwicklung, Genexpressionseinflüsse, Signalwege, Differenzierungsabläufe und menschliche Krankheitsmodelle *in vivo* untersuchen lassen. ESZ zeichnen sich morphologisch durch ein hohes Kern-Zytoplasmaverhältnis aus. Sie besitzen eine hohe alkalische Phosphataseaktivität (Resnick *et al.*, 1992) und exprimieren Keimzellmarker wie z.B. Oct-4 (Scholer *et al.*, 1989; Wobus *et al.*, 2001) und „stage specific embryonic antigen-1“ (Stadium spezifisches, embryonales Antigen-1 – SSEA-1) (Solter und Knowles, 1978), sowie eine Vielzahl weiterer Pluripotenzmarker. ESZ haben den weiteren Vorteil, dass sie in der Blastozyste leicht „auffindbar“ sind, im Gegensatz zu den zell-/organspezifischen adulten Stammzellen, die sich häufig nur sehr begrenzt undifferenziert *in vitro* kultivieren lassen. Die Kultur und undifferenzierte Expansion der ESZ gelingt in den meisten Fällen problemlos und im Gegensatz zu Tumorzelllinien behalten ESZ gewöhnlich auch nach vielen Passagen einen normalen Karyotyp. Um *in vitro* die pluripotenten Eigenschaften der undifferenzierten murinen ESZ zu erhalten, werden sie unter Zugabe von „leukemia inhibitory factor“ (Leukämie inhibierender Faktor - LIF) bzw. auf Stromazellen (im Weiteren als Feeder bezeichnet) kultiviert die LIF generieren und in das Medium sezernieren, wie z.B. primäre, embryonale Fibroblasten. LIF inhibiert effizient die Differenzierung von ESZ über STAT3-Aktivierung und unterstützt so die Selbsterneuerung (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988; Pease *et al.*, 1990) (Abb. 3.1 B).

Die Verwendung von ESZ-Linien für therapeutische Zwecke ist allerdings problematisch, da Spender und Empfänger niemals ein und dasselbe Individuum sein können. Hier muss für differenzierte, transplantierbare ESZ-Derivate eine Gewebeverträglichkeit mit dem Empfänger sichergestellt werden sowie eine Immunsuppression des Empfängers herbeigeführt werden. Dies stellt starke Einschränkungen dar, die besonders im humanen Kontext unerwünscht sind. Eine künstliche Gewebeübereinstimmung von

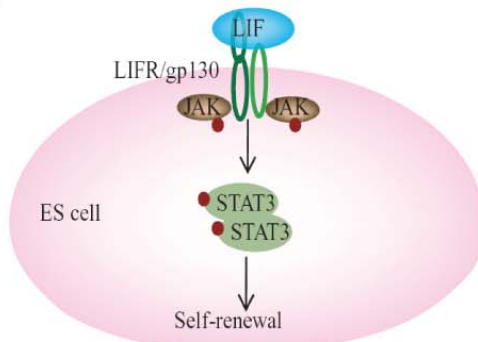
generierten ESZ zum Empfänger konnte Mitte der 90er Jahre durch die neuartige Methode des somatischen Kerntransfers in entkernte Eizellen (Wilmut *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1998) geschaffen werden. Diese geklonten Zygoten ließ man sich zu Blastozysten entwickeln, aus deren innerer Zellmasse die so genannten „*nuclear-transfer*“-ESZ (ntESZ) gewonnen werden konnten (Munsie *et al.*, 2000; Wakayama *et al.*, 2001). Auch dieser Ansatz stellt für die translationale Anwendung im humanen System keine Alternative dar, da neben weiterhin bestehenden technischen Schwierigkeiten bei der ntESZ-Gewinnung die Embryonenschutzgesetze der meisten Länder die gezielte Herstellung von Embryonen zur ESZ-Gewinnung, einschließlich durch therapeutisches Klonen, verbieten. Daher lag und liegt ein Fokus der Forschung auf der Etablierung von ESZ-Alternativen.

In den letzten 20 Jahren konnte gezeigt werden, dass sich differenzierte Zellen wieder dedifferenzieren und sich bestimmte Zelltypen in andere Zellen transdifferenzieren lassen (Bjornson *et al.*, 1999; Mezey *et al.*, 2000; Toma *et al.*, 2001). Doch der wirklich durchschlagende Erfolg in der Suche nach ESZ-Alternativen gelang, als Yamanaka 2006 die ersten induzierten, pluripotenten Stammzellen (iPS) herstellte. Mittels dieser noch jungen Alternative werden verschiedene somatische Zellen durch eine Überexpression einer Genkombination wieder in einen undifferenzierten und pluripotenten Status zurück versetzt. Im Jahr 2006 benutzten Yamanaka und Kollegen dafür die retrovirale Überexpression von SOX2, Klf4, Oct-4 und cMyc (Takahashi und Yamanaka, 2006). Eine dauerhafte Veränderung des Erbguts durch Integrationen von Transgenen birgt das Risiko der Insertionsmutagenese (Dang *et al.*, 2002). Zusätzlich sind c-Myc und Klf4 selbst Protoonkogene. Daher sind die Bestrebungen alternative Reprogrammierungstechniken zu entwickeln groß. Erfolgreich wurden iPS-Zellen bereits ohne cMyc generiert (Nakagawa *et al.*, 2008). Weiterhin konnten mittels nur eines Reprogrammierungsfaktors (Oct-4) adulte, neuronale Stammzellen reprogrammiert werden, da sie SOX2, KLF4 und cMYC endogen exprimieren (Kim *et al.*, 2009). Nicht-virale Expressionsvektoren, die nach erfolgreicher Reprogrammierung wieder aus dem Genom entfernt werden können (Kaji *et al.*, 2009), sowie die nicht integrative Reprogrammierung mittels des piggy-bac-Transposons (Yusa *et al.*, 2009) ermöglichten letztendlich völlig transgenfreie iPS-Zellen. Generierte iPS-Zellen können anschließend wieder in jedes somatische Gewebe differenziert werden. Ihr großer Vorteil liegt darin, dass Spender und Empfänger nun eine Person sein können und somit keine immunologischen Risiken zu erwarten sind. Allerdings müssen diese Zellen erst detailliert charakterisiert werden und Selbsterneuerung sowie Differenzierung völlig verstanden sein, um solche Zellen ohne Tumorrisiko transplantieren zu können.

A



B



**Abb. 3.1 (A) Der *in vivo* und *in vitro* Weg der embryonalen Stammzellen (ESZ). (B) Der Leukämie inhibierende Faktor induziert über den JAK/STAT-Signalweg die Selbsterneuerung *in vitro* kultiverter ESZ.**

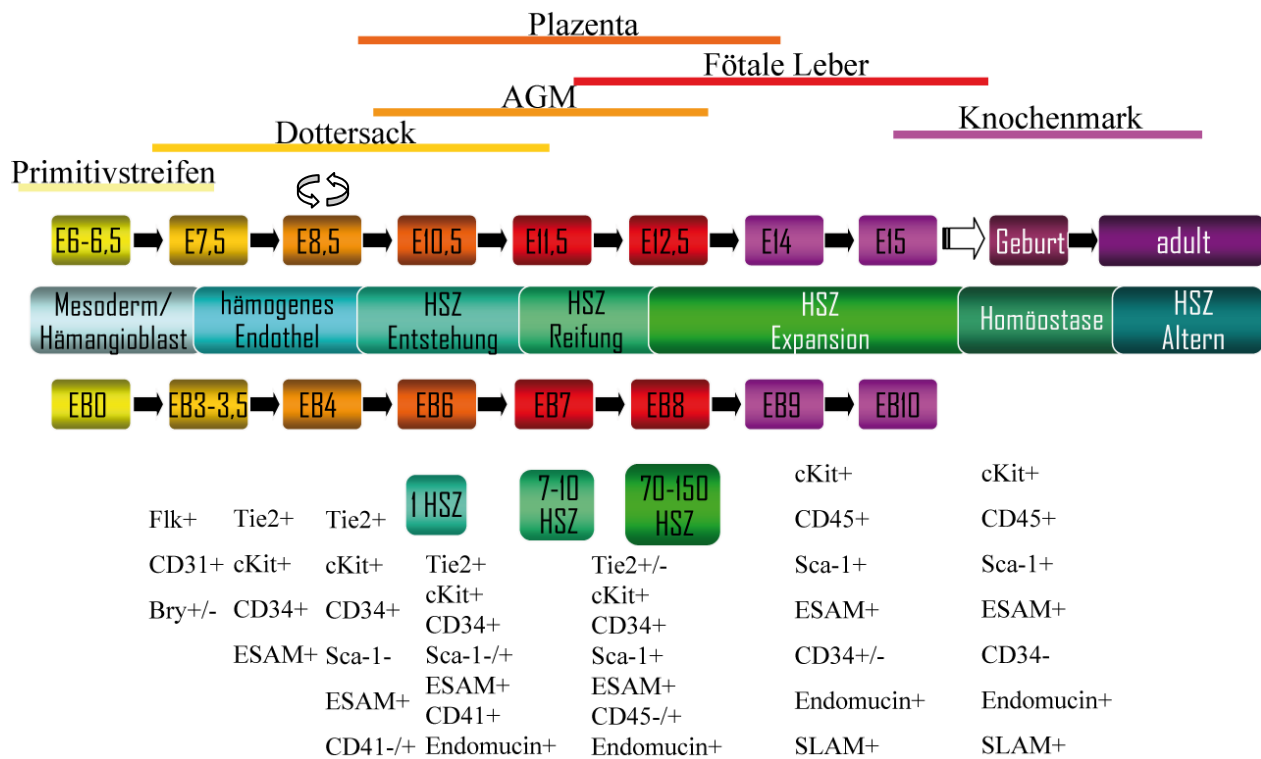
## 3.2 Die Hämatopoese der Maus

### 3.2.1 Primitive und definitive Hämatopoese *in vivo*

Die Hämatopoese (Blutbildung) beginnt bei den Wirbeltieren im Dottersack (Moore und Metcalf, 1970; Risau und Flamme, 1995). Siebeneinhalb Tage nach der Befruchtung entstehen aus extraembryonalen, mesodermalen Zellen so genannte Blutinseln. Bei den Blutinseln handelt es sich um Zellaggregate von Hämangioblasten (Sabin, 1920) die in der Peripherie Angioblasten und in den inneren Bereichen primitive, kernhaltige, erythropoetische Zellen enthalten. Aus diesen Zellaggregaten entstehen erste versorgende Gefäße (Hatzopoulos *et al.*, 1998; Palis *et al.*, 1999). Neben den primitiven Erythrozyten befinden sich im Dottersack auch primitive Makrophagen (Keller *et al.*, 1993; Bonifer *et al.*, 1998), und es gibt eine primitive Megakaryopoese (Maximow, 1909; Xu *et al.*, 2001). Eine Spezifizierung von Hämangioblastenzellen zu hämogenem Endothel bildet die Basis für ein größeres Spektrum primitiver hämatopoetischer Zellen (Lancrin *et al.*, 2009). In dieser Phase der primitiven Hämatopoese konnten E9,0 (Embryonaltag 9 = 9 Tage nach Befruchtung) im Dottersack und auch in der intraembryonalen, para-aortischen Splanchnopleura-Region (P-Sp) des sich entwickelnden Embryos bereits hämatopoetische Stammzellen (HSZ) nachgewiesen werden, die nach Transplantation (Tx) in neugeborene Mäusen dort alle reifen Blutlinien bilden können (Yoder *et al.*, 1997). Aber die Fähigkeit adulte Tiere zu repopulieren (alle Blutlinien wiederherstellen) haben erst HSZ, die ab E10,5 in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM) gebildet werden (Muller *et al.*, 1994; Cumano *et al.*, 1996; Medvinsky und Dzierzak, 1996; Jaffredo *et al.*, 2005). Die AGM, die sich während der Organogenese teilweise aus der P-Sp entwickelt, enthält Vorläuferzellen (HPZ) des multipotenten, adulten Typs (CFU-S = spleen colony forming unit) (Medvinsky *et al.*, 1993) sowie erste pluripotente hämatopoetische Langzeit-selbsterneuernde Stammzellen (LT-HSZ) (Medvinsky und Dzierzak, 1996). Letztere haben ihren Ursprung nicht mehr in Hämangioblasten, sondern werden vom hämogenen Endothel (besteht aus bipotenten Zellen, welche endothelial und hämatopoetisch differenzieren können) gebildet (Garcia-Porrero *et al.*, 1998; de Bruijn *et al.*, 2002; Kumano *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2007; Zambidis *et al.*, 2007). Dies ist der Initiationszeitpunkt und -ort der definitiven Hämatopoese. Bis E11,5 nehmen die HSPZ in der AGM und im Dottersack weiter zu, danach wieder ab und sind dort E13 nicht mehr nachweisbar (Moore und Metcalf, 1970; Muller *et al.*, 1994; Garcia-Porrero *et al.*, 1995; Godin *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass der Grund ein "Auswandern" der HSPZ aus diesen Regionen über den Blutstrom hin zur fetalen Leber ist (Medvinsky und Dzierzak, 1996; Kumaravelu *et al.*, 2002). Ab E11,5 beginnt die HSZ-Besiedlung der fetalen Leber mit einer exponentiellen Vermehrung der HSPZ-Fraktion zwischen E11 und E15/16 und deren Reifung (Ikuta und Weissman, 1992; Morrison *et al.*, 1995; Ema und Nakauchi, 2000).



Danach kommt es aufgrund der Verlagerung der HSZ in Milz und Knochenmark (Morrison *et al.*, 1995) auch in der fetalen Leber wieder zum Absinken der HSZ-Zahl. Die Plazenta ist eine weitere Nische für eine große Population muriner HSZ (Alvarez-Silva *et al.*, 2003; Gekas *et al.*, 2005; Ottersbach und Dzierzak, 2005), die dort zeitgleich zur HSZ-Entstehung in der AGM auftauchen, aber mit einer 15fach höheren Frequenz. Ob sie in der Plazenta neu gebildet werden oder von einer bisher unbekannt Quelle dort einwandern und nur noch reifen und sich vermehren ist bisher unbekannt. Aber auch die Plazenta-HSZ-Zahlen sinken zu dem Zeitpunkt an dem die HSZ-Zahlen in der fetalen Leber stark ansteigen. Da AGM und Dottersack aber nur wenige HSZ beherbergen, wird angenommen, dass auch die Plazenta-HSZ über den Blutstrom in die fetale Leber einwandern (Mikkola *et al.*, 2005) (Überblick in Abb. 3.2). Ab der Geburt findet die Hämatopoese im Knochenmark (KM) statt, nur in einer kurzen Phase nach der Geburt zusätzlich noch in der Milz. Unter pathologischen Bedingungen kommt es auch zur Hämatopoese in den Lymphknoten, der Leber und den Nieren (Pattengale, 1994). Eine Zirkulation von HSZ gibt es im gesunden, adulten Organismus kaum noch. Die HSZ des KM vermehren sich dann nicht mehr, es kommt zu Homöostasis.

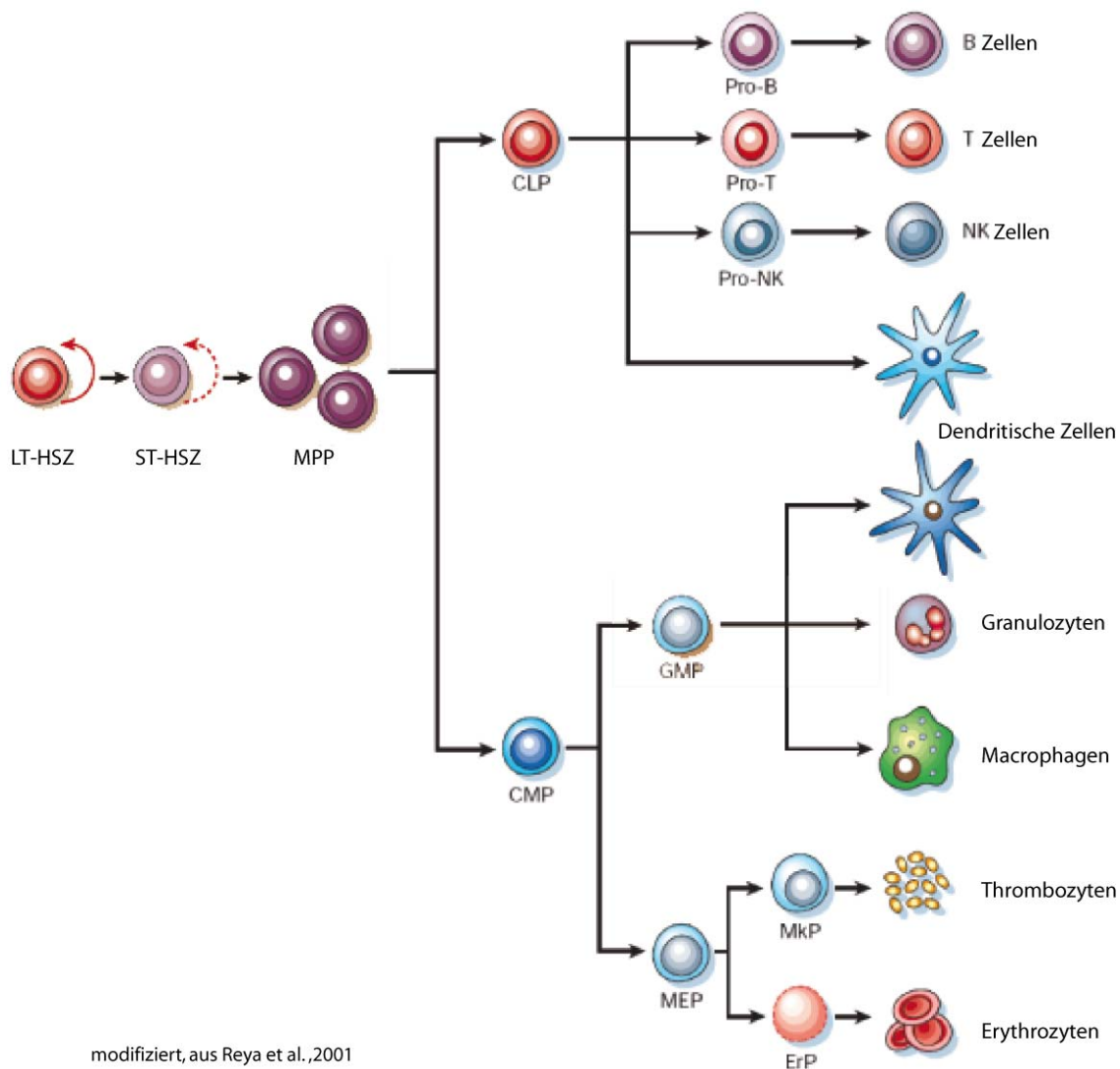


**Abb. 3.2. Korrespondierende *in vivo* und *in vitro* Entwicklung des hämatopoetischen Systems der Maus.** Die hämatopoetische Entwicklung findet in mehreren Schüben in unterschiedlichen extra- und intraembryonalen Geweben ab Embryonaltag (E) 6 statt. Ab E8,5 setzt die Blutzirkulation ein. Zwischen E10,5 und E12,5 entstehen im Embryo mit sehr hoher Frequenz HSZ (Kumaravelu *et al.*, 2002; Gekas *et al.*, 2005). Eine parallele Entwicklung konnte in den unterschiedlichen Stadien der „embryoid body“ (EB)-Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESZ) nachgewiesen werden (Doetschman *et al.*, 1985; Keller *et al.*, 1993; Kyba *et al.*, 2003). Charakteristische Oberflächenmarker kennzeichnen die Entwicklungszustände in beiden Systemen. HSZ: hämatopoetische Stammzelle(n) AGM: Aorta-Gonaden-Mesonephros (Abb. teilweise in Anlehnung an Mikkola und Orkin, 2006)

### 3.2.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSZ)

Die hämatopoetischen Stammzellen bilden die Basis der Hämatopoese. Eine hämatopoetische Stammzelle definiert sich dadurch, dass sie sich potentiell lebenslang selbst erneuern kann und aufgrund ihrer Multipotenz lebenslang teilungs- und differenzierungsfähige Zellen aller Blutlinien hervorbringen kann. Die Suche nach der hämatopoetischen Stammzelle ist mittlerweile über 100 Jahre alt. Zuerst wurde ein Lymphozyt als gemeinsame Stammzellen aller embryonal und auch nachgeburtlich gebildeten Blutzellen angenommen (Maximow, 1909), etwas später dann postuliert, dass ein Myeloblast die Hämatopoese des Knochenmarks treibt und ein Lymphoblast die Stammzelle des lymphatischen Systems sei, es sogar eine „Extrastammzelle“, einen Monoblasten für Monozyten gäbe (Bucher und Wartenberg, 1992). Die morphologische Bestimmung einer multipotenten, hämatopoetischen Stammzelle war damals wie heute nicht möglich, sie lässt sich nicht von anderen frühen Blasten unterscheiden. Mitte der 1950er Jahre gelang der funktionelle Nachweis einer einzelnen gemeinsamen Stammzelle aller Blutzellen durch die Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems einer letal bestrahlten Maus nach Transplantation eines einzelnen, chromosomal markierten, Zellklons (Ford *et al.*, 1956). Kurze Zeit später konnten Till und McCulloch (1961) die Existenz einer multipotenten Knochenmarkstammzelle bestätigen, indem sie in der Milz letal bestrahlter Mäuse nach intra venöser Injektion von Knochenmarkzellen Kolonien detektierten, so genannte „*colony forming units-spleen*“ (CFU-S) (Till und McCulloch, 1961). Erst Mitte der 1980er Jahre gelang erstmals eine immunphänotypische Annäherung an die humane HSZ-Fraktion mittels generiertem Antikörper gegen das heute CD34 genannte Epitop (Civin *et al.*, 1984). Bis heute gibt es keine *in vitro* Detektionsmethode, mittels derer man hämatopoetische Stammzellen prospektiv zu 100% isolieren kann. Mittels durchflusszytometrischer (FACS)-Analysen kann man heutzutage aufgrund von Oberflächenmarkerkombinationen jedoch unterschiedliche Vorläufer- und Stammzellpopulationen (HSPZ) eingrenzen. Nur rund 0,01 % der Knochenmarkzellen sind HSZ (Brecher *et al.*, 1988), das bedeutet, dass von ca.  $2 \times 10^4$  kernhaltigen Knochenmarkzellen nur Eine eine multipotente HSZ ist (Sutherland *et al.*, 1990). Unterschieden wird das HSPZ-Kompartiment mittlerweile in Langzeit-selbsterneuerungsfähige Stammzellen (LT-HSZ), den daraus hervorgehenden Kurzzeit-selbsterneuerungsfähigen Stammzellen (ST-HSZ) und den von ST-HSZ abgeleiteten multipotenten Vorläuferzellen (MPP) (Akashi *et al.*, 2000b; Reya *et al.*, 2001). Auch die MPP liefern noch weitere intermediäre Vorläuferzellen, und zwar die Vorläuferzellen der myeloischen Reihe (CMP) und der lymphoiden Reihe (CLP), aus denen dann letztendlich die rund  $4 \times 10^{11}$ /Tag terminal differenzierten Blutzellen hervorgehen (Moore, 1995). Der Anteil der MPP im Knochenmark beträgt ca. 0,05% (Reya *et al.*, 2001). Diese Hierarchie (Abb. 3.3 nach (Reya *et al.*, 2001) sorgt dafür, dass eine einzige Stammzelle das gesamte blutbildende System eines letal bestrahlten Empfängers wieder herstellen kann (Metcalf,

1984). Die Voraussetzung für die Wiederherstellung ist das Anwachsen (im Weiteren als Engraftment bezeichnet) der transplantierten Zelle im KM. Dem voraus geht das zielgerichtete Einwandern der Zelle ins Knochenmark, dass so genannte „*Homing*“ (Torok-Storb, 1988). Eine Vielzahl am Homing beteiligter Moleküle, die sowohl über Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakte sowie freie lösliche Faktoren wirken, wurden bereits entdeckt, der komplexe Prozess aber noch längst nicht vollständig aufgeklärt (Aizawa und Tavassoli, 1988; Hardy und Minguell, 1993; Papayannopoulou und Craddock, 1997; Hoggatt *et al.*, 2009).



modifiziert, aus Reya et al., 2001

**Abb. 3.3: Hierarchie der Hämatopoese, ausgehend von einer multipotenten, Langzeit-selbsterneuernden, hämatopoetischen Stammzelle (LT-HSZ)** HSZ: Hämatopoetische Stammzelle; LT-HSZ Langzeit-selbsterneuernde HSZ; ST-HSZ: Kurzzeit-selbsterneuernde HSZ, CLP: Gemeinsamer Lymphoider Progenitor/Vorläufer (common lymphoid progenitor); CMP: Gemeinsamer Myeloider Vorläufer (common myeloid progenitor); NK Natürliche Killerzelle; GMP: Granulozyt-Monozyt-Vorläufer; MEP: Megakaryozyt-Erythrozyt-Vorläufer; MkP: Megakaryozytenvorläufer; ErP: Erythrozytenprogenitor

Während die LT-HSZ lebenslang durch asymmetrische Zellteilung zur Selbsterneuerung und „Nachschublieferung“ an differenzierenden Zellen fähig sind (Metcalf, 1984), können die ST-HSZ dies nur wenige Wochen, allerdings ist die Proliferation im ST-HSZ- und MPP-Kompartiment höher als unter den LZ-HSZ. Die frühen Vorläuferzellen (HPZ) der Hämatopoese lassen sich, im Gegensatz zu LT-HSZ, direkt *in vitro* nachweisen. Sie bilden in Methylzellulosekulturen durch differenzierungsstimulierende Zytokine verschiedene Kolonien und werden daher als „*colony forming units*“ (CFU) bezeichnet. Die Art der ausgebildeten Kolonien definiert den Reifegrad näher (Metcalf, 1984). Bildet eine *in vitro* Kultur nach fünf Wochen immer noch solche Kolonien, ist dies der Nachweis für das Vorhandensein einer Langzeitkultur-initiierenden Zelle („*long-term-culture-initiating-cell*“- LTC-IC), welche als Surrogat für HSZ gilt (Sutherland *et al.*, 1989; Eaves *et al.*, 1991).

Neben diesem funktionellen Nachweis konnten die unterschiedlichen HSPZ-Populationen auch immunphänotypisch charakterisiert werden. Die Expression von typischen Oberflächenmarkern während der murinen embryonalen Hämatopoese sind in Abb. 3.2, den entsprechenden Stadien zugeordnet, dargestellt (nach McKinney-Freeman *et al.*, 2009; Mikkola, 2009). Für die *in vitro* generierten HSPZ ist die Charakterisierung erschwert, weil sie in ihrer Entwicklung zwischen embryonalen und adulten HSZ liegen und daher eine Oberflächenmarkermischform tragen (McKinney-Freeman *et al.*, 2009). So sind sie beispielsweise noch CD41+ (d.h. noch nicht zu adulten Zellen ausgereift), sind aber trotzdem CD150+ CD48- (SLAM-positiv), eine Eigenschaft die *in vivo* nur die adulten LT-HSZ besitzen. Daher wurde der Phänotyp der Langzeit-repopulierungsfähigen, ESZ-abgeleiteten hämatopoetischen Zellen (ESZ-HZ) durch stufenweise Transplantationsexperimente ermittelt. Den größten Anteil an LT-HSZ beinhaltet demnach die CD41-hochexprimierende, ckit-positive, CD34-negative Subpopulation (CD41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>) (Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Für die murinen adulten HSPZ hingegen wurden entsprechend ihrer Potenz unterschiedliche Markerkombinationen etabliert (Tab. 3.1).

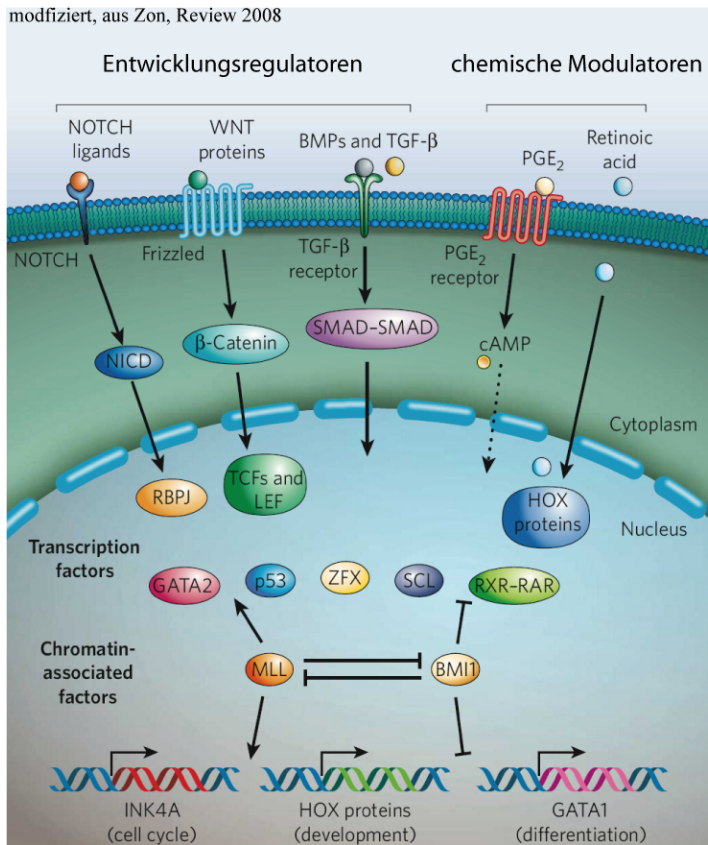
Bei der Charakterisierung der HSZ über CD34 im murinen System ist zu beachten, dass fetale HSZ und adulte HSZ bis ca. 5-7 Wochen postnatal CD34<sup>+</sup> sind. Danach erfolgt der Übergang auf den adulten CD34<sup>-</sup> Phänotyp. Doch auch in der adulten Maus exprimieren ca. 20% der HSZ CD34 vorrangig nach Mobilisation (Ito *et al.*, 2000) oder auch stressinduziert.

**Tab. 3.1 Oberflächenmarkerkombination zur Phänotypisierung der unterschiedlichen adulten Stamm- und Vorläuferzellpopulationen der Maus.** Aufgeführt sind vier etablierte Protokolle. LT-HSZ: Langzeit-selbsterneuernde, hämatopoetische Stammzelle; ST-HSZ: Kurzzeit-selbsterneuernde HSZ; MPP: Multipotenter Progenitor; LSK: Linienmarker-negative ckit-positive Sca-1-positive Zellen; lo: low = niedrig exprimierend

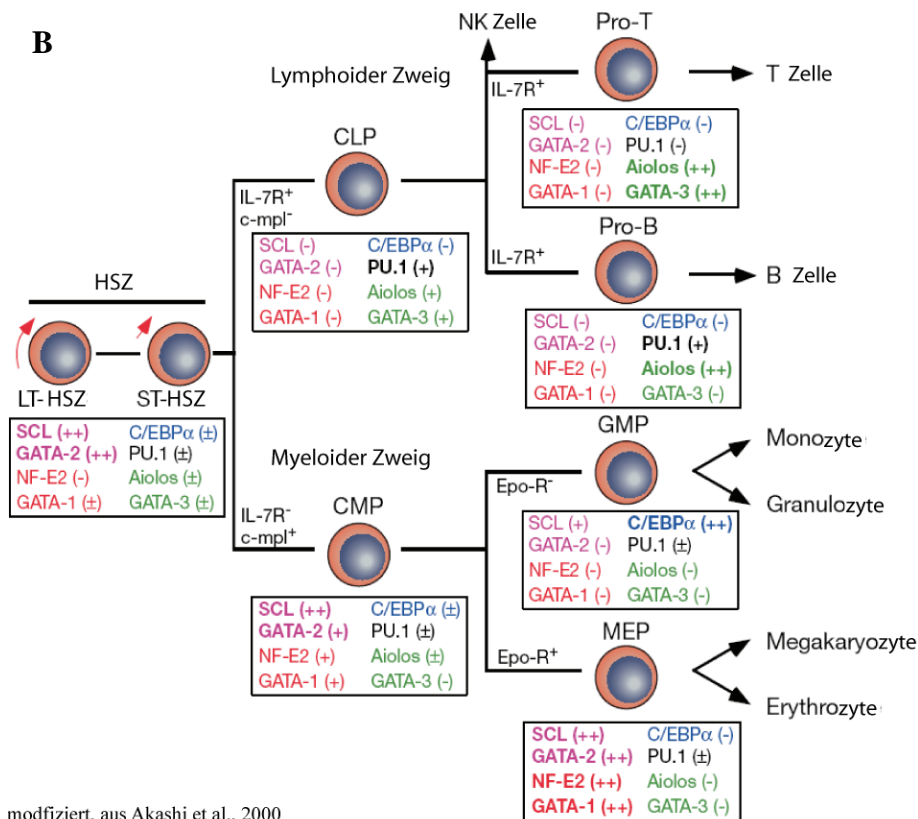
	<b>Jacobson-Gruppe</b> (Yang <i>et al.</i> , 2005)	<b>Nakauchi-Gruppe</b> (Osawa <i>et al.</i> , 1996)	<b>Weissman-Gruppe</b> (Christensen und Weissman, 2001; Papathanasiou <i>et al.</i> , 2009)	<b>Morrison-Gruppe</b> (Kiel <i>et al.</i> , 2005)
<b>LT-HSZ</b>	LSK, CD34-/lo, Flt3-, mpl+	LSK, CD34-/lo	LSK, Thy1.1-lo, Flt3- CD150+	CD150+, CD244- CD48 -
<b>ST-HSZ</b>	LSK, CD34+, Flt3-, mpl+	LSK, CD34+	LSK, Thy1.1lo, Flt3+, CD150-	
<b>MPP</b>	LSK, CD34+, Flt3+, mpl-/lo		LSK, Thy1.1-, Flt3+ CD150-	CD244+, CD150- CD48-

Um das Überleben und die Selbsterneuerungskapazität dieser adulten LT-HSZ auch *in vitro* zu gewährleisten mussten spezielle Kulturbedingungen geschaffen werden, die das natürliche Umfeld der HSZ, die Stammzellnische, nachbilden. Dafür wurden aus verschiedenen hämatopoetischen Stammzellnischen wie Dottersack (Yoder *et al.*, 1994), AGM (Nishikawa *et al.*, 2001; Oostendorp *et al.*, 2002), fetale Leber (Moore *et al.*, 1997a), KM (Nakano *et al.*, 1994), Stromazelllinien etabliert, die in der Kokultur den Erhalt bzw. sogar die Expansion von HSZ erlauben. In Kombination mit der Kokultivierung oder auch allein, wurden diverse „Zytokincocktails“ entwickelt, die die HSZ-Expansion oder auch deren gezielte Differenzierung ermöglichen (Keller *et al.*, 1983; Pilat *et al.*, 2005b; Zhang und Lodish, 2005; Zhang *et al.*, 2008a; McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Weitere Details zu den Zytokinen folgen im Kapitel 3.4ff. Nicht nur die Zytokine, Wachstumsfaktoren und biochemischen Modulatoren haben Einfluss auf Ruhe, Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation der HSZ, ein eng kontrolliertes, regulatorisches Genexpressionssystem, gesteuert von aktivierenden und hemmenden Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen ist dafür mitverantwortlich (Zon, 2008)(Abb. 3.4 A). Dabei sind Transkriptionsfaktoren (TF) nicht nur in speziellen liniendeterminierten Vorläuferzellen bzw. reifen Zellen aktiv, sondern werden auf niedrigem Niveau auch in den multipotenten Progenitoren exprimiert (Cheng *et al.*, 1996; Akashi *et al.*, 2000a; Akashi *et al.*, 2000b; Rosmarin *et al.*, 2005) (Abb. 3.4 B). Das Cocktailpartymodell von Sieweke und Graf sowie das Regulationsmodell von Akashi *et al.* erklären anschaulich die unterschiedlichen Auswirkungen von Transkriptionsfaktorkomplexen bei verschiedener Kombination von immer wieder gleichen „Zutaten“ (Transkriptionsfaktoren). Diese dynamische Mischung der Zusammensetzung steuert die Differenzierung der Blutzellen durch geänderte Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Promotor- und/oder Enhancer-Elementen über die Aktivierung differenzierungsnotwendiger Gene und Deaktivierung von Genen für eine alternative Liniendifferenzierung (Sieweke und Graf, 1998; Akashi *et al.*, 2000b).

A



B



**Abb. 3.4 Übersicht über die Einflussnahme und Aktivität von Zytokinen/Wachstumsfaktoren, biochemischen Modulatoren und Transkriptionsfaktoren (TF) in der hämatopoetischen Entwicklung.** (A) Signalwege in der Selbsterneuerung von HSZ.

Aktivierung/Deaktivierung von Signalwegen über Liganden/Rezeptorinteraktion und daraus resultierender Aktivitätsänderung von TF, welche wiederum durch Wechselwirkung mit anderen zellulären TF und Chromatin-assoziierten Faktoren die Selbsterneuerung und Differenzierung sensibel regulieren. (B) Das unterschiedliche Zusammenspiel gleicher TF moduliert Selbsterneuerung und Differenzierung. HSZ: Hämatopoetische Stammzellen; LT-HSZ Langzeit-selbsterneuernde HSZ; ST-HSZ: Kurzzeit-selbsterneuernde HSZ, CLP: Gemeinsamer Lymphoider Vorläufer; CMP: Gemeinsamer Myeloider Vorläufer; NK: Natürliche Killerzelle; GMP: Granulozyt-Monozyt-Vorläufer; MEP: Megakaryozyt-Erythrozyt-Vorläufer; BMP: Knochen-Morphogenes Protein; cAMP: zyklisches Adenosinmonosphat; LEF: Lymphoider Enhancer-Bindungsfaktor; NICD: NOTCH intrazelluläre Domäne; PGE2: Prostaglandin E2; RXR: Retinoid-X Rezeptor; TCF: T-Zellfaktor; TGF-β: Transformierender Wachstumsfaktor-β; ZFX: X-gebundenes Zinkfinger-Protein.

modifiziert, aus Akashi et al., 2000



### 3.2.3 Nachbildung der murinen, embryonalen Hämatopoese *in vitro*

Zum besseren Verständnis der *in vivo*-Prozesse bei der Entstehung und dem Verlauf der Hämatopoese machte man sich die Erkenntnisse zu nutze, dass *in vitro*-Differenzierungen, ausgehend von den pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESZ), die frühen embryonalen Entwicklungsstadien gut nachbilden können. Für die *in vitro* Differenzierung der pluripotenten Stammzellen wurden verschiedene Methoden etabliert. Die drei Häufigsten sind:

1. Die Aggregation von ESZ zu dreidimensionalen Kolonien, so genannten „*embryoid bodies*“ (dt.: embryonale Körperchen) (Evans und Kaufman, 1981; Keller, 1995) z.B. in Methylzellulose oder in hängenden Tropfen („*Hanging Drops*“) (Dang *et al.*, 2002).
2. Die Kokultivierung auf Stromazellen, am häufigsten wird dafür die OP9 Zelllinie verwendet (Nakano *et al.*, 1994), (etabliert aus M-CSF- [Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor] defizienten op/op-Mäusen [homozygote Osteopetrosis-Mutation]; Yoshida *et al.*, 1990).
3. Die ESZ werden als Einschicht-Kultur („*Monolayer*“) auf Extrazellulärmatrix-Proteinen differenziert (Nishikawa *et al.*, 2007).

Die dreidimensionale EB-Differenzierung bildet den programmierten Ablauf der *in vivo* Embryogenese in ihren Anfangsstadien am besten nach (Doetschman *et al.*, 1985; Keller, 1995; Weiss und Orkin, 1996; Guan *et al.*, 1999; Leahy *et al.*, 1999; Rohwedel *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2007). Im Jahr 1985 zeigten Doetschmann *et al.* dass ESZ-abgeleitete EBs komplexe Zellaggregate sind, die Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) enthielten und im weiteren Verlauf zystische Strukturen ausbildeten die dem Dottersack zum Zeitpunkt E8-E10 entsprechen (Doetschman *et al.*, 1985). Darauf basierend wurden in den letzten 25 Jahren verschiedene modifizierte Differenzierungs- und Expansionsverfahren für die hämatopoetische *in vitro*-Differenzierung entwickelt (Schmitt *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 1993; Inamdar *et al.*, 1997; Kyba *et al.*, 2003; Pilat *et al.*, 2005b; Pearson *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). So konnte die Kolinearität von *in vivo* zur *in vitro* Hämatopoese zunehmend detaillierter aufgezeigt werden (Abb. 3.2).

Die hämatopoetischen Zellen werden vom Mesoderm gebildet. Untersuchungen von Keller *et al.* zeigten die Expression mesodermaler Marker zeitlich vor dem Auftreten hämatopoetischer Marker im Embryo wie auch in den frühen EBs (Keller *et al.*, 1993). In einem Zeitfenster von ca. 36h (EB-Differenzierungstag 2,5-4 = EB d2,5-EB d4) sind im EB VEGF-sensitive Vorläuferzellen (so genannte „*blast-colony forming cells*“-BL-CFC) präsent, die hämatopoetische und endotheliale Tochterzellen im gleichen zeitlichen und räumlichen Ablauf erzeugen wie sie auch die Hämangioblasten des Dottersacks generieren (Keller *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1998; Palis *et al.*, 1999; Fehling *et al.*, 2003). *In vitro* Differenzierungen von unmanipulierten ESZ kommen über den Status hämatopoetischer Vorläuferzellen

mit den Charakteristika von Dottersack-Vorläuferzellen, die nicht die Fähigkeit des Langzeitengraftments in adulten Mäusen besitzen, nicht hinaus. Durch Überexpression von z.B. HOXB4 erzeugen EBs nach sechs Tagen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPZ) die zur definitiven Hämatopoese und Engraftment in einem adulten Empfänger fähig sind. Sie sind damit *in vitro* Pendant der Plazenta- und/oder AGM-HSZ (Pearson *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009) (Überblick in Abb. 3.2). Eine Reihe homöotischer Gene (z.B. HOXB3, B4, A4, A5) wurden in Expressionsstudien identifiziert, die in definitiven HSZ exprimiert werden jedoch nicht in den primitiven Dottersack-HSZ. Aber nur HOXB4 konnte bei Überexpression in KM-HSZ die Selbsterneuerung früher HSZ verstärken und die hämatopoetische Repopulierung fördern ohne Leukämie zu induzieren (Sauvageau *et al.*, 1995). Einen gleichermaßen unterstützenden Effekt hat HOXB4 auch auf die ESZ-HZ *in vitro* und *in vivo* (Pilat *et al.*, 2005b). Da besonders unreife/frühe HSPZ empfänglich für die HOXB4-Wirkung sind, ist erst unter HOXB4-Einwirkung eine weitere Ausreifung der ESZ-HSZ zu einem Status früher definitiver HSZ, die adulte Mäuse langzeitrepopulieren können, möglich geworden (Kyba *et al.*, 2002)

### **3.3 Zytokine und andere Faktoren in der Kultur von ESZ und den von ihnen abgeleiteten hämatopoetischen Zellen (ESZ-HZ)**

Da *in vitro* kultivierte Zellen ohne die stimulierenden aber auch inhibierenden Signale ihrer Nische und deren spezifischen Faktoren auskommen müssen, wird durch die Zugabe von Zytokinen und anderen löslichen Faktoren in das Zellkulturmedium versucht diese physiologischen Bedingungen zu simulieren und die Zellen damit zu einer natürlichen Entwicklung anzuregen. Aber auch die Änderung des physiologischen Zellschicksals ist über eine gesteuerte Gabe solcher Substanzen möglich.

Der Begriff Zytokine fasst eine Vielzahl regulatorischer Moleküle zusammen, sie sind Proteine, Peptide oder Glycoproteine. Zytokine werden von unterschiedlichen Zellen als autokrine oder parakrine Botenstoffe mit zumeist kurzer Reichweite und Halbwertszeit gebildet. Sie sind in die Regulierung der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten, in immunmodulatorische Prozesse, Entzündungsprozesse und in die Regulation der Hämatopoese involviert. Zytokine sind in picomolaren Konzentration wirksam, im Vergleich, die meisten Hormone wirken erst in nanomolaren Konzentrationen. Zytokine binden hochspezifisch an ihre Rezeptoren (Bindungskonstante  $10^{-10}$  M -  $10^{-12}$  M), können synergistisch wie auch antagonistisch fungieren und weisen eine hohe Redundanz auf (Kishimoto *et al.*, 1994).



Zytokine werden in fünf Klassen unterschieden: Interferone, Interleukine, Kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine (Chemoattraktoren) und sind Liganden für sieben verschiedene Rezeptorenklassen:

1. Hämatopoetin-Rezeptorfamilie: gp130 ist gemeinsamer Signalübermittler („*signaltransducer*“) (Taga, 1996) Liganden: IL2-IL7, IL-9, IL11-IL13, IL-15, EPO, TPO, LIF, G-CSF, GM-CSF u.a. (Kishimoto, 1994; Metcalf, 2008)
2. Interferon-Rezeptorfamilie: Liganden: IFN $\alpha/\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-10 u.a.
3. TNF-Rezeptorfamilie: Liganden: TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FasL, CD27, CD30, CD40 u.a.
4. Immunglobulin-Superfamilie-Rezeptoren: Liganden: IL-1a, IL-1b, sowie BCR, TCR, MHC u.a.
5. Tyrosinkinase-Rezeptoren: Modulation des Ras/Raf-Signalwegs, Jak/STAT-Signalwegs; Liganden: M-CSF, SCF, u.a.
6. Serin-/Threoninkinase-Rezeptoren: Liganden: TGF $\beta$ , BMP u.a.
7. Chemokin-Rezeptoren: G-Protein-vermittelte Aktivität; Liganden: IL8, CP-1 („*monocyte chemotactic protein 1*“) u.a.

(Taga und Kishimoto, 1992; Metcalf, 2008) Für diese Arbeit wurden Zytokine verwendet die Liganden für die Hämatopoetin-, die Tyrosin-Kinase- und die Serin/Threoninkinase-Rezeptoren sind.

### 3.3.1 Unterschiedliche Zytokincocktails zur *in vitro* Expansion von ESZ-HZ

Oft erzielt erst der synergistische Einsatz mehrerer Zytokine den erwünschten Wachstums/Expansions-Effekt, wogegen der Einsatz einzelner Zytokine suboptimale Resultate liefert (Heimfeld *et al.*, 1991). Es konnte schon früh gezeigt werden, dass beispielsweise die Kombination von Interleukin-3 (IL3) und Interleukin-6 (IL6) besonders proliferationsunterstützend auf die frühen HSPZ wirkt (Ogawa und Clark, 1988; Luskey *et al.*, 1992). Ein Zusatz von Stammzellfaktor (SCF) verstärkte diesen Effekt noch. Für den *FMS* ähnliche Tyrosinkinase-3 Liganden (Flt3L) konnte gezeigt werden, dass dieser nur in Kombination mit weiteren Zytokinen, wie z.B. SCF, seinen proliferationsunterstützenden Effekt auf primitive hämatopoetische Zellen sowie seinen aktivierenden Effekt auf die B-Zellpoese ausüben kann (Lyman und Jacobsen, 1998).

Der in dieser Arbeit als Standard (STD-SF) definierte Zytokincocktail, der im serumfreien Basismedium StemPro34 eingesetzt wurde, machte sich diese synergistischen Effekte zunutze und konnte zur Expansion von transplantierbaren ESZ-HZ eingesetzt werden (Pilat *et al.*, 2005b).

Zusätzlich zu diesen mittlerweile etablierten Zytokinen für die *in vitro* Expansion von HSZ, wurden in den letzten Jahren weitere Zytokine etabliert, die aufgrund von Untersuchungen an HSPZ bzw. den

unterschiedlichen Nischenzellen der hämatopoetischen Entwicklung eruiert wurden. Drei gute Beispiele dafür sind die weiteren Zytokincocktails die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Dazu gehört erstens der so genannte STIF-Cocktail, bestehend aus SCF, Thrombopoietin (TPO), insulinähnlichem Wachstumsfaktor-2 (IGF-2), basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) und Heparin (Zhang und Lodish, 2005). Zweitens gehört der STIF-A5-Cocktail: SCF, TPO, Insulinähnlichen Wachstumsfaktor bindendes Protein-2 (IGFBP-2), bFGF, Angiopoietinähnlicher Faktor-5 (Angptl5) (Zhang *et al.*, 2008a), Heparin und drittens der STFV-Cocktail: SCF, TPO, Flt3L, Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) (Kyba *et al.*, 2002; Lengerke *et al.*, 2007) dazu. Diese verwendeten Zytokine werden im Folgenden in Kürze vorgestellt.

### 3.3.2 Interleukin-3 (IL3)

IL-3 ist ein Spezies spezifisches Glycoprotein, das als hämatopoetischer Wachstumsfaktor Überleben, Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen der Megakaryozyten-, Granulozyten-, Makrophagen-, Erythroiden-, Eosinophilen-, Basophilen-, und Mastzell-Linien fördert. IL3 hat sowohl auf die multipotenten Progenitoren als auch auf liniendeterminierte Zellen der myeloischen und erythroiden Reihe eine proliferationsunterstützende und antiapoptotische Wirkung (Heyworth *et al.*, 1990; McKinstry *et al.*, 1997). IL3 wirkt über die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges (Callus und Mathey-Prevot, 1998). Es wird von T-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen gebildet und fördert die Thrombopoese, Phagozytose und antikörpervermittelte Zelltoxizität (Cannistra *et al.*, 1988). Seine Aktivität hängt häufig von der Kostimulation durch andere Zytokine ab (Ogawa und Clark, 1988). Da der IL3-Rezeptor während der EB-Differenzierung bereits ab dem vierten Tag exprimiert wird, lässt sich durch IL3 Einsatz bereits frühzeitig Einfluss auf die HSPZ-Fraktion nehmen (McClanahan *et al.*, 1993).

### 3.3.3 Interleukin-6 (IL6)

IL6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das über die Bindung an den IL6 Rezeptor (IL6R) spezifische Signaltransduktionskaskaden (JAK/STAT - „*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*“) im Zellinneren auslöst. Dieser Rezeptor besteht aus zwei Ketten, der IL6R-alpha Kette und gp130. Ist IL6 gebunden an die lösliche Form des IL6R, kann es sein Signale an jede gp130-tragende Zelle weitergeben (Hirano, 1998). IL6 nimmt eine wichtige Rolle in der Immun- und Entzündungsregulation ein (Galandrini *et al.*, 1991), weil es die B-Zelldifferenzierung,

Antikörperproduktion (Hirano *et al.*, 1986) und in Synergie mit IL3 die Megakaryozytenentwicklung und Thrombozytenproduktion stimuliert (Kimura *et al.*, 1990) sowie auf auf viele weitere Zelltypen wirkt (Hirano, 1998). IL6 wird von T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten gebildet. Neben einem direkten Differenzierungseinfluss auf primitive Blasten sowie granulozytäre und monozytäre Vorläuferzellen (Wong *et al.*, 1986; Metcalf, 1989) ist IL6 als HSPZ-Expansionszytokin etabliert worden, weil es den Zellzyklus aktiviert. HSZ werden aus der G<sub>0</sub>-Phase (Ruhephase) in die G<sub>1</sub>-Phase (postmitotische Phase) getrieben, wodurch sie sensibler für weitere hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind (Ikebuchi *et al.*, 1988). Humanes IL6 ist kreuzreaktiv im murinen System, jedoch nicht *vice versa*.

### 3.3.4 Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (IGF-1)

IGF-1 (auch *Somatomedin C*) ist ein 70 Aminosäuren großes Polypeptid mit drei Disulfidbrücken, das erst nach protolytischer Prozessierung der inaktiven Vorstufe zu einem aktiven Wachstumsfaktor wird (Philippou *et al.*, 2007). IGF-1 gehört zur Insulin-Superfamilie und weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Insulin auf, ist aber ein potenterer Wachstumsfaktor als Insulin selbst. IGF-1 gehört zu einem kommunikativen System, das als IGF-Achse bezeichnet wird. Dieses System besteht aus zwei Liganden (IGF-1 und IGF-2), zwei membranständigen Rezeptoren (IGF1R und IGF2R), sechs IGF-Bindungsproteinen (IGFBP 1-6) und mehreren IGFBP-assoziierten Proteasen (Rotwein, 1999).

IGF-1 wird nach Somatotropin-Stimulation (Wachstumshormon) hauptsächlich in der Leber gebildet und, spezifisch an IGFBP gebunden, über die Blutbahn verteilt (Hwa *et al.*, 1999; Denley *et al.*, 2005). Diese IGF-1-Isoform ist eines der wenigen systemisch (endokrin) wirkenden Zytokine. Eine weitere, in anderen fetalen und adulten Geweben zu verschiedenen Zeitpunkten sezernierte, IGF-1 Isoform wirkt hingegen nur lokal (autokrin oder parakrin) (Philippou *et al.*, 2007). IGF-1 vermittelt seine Stimuli über den Tyrosinkinase-Rezeptor IGF1R, der in fast allen Geweben nachweisbar ist (Nitert *et al.*, 2005). Durch seine proliferationsunterstützenden und antiapoptotischen Eigenschaften ist IGF-1 an vielen physiologischen aber auch pathologischen Prozessen, wie z.B. Tumorgenese (Samani *et al.*, 2007), beteiligt. Dieser Wachstumsfaktor stimuliert das Überleben und die Proliferation unterschiedlichster Zelltypen, wie z.B. Gehirn-, Muskel-, Knochen- und Knorpelgewebe (Guvakova, 2007). Auch auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wird der IGF1R exprimiert, wodurch IGF-1 seinen proliferationsunterstützenden Effekt im hämatopoetischen System entfalten kann (McCubrey *et al.*, 1991; Svegliati-Baroni *et al.*, 1999). Die reife Form von IGF-1 ist ein stark konserviertes Polypeptid welches in vielen Spezies kreuzreaktiv ist (Sandberg-Nordqvist *et al.*, 1992).

### 3.3.5 Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-2 (IGF-2)

IGF-2 (auch *Somatomedin A*) ist ein zu IGF-1 strukturgleiches Polypeptid, das durch proteolytische Modifikation in die reife Form überführt wird. IGF-2 ist ebenfalls ein Mitglied der Insulin-Superfamilie und der zweite Ligand in der unter 3.3.4 beschriebenen IGF-Achse (Rotwein, 1999; Pavelic *et al.*, 2007). Auch IGF-2 hat eine funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit zu Insulin, ist in seiner Wirkung jedoch auch potenter als Insulin. IGF-2 ist Ligand sowohl für den Tyrosinkinase Rezeptor IGF1R als auch für den Mannose-6-Phosphat Rezeptor IGF2R und auch den Insulinrezeptor (IR). Die IGF-2-Aktivität wird in den unterschiedlichen Geweben durch die Bindung an die IGFBP reguliert (Denley *et al.*, 2005; Belfiore, 2007). IGF-2 ist ebenso wie IGF-1 eingebunden in ein komplexes System von Wachstum- und Metabolismus-regulierenden Proteinen. Während IGF-1 besonders im adulten System von Bedeutung ist, ist IGF-2 ein Wachstumsfaktor der frühen Zellentwicklung. Seine Sezernierung wird durch das Plazenta-Laktogen stimuliert. IGF-2 ist während der Entwicklung in diverse Proliferations- und Differenzierungsvorgänge eingebunden, beispielsweise in die des Nervensystems, der Myelinisierung, des Skelettmuskelwachstums und der Nebennierenrinde (Varela-Nieto *et al.*, 2007). Im humanen System wird auch IGF-2 hauptsächlich von der Leber sezerniert und sowohl im Fetus als auch im Erwachsenen per Blutbahn zirkuliert. In Nagern wird IGF-2 hauptsächlich in der Embryonalphase gebildet. Nach der Geburt ist es nur noch lokal in geringeren Mengen nachweisbar, denn für eine vermehrte Synthese fehlt der entsprechende aktive Promotor (Rotwein und Hall, 1990). Für die fetale Leber wurde gezeigt, dass sie eine bedeutende hämatopoetische Stammzellnische während der Embryonalentwicklung darstellt. Das hier sezernierte IGF-2 unterstützt über die Aktivierung des IGF1R die Expansion fetaler HSZ. Dieser Effekt kann auch für die *in vitro* Expansion von HSZ genutzt werden (Zhang und Lodish, 2004; Chou und Lodish, 2010). Neben der Beteiligung an den verschiedensten physiologischen Prozessen wurde auch für IGF-2 eine Beteiligung an der Progression unterschiedlicher Tumore nachgewiesen (Hartmann *et al.*, 2005; Pavelic *et al.*, 2007; Samani *et al.*, 2007). Auch IGF-2 ist kreuzreaktiv in Mensch und Maus.

### 3.3.6 Insulinähnlichen Wachstumsfaktor bindendes Protein-2 (IGFBP-2)

IGFBP-2 gehört als eines von sechs zur Superfamilie der IGF-bindenden Proteine und damit zur unter 3.3.4 erläuterten IGF-Achse. Alle sechs hochaffinen IGFBP besitzen eine ähnliche Primärstruktur. Sie weisen cysteinreiche, hochkonservierte N- und C-terminale Domänen auf, die über eine variable Linker-Domäne (L-Domäne) verbunden sind (Firth und Baxter, 2002). Die Bindung an beide IGF-Faktoren (IGF-1 und IGF-2) erfolgt sowohl über die C- als auch die N-terminale Domäne (Bach *et al.*, 2005). Eine Modulation der biologischen Aktivität der IGFBP erfolgt durch posttranslationale Modifikationen der L-Domäne, wie

z.B. Glycosylierung oder Phosphorylierung bzw. durch proteolytische Spaltung (Firth und Baxter, 2002). Die IGFBP regulieren die Verteilung, Funktion und Aktivität von IGF-1 und IGF-2 in den unterschiedlichsten Geweben und Körperflüssigkeiten, da ihre Affinität zu den beiden IGF höher ist, als deren Rezeptoraffinität. Gebunden an die IGFBP erfolgt keine Signalübertragung auf die Rezeptoren. Die Verteilung der IGFs sowie deren Schutz vor Degradation, einhergehend mit einer Verlängerung ihrer Halbwertszeit, wird ebenfalls durch die Bindung an die IGFBP erreicht (Jones und Clemmons, 1995). IGFBP-2 hat eine wesentlich höhere Affinität zu IGF-2 als zu IGF-1. Unabhängig von der Bindung an IGF weisen einige IGFBP, so auch IGFBP-2, selbst eine Rezeptoraffinität auf (Kelley *et al.*, 1996). IGFBP-2 besitzt eine Integrinrezeptorerkennungsstelle. Darüber vermittelte Interaktionen mit Integrinen der Extrazellulärmatrix sowie Zellmembranen führen in physiologischen wie auch in pathologischen Prozessen zur Beeinflussung von Proliferation, Migration und Adhäsion der Zielzellen (Russo *et al.*, 2005). *IGFBP-2* wird bereits ab der frühen Embryonalentwicklung exprimiert (Schuller *et al.*, 1993). Postnatal ist IGFBP-2 das zweithäufigste Bindungsprotein im Blut. Es ist im Gehirn hochkonzentriert vorhanden und in vielen weiteren Geweben aktiv (Kelley *et al.*, 1996). Einen Effekt auf das hämatopoetische System konnten Zhang *et al.* 2008 zeigen, indem sie durch IGFBP-2 Zugabe in das Kultivierungsmedium einen signifikanten Expansionsvorteil von LT-HSZ erzielten. Ob IGFBP-2 auch *in vivo* Selbsterneuerung oder Differenzierung beeinflusst ist momentan Gegenstand ihrer Untersuchungen (Huynh *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008a).

### 3.3.7 Stammzellfaktor (SCF)

SCF ist ein transmembranes Glycoprotein, bei dem durch proteolytische Spaltung zwei aktive lösliche Isoformen der Extrazellulärdomäne frei werden können (Ashman, 1999). SCF ist auch unter den Bezeichnungen ckit-Ligand (KL), Steel-Faktor oder auch Mastzellen-Wachstumsfaktor (MGF) bekannt und wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. SCF ist *in vivo* und *in vitro* ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor (Toksoz *et al.*, 1992) der durch Bindung als Dimer an den ckit-Rezeptor, ein Tyrosinkinase-Rezeptor, seine Stimuli an die Zielzellen weitergibt (Lemmon *et al.*, 1997). SCF und sein Rezeptor sind essentiell für das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von diversen hämatopoetischen Progenitoren (HPZ) (McKinstry *et al.*, 1997), Melanozyten sowie Keimbahnzellen (Ashman, 1999; Bashamboo *et al.*, 2006). SCF ist ein direkter Wachstumsfaktor und Aktivator für Mastzellen (Yung und Welte, 1985) und eosinophilen Granulozyten (Reber *et al.*, 2006). Murines SCF ist kreuzreaktiv im humanen System, *vice versa* wird nur eine sehr schwache Aktivität erzielt (Martin *et al.*, 1990).

### 3.3.8 Thrombopoietin (TPO)

TPO ist ein aus 332 bis 335 Aminosäuren bestehendes Glycoprotein, dessen N-terminale Domäne große Ähnlichkeit zu Erythropoietin, dem Wachstumshormon für Erythrozyten, aufweist. Es geht nach Spaltung aus einem TPO-Vorläufermolekül hervor (de Sauvage *et al.*, 1994). TPO ist ein linienspezifisches Wachstumshormon das in der Leber, den Nieren, den Skelettmuskeln und von den Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird. Die Signalweiterleitung und Internalisierung erfolgt über den TPO-R/c-mpl-Rezeptor (Bartley *et al.*, 1994). TPO ist an multiplen Abläufen der Hämatopoese beteiligt. Es ist essentiell für die Proliferation und Reifung von Megakaryozyten, die Thrombopoese und die Regulation der zirkulierenden Blutplättchen (Li *et al.*, 1999; Deutsch und Tomer, 2006). Mutationen des *TPO*-Gens und Störungen des TPO/TPO-R-Signalweges führen zu unterschiedlichen Thrombozytenstörungen (Ballmaier *et al.*, 2001). Die Produktion von TPO ist *in vivo* durch die Anzahl der verfügbaren Rezeptoren autoreguliert. TPO stimuliert die Thrombozytenbildung, diese binden mit ihrem TPO-R das TPO, dadurch steht weniger freies TPO für die weitere Thrombozytenproduktion zur Verfügung. TPO existiert in mehreren gewebespezifischen Isoformen (Marcucci und Romano, 2008), die über das Blut zirkuliert werden können (de Sauvage *et al.*, 1994). Neben den Megakaryozyten und den Thrombozyten wird der TPO-R auch auf hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) exprimiert. Dort weist TPO *in vivo* und *in vitro* einen expansionsfördernden Effekt auf und wirkt positiv auf die Selbsterneuerung und das Überleben der HSZ (Borge *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, aber es wird angenommen, dass dieser Effekt indirekt durch TPO-verstärkte *HOXB4*-Transkription, und gesteigerte VEGF-Expression, sowie verstärkte Kernlokalisierung von *HOXA9* erreicht wird (Kaushansky, 2005). Aufgrund ihrer Sequenzhomologie sind humanes und murines TPO kreuzreaktiv (de Sauvage *et al.*, 1994).

### 3.3.9 Gefäßendothel Wachstumsfaktor (VEGF)

VEGF (auch vaskularer Permeabilitäts-Faktor) ist ein über Disulfidbrücken verbundenes, homodimeres Glycoprotein das zur Familie der vaskulären Endothelwachstumsfaktoren gehört. VEGF ist ein potenter, angiogener Wachstumsfaktor, der Proliferation und Überleben von Gefäßendothelzellen stimuliert und somit Angiogenese und vaskuläre Permeabilität unterstützt. Bei der Bezeichnung VEGF handelt es sich zumeist um VEGF-A. Neben VEGF-A sind VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF (Plazenta-Wachstumsfaktor) Mitglieder der PDGF- („platelet derived growth factor“) Supergenfamilie. Sie sind funktionell unterschiedlich. Während VEGF-A, VEGF-B und PlGF hauptsächlich Effektoren vaskulären

Endothels sind, sind VEGF-C und VEGF-D essentiell für die Bildung des Lymphsystems (Stacker *et al.*, 2002; Yla-Herttuala *et al.*, 2007). VEGF-A kommt in unterschiedlichen Varianten vor, die durch alternatives „*Splicing*“ der mRNA entstehen. Sie besitzen unterschiedliche C-terminale Domänen, die ihre biologische Funktionalität beeinflussen, besonders die Heparinbindefähigkeit und ihre Rezeptoraffinität (Eming und Krieg, 2006). Das für diese Arbeit verwendete, rekombinante VEGF entspricht der biologischen 165-Aminosäuren-Isoform von VEGF-A. Die Signaltransduktion erfolgt über drei verschiedene Tyrosinkinase-VEGF-Rezeptoren (VEGF-R1: Flt-1; VEGF-R2: Flk-1/KDR; VEGF-R3: Flt-4) und ihnen nachgeschalteten Signalkaskaden. Die verschiedenen VEGF-Proteine weisen dabei unterschiedliche Rezeptoraffinitäten auf (Robinson und Stringer, 2001). VEGF ist sowohl während der Vaskulogenese im Embryo als auch in der Angiogenese im adulten Organismus essentiell (Leung *et al.*, 1989). Die Produktion von VEGF wird maßgeblich durch Sauerstoffmangel in Zellen und die damit verbundene Expression der Hypoxie-induzierten-Faktoren (HIFs) angeregt (Shweiki *et al.*, 1992; Marti und Risau, 1998). Die Folge ist Angiogenese. Verschiedene andere Wachstumsfaktoren wie z.B. IGF-1 (Goad *et al.*, 1996) oder Interleukine wie beispielsweise IL6 (Cohen *et al.*, 1996) erhöhen die VEGF-Produktion. VEGF ist weiterhin ein bedeutender Effektor des hämatopoetischen Systems. So stimuliert VEGF beispielsweise die Migration von Monozyten/Macrophagen. (Barleon *et al.*, 1996) und ist an der postnatalen Hämatopoese durch Rekrutierung von HSZ beteiligt (Hattori *et al.*, 2001). VEGF- und VEGF-R1-vermittelte Signalkaskaden steuern das Überleben von HSZ und nehmen Einfluss auf die embryonale Hämatopoese (Gerber *et al.*, 2002). Der VEGF-R2 wird bereits auf Hämangioblastenzellen exprimiert (Kabrun *et al.*, 1997). VEGF-Stimulation vermittelt *in vivo* aber auch *in vitro* die Ausreifung zu HSPZ (Pearson *et al.*, 2008). Unter TPO-Stimulation wird VEGF von den HSZ selbst sezerniert (Kirito und Kaushansky, 2005). Die große Aminosäuresequenzhomologie von VEGF-A<sub>165</sub> führt zu einer Kreuzreaktivität in vielen Spezies.

### 3.3.10 Angiopoietinähnlicher Wachstumsfaktor-5 (Angptl5)

Angptl5 ist eines von sieben Proteinen, das mit seiner „*coiled-coil*“- und fibrinogenähnlichen Domäne strukturelle Ähnlichkeiten zu den Angiopoietinen aufweist und daher als angiopoietinähnliches Protein benannt wurde. Wie auch andere Mitglieder der Angiopoietin-Familie besitzt Angptl5 N-terminal ein abspaltbares Signalpeptid. Trotz ihrer Angiopoietinähnlichkeit sind die Angptl-Proteine keine Liganden der Angiopoietin-Rezeptoren. Sie besitzen jedoch auch einen angiogenen Effekt, denn sie stimulieren die Bildung von Blutgefäßen, ausgehend von bereits bestehenden Gefäßen. Außerdem sind sie im humanen System Regulatoren des Lipoprotein-Metabolismus (Hato *et al.*, 2008; Tabata *et al.*, 2009). Für Angptl5

war bisher erwiesen, dass es hauptsächlich im adulten humanen Herz exprimiert wird (Zeng *et al.*, 2003). Allerdings zeigten neuere Microarraystudien, dass CD3-positive Zellen der fetalen Leber, welche die Expansion von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) unterstützen, auch verschiedene angiopoietinähnliche Faktoren exprimieren. Eine *ex vivo* Kultivierung von LT-HSZ in STIF in Kombination mit angiopoietinähnlichen Faktoren führt zu einer signifikanten Expansion der adulten HSZ. Dabei wirken nicht alle Angptl-Proteine im humanen und murinen System gleich. Für Anptl5-kultivierte HSZ konnte die signifikanteste Langzeitrepopulierungsfähigkeit nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2006a). Eine weitere Optimierung des Expansionsmedium wurde durch den gemeinsamen Einsatz von Anptl5 und IGFBP-2 erreicht (Zhang *et al.*, 2008a). Humanes Angptl5 ist im Maussystem kreuzreaktiv.

### 3.3.11 FMS ähnliche Tyrosinkinase-3-Ligand (Flt3L)

Flt3L ist ein Wachstumsfaktor, der die Proliferation und Differenzierung von frühen hämatopoetischen Zellen reguliert (Hannum *et al.*, 1994). Dies ist allerdings nur im Synergismus mit Zytokinen aus der Gruppe der Kolonie-stimulierenden-Faktoren, der Interleukine bzw. dem Tyrosinkinase-Liganden SCF möglich (Lyman und Jacobsen, 1998). Flt3L kommt in verschiedenen Isoformen vor. Die vorherrschende bioaktive Form liegt zelloberflächengebunden als Extrazellulardomäne eines Transmembranproteins auf lymphoiden Zellen sowie Knochenmarkstromazellen vor und wird durch proteolytische Spaltung frei (Lyman *et al.*, 1995). Flt3L wirken über die Bindung an den Tyrosinkinase Rezeptor Flt3 (Weisel *et al.*, 2007). Sie wirken aktivierend auf die Lymphopoese und Proliferation früher hämatopoetischer Vorläuferzellen (McKenna *et al.*, 2000). Synergistisch mit SCF wird *in vitro* die Proliferation von LTC-IC (long-term-culture initiating cells) gefördert (Lyman *et al.*, 1994; Jacobsen *et al.*, 1995).

### 3.3.12 Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)

Der bFGF (auch FGF-2) ist eines von 23 Mitgliedern der FGF-Familie. Im Gegensatz zu allen anderen FGF fehlt aber FGF-1 (aFGF) und FGF-2 die Signalpeptiddomäne und ihr Sekretionsweg ist unterschiedlich zu den übrigen FGF. Durch N-terminale Modifikationen gibt es bFGF in mehreren Isoformen, diese Modifikationen beeinflussen die Verteilung aber nicht die biologische Wirksamkeit von bFGF. Für eine Interaktion von bFGF mit seinem hochaffinem Tyrosinkinase-Rezeptor (FGFR) ist eine vorherige Bindung an Heparin bzw. Heparansulfat-Proteoglycanen der Zelloberfläche nötig. Sowohl bFGF als auch aFGF binden den gleichen Rezeptor, der dann autophosphoryliert eine Signalkaskade startet.



Dabei ist aFGF allerdings der stärkere Faktor, er kann alle sieben Varianten der FGFR binden, bFGF hingegen nur FGFR1b, 1c, 2c, 3c, und 4 (Ornitz *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006b).

Der bFGF stimuliert die Proliferation vieler Zellen neuroektodermalen, ektodermalen und endodermalen Ursprungs sowie aller Zellen mesodermalen Ursprungs, so auch die Proliferation aller hämatopoetischer Zellen inklusive des Stamm- und Vorläuferkompartiments (HSPZ). In der *in vitro* Differenzierung von ESZ zu HSPZ initiiert bFGF zusammen mit Activin A die Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen zu Hämangioblasten und leitet damit das hämatopoetische Entwicklungsprogramm ein (Pearson *et al.*, 2008; Irion *et al.*, 2010). Eine weitere Expansion der ESZ-HZ sowie adulter HSZ mit Unterstützung von HOXB4 erfordert die Blockade der FGF-Signalwege (Schiedlmeier *et al.*, 2007).

### 3.3.13 Activin A

Activin A und sein strukturverwandter Gegenspieler Inhibin gehören zur TGF- $\beta$  Superfamilie. Activin A ist ein disulfidbrückenverbundenes, unglycosyliertes Homodimer aus zwei  $\beta$ -Ketten des A-Typs, die aus einer inaktiven Vorform prozessiert werden (Gray und Mason, 1990). Die Aktivität von Activin A wird über die Bindung an den Typ-2 Serin/Threoninkinase Activin Rezeptor (R2A) und dessen Interaktion mit dem Typ-1 Serin/Threoninkinase Activin Rezeptor R1B/ALK4) auf die Zielzellen übertragen. (Chen *et al.*, 2006). Activin A wird in den Gonaden, in der Hypophyse, der Plazenta und weiteren Organen gebildet. Es ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. Zellproliferation und Differenzierung, Morphogenese sich verzweigender Organe (Lunge, Nieren, Prostata), Wundheilung, Spermatogenese, Androgensynthese, neuraler Entwicklung aber auch Entzündung, Fibrose, Tumorgenese und Apoptose beteiligt (Chen *et al.*, 2006). Die Aktivität und Bioverfügbarkeit kann durch Änderung der Ketten im Dimer, der Bindung an  $\alpha$ 2-Macroglobulin und der Interaktion mit Follistatin und Inhibin beeinflusst werden (Phillips *et al.*, 1997). Neben der *in vivo* Aktivität, kann der Einsatz von Activin A *in vitro* z.B. dazu genutzt werden, während der ESZ/iPS/EB-Differenzierung zusammen mit FGF-2 mesodermale Vorläufer zu Hämangioblasten zu differenzieren und damit das hämatopoetische Programm zu induzieren (Pearson *et al.*, 2008; Irion *et al.*, 2010). Die starke Konservierung der Aminosäuresequenz macht humanes Activin A kreuzreaktiv mit vielen anderen Spezies.

### 3.3.14 Knochenmorphogenes Protein-4 (BMP4)

BMP4 gehört zu einer Reihe weiterer BMP, die eine Unterfamilie der TGF- $\beta$ -Superfamilie bilden. Die reife BMP4-Form wird intrazellulär aus einem BMP4-Vorläufer-Protein gespalten, dieses kann dann über Disulfidbrücken mit einem weiteren BMP4-Monomer ein aktives Homodimer oder mit BMP7 ein Heterodimer bilden (Cui *et al.*, 1998). BMP4 induziert die Tetramerisierung von Typ-1 (Activin R1A oder BMPRI1) und Typ-2 (Activin R2A oder BMPRII) Rezeptoren und initiiert so den nachgeschalteten Smad-Signalweg. Die Liganden Chordin, Noggin oder Follistatin sind die Gegenspieler im BMP4-Signalweg (Chen *et al.*, 2004). Die Aktivität und Bioverfügbarkeit von BMP4 wird durch zahlreiche Protein- und Glycosaminoglycan-Interaktionen reguliert. BMP4 hat eine Schlüsselfunktion während der frühen Embryogenese der Säuger. Es sorgt für die Etablierung der Dorsal-Ventral-Achse, zusammen mit SHH („*sonic hedgehog*“). Sowohl prä- als auch postnatal sind die BMP in den meisten Körpergeweben zu finden und regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse. BMP4 ist neben BMP7 ein wichtiger Signalfaktor für die Mesodermgenerierung (Winnier *et al.*, 1995) sowie spätere Entwicklung und Erhaltung von Knochen, Knorpelgewebe und weiteren Geweben und Organen. Auch während der *in vitro* Differenzierung von humanen und murinen ESZ sowie auch iPS-Zellen induziert BMP4 sehr effizient die Bildung von Mesoderm. Die Zellen des Mesoderm können dann weiter in verschiedene Zelltypen differenziert werden (Pearson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008b; Irion *et al.*, 2010). Eine effiziente Differenzierung und Expansion transplantierbarer LT-HSZ aus diesen mesodermalen Vorläufern ist durch die BMP4-vermittelte Aktivierung von *Hox*- und *Cdx*-Genen möglich (Bonde *et al.*, 2008; Lengerke *et al.*, 2009). Murines und humanes BMP4 sind kreuzreaktiv.

### 3.3.15 Leukämie inhibierender Faktor (LIF)

LIF ist ein monomeres Glycoprotein der Interleukin-6 Klasse das Wachstum und Entwicklung von verschiedenen Zellen beeinflusst. Benannt ist LIF nach seiner Fähigkeit die Differenzierung myeloider, leukämischer Zellen in Macrophagen zu induzieren. Außerdem ist das pleiotrop wirkende LIF an der Initiation und Erhaltung der frühen Schwangerschaft beteiligt (Vogiagis *et al.*, 1997). LIF wird im Trophektoderm gebildet und sein Rezeptor auf den Zellen der inneren Zellmasse exprimiert. Darüber wird eine ausreichende Menge an undifferenzierten ESZ für die folgende embryonale Differenzierung gewährleistet (Gearing, 1993). Weiterhin ist LIF in den Knochenmetabolismus, die Neuralentwicklung und -regeneration und Entzündungsprozesse involviert (Gadient und Patterson, 1999). Der LIF induzierte JAK/STAT („*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*“) Signaltransduktionsweg

beginnt mit der Bindung an den LIF-Rezeptor- $\alpha$  (LIFR- $\alpha$ ) welcher so ein Heterodimer mit der signalübermittelnden-Einheit gp130 bildet (Abb. 3.1 B). Die Bioverfügbarkeit und Aktivität von LIF wird über seine unterschiedliche Glycosylierung geregelt. Bindet LIF an den IGF2R, wird es internalisiert und degradiert (Blanchard *et al.*, 1999). LIF wird im adulten Organismus von den verschiedensten Zellen und Geweben sezerniert.

Für die unterschiedlichsten *in vitro* Experimente wird auf etablierte ESZ-Linien zurückgegriffen. Diese wurden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten etabliert. Doch entnimmt man die Zellen der inneren Zellmasse fehlt ihnen die LIF-Sezernierung des Trophektoderms. Um murine ESZ *in vitro* undifferenziert halten zu können, wird deshalb LIF dem Kulturmedium zugesetzt. Genetische Modifikationen, wie z.B. die Überexpression von Nanog machen ESZ LIF unabhängig. Auch neue drei-dimensionale (3D) Kulturtechniken in speziellen Medien funktionieren LIF unabhängig (Kawahara *et al.*, 2009). Humane ESZ (hESZ) werden LIF-unabhängig kultiviert, denn humanes LIF und die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges haben keinen Einfluss auf die Erhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit von hESZ (Daheron *et al.*, 2004).

### 3.3.16 Dexamethason (DEX)

Dexamethason ist ein halogeniertes, künstliches Glukokortikoid mit langer Wirkungsdauer jedoch weitgehend ohne physiologisch mineralkortikoide Wirkung. Es wirkt entzündungshemmend und dämpfend auf das Immunsystem (DEX ist Gegenspieler von Interferon- und TNF- $\alpha$ -Signalwegen) (Wakugawa *et al.*, 2001) und ist rund 30mal stärker als körpereigene Kortikoide. Dexamethason wird in der Medizin zu unterschiedlichen therapeutischen Zwecken eingesetzt. *In vitro* bewirkt eine DEX-Gabe die Herunterregulation der IL6-Expression sowie des IL6-Rezeptors auf Myelomzellen und wirkt daher apoptotisch auf diese Tumorzellen (Hardin *et al.*, 1994). Einen proliferations- und differenzierungsunterstützenden Effekt erzielt DEX *in vitro* bei der Knochenzeldifferenzierung (Coelho und Fernandes, 2000). Es konnte in der hämatopoetischen Differenzierung von mESZ gezeigt werden, dass Dexamethason die Expression von *GATA-1*, *Flk-1*, *Hoxb4*, *Epo-R* und verschiedenen Globingenen steigert und dies führt zu einer verstärkten erythroiden Differenzierung, sowie zur Hoxb4 induzierten Unterstützung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPZ) (Srivastava *et al.*, 2006). *In vivo*-Gaben von Dexamethason erzeugten eine Steigerung der Angiopoietin-1 Sezernierung durch CD45-negative Zellen im murinen Knochenmark mit einhergehender „Ruhigstellung“ von HSZ. Somit wird ein Stammzellschutz erzielt (Kim *et al.*, 2008).

### 3.3.17 Heparin

Heparin ist ein Glycosaminoglycan, das aus einer unterschiedlichen Anzahl von Aminozuckern besteht. Daraus resultieren Heparine unterschiedlicher molarer Massen. Niedermolekulare Heparine besitzen eine geringere Affinität zu Plasmaproteinen, vaskulären Matrixproteinen, Endothelzellen, Makrophagen und Thrombozyten als unfraktionierte, hochmolekulare Heparine. Heparin wird therapeutisch zur Blutgerinnungshemmung eingesetzt weil es die gerinnungsfaktorenhemmende Wirkung von Antithrombin III vertausendfacht. Heparin ist nicht Magen-Darm-gängig und muss daher injiziert werden (Rabenstein, 2002). Beim *in vitro*-Einsatz in der Zellkultur ist die Interaktion von Heparin mit Zelloberflächenproteinen beabsichtigt, um die Heparin- bzw. Heperansulfat-abhängige Rezeptorbindung von bFGF und VEGF zu stimulieren, daher muss dort hochmolekulares Heparin eingesetzt werden (Krilleke *et al.*, 2009).

### 3.4 HOX-Transkriptionsfaktoren

Im Gen- und Transkriptionsfaktor-Zusammenspiel der hämatopoetischen Stammzellregulation nehmen die *HOX*-Gene eine wichtige Stellung ein. Sie gehören einer Gruppe eng verwandter Gene an, die die Anterior-Posterior Achsenbildung und die Segmentierung aller Metazoa während der frühen Embryogenese steuern. Die *HOX*-Gene sind in Clustern organisiert. Bei *Drosophila* sind es acht Gene in einem Cluster, welches in zwei Gruppen geteilt ist: Antennapedia-Komplex (ANT-K) und Bithorax-Komplex (BX-K). In den Säugetieren die *HOX*-Gene in vier Clustern (A-D) mit insgesamt 39 Genen organisiert, mit einer Orientierung von 3' nach 5'. Sie werden kolinear zu ihrer Position im Cluster exprimiert, wodurch das spezifische zeitliche und räumliche Expressionsmuster entsteht (Abb. 3.5 A)(Krumlauf, 1994). *HOX*-Gene beinhalten die 183 Nukleotide umfassende Homöobox, die für die sequenzspezifische DNS-Bindungsdomäne, die Homöodomäne (61 Aminosäuren) der Transkriptionsfaktoren kodiert (Levine und Hoey, 1988) (Abb. 3.5 B). Die Domäne umgebende Sequenzen beeinflussen durch Wechselwirkung mit weiteren regulatorischen Proteinen die Spezifität der Transkriptionsfaktoren. Trotz einiger arttypischer Änderungen in der Homöobox-Sequenz ist die Proteinsequenz stark konserviert, daher sind die *HOX*-Proteine auch artfremd wirksam (Gehring *et al.*, 1994; Buske und Humphries, 2000). Zusätzlich zu ihrer oben beschriebenen Rolle während der Embryogenese sind sie auch wichtige Regulatoren des Stammzellverhaltens, besonders im hämatopoetischen System (Lawrence und Largman, 1992; Sauvageau *et al.*, 1995; Abramovich *et al.*, 2005). Im humanen Stamm- und Vorläuferzellkompartiment (HSPZ) werden mindestens 16 verschiedene *HOX*-Gene exprimiert. Dabei werden *HOX*-Gene des A, B und C Clusters (vorrangig 3' im Cluster gelegene Gene) hauptsächlich in

unreifen Vorläuferzellen (CD34+) exprimiert, die Gene des D-Clusters sind hier nicht aktiv (Moretti *et al.*, 1994; Buske und Humphries, 2000). Dafür sind die Gene der A, B und C Cluster wiederum nicht oder kaum (nur 5' gelegene Gene) in den reifen HSPZ (CD34-) aktiv (Lawrence *et al.*, 1996). Somit spielen die *HOX*-Gene eine größere Rolle in den primitiven HSZ. Eine dysregulierte Expression führt in vielen Fällen zur Leukämogenese (Kawagoe *et al.*, 1999; Buske und Humphries, 2000). Das für diese Arbeit verwendete *HOX*-Gen ist *HOXB4*, es gehört zur Gruppe der 3' gelegenen *HOX*-Gene und ist *in vivo* auch primär in den unreiferen HSPZ aktiv (Buske und Humphries, 2000).

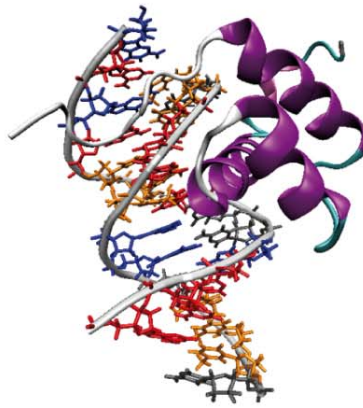
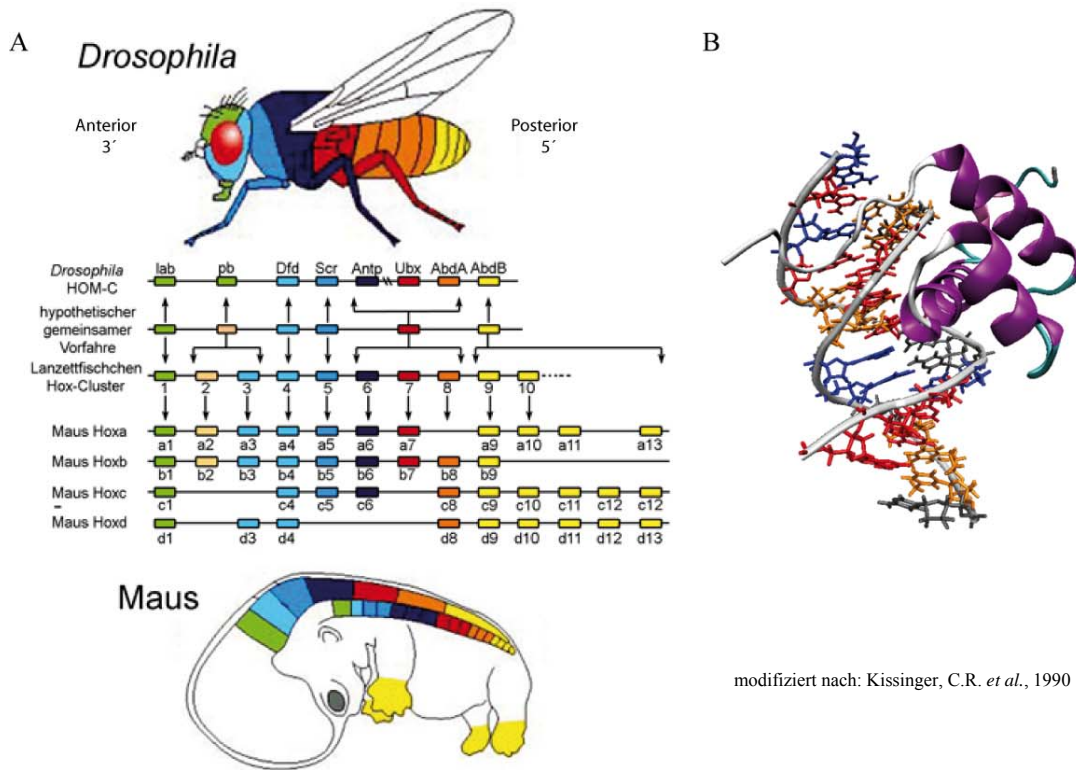
### 3.4.1 *HOXB4*

Als ein Mitglied der embryonalentwicklungsrelevanten *HOX*-Gene wird *HOXB4* nicht nur im Mesoderm und der fetalen Leber exprimiert (korrelierend mit der hämatopoetischen Entwicklung) sondern auch direkt in den primitiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPZ) (Sauvageau *et al.*, 1995; Helgason *et al.*, 1996). Für *HOXB4* konnte als erstes eine Schlüsselrolle in der Regulation der HSZ-Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung gezeigt werden (Sauvageau *et al.*, 1994; Antonchuk *et al.*, 2001, 2002) Ist die *HOXB4* Expression inhibiert oder gestört, kommt es zur Reduktion der HSZ-Proliferationskapazität, einhergehend mit einer Reduktion der Zellzahlen in Milz und Knochenmark um 20%. Dies hat eine Minderung der Erythrozyten- und Myelozytenzahl im peripheren Blut zur Folge (Bjornsson *et al.*, 2003).

Die Überexpression des humanen *HOXB4* auf murinen HSZ verleiht selbigen, durch einen verkürzten (Stamm)zellzyklus und gesteigerter Zellteilungsrate (Krosi und Sauvageau, 2000; Antonchuk *et al.*, 2001) einen deutlichen Proliferationsvorteil *in vitro* sowie *in vivo* (Sauvageau *et al.*, 1995). Dies führt zu einer Vergrößerung des Stammzellpools, eine Eigenschaft die *in vitro* für die Optimierung von Stammzelltransplantaten genutzt wird. Denn Knochenmark- oder auch Nabelschnurbluttransplantate enthalten nur wenige Stammzellen, was ein langsames Engraftment zur Folge hat und daher zu einer längeren Rekonstitutionsphase des Empfängers führt - eine Phase in der es zu lebensbedrohlichen Infektionen kommen kann, da kein funktionstüchtiges Immunsystem vorhanden ist. Eine kurze *in vitro* Expansion der Transplantate unter *HOXB4* Überexpression führt zu einer signifikant verbesserten Rekonstitution (Sauvageau *et al.*, 1995; Thorsteinsdottir *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006c). Die retrovirale Expression von *HOXB4* ist allerdings für die Anwendung im therapeutischen Sektor aus drei Gründen keine zukunftssträchtige Anwendung: erstens weil eine Modifikation des Wirtsgenoms das Risiko einer Insertionsmutagenese beinhaltet (Dang *et al.*, 2002), zweitens weil es unter andauernder *HOXB4* Expression zu einer Dysregulation von Myelopoese und Lymphopoese kommt (Brun *et al.*, 2003;

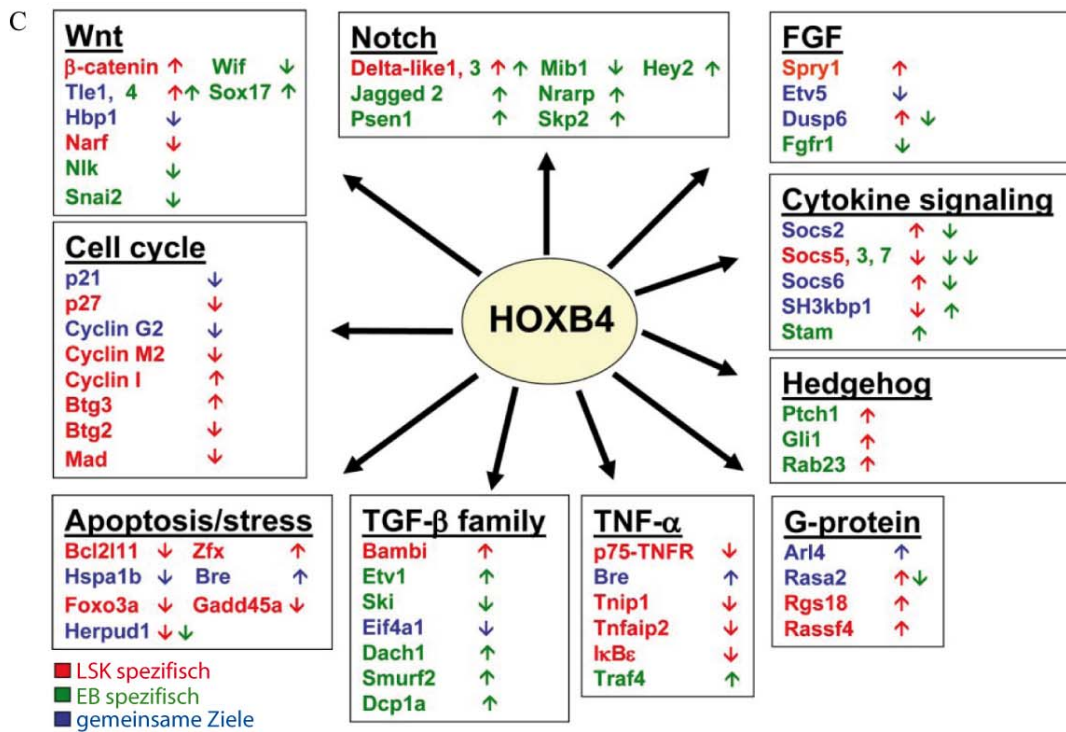
Schiedlmeier *et al.*, 2003; Pilat *et al.*, 2005b) und drittens auch die Entstehung einer Leukämie nicht auszuschließen ist (Zhang *et al.*, 2008c). Eine regulierbare Expression z.B. via Tet-System löst nur das zweite Problem, die Applikation von HOXB4-Protein immerhin das erste und das zweite Problem. Allerdings ist die Effizienz der Proteingaben momentan für *in vivo*-Applikationen noch unzureichend (Amsellem *et al.*, 2003; Krosi *et al.*, 2003). Von embryonalen Stammzellen abgeleitete HSZ (ESZ-HSZ) weisen unter HOXB4-Überexpression einen signifikant höheren Anteil langzeitpopulierender HSZ mit gleichzeitig gesteigerter *in vivo* Engraftment- und Repopulierungsfähigkeit auf (Kyba *et al.*, 2002; Pilat *et al.*, 2005b; Chan *et al.*, 2008). Der zugrunde liegende mechanistische Prozess ist noch weitgehend ungeklärt. Anscheinend beeinflusst HOXB4 hauptsächlich die Wahrnehmung und Reaktion auf klassische Signalwege sowohl in adulten HSZ als auch in ESZ-HZ (Schiedlmeier *et al.*, 2007).

**Abb. 3.5 (nächste Seite) Das Homöobox-Gen *HOXB4* ist Mitglied der *HOX*-Genfamilie.** (A) Die Homöobox-Gene sind in den Säugetieren in 4 Clustern (A-D) mit insgesamt 39 Genen organisiert. Sie besitzen ein zeitliches und räumliches Expressionsmuster und definieren daher die Anterior-Posterior Körperachse sowie die Segmentierung. Außerdem sind sie wichtige Regulatoren des Stammzellverhaltens. (B) Homöobox-Sequenz codiert für die stark konservierte Homöobox. Diese besteht aus drei  $\alpha$ -Helices, die Dritte ist die sequenzspezifische DNS-Bindungsdomäne, die angrenzenden Strukturen gehen Wechselwirkungen mit anderen regulatorischen Proteinen ein, wodurch eine Aktivitätsmodulation der Transkriptionsfaktoren erreicht wird. (C) Der regulatorische Mechanismus von HOXB4 ist nicht vollständig erforscht, aber verschiedene Studien weisen darauf hin, dass HOXB4 die Wahrnehmung und Reaktion von HSZ und ESZ-HZ auf klassische Signalwege moduliert.



modifiziert nach: Kissinger, C.R. *et al.*, 1990

modifiziert, aus Alberts et al. 2003 Molekularbiologie der Zelle



modifiziert, aus Schiedlmeier et al., 2007

### 3.5. Immunsystem (Janeway *et al.*, 2005) und Transplantation

Neben dem Transport von Atemgasen, Nährstoffen, der Verteilung von Hormonen, dem Wundverschluss, der Wärmeregulation und weiteren Funktionen ist das Blut mit seinen spezialisierten Zellen und Proteinen ein Hauptbestandteil des Immunsystems. Dieses hat sich im Laufe der Evolution zu einem immer komplexeren System zur Abwehr exogener und endogener Gefahrenstoffe und Organismen entwickelt, bis hin zu dem dualen Immunsystem der Säuger. Dieses komplexe Immunsystem besteht aus verschiedenen Organen, Geweben, Zellen und Molekülen, deren Aufgaben die Erkennung und Vernichtung bzw. Neutralisierung von in den Körper eindringender pathogener Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, etc.), sowie die „Entsorgung“ bereits infizierter oder aus sonstigen Gründen entarteter eigener Körperzellen ist. Dafür ist es unabdingbar, dass das Immunsystem zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden kann. Ist diese Regulation gestört, richtet sich die Immunantwort auch gegen körpereigene gesunde Zellen, dann entsteht eine so genannte Autoimmunreaktion, die z.B. Ursache für Multiple Sklerose, Rheuma, Diabetes Typ I ist. Eine entgegengesetzte Fehlfunktion wäre die Tolerierung entarteter Zellen, was zur Entstehung von Tumoren führen würde. Es werden die primären Organe des Immunsystems - Knochenmark und Thymus und die Sekundären - Milz, Lymphknoten und weitere lymphatische Gewebe, unterschieden. Der sich neu entwickelnde Organismus ist durch das Immunsystem der Mutter geschützt, um postnatal den Immunschutz zu gewährleisten besitzen Säuger ein angeborenes Immunsystem, welches im Verlauf der Entwicklung durch das erworbene bzw. adaptive, spezifische Immunsystem ergänzt wird. Letzteres ist anpassungsfähig gegenüber neuen oder sich verändernden Strukturen (Antigenen) auf Pathogenen oder malignen Zellen. Allerdings ist zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems ein Erstkontakt mit dem Erreger oder dem körperfremden Protein sowie kostimulatorische Reize des angeborenen Immunsystems nötig (Iwasaki und Medzhitov, 2010). Das angeborene Immunsystem, das so genannte unspezifische Immunsystem, ist bereits in der Lage zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Neben humoralen Faktoren wie dem Komplementsystem, verschiedenen bakteriziden Enzymen sowie immunmodulatorischen Zytokinen, wie z.B. Interferone oder Interleukine (welche allerdings nicht ausschließlich auf das angeborene Immunsystem beschränkt sind) sind auch verschiedene zelluläre Komponenten an der angeborenen Immunreaktion beteiligt. Aktivierte Macrophagen und Granulozyten phagozytieren opsonierte pathogene Mikroorganismen. Die in den Mastzellen gespeicherten Zytokine sind Entzündungsmediatoren und Aktivatoren des Immunsystems, und die natürlichen Killerzellen (NKZ) sind in der Lage virusinfizierte Zellen und entartete Körperzellen zu eliminieren.

Bei einer Transplantation (Tx) körperfremden Gewebes (Xenotransplantation - artfremde Tx, Allotransplantation - gleiche Art) gelangen körperfremde Antigene in den Organismus. Diese Antigene



werden prozessiert, präsentiert und führen zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems und damit zu Entzündungs- und Apoptosereaktionen, die allgemein als Abstoßungsreaktion (*host versus graft*) bezeichnet werden. Zusätzlich wenden sich mittransplantierte T-Zellen gegen das Gewebe des Empfängers und verursachen dort gleiche Effekte, diese Reaktion wird als „*graft versus host disease*“ (GVHD) bezeichnet. Selbst eine möglichst große Gewebetypähnlichkeit (HLA/MHC-Übereinstimmung) zwischen Spender und Empfänger kann diese Reaktionen nicht völlig ausschließen (Jacobsohn und Vogelsang, 2007). Bei einer autologen Transplantation (körpereigenes Gewebe) gibt es keine fremden Antigene und T-Zellen und somit auch keine Abstoßungs- bzw. GVHD-Reaktionen. Im Mausmodell lassen sich durch Auswahl übereinstimmender Zelllinien mit dem zu transplantierenden genetischen Maushintergrund derartige Reaktionen minimieren. Für artifizielle Zellen wie z.B. embryonale Stammzell-Derivate, liegt das Abstoßungsrisiko allerdings nicht darin, dass sie die falschen MHC-I tragen könnten, sondern darin, dass sie gar keine oder nur sehr wenige MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren und sich damit zum Ziel der zytotoxischen NKZ machen (Rideout *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2007; Tabayoyong *et al.*, 2009).

### 3.5.1 Natürliche Killerzellen (NKZ) der Maus

Neben T- und B-Lymphozyten stellen die NKZ die dritte Lymphozyten-Population dar. Während T- und B-Zellen schon länger bekannt waren, wurden die NKZ erst Mitte der 1970er Jahre entdeckt (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975b). NKZ entstammen dem Knochenmark, besitzen mit den T-Zellen eine gemeinsame Vorläuferzelle und können wie diese auch im Thymus ausreifen. Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3-Ligand) ist dabei frühester treibender Differenzierungsfaktor (Lanier *et al.*, 1992). Reife NKZ entstehen schon während der Embryogenese, noch bevor T-Zellen nachweisbar sind (Carlyle *et al.*, 1998). NKZ zirkulieren nach einer circadianen Rhythmik im Blut und kommen im lymphatischen Gewebe, in der Milz, Leber und anderen soliden Organen vor. Es handelt sich um eine heterogene Population großer granulärer Lymphozyten, die wichtige und schnelle Produzenten von Zytokinen, wie z.B. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sind. IFN- $\gamma$  wirkt direkt antiviral und kann auch T-Zell-Aktivität stimulieren (Martin-Fontecha *et al.*, 2004). NKZ können durch verschiedene Zytokine in ihrer Proliferation, Differenzierung und Zytotoxizität inhibiert aber auch stimuliert werden. Die Proliferation von NKZ wird *in vivo* und *in vitro* z.B. durch Interleukin-2 (IL2), ein generell Lymphozyten aktivierendes Peptidhormon, stimuliert. Es erhöht zudem *in vivo* die Zytotoxizität der NKZ und aktiviert NKZ *in vitro* (London *et al.*, 1986). Die Zytotoxizität von NKZ wird durch eine ganze Reihe weiterer Interleukine und auch INF $\gamma$  gesteigert (Weigent *et al.*, 1983; Manyak *et al.*, 1989). NKZ sind anders als T- oder B-Zellen nicht Einzel-Antigen-

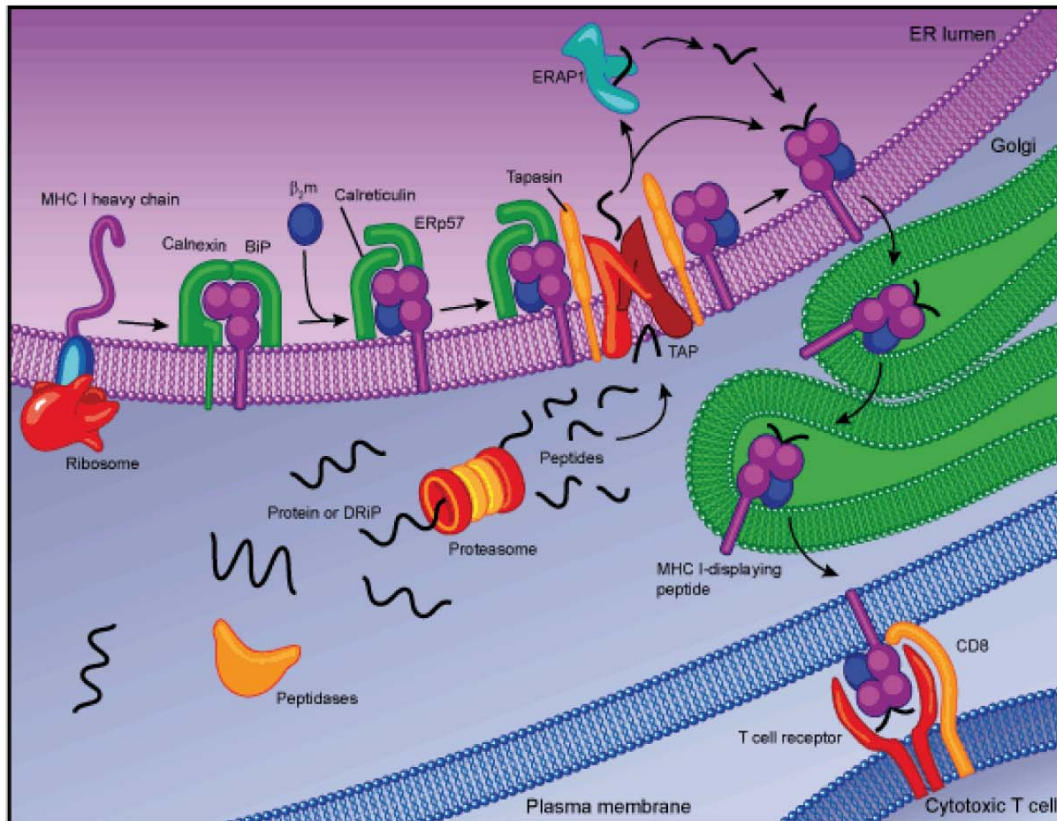
Rezeptoren limitiert, sondern besitzen ein variables, aber balanciertes, inhibitorisches und aktivierendes Rezeptorenrepertoire, mittels dessen sie verschiedenste Zellen ohne vorherige Sensibilisierung oder MHC-restringierte Antigenpräsentation lysieren können. Dadurch zählen sie zu den zellulären Mediatoren des angeborenen unspezifischen Immunsystems und sind gleichzeitig Schaltstelle zum erworbenen adaptiven Immunsystem (Lanier, 2005). Diese aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren werden mehrheitlich konstitutiv auf der NKZ-Oberfläche exprimiert und müssen somit nicht gesondert induziert werden. Dabei besitzen nicht alle NKZ das gleiche Rezeptorenrepertoire (Cerwenka und Lanier, 2001). Alle inhibitorischen Rezeptoren, darunter auch die stärkste inhibitorische Rezeptorenfamilie im murinen System, die Ly-49-Rezeptoren (funktionelles Homolog im Mensch: KIR), binden hochaffin die körpereigenen MHC-I Moleküle auf den Zielzellen und halten die NKZ inaktiv, selbst wenn andere Liganden an aktivierende Rezeptoren gebunden haben. Diese aktivierenden Liganden werden vermehrt auf infizierten und gestressten Zellen exprimiert, sind aber auch auf allen gesunden Zellen vorhanden und nötig um NKZ-Aktivität und primär auch die „Selbst“-Erkennung zu stimulieren. Sind nun die körpereigenen MHC-I Moleküle reduziert oder fehlen ganz, wie es bei virusinfizierten (Bukowski *et al.*, 1983; Biron *et al.*, 1999) oder tumorentarteten (Diefenbach und Raulet, 2002) Zellen oft der Fall ist, fehlt es an der „Selbst“-Erkennung, die aktivierenden Reize auf die NKZ überwiegen und die Zielzelle wird lysiert. Dieser Mechanismus wurde Mitte der 1980er Jahre als der primäre „missing self“-Prozess beschrieben (Ljunggren und Karre, 1985; Karre *et al.*, 1986; Karre, 2002; Raulet, 2006). ESZ weisen auch keine bzw. nur sehr geringe Level an MHC-I Expression auf. Trotzdem wurden sie oft als immunprivilegiert charakterisiert, nicht zugänglich für die NKZ-Lyse und auch nicht für die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Verschiedene Studien diskutieren dies mittlerweile konträr (Drukker *et al.*, 2002; Fandrich *et al.*, 2002; Kofidis *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2007). Auch die EB-Zellen galten als immunprivilegiert (Drukker *et al.*, 2006), doch EB-Zellen bilden eine starke Mischkultur, sodass ihre immunologische Klassifizierung problematisch ist. Im Vergleich dazu lassen sich gewebe-/linienspezifisch ausdifferenzierte und ESZ-abgeleitete Zellen besser charakterisieren. Für die hämatopoetischen ESZ-abgeleiteten Zellen wurde nun in vielen Studien gezeigt, dass eine NKZ-vermittelte Abstoßung deren Langzeitengraftment in immunkompetenten Empfängern unmöglich macht (Rideout *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2007; Tabayoyong *et al.*, 2009). Ursächlich dafür ist eine Disbalance zwischen inhibitorischen und aktivierenden NKZ-Liganden: die NKZ-inhibitorischen MHC-I-Moleküle fehlen ganz oder größten Teils, verschiedene aktivierende NKZ-Liganden, wie z.B. H60 (Tabayoyong *et al.*, 2009) werden hingegen exprimiert. Eine Erkennung als „Selbst“ beendet den NKZ-Zell-Kontakt. Wurde eine gebundene Zelle von einer NKZ aber als „Nicht-Selbst“ erkannt, kommt es zur Lyse der Zelle durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen aus den NKZ-Granula (Criado *et al.*, 1985). Exprimieren Zielzellen Fas („dead receptor“) können NKZ diesen mit ihrem FAS-Liganden (Fas-

L) binden, dadurch werden in der Zielzelle Caspasen aktiviert, die dann zur Apoptose führen (Henkart und Sitkovsky, 1994). Über diesen Mechanismus werden auch aktivierte NKZ zerstört, wenn die Immunreaktion beendet werden soll.

### 3.5.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I (MHC-I)

Die Proteine des MHC („*major histocompatibility complex*“) bestimmen unser immunologisches „Selbst“. Ihre Entdeckung auf Leukozyten führte zu dem im humanen System verwendeten Begriff HLA-System („*human leucocyte antigen*“). Sie sind wichtige Interaktionspartner des unspezifischen (angeborenen) und des adaptiven (erworbenen) Immunsystems. In den Vertebraten kodieren verschiedene Genen für drei Klassen von MHC. Die Klasse I und Klasse II MHC-Proteinkomplexe bereiten Antigene auf, und präsentieren sie auf der Zelloberfläche, damit die Antigene von T-Zellen erkannt werden können. Die MHC-abhängige Antigen-Erkennung durch T-Zellen wird MHC-Restriktion genannt. Außerdem sind die MHC-I wichtige Liganden für die NKZ zur Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ der interagierenden Zelle. Die MHC-III sind Plasmaproteine des Komplementsystems, zu denen die Komplementfaktoren C2, C4, Bf und verschiedene Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gehören. MHC-III sind Bestandteil der unspezifischen und spezifischen humoralen Immunantwort. MHC-I bestehen aus einer schweren Kette, die wiederum aus drei  $\alpha$ -Untereinheiten besteht, sowie der  $\beta_2$ -Mikroglobulinuntereinheit. Für die schwere Kette der MHC-I existieren verschiedene Allele (genetischer Polymorphismus), was zur Entstehung individueller Gewebemerkmale führt. Die Peptid-/Antigenbindestelle wird von den  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Untereinheiten der schweren Kette gebildet. Der Zusammenbau des MHC-I, inklusive Peptidbeladung, erfolgt durch eine Reihe von Hilfsproteinen und läuft konstitutiv in allen kernhaltigen Zellen ab (Abb. 3.6; Krebs *et al.*, 2010). Bei dem klassischen Vorgang wird die schwere Kette des zu bildenden MHC-I kotranslational in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert. Daran binden zunächst die Chaperone Calnexin und BiP (Immunoglobulin bindendes Protein). Sie unterstützen die Proteinfaltung der schweren Kette und die Zusammenführung mit der  $\beta_2$ -Mikroglobulineinheit. Dies nicht kovalent verbundene Dimer wird dann durch das nachfolgende Chaperonpaar Calreticulin und ERp57 (Thiolreduktase) stabilisiert und für die Peptidbeladung optimiert (Gromme und Neefjes, 2002; Paulsson und Wang, 2003). ERp57 unterstützt dabei die intramolekulare Disulfidbrückenbildung in der  $\alpha$ -Kette (Lindquist *et al.*, 2001). Der TAP-Transporter („*transporter associated with antigen processing*“) schleust nun passende, im Zytoplasma durch das Proteasom und Peptidasen prozessierte, Peptidfragmente ins Lumen des ER. Bei Bedarf werden die Peptidfragmente vom ER-Lumen-Protein ERAP1 weiter getrimmt. Der TAP ist dabei von vier

Tapasin-Molekülen umgeben (Peptidbeladungskomplex), die einen dichten Kontakt zum vorbereiteten MHC-I-Molekül herstellen und ERp57 vom MHC-I-Chaperon-Komplex zurücknehmen. An dieser Stelle wird das fertig prozessierte Peptid auf die Peptidbindestelle des fertigen MHC-I geladen. Das Antigenbeladene MHC-I wird vom TAP-Tapasin-Komplex dissoziiert und wird dann durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (Tan *et al.*, 2002), wo es mit T-Zellen oder NKZ entsprechend interagiert.



aus: Philippe Krebs, Eva Marie Y. Moresco, Beutler B. Record for ganymede, updated Jul 27, 2010. MUTAGENETIX (TM), B. Beutler and colleagues, Department of Genetics, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA. <http://mutagenetix.scripps.edu/>

**Abb. 3.6 Prozessierung zelleigener oder fremder Proteine und Antigenbeladung entstehender MHC-I.** Durch Peptidasen und Proteasome werden Proteine gespalten. Die so entstandenen Fragmente werden durch den TAP-Peptidtransporter ins Lumen des ER geschleust und dort mit dem ERAP1 fertig getrimmt. Parallel wird kotranslational die schwere Kette des zu generierenden MHC-I in der ER-Membran verankert, dort durch verschiedene Chaperone gefaltet, mit der  $\beta_2m$ -Mikroglobulinuntereinheit ( $\beta_2m$ ) verbunden, stabilisiert und dann am TAP-Tapasin-Peptidbeladungskomplex mit den getrimmten Peptidfragmenten beladen. Anschließend wird das fertiggestellte MHC-I aus diesem Komplex dissoziiert und über das Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert. Dort präsentiert es das Antigen für zytotoxische T-Zellen oder die „Selbst/Nicht-Selbst“-Erkennung durch natürliche Killerzellen. MHC-I: Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I; ER: Endoplasmatisches Retikulum; BiP: Immunoglobulin bindendes Protein; TAP: mit Antigenprozessierung verbundener Transporter („transporter associated with antigen processing“); ERAP1: Antigenprozessierendes Protein-1 des Endoplasmatischen Retikulums

### 3.5.3 Das murine Cytomegalievirus (mCMV) und sein MHC-I-Mimetikum m144

Bei der Bekämpfung von beispielsweise durch das murine Cytomegalievirus (mCMV) hervorgerufenen Virusinfektionen sind sowohl Komponenten des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems beteiligt. NKZ, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  sind besonders in der akuten Phase einer Infektion aktiv. Sie können den Erreger nicht vollständig eliminieren, so dass dieser sich dauerhaft, latent im Wirt „einnistet“ und in immunschwachen Phasen durch Reaktivierung wieder zu einer akuten Infektion führen kann. Um sich der Immunkontrolle zu entziehen hat mCMV verschiedene Strategien entwickelt. Die erste Stadiestufe ist seine Replikation in weniger immunüberwachten Geweben, wie z.B. den Epithelzellen der Speicheldrüse, oder in Macrophagen (Jarvis und Nelson, 2002). In der latenten Infektionsphase ist die virale Genexpression zusätzlich stark vermindert, was zu einer verminderten Produktion von Antigenen führt. In der zweiten Stufe arbeitet mCMV aber auch mit aktiven Strategien, um aktiv mit einer Immunantwort konkurrieren zu können und eine Ausdehnung der Phase der Virusreplikation, Freisetzung und Transmission zu ermöglichen. In Macrophagen wird die IFN- $\gamma$  gesteuerte Genexpression für die MHC-II-Synthese gestört (Heise *et al.*, 1998). In anderen Zellen produziert mCMV mittels seines *early*-Gens Proteine, die bei der MHC-I-Synthese eingebaut werden und verhindern darüber dass MHC-I das ER/cis Golgi verlassen kann. Somit werden die mCMV-Antigene nicht auf der Zelloberfläche präsentiert (del Val *et al.*, 1992; Ziegler *et al.*, 1997), aber dies führt zu einer Verminderung von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche. So versucht sich das Virus der zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Zell-Reaktion zu entziehen, doch aktiviert es damit den Gegenspieler. Eine Reduktion oder gar Eliminierung von MHC-I löst den „missing self“-Mechanismus von NKZ aus. Um dies zu verhindern produziert mCMV ein weiteres Protein, m144, das als Homolog der schweren Kette von MHC-I mit  $\beta$ 2-Microglobulin einen funktionsfähigen MHC-I bildet und so an die Zelloberfläche transportiert wird (Farrell *et al.*, 1997). Dort bindet es die inhibitorischen Ly49-NKZ-Rezeptoren und interagiert mit weiteren inhibitorischen NKZ-Rezeptoren der C-Lektin-Superfamilie, wie z.B. CD94 (Kubota *et al.*, 1999; Voigt *et al.*, 2007). In der respektiven Struktur der alpha-2 Domäne von MHC liegt bei *m144* eine Deletion vor, die dazu führt, dass im Protein keine Peptidbindungsstelle für ein Antigen geformt werden kann. Dadurch ist das geformte MHC-I-Mimetikum nicht zur Antigenpräsentation fähig und entzieht sich somit zusätzlich der T-Zell-Erkennung (Chapman und Bjorkman, 1998).

### 3.6 Genetische Manipulation mittels retroviraler Vektoren

Um die Funktion von Genen untersuchen zu können oder sich bereits deren bekannte Funktion zunutze machen zu können, haben sich zwei dominante Strategien durchgesetzt. 1. das Ausschalten eines Genes (Knockdown oder Knockout) und 2. die Überexpression. Diese Strategien bedeuten immer die Manipulation des Erbguts einer Zelle, der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Zur Manipulation der DNS wurden unterschiedliche Techniken etabliert. Eine sehr verbreitete und wirkungsvolle Methode ist dabei das Einbringen zusätzlicher genetischer Information in den Wirtsorganismus mittels Viren. Allerdings waren nicht alle Viren dafür geeignet. Neben wenigen anderen Viren haben sich hauptsächlich die Retroviren (*Retroviridae*) durchgesetzt. Diese teilen sich in zwei Unterfamilien (Orthoretroviren, Spumaretroviren) und sieben Gattungen (Alpha,- Beta,- Gamma,- Delta,- Epsilonretroviren, Lentiviren, Foamyviren). Zusätzlich werden sie noch in einfache und komplexe Retroviren unterschieden (Baum *et al.*, 2006). Primär ist der Aufbau aller replikationskompetenter Retroviren gleich. Sie besitzen ein Kapsid, das von einer inneren Hüllmembran (Matrix) und einer äußeren Hüllmembran (aus der Zellmembran des Wirts) umschlossen ist, welche mit spezifischen Glykoproteinen durchsetzt ist. Im Kapsid liegt das Virusgenom als einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNS) diploid vor. Die RNS-Moleküle sind an das Nukleokapsid gebunden. Zusätzlich beinhalten diese Viren noch die drei Enzyme Integrase, Protease und die reverse Transkriptase. Die Virusproteine der einfachen Retroviren werden von *gag-pol* und *env* codiert, komplexere Retroviren enthalten noch weitere regulatorische Elemente (Coffin *et al.*, 1997). Im Folgenden wird nur noch auf die einfachen Retroviren eingegangen, speziell auf die Gattung der gamma-Retroviren, weil sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. *Gag-pol* und *env* werden 5' und 3' von „*long-terminal repeats*“ (LTR) flankiert. Diese besitzen repetitive Sequenzen, Promotor und Enhancer-Domänen, Anheftungsregionen („*attachment sites*“) sowie Cap- und Polyadenylierungssignal. Zusätzlich trägt die RNS ein Verpackungssignal ( $\psi$ ), das für die Aufnahme der RNS in ein neues Viruspartikel sorgt, und eine Primerbindungsstelle (PBS), die der Startpunkt der reversen Transkription ist (Baum *et al.*, 2006). Retroviren replizieren über ein Provirus (doppelsträngiges DNS-Intermediat), das stabil ins Wirtsgenom integriert wird. Einfache Retroviren infizieren nur sich teilende Zellen, ruhende oder terminal differenzierte Zellen lassen sich mit ihnen nicht produktiv infizieren, dies können aber die komplexeren, lentiviralen Retroviren (Roe *et al.*, 1993; Naldini *et al.*, 1996). Bevor diese Viren aber für einen kontrollierten Einsatz zur Manipulation von Zellen verwendet werden können, müssen die viralen Struktur- und Enzymgene vom Genom separiert werden. An diese Stelle rückt das zu übertragende „Gen von Interesse“ (GOI). Die separierten Virusgene werden dann auf Extraplasmiden zusätzlich in die so genannten Verpackungszellen (Virusproduktionszelllinie, die dem eigentlichen Wirtsorganismus

vorgeschaltet wird) transfiziert. Sie werden dort integriert und translatiert und sind in der Lage funktionsfähige Viruspartikel zu generieren. In diese Viruspartikel wird allerdings nur die Verpackungssignal-tragende „messenger“ RNS (mRNS) des GOI verpackt. Damit ist das Virus nicht in der Lage nach Infektion der Zielzellen erneut Viruspartikel zu generieren. Die neu verpackte mRNS wird über ein erneutes Provirus in das Wirtsgenom integriert. Durch Auswahl bestimmter *env*-Gene bzw. auch rekombinater, veränderter *env*-Gene kann ein wirtszellspezifisches Hüllprotein generiert werden (Danos und Mulligan, 1988; Baum *et al.*, 2006). In den ursprünglichen LTR-getriebenen retroviralen Vektoren kam es aber auf Grund der Intensität der viralen Enhancer und Promotoren zur Koaktivierung von Genen der Integrationsstellennachbarschaft. Dies birgt ein erhebliches (Tumor)risiko. Daher wurde in der neueren Generation der retroviralen Vektoren eine Deletion in die 3' Promotor-Enhancer-Region eingebracht, die nach der reversen Transkription in der Verpackungszelle auch 5' lokalisiert ist und damit keine Transkription mehr starten kann. Diese Vektoren werden als selbst-inaktivierende (SIN) Vektoren bezeichnet. Ein Transkriptionsstart ist dann nur über einen zusätzlichen internen Promotor möglich (Yu *et al.*, 1986). Die Verwendung von definierten internen Promotoren läßt eine zellspezifische und annähernd dosierte Expression des GOI zu. Ein derartiges Expressionssystem erlaubt allerdings keine eng regulierte Expression eines GOI. Handelt es sich um ein integrierendes Retrovirus, wird das GOI dauerhaft synthetisiert. Werden nicht-integrierende Vektoren verwendet, wird das GOI nur sehr kurzzeitig exprimiert, solange bis der Vektor eliminiert wurde. Soll aber über einen definierten Zeitraum eine Expression des integrierten Gens erfolgen, sind indizierbare Systeme nötig. Gossen und Bujard haben im Jahr 1992 das Tetracyclin (Tet)-regulierbare Vektorsystem etabliert (Gossen und Bujard, 1992). was mittlerweile in den Varianten Tet-on (an) und Tet-off (aus) existiert. Es wird jeweils durch die Zugabe von Tetracyclin bzw. dem Tetracyclin-Derivat Doxycyclin reguliert. Die dafür benötigten Elemente wurden anfangs auf zwei Vektoren verteilt (Zweivektorsystem - ZVS). Mit zunehmender Modifizierung dieses Systems konnten alle Elemente in einem Vektor untergebracht werden (Einvektorsystem-EVS). In der vorliegenden Arbeit wurde das Einvektorsystem für die Etablierung einer HOXB4-Tet-on-Regulation in ESZ und ESZ-HZ verwendet. Bei diesem System wird der Tet-Aktivator konstitutiv exprimiert und durch Doxycyclinzugabe dimerisiert. In diesem Zustand bindet er den Tet-Operator („*tet-responsive element*“), der den ihm nachgeschalteten Promotor und damit die Transkription des GOI induziert (Heinz *et al.*, 2010).

### 3.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die gezielte Differenzierung pluripotenter Stammzellen (ESZ, iPS) zu funktionellen, adulten, hämatopoetischen Stammzellen (ESZ-HSZ) *in vitro* ermöglicht detaillierte Untersuchungen zur Entstehung und Progression der embryonalen und adulten Hämatopoese. Darüber hinaus besteht das große Interesse *in vitro* generierte HSZ für Zellersatztherapien im Menschen einzusetzen. Unabhängig zu sein von verfügbaren, histokompatiblen Knochenmarkspendern könnte die Transplantationstherapie revolutionieren und vielen Patienten frühzeitigere Hilfe verschaffen. Noch stärker in den Focus gerückt ist das Interesse für die hämatopoetische Zellersatztherapie durch die stetigen Fortschritte in der Herstellung von induziert pluripotenten Stammzellen (iPS). Damit stände dann erstmalig patientenspezifisches Ausgangsmaterial für die hämatopoetische *in vitro*-Differenzierung zu Verfügung. Vollständig histokompatible und zusätzlich genetisch modifizierbare HSZ könnten das gesamte blutbildende System eines Patienten rekonstituieren sowie genetische Defekte korrigieren. Da bisher etablierte *in vitro* Differenzierungen aber nach wie vor nicht in der Lage sind eine ausreichende Menge ausgereifter, hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) zu generieren, die auf Lebenszeit immunkompetente Empfänger vollständig repopulieren können, erfordert die Umsetzung der genannten Ziele zuerst eine Optimierung der *in vitro* Differenzierung. Daher war es Ziel dieser Arbeit, eine immunphänotypisch charakterisierte, hämatopoetische Stammzellpopulation aus ESZ zu generieren, die nach *in vitro* Expansion und anschließender Transplantation zur uneingeschränkten, dauerhaften Rekonstitution aller Blutzelllinien in immunkompetenten Mäusen führt. Diese Aufgabenstellung soll in folgenden Etappen erreicht werden:

#### Ziel 1:

Optimierung des Differenzierungs- und Expansionsverfahrens zur Generierung der ESZ-HZ und deren immunphänotypische Charakterisierung zur Identifizierung der ESZ-HSZ-Subpopulation, *in vitro*. Dabei sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- a) Welche Subpopulation der ESZ-HZ beinhaltet das Gros der langzeitrepopulierenden HSZ?
- b) Unter welchen Bedingungen wird die Entstehung der ESZ-HSZ erhöht?
- c) Unter welchen Bedingungen und wie weit ist eine Anreicherung der *in vitro* produzierten HSZ möglich?
- d) Wie weit kann man sich bei der *in vitro*-Differenzierung und -Expansion von tierischen und undefinierten Kulturzusätzen lösen?

#### Ziel 2:

Die in der Literatur häufig beschriebene Abstoßung des Transplantats (ESZ-HZ) durch natürliche Killerzellen (NKZ) *in vivo* (Rideout *et al.* 2002; Tabayoyong *et al.* 2009) soll vermieden werden.



Fragestellungen:

- a) Kann stabiles Engraftment in immunokompetenten Empfängern mit ESZ-HZ erreicht werden?
- b) Wie müssen die ESZ-HZ oder deren Generierungsbedingungen für das Engraftment in immunkompetenten Empfängern modifiziert werden?

**Ziel 3:**

Vermeidung der Störung der hämatopoetischen Differenzierung *in vivo*, die durch die ektope Expression von HOXB4 verursacht wird (Schiedlmeier *et al.*, 2003; Pilat *et al.*, 2005b)

Fragestellungen:

- a) In welchem zeitlichen Fenster muss HOXB4 *in vitro* und/oder *in vivo* exprimiert werden um potente ESZ-HSZ zu generieren und diesen robustes Engraftment zu ermöglichen?
- b) Wie hoch muss HOXB4 dafür exprimiert werden?

## 4. Materialien

### 4.1. Versuchstiere

Die, für die im Nachfolgenden genannten Experimente, erforderlichen Tiere wurden nach Einkauf von Zuchtpaaren im zentralen Tierlabor der MHH weiter gezüchtet.

Mausstamm ( <i>mus musculus</i> )	verfügbar durch
129S6/SvEvTac	Taconic, Dänemark
Rag2 <sup>-/-</sup> γC <sup>-/-</sup> Hc <sup>0</sup> (C.129S6(B6)-Rag2 <sup>TM1FWA</sup> N12)	Adrian Trasher Labor, UCL, London, UK

### 4.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Chloroform	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Dtl.
Chloroquine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Ciprofloxacin (Ciprobay®)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Dtl.
Co-trimoxazol (Trimethoprim und Sulfamethoxazol) (Cotrim K® 240mg/5ml)	Ratiopharm, Ulm, Dtl.
Dextransulfat Natriumsalz	Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Schweden
Diethylether	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Dtl.
Essigsäure 100% (v/v)	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Dtl.
Ethanol 100% (v/v)	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Dtl.
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biomol GmbH, Hamburg, Dtl.
Formaldehyd 37% (w/v)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Glycerin 85% (v/v)	Merck, Darmstadt, Dtl.
Isopropanol (2-Propanol)	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Dtl.
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Dtl.
Kalziumchlorid Lösung (2,5M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Ketaminhydrochlorid (Ketamin Gräub®)	Albrecht GmbH, Aulendorf, Dtl.
Magnesiumchlorid	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Magnesiumsulfat	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Midazolamhydrochlorid (Midazolam Injektionslösung 5mg/ml)	Delta Select, Dreieich, Dtl.
Natriumacetat-3-Hydrat	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Dtl.
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Natriumchlorid 0,9% Lösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Dtl
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Protaminsulfat-Salz Reinheit III	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Puromycin (10mg/ml)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
RNaseZap	Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Salzsäure 37% (w/v)	Mallinckrodt Baker, Griesheim Dtl.
Sodiumdodecylsulfat/Natriumdodecylsulfat (SDS/NaDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Streptavidin-Pacific orange	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Streptavidin-PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Mallinckrodt Baker, Griesheim Dtl.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Ultra Qualität)	Biomol GmbH, Hamburg, Dtl.
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Trizol Reagent	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Xylazine (Rompun 2%®)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Dtl.

### 4.3. Enzyme und biologische Substanzen

<b>Enzym/biologische Substanz</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
1 kbp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
100 bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
Adenosintriphosphat (ATP)	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Agarose, Ultra Pure™	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Bacto™ -Trypton	BD, Heidelberg, Dtl.
Betain (5M)	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
CIAP (Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm) (1U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.

Enzym/biologische Substanz	Hersteller/Lieferant
Dispase (10U/mg)	Gibco, Invitrogen GmbH Darmstadt, Dtl.
fetales Kälberserum (FCS) (ESZ getestet)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
fetales Kälberserum (FCS) (Standard)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.; Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Gelatine (Schwein)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Glycogen	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Bacto™ Hefeextrakt	BD, Heidelberg, Dtl.
Heringssperma-DNS (SSDNA)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
humanes holo-Transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Klenow 5U/µl	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
PFU-DNA-Polymerase 2,5U/µl	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Pfx-DNA-Polymerase 1,2U/µl	Stratagene, Amsterdam, NL
Proteinase K	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
Restriktionsenzym AgeI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym BamHI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym BglII	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym Bst1107 ( <i>SnaI</i> )	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym BstXI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym Eco47III	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym EcoRI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym EcoRV	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym FseI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main, Dtl.
Restriktionsenzym HaeIII	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym HincII	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym HindIII	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym HpaI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym NcoI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym NdeI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym NotI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym SalI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym SmaDI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym SphI ( <i>PaeI</i> )	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym StuI ( <i>Eco147I</i> )	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym TaqI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Restriktionsenzym XhoI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
RiboLock	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Rinderserumalbumin (BSA)	US Biological/Biomol GmbH, Hamburg, Dtl.
Select Agar	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
T4-DNA-Ligase (1U/µl)	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.

Enzym/biologische Substanz	Hersteller/Lieferant
T4-Polynucleotid Kinase (10U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Taq-DNA-Polymerase, 1U/μl	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.

### 4.3.1 Antikörper

Antikörper (Klon)	Hersteller/Lieferant
anti-Maus-CD150 (9D1) biotinyliert (TC15-12F12.2) biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-Maus-cKit (2B8) APC ; APC-eFluor750;	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-cKit (2B8) PerCp-Cy5.5	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-Maus-Flk1 (Avas12a1) Alexa Fluor700; biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD34 (RAM34) Alexa Fluor700	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Human-CD34 (OKT4) PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD45 (30-F11) PerCp-Cy5.5; PE; APC; Alexa Fluor700	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD45 (30-F11) PerCp-Cy5.5; PE-Cy7, APC-Cy7	BD, Heidelberg, Dtl.
anti-Maus-CD41 ( ebioMWRreg 30) eFluor450; PE; PE-Cy7	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-Tie2 (TEK4) PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-Sca-1 (D7) PE-Cy7; Alexa700; APC-Cy7; PerCp-Cy5.5	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-Hematopoietic-Lineage-Mix eFluor450 biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA Caltag, Hamburg, Dtl.
anti-Maus-ESAM (1G.8) PE; FITC	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD201 (ebio1560) PE; biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD49b (DX5) APC	eBioscience, San Diego, CA, USA

<b>Antikörper (Klon)</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
anti-Maus-H-2Kb biotinyliert	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-Maus-H60 (205326) APC	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Dtl.
anti-Maus-CD19 (1D3) PE; APC; PerCp-Cy5.5; Alexa Fluor750	BD, Heidelberg, Dtl.
anti-Maus-CD16/32 (93) FcR-Block	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD31 (390) PE; APC; biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-Ter119 (Ter119) PE; APC; eFluor450	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD49b (DX5)-MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Dtl.
anti-Sca-1-MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Dtl.
anti-Maus-CD3e (145-2C11) PE, APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD45.2 (104) APC-eFluor780	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD48 (HM48-1) Pacific Blue; PE-Cy7 APC	BioLegend, San Diego, CA, USA eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD11b (M1/70) eFluor450; APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-F4/80 (BM8) PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-NK1.1 (PK136) PE; APC; biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD69 (H1.2F3) biotinyliert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD150 (TC15-12F12.2) PE; PE-Cy7; biotinyliert	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-Maus-FcεRI (MAR-1) PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-NKp46 (29A1.4) PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD4 (RM4-5) PE; APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-B220 (RA3-6B2) Alexa Fluor700; PE-Cy7, eFluor450	eBioscience, San Diego, CA, USA

Antikörper (Klon)	Hersteller
anti-Maus-CD8 (53-6.7) PE; APC PerCp-Cy5.5	eBioscience, San Diego, CA, USA BD, Heidelberg, Dtl.
anti-Maus-Gr-1 (RB6-8C5) Alexa Fluor700; Pacific Blue; APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
CompBeads anti-Ratte + anti-Hamster Ig <sub>κ</sub>	BD, Heidelberg, Dtl.
CompBeads anti-Maus Ig <sub>κ</sub>	BD, Heidelberg, Dtl.
CompBeads Negativkontrolle	BD, Heidelberg, Dtl.

### 4.3.2 Desoxyoligonukleotide

Desoxyoligonukleotid	Sequenz 5'=> 3' / Katalognr.	Hersteller/Bemerkung
M13f	GTAAAACGACGGCCAGT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M13r	GAAAACAGCTATGACCATG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
SF for	CTGCTGCAGCATCGTTCTGT G	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
LM-PCR1-PRE_Bio	Biotin- GCACTGATAATTCCGTGGTG TTGTC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
LM-PCR2-U3-SIN	ACCTGTAGGTTTGGCAAGCT AGC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
LM-PCR3-R-SIN	TCCAATAAAGCCTCTTGCAG TTGC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
MHJM355 (LM-PCR Polylinker fw-cass.)	CGTCTACCTGCTGTGCCAC TCGAATTCAGATCTCCCG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
MHJM356 (LM-PCR Polylinker rev.-cass.)	GACCCGGGAGATCTGAATTC GAGTGGCACAGCAGTTAGG ACG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
MHJM357 (Polylinker- outer)	GACCCGGGAGATCTGAATTC G	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
MHJM358 (Polylinker-inner)	AGTGGCACAGCAGTTAGGA CG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
EGFPcterm	CATGGTCCTGCTGGAGTTCG TG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
TAV2A-s	CTCGAGAGAGCCGAGGGCA GGGGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
TAV2A-a	CCAGGCCCGGGATTTTCCTC CAC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.

<b>Desoxyoligonukleotid</b>	<b>Sequenz 5'=&gt; 3' / Katalognr.</b>	<b>Hersteller/Bemerkung</b>
TAV2A-a2	[Phos]CCAGGGCCCGGGATTT TCCTCCAC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl. /5' phosphoryliert
Red-s	[Phos]TCGCCACCATGGCCTC CTCCGAGGACGTC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl. /5' phosphoryliert
Red-a	[Phos]GAACAGGTGGTGGCG GCCCTC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl. /5' phosphoryliert
RedExpress- <i>StuI</i>	CCTCCACCGAGCGCCTGTAC C	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144- <i>XhoI</i>	CCCTCGAGCCATGAGGGCTC TGGCGCTG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144- <i>HindIII-s</i>	AATTCAAAAAGCTTCTCGAG CTGCCACCATGAGGGCTCTG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-s1	AACCGCCGTGCGACCTACC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-s2	GAACGCATCTCACGTAGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-s3	CGTATCACCACAGCTGGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-a4	AGAGCCCGTTACCGGACG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-a5	ACAAAGGCTTCCCCGTCGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-a6	GAACCTCCTACGCGTCTT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144-myc- <i>NotI</i>	GCGGCCGCTTACTACAGATC TTCTTCAGAAATAAGTTTTT GTTC AATGCTGGGATCCGGG ACCG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144 – fus- <i>NcoI</i> -a	CTTGCTCACCATGGCTCCAG CTCCAATGCTGGGATCC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
<i>Eco47III</i> -M144-start-s	[Phos]GCTGCCACCATGAGGG CTCTGGCGCTGATATG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl. /5' phosphoryliert
M144- <i>AgeI</i> -a	TCGGAGGAGGCCATGGTGG CGACCGGTCCAATGCTGGG ATCCGGGAC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
<i>AgeI</i> -M144-s	GTCCCGGATCCCAGCATTGG ACCGGTCGCCACCATGGCCT CCTCCGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
M144fus-dsRedEx-ende-a	CTCGGCGCGCTCGTACTGCT CCACGATG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
wPRE for.	GAGGAGTTGTGGCCCGTT GT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
wPRE rev.	TGACAGGTGGTGGCAATG CC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.



<b>Desoxyoligonukleotid</b>	<b>Sequenz 5'=&gt; 3' / Katalognr.</b>	<b>Hersteller/Bemerkung</b>
eGFP for.	CTATATCATGGCCGACAAGC AGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
eGFP rev.	GGACTGGGTGCTCAGGTA GTGG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
flk1 intron for.	GGTTTCAATGTCCCGTATCC TT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.
flk1 intron rev.	CTTTGCCCCAGTCCCAGTTA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtl.

### 4.3.3 Zytokine

<b>Zytokin</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
rhIL2	Aktivierung primärer NK-Zellen	Cetus Cooperation, Emeryville, CA, USA
mIL3	STD-SF-Expansionsmedium	PeproTech, Hamburg, Dtl.
hIL6	STD-SF-Expansionsmedium	PeproTech, Hamburg, Dtl.
mTPO	STIF-, STIF-A5-, STFV- Expansionsmedien, serumfreies EB-Differenzierungsmedium	PeproTech, Hamburg, Dtl.
hFlt3L	STD-SF-, STIF-, STIF-A5-, STFV- Expansionsmedien	PeproTech, Hamburg, Dtl.
mSCF	STD-SF-, STIF-, STIF-A5-, STFV- Expansionsmedien, serumfreies EB-Differenzierungsmedium	PeproTech, Hamburg, Dtl.
hIGF-1	STD-SF-Expansionsmedien	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
hIGF-2	STIF-Expansionsmedien	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Dtl.
rhIGFBP2	STIF-, STIF-A5- Expansionsmedien	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Dtl.
rhFGF basic	STIF-, STIF-A5- Expansionsmedien,	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Dtl.
rkAngptl5	STIF-A5-Expansionsmedium	Abnova, Heidelberg, Dtl.
rhBMP4	serumfreies Differenzierungsmedium	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Dtl.
rhVEGF	STFV-Expansionsmedien, serumfreies EB- Differenzierungsmedium	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Dtl.

Zytokin	Verwendung	Hersteller/Lieferant
rhActivin A	serumfreies EB-Differenzierungsmedium	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Dtl.
mLIF	ESZ-Medium	konditioniertes Medium, eigene Herstellung

#### 4.4 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/zur Verfügung gestellt von
CCE	E.F. Wagner, Institut für Molekulare Pathologie, Wien, Österreich
AFT024	Timm Schröder, Helmholtz-Zentrum, München, Dtl /K.A. Moore
OP9	ATCC/T. Nakano
OP9-delta like 1	J.C.Zúniga-Pflücker, HPI, Hamburg. Dtl.
293T [HEK 293T/17]	ATCC/Rockefeller University
SC1	ATCC/J.W. Hartley, W.P. Rowe
LIF $\alpha$ 5	H.Beug, Institut für Molekulare Pathologie, Wien, Wien, Österreich
YAC-1	DSMZ / Prof. P. F. Mühradt, GBF, Braunschweig, Dtl.

#### 4.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller/Lieferant
100x NEAA (nicht essentielle Aminosäuren)	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
100x Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
10x Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
200 mM Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Biocoll (Dichte 1.077 g/ml)	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Dtl.
DMEM	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
Doxycyclin Hyclat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Heparin Natriumsalz 100KU, Reinheit I-A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Hepes	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
humanes holo-Transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.

Medium/Zusatz	Hersteller/Lieferant
IMDM	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
Knockout-DMEM	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Lympholite-M (Dichte: 1,0875g/ml)	Cedarlane Laboratories/ BIOZOL Diagnostica GmbH, Eching, Dtl.
MethoCult GF M3434	StemCell Technologies, Köln, Dtl.
Monothioglycerol (MTG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
Proteinfreies Hybridomamedium	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Reinstwasser	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
StemPro34 + Nutrition Supplement	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
$\alpha$ -MEM	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.

#### 4.6 Radioaktive Substanzen

Substanz	Herkunft/zur Verfügung gestellt von
$\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Dtl./ Klinik für Strahlentherapie, MHH
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Dtl.

#### 4.7 *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämme

Stamm/Genotyp	Herkunft/zur Verfügung gestellt von
XL-1 blue /recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene AG, Zürich, Schweiz
DH5- $\alpha$ / F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ )	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.

## 4.8 Plasmide

Plasmid	Herkunft/zur Verfügung gestellt von
pcDNA3.MLVsyngag	Axel Schambach, Exp. Hämatologie, MHH
K73 (eco)	T. Kitamura (Morita <i>et al.</i> , 2000)
pMD.G (VSV-g)	Daniel Ory (Dull <i>et al.</i> , 1998)
pCR2.1-TOPO	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
pRRL.PPT.SF.Oct4.PRE	Axel Schambach, Eva Wahrlich, Exp. Hämatologie, MHH (Warlich <i>et al.</i> , 2011)
pRRL.PPT SF.Klf4.PRE	Axel Schambach, Eva Wahrlich, Exp. Hämatologie, MHH (Warlich <i>et al.</i> , 2011)
pRRL.PPT SF.Sox2.PRE	Axel Schambach, Eva Wahrlich, Exp. Hämatologie, MHH (Warlich <i>et al.</i> , 2011)
SF91eGFP2AHOXB4.PRE	Hannes Klump, Exp. Hämatologie, MHH
pMOV.1-hcT2eGFP2AHAHOXB4.PRE (eGFP2AHAHOXB4-TET)	Niels Heinz, Exp. Hämatologie, MHH (Heinz <i>et al.</i> , 2010)
SRS11-SF m144fusmCherry.PRE	Dietrich Armin Lesinski, Exp. Hämatologie, MHH
SRS11-mCherry.PRE	Tobias Mätzig, Exp. Hämatologie, MHH
SRS11-dsRedExpress.PRE	Axel Schambach, Exp. Hämatologie, MHH
pBK-CMV	Hannes Klump, Exp. Hämatologie, MHH
pQPCR-StdX4 (Plasmidstandard)	Tobias Mätzig, Exp. Hämatologie, MHH (Heinz <i>et al.</i> , 2010)

## 4.9 Stammlösungen, Puffer und Kits

Puffer aus Eigenherstellung nach Sambrook *et al.* (1989)

Stammlösung/Puffer/Kit	Hersteller/Lieferant
10x CIAP-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
10x PCR-Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
10x Restriktionsenzym-puffer O, R, G, B, Tango, <i>Bam</i> HI	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
10x T4-DNA-Ligase Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
10x T4-Polynucleotide Kinase-Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE): 0,89 M Tris 0,02 M EDTA pH8,0 0,89 M Borsäure ddH <sub>2</sub> O	eigene Herstellung

<b>Stammlösung/Puffer/Kit</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
20x Saline-Sodium Citrate-Puffer (SSC): 3 M NaCl 0.3 M Tri-Na-Citrat-Dihydrat in ddH <sub>2</sub> O	eigene Herstellung
2x Hepes-Buffer-Solution (HBS): 50 mM Hepes 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ddH <sub>2</sub> O	eigene Herstellung
50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE): 2 M Tris 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA pH8,0 ddH <sub>2</sub> O	eigene Herstellung
Bacillo <sup>®</sup> Plus	Bode Chemie, Hamburg, Dtl.
CASY-Ton	Innovatis AG, Reutlingen, Dtl.
DecaLabel <sup>™</sup> DNA Labeling Kit	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Dye terminator cycle sequencing (DTCS)	Beckman Coulter, Krefeld, Dtl.
Dynabeads-M280-Streptavidin	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Dtl.
Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix	ABgene/ Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
FACS-Flow	BD, Heidelberg, Dtl.
GIEMSA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Lysogeny Broth (LB)-Medium: 10 g/l Bacto <sup>™</sup> Trypton 5 g/l Bacto <sup>™</sup> Hefeextrakt 10 g/l NaCl ddH <sub>2</sub> O autoklavieren 50ng/ml Ampicillin	eigene Herstellung
Lösung Q	Fermentas, St.Leon-Rot, Dtl.
Lyse Puffer	BD, Heidelberg, Dtl.
May-Grünwald-Färbelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Nukleasefreies Wasser	Ambion/ Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Dtl.
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
QIAprep Spin Midi/Maxiprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
QIAquick PCR Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
QuantiTect Fast Sybr Green-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
ReadyMixExtensor PCR Master	ABgene/Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
RNeasy-Mini-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Dtl.
Roti Histokit	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Dtl.

<b>Stammlösung/Puffer/Kit</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Sample Loading Solution (SLS)	Beckman Coulter, Krefeld, Dtl.
Scintillationslösung: OptiPhase SuperMix	PerkinElmer, Rodgau, Dtl.
Tris-EDTA-Puffer pH8,0 (TE): 10mM Tris 1mM EDTA pH 8.0	eigene Herstellung

#### 4.10 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
96 Well-Sequenzprobenplatten	Starlab GmbH, Ahrensburg, Dtl.
96 Well-Sequenzpufferplatten	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
96 Well-Spitzbodenplatten	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Atenschutzmaske Dental Maske mit Ohrschlaufen	FarStar GmbH, Hamburg, Dtl.
Combitips für Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Cytofunnel	Shandon/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Dtl.
Einwegskalpell No. 21	Feather Safty Razor Co., Osaka, Japan
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5; 2,0ml)	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Foliodrape	Hartmann, Heidenheim, Dtl.
Handschuhe Digitil PF	Hartmann, Heidenheim, Dtl.
Kanülen Sterican 20G x1 ½, 23G x 1½, 27G x ½	Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.
Kryoröhrchen 1ml	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Dtl.
MACS LS-Seperationssäulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Dtl.
MACS Prä-Seperationsfilter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Dtl.
Mauskäfige Duracage	Alternative Design Manufacturing & Supply, Inc., Siloam Springs, AK, USA
Menzel Gläser Deckgläschen 24 mm x 50 mm, 21 mm x 24 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Dtl
Menzel Gläser Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Dtl
Röhrchen 7ml mit weißem Deckel	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
MicroAmp 96-Reaktionsplatte mit Barcode 0,1 ml	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.
Mobi Spin Columns S300	MobiTec GmbH, Göttingen, Dtl.
Multiwellplatten für adhärenente Zellen (6, 12)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Multiwellplatten für Suspensionszellen (12, 24)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Multiwellplatten für Suspensionszellen (6, 96)	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml 8er Kette + Deckel	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Petrischalen	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Petrischalen steril 15cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Photopapier K65HM-CE	Mitsubishi Electric Europe, Ratingen, Dtl.
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Pipettenspitzen gestopft	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Dtl.
Präparierbesteck	Omnilab GmbH & Co KG, Bremen, Dtl.
Probengefäß EDTA/KE1.3	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Röntgenfilm Fuji Super	BW Plus Röntgen, Kamp-Lintfort, Dtl.
Röntgenfilmkassette rego spezial 200	Rego X-Ray GmbH, Augsburg, Dtl.
Positiv geladene Nylon-Membran	Amersham Biosciences/GE-Healthcare Europe GmbH, Glattburg, Schweiz
Serologische Pipetten (1 ml - 25 ml)	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Spritzen Injekt <sup>®</sup> 5 ml, 10 ml, 20 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.
Spritzen Omnifix-F 1 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.
Sterilfilter Millex GP 0,22µm	Millipore, Carrigtwohell, Irland
Whatmanpapier	Biometra GmbH, Göttingen, Dtl.
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Zellkulturschalen Adhärente Zellen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Zellkulturschalen Suspensionskultur	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht, Dtl.
Zellsiebe (Falcon)	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.

#### 4.11 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
-80°C Schränke	Sanyo/GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Dtl.
Abzüge	Wesemann GmbH, Syke, Dtl.
Animal Blood Counter – Scil Vet abc	Scil Diagnostics GmbH, Viernheim, Dtl.
CASY <sup>®</sup> Cell Counter TTC	Innovatis, Reutlingen, Dtl.
Digitalkamera	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Dtl.
Digitalkamera Axiocam MRm	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Dtl.
Dispensette <sup>®</sup>	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Dtl.
Durchflusszytometer: FACSAria IIu, MoFlow MoFlow XDP FACSCalibur LSRII	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl. Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl. Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl. BD Bioscience, Heidelberg, Dtl. BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
Elektrophoresekammer + Gelschlitten	bsb11 biotech service blu, Schauenburg, Dtl.
Entwickler X-OMAT 1000	Kodak GmbH, Stuttgart, Dtl.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Feinwaage CPA64	Sartorius AG, Göttingen, Dtl.
Hybridisierungssofen	Stuart Scientific/ Sigma-Aldrich GmbH, München, Dtl.
Kryokontainer „Mr.Frosty“	Nalgene Labware/ Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Kühl-Gefrierkombi Premium Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Dtl.
MACS Multistand + Quadromacs	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Dtl.
Mikropipetten	Gilson inc, Middleton, WI, USA
Mikroskop Olympus CKX 31	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Dtl.
Mikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Dtl.
Mikroskop Zeiss Observer.Z1 + Fluoreszenz-Illuminationssystem EXFO + Inkubator XL multi S1 + TempModul S + Heizeinheit XL-S	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Dtl.
Mikrowelle NN-E205W	Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg, Dtl.
Multipette®	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Multikanalpipette Research 8fach + 12fach	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
NanoDrop Spectrophotometer ND-100	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.
Orbital-Schüttler	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
PCR Cycler Tpersonal, Tgradient	Biometra GmbH, Göttingen, Dtl.
pH-Meter SevenEasy	Mettler Toledo/ Omnilab GmbH & Co KG, Bremen, Dtl.
Photodrucker Mitsubishi P93D	Mitsubishi Electric Europe, Ratingen, Dtl.
Pipettierhilfe Pipetus® classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Dtl.
Real-Time-PCR System- StepOne™ Plus	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.
Scintillationscounter: Beckman Counter LS 6500 Wallac 1450 MicroBeta TriLux	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl PerkinElmer, Rodgau, Dtl.
Sequenzier CEQ™ 8000	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl
Shandon Cytospin	Shandon/Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Siemens Primus Linearbeschleuniger	Siemens Healthcare, Erlangen, Dtl.
SpeedVac RVC 2-18 Rotations-Vakuumkonzentrator	Martin Christ GmbH, Osterode, Dtl.
Sterilwerkbanken Hera Safe Typ HS12	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH in Langenselbold, Dtl.
Stickstoff-Kryotank CBS 2300 series	Custom Biogenic Systems/ Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Dtl.
Stromversorgungsgerät für Gelkammern Biometra PowerPack P25T	Biometra GmbH, Göttingen, Dtl.
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
UV-Photoanlage Gel/Chemi Doc Hood II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.



<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
UV-Tisch Vilber Lourmat EXT-35C	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Dtl.
Vortex Genie 2	Scientific industries, Inc./ Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Dtl.
Vortex Genie 3, IKA	Scientific industries, Inc /Omnilab GmbH & Co KG, Bremen, Dtl.
Vortexer Relaxx top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Dtl.
Waage CPA 4233	Sartorius AG, Göttingen, Dtl.
Wärmeschrank Typ B20	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH in Langenselbold, Dtl.
Wasserbad Julabo 7A + MP Bad/Umwälzthermostat	Julabo GmbH, Seelbach, Dtl.
Wasserbäder Typ 1083, Typ1002	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Dtl.
Werkbänke Captair bio	Omnilab GmbH & Co KG, Bremen, Dtl.
Zellinkubatoren	Binder GmbH, Tuttlingen, Dtl.
Zentrifugen: Allegra X-22-R Avanti J-26-XP Optima™LE-80K Ultrazentrifuge + SW-28 Rotor Heraeus Pico 17  Eppendorf 5415R	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl. Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl. Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl.  Heraeus/Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Dtl. Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.

#### 4.12 Software

<b>Software</b>	<b>Herkunft</b>
CloneManager Vers.7 und 9	Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA
FlowJo Vers. 7.2.2 und 7.6.1	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
FACSDiva	BD, Heidelberg, Dtl.
Cell Quest Pro	BD, Heidelberg, Dtl.
Microsoft® Office 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Dtl.
GraphPad PrismGraph	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe Illustrator CS2 12.0.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Zeiss AxioVisonLE 4.6.3	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Dtl.

---

<b>Software</b>	<b>Herkunft</b>
CASY Doc	Innovatis, Reutlingen, Dtl.
CEQ 8000 - Genetic Analysis System Software Vers. 9.0	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Dtl
Endnote Vers. 7 und 8	Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA
Scil Vet abc-Software	Scil Diagnostics GmbH, Viernheim, Dtl.
XMind	XMind LTD, Hong Kong, China
StepOne™ Software v2.0	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.
ND-1000 V3.3.0	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.

## 5. Methoden

### 5.1 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden gemäß genehmigten Tierversuchsvorhaben (Aktenzeichen 06/1193) nach geltendem deutschen Recht durchgeführt. Cindy Elfers und Rena Struß (Tier-Technische Assistentinnen der Abteilung für Experimentelle Hämatologie, MHH) übernahmen die Betreuung der Zuchten, die Durchführung von intravenösen Injektionen und retro-bulbären Blutungen.

#### 5.1.1 Haltung und Zucht

Eingekaufte Zuchtpaare der Inzuchtstämme 129S6/SvEvTac und Rag2<sup>-/-</sup>γC<sup>-/-</sup>Hc<sup>0</sup> (C.129S6(B6)-Rag2<sup>TM1FWA</sup>N12) wurden im Reinbereich (IVC-Haltung) des Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) nach Vorschrift gehalten, verpaart und Nachkommen für die eigenen Tierversuche gezüchtet. Die Zuchten wurden im Zuchtbuch protokolliert. Für die Verpaarungen wurden immer Geschwistertiere verwendet die mind. 12 Wochen alt waren. Alle Tiere wurden unter fortlaufender Nummer geführt. Die Markierung erfolgte per Lochcode in den Ohren.

#### 5.1.2 Bestrahlung von Versuchstieren

Einen Tag vor der geplanten Transplantation wurden die dafür vorgesehenen Mäuse in Bestrahlungskäfige umgesetzt und von den Medizinphysikern (Jörg Frühauf und Kollegen) der „Klinik für Strahlentherapie und spezielle Onkologie“ der MHH nach dem in Tab. 5.1 angegebenen Protokoll am Linear-Beschleuniger Siemens Primus bestrahlt. Die 129S6/SvEvTac-Mäuse wurden mit 11 Gy und die Rag2<sup>-/-</sup>γC<sup>-/-</sup>Hc<sup>0</sup>-Mäuse mit 9.5 Gy in einer Dosis letal bestrahlt. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihre ursprünglichen Käfige umgesetzt und ihrem Trinkwasser 100 ng/ml Ciprofloxacin (Ciprobay, 200 mg/100 ml) beigesetzt. In der zweiwöchigen Behandlungsdauer wurde das Trinkwasser all drei Tage gewechselt.

**Tab5.1 Bestrahlungsprotokoll für eine mittlere Bestrahlungsintensität (1,5 Gy/min)**

Einstellung:	Feldgröße (FG):	40 cm x 40 cm
	Gantrystellung:	180°
	Kolliwinkel:	0°
	Abstand (FHA):	146 cm
Energie:		6 MV Photonen
Dosisleistung:	Hoch	300 cGy/min (Tatsächliche Dosisleistung durch 146 cm Abstand ist 1,5 Gy/min)
Monitorvorwahl:	Dosis: 11 Gy	2109 Monitoreinheiten (M.U.)
	Dosis: 10 Gy	1917 M.U.
	Dosis: 9,5 Gy	1821 M.U.

### 5.1.3 Gewinnung von Kompetitorzellen (inkl. Depletion von Sca-1+ Zellen)

Wie im Experiment angegeben wurden für die Präparation entweder 129S6/SvEvTac oder Rag2<sup>-/-</sup>γC<sup>-/-</sup>Hc<sup>0</sup> im Alter von 3-6 Monaten verwendet. Das Knochenmark (KM) von Femur und Tibia beider Hinterläufe wurde mittels einer 27G-Kanüle aus den Knochen gespült. Die Zellen wurden entsprechend des Miltenyi-Protokolls des anti-Sca-1-MicroBead-Kits markiert, und in zwei Durchläufen per Positivselektion über LS-Säulen (gemäß Miltenyi-Protokoll) getrennt. Die Sca-1-negative Zellsuspension des Säulendurchflusses wurde gezählt, gewaschen und mit FACS-Puffer (1x PBS, 4% FCS, 2 mM EDTA) eine Konzentration von 2x10<sup>5</sup> Zellen/100 µl eingestellt.

### 5.1.4 Transplantationen und Verlaufskontrolle

Die zu transplantierenden Zelldosen (zw. 1x10<sup>5</sup> - 4x10<sup>6</sup> ESZ-HZ) wurden im ESZ-HZ-Medium auf Zelldosis/Maus/100 µl eingestellt, und dann 1:1 mit der Kompetitorsuspension gemischt. 200 µl Zellsuspension wurden über die Schwanzvene mittels 27G-Kanüle injiziert. Die Tiere wurden für diese Prozedur unter einer Rotlichtlampe angewärmt, um die Blutgefäße zu erweitern. Für die Injektion wurden

die Mäuse kurzzeitig, einzeln in eine Zwangsröhre/Kasten gesetzt. Die frisch transplantierten Mäuse wurden für die ersten zwei Wochen jeden Tag kontrolliert, danach 2-4 Mal pro Woche, bei Krankheitsanzeichen wiederum täglich. Überprüft wurden dabei jedes Mal Agilität, Körperhaltung, Mimik, Ernährungszustand, Fellbeschaffenheit, Durchblutung der Vorder- und Hinterläufe, Verletzungen und eventuelle sonstige Auffälligkeiten.

### 5.1.5 Zwischen- und Endanalysen

Zur Kontrolle des Anwachsens (im Folgenden als Engraftment bezeichnet) und des Chimärismus der transplantierten ESZ-HZ wurde den Mäusen erstmals vier bis fünf Wochen nach der Transplantation (pTx) und dann in mehrwöchigen Abständen ca. 150 µl peripheres Blut (PB) aus dem retro-bulbären Plexus entnommen. Vom PB wurde ein kleines Blutbild sowie ein Blutaussstrich angefertigt. Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten mittels 1x Lysepuffer. Die weißen Blutzellen (WBZ) wurden mit 1x PBS gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für die anschließenden FACS-Analyse (Durchführungsprotokoll siehe 5.2.12) wurden die WBZ mit Antikörpern (AK), gerichtet gegen myeloische (CD11b, Gr-1) und lymphatische (CD3, B220, etc.) Oberflächenmarker markiert, um eine Multilinenbeteiligung der transgenen (GFP+) Zellen zu eruieren.

Bei stärkeren Krankheitssymptomen wie z.B. Anämieanzeichen, starke Abmagerung, oder größeren Wunden, wurden die betroffenen Tiere aus dem Versuch genommen, getötet und endanalysiert. Die Prozedur war dann identisch zur Endanalyse der Tiere bei Versuchsende. Die Mäuse wurden mit Diethylether betäubt, ausgeblutet (retro-bulbär oder durch Eröffnung der *Vena axillaris* in der Achselhöhle) und durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde die Leibeshöhle geöffnet und die Obduktion der inneren Organe vorgenommen. Routinemäßig wurden das Herz, eine Niere, das Sternum, ein Teil von Leber und Lunge, die Milz, Thymus (wenn möglich) sowie pathologische Gewebestrukturen in 4% Formaldehydlösung fixiert und bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf können hiervon histologische Untersuchungen veranlasst werden. Das Knochenmark wurde aus Tibia und Femur beider Hinterläufe mittels einer 27G-Kanüle gespült, mechanisch dissoziiert und über ein 70 µm Zellsieb filtriert. Nach Zählung der KM-Zellen mittels des automatischen Zellzählgerätes CASY, wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen für „Cytospins“ (siehe dazu 5.2.9) verwendet und ca.  $1 \times 10^6$  Zellen für anschließende FACS-Analysen, die übrigen KM-Zellen wurden in 90% FCS und 10% DMSO bei -80 °C eingefroren (stufenweises Einfrieren in Isopropanol-befüllten Kryokontainern), nach 24 h erfolgte die langfristige Kryokonservierung im stickstoffgekühlten Lagertank. Mit dem PB wurde verfahren wie zu den Zwischenanalysen. Der Blutaussstrich sowie die Cytospins des KM wurden mikroskopiert und morphologisch ausgewertet. Für die

FACS-Analysen wurden die WBZ des PB wiederum mit linienspezifischen AK markiert, sowie AK gegen adulte Stammzellmarker (LIN, Sca-1, ckit, CD150, CD48, CD34) für die KM-Proben verwendet. Zur Durchführung der FACS-Analysen siehe 5.2.12.

## **5.2 Zellkultur**

### **5.2.1 Kultur muriner embryonaler Stammzellen (ESZ)**

CCE-ESZ wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Sarstedt) ohne Feederzellen in Knockout-DMEM (Gibco), substituiert mit 15% FCS (ESZ getestet), 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), 1% nicht essentielle Aminosäuren (NEAA), 0.5% mLIF konditionierter Zellkulturüberstand und  $1,5 \times 10^{-4}$  M MTG, bei 37 °C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub> und 5% (v/v) O<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) gewaschen, 2-3 min bei 37 °C inkubiert, in 5 ml frischem Medium aufgenommen, kräftig resuspendiert, ein Aliquot in eine neue Zellkulturflasche überführt und auf 5 ml mit frischem Medium aufgefüllt. An den passagefreien Tagen wurde das Medium gewechselt.

### **5.2.2 Transduktion von ESZ mit retroviralen Partikeln**

Die ESZ wurden mit Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) dissoziiert und dann per CASY gezählt. Pro Well wurden  $3 \times 10^5$  ESZ in 1 ml ESZ-Medium in eine 6- oder 12-Wellplatte für Suspensionszellen ausgesät (bei Gesamtvolumina von über 2 ml wurden 6-Wellplatten verwendet). Unter Beachtung des noch zuzufügenden Volumens viruspartikelhaltiger Zellkulturüberstände wurde Protaminsulfat (4 ng/ml finale Konzentration) und HEPES (20 mM finale Konzentration; Überstände enthielten bereits HEPES) zu den ESZ zugegeben. Anschließend wurden die viruspartikelhaltigen Zellkulturüberstände mit zumeist einer Infektionsdosis von 10 (MOI 10) dazugegeben. Die Platten wurden daraufhin für 60 min bei 32°C und 711xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Ansätze pro Well in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche umgesetzt und mit ESZ-Medium auf 5 ml Mediumvolumen aufgefüllt. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, am übernächsten Tag wurden die Zellen gesplittet, und die Transduktionseffizienz anhand der GFP-Reporterexpression durchflusszytometrisch (FACS) ermittelt. Die Massenkulturen wurden dann wie unter 5.1.1 beschrieben weiterkultiviert oder via FACS sortiert.

### 5.2.3 Zellsortierung am Durchflusszytometer

Transduzierte ESZ wurden mit Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) dissoziiert, mit 1x PBS + 10% FCS der Verdau inaktiviert, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit einem 70 µm Zellsieb filtriert und anschließend in FACS-Puffer (1x PBS, 4% FCS, 2 mM EDTA) resuspendiert und auf  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Die Sortierung erfolgte dann im zentralen Zellsortierlabor der MHH unter der Leitung von Dr. M. Ballmeier. Je nach gewählten Fluoreszenzen wurden die Sortierungen am FACSAriaIIu (Becton Dickinson), MoFlow (Beckman-Coulter) oder XDP (Beckman-Coulter) durchgeführt. Jeweils wurde auf lebende Einzelzellen voreingestellt und dann die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Populationen entweder per Einzelzellablage in 96-Wellplatten (Rund- oder Flachbodenplatten, je 100 µl ESZ-Medium/Well vorgelegt) oder als Massensortierung in Sammelröhrchen (1 ml ESZ-Medium vorgelegt) sortiert. Die Zellen in den Sammelröhrchen wurden mit ESZ-Medium auf ca.  $1 \times 10^5$ /ml eingestellt und jeweils 5 ml in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Die ESZ der Einzelzellablage wurden ohne weitere Behandlungen für die nächsten drei Tage kultiviert.

### 5.2.4 Expansion von ESZ-Einzelzellklonen

Drei Tage nach der Einzelzellsortierung wurden die Wells auf angewachsene Einzelzellklone überprüft und positive Wells markiert. Ca. zwei bis vier Tage später wurden die positiven Wells mit 100 µl frischem ESZ-Medium beschickt. Nach ca. 10 Tagen der Expansion im 96-Well wurden die Einzelzellkolonien mit einer 1000 µl-Mikropipette in eine 12-Well-Suspensionplatte umgesetzt und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mechanisch zerkleinert. Weitere zwei bis vier Tage erfolgte die Kultur im 12-Well, dabei wurde täglich das Medium zur Hälfte getauscht, dabei waren nicht immer alle Kolonien adhärent. Adäquat bewachsene Wells wurden geerntet, indem die in Suspension befindlichen ESZ-Kolonien mit dem Medium abgenommen und in einem Röhrchen trypsiniert, die angehefteten ESZ mit Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) im Well dissoziiert wurden. Beide Suspensionen wurden vereinigt und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 5 ml ESZ-Medium wie unter 5.1.1 weiterkultiviert.

### 5.2.5 Hämatopoetische „Embryoid Body“(EB)-Differenzierung von ESZ

Die ESZ wurden zwei Tage vor der Differenzierung in IMDM, substituiert wie das unter 5.1.1 beschriebene Medium, umgesetzt. Für die EB-Differenzierung wurden die ESZ mit Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) dissoziiert und anschließend gezählt. Für die serumhaltige EB-Differenzierung wurden 3000-4000 Zellen/ml und für die serumfreie EB-Differenzierung 5000-8000 Zellen/ml in 10 cm sterile Bakterienschalen ausgesät. Die serumhaltige EB-Differenzierung wurde in Anlehnung an das von Pilat *et al.*, 2005 publizierte Protokoll durchgeführt. Die ESZ wurden in IMDM, substituiert mit 15% FCS (ESZ getestet), 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), 50 µg/ml Ascorbinsäure, 200 µg/ml humanem Holo-Transferrin, 5% proteinfreiem Hybridoma-Medium (PFHM-II, Gibco) und  $4 \times 10^{-4}$  M MTG, ausgesät. Drei bis vier Tage danach wurde frisches Differenzierungsmedium zugegeben (50% des Ausgangsvolumens), bei Bedarf wurde das Medium am fünften EB-Differenzierungstag vollständig erneuert und die EBs bei zu hoher Dichte auf zwei Platten aufgeteilt. Für die serumfreie EB-Differenzierung wurden die Zellen in StemPro34 + Nutrition Supplement, substituiert mit 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), 50 µg/ml Ascorbinsäure, 200 µg/ml humanem Holo-Transferrin,  $4 \times 10^{-4}$  M MTG und 4 ng/ml rhBMP4, ausgesät. Zweieinhalb Tage später wurden, vorgelegt in jeweils 1 ml Differenzierungsmedium/Ansatz, 5 ng/ml rhFGFbasic, 5 ng/ml rhActivin A, 5 ng/ml rhVEGF, 100 ng/ml rmTPO, 100 ng/ml rmSCF zugegeben. In beiden EB-Differenzierungsprotokollen wurden die EBs nach sechs Tagen geerntet. Verlängerte EB-Differenzierungsphasen erforderten in beiden Systemen die Zugabe von frischem Differenzierungsmedium, sowie Zytokinen beim serumfreien Ansatz. Die geernteten EBs wurden bei 20xg pelletiert, einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 3-5 ml Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) für ca. 3 min. im Wasserbad bei 37 °C dissoziiert (EBs aus späteren Entwicklungsphasen wurden mittels Dispase dissoziiert). Der Verdau wurde dann direkt mit 5 ml FCS inaktiviert, EBs durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert, danach über ein 70 µm Zellsieb filtriert und erneut mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml Expansionsmedium resuspendiert, im CASY gezählt und mit einer Dichte von  $2-3 \times 10^6$ /ml in 12- oder 6-Well-Suspensionsplatten, bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen in die Kokultivierungsansätze ausgesät. Die ESZ-Prädifferenzierungen in IMDM sowie die EB-Differenzierungen wurden bei 37 °C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub> und 5% (v/v) O<sub>2</sub> kultiviert.



### 5.2.6 Kultur und Expansion ESZ-abgeleiteter hämatopoetischer Zellen (ESZ-HZ)

Für die Stromazell-freie Expansion wurden die dissoziierten EB-Zellen (ESZ-HZ d0) mit  $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml in Suspensionszellplatten ausgesät. An den folgenden zwei bis drei Tagen wurden die entstandenen Suspensionszellen von den entstandenen adhären Zellen abgenommen und mit frischem Expansionsmedium in neue Wells überführt. Ab einem Volumen von ca. 4ml mit ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml wurde die Kultur in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen fortgeführt. Ca. die Hälfte des Mediums wurde jeden Tag erneuert und wieder eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Die Zelldichte und Viabilität wurde dabei regelmäßig mit dem CASY kontrolliert. Bei einer Viabilitätsrate unter 80% wurden die toten Zellen bei 4 °C über eine Biocollgradientenzentrifugation für 8 min bei 719 xg abgetrennt. (Durchführung nach Herstellerprotokoll).

Drei verschiedene Basis-Expansionsmedien wurden verwendet:

1. Standardbedingungen (STD-SF) adaptiert nach (Pilat *et al.*, 2005b):

StemPro34 + Nutrition Supplement, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), mSCF (100 ng/ml), mIL3 (4 ng/ml), mIL6, (10 ng/ml), hFlt3L (20 ng/ml), hIGF-I (40 ng/ml), Dexamethason (1 µM)

2. STFV-Bedingungen mit Serum (STFV-S) adaptiert nach (Kyba *et al.*, 2002):

IMDM, 10% FCS (Gibco), 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), mSCF (10 ng/ml), mTPO (20 ng/ml), hFlt3L, 100 ng/ml), rhVEGF (40 ng/ml)

3. STFV-Bedingungen ohne Serum (STFV-SF), Kombination aus 1. und 2.

StemPro34 + Nutrition Supplement, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), mSCF (10 ng/ml), mTPO (20 ng/ml), hFlt3L (100 ng/ml), rhVEGF (40 ng/ml)

**Die Expansion im Kokultivierungsverfahren mit OP9 Zellen** wurde in Ahnlehnung an publizierte Protokolle durchgeführt (Nakano *et al.*, 1994).  $2,5 \times 10^4$  OP9-Zellen, in ihrem Basismedium  $\alpha$ MEM mit 20% FCS (Gibco), 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (PenStrep) in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen expandiert, wurden 24 h vor Kokultivierungsbeginn pro Well in 6-Wellplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium von den OP9-Zellen entfernt und  $1 \times 10^5$  ESZ-HZ d0 (bzw. d7 bei Doppelkokultivierung) in 2 ml STFV-S Medium/Well dazugegeben. Die ESZ-HZ wurden für sieben Tage auf den OP9-Zellen belassen, ab dem dritten Tag wurde das Medium immer zur Hälfte erneuert. Nach sieben Tagen wurden die ESZ-HZ geerntet, dafür die Suspensionszellen aus den

Überständen geerntet, die OP9-Zellen mit 1x PBS gewaschen und das Waschpuffer-Zellgemisch zu den Überständen gegeben. Anschließend wurde die adhärenente OP9-ESZ-HZ-Zellschicht mit Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) dissoziiert, das Trypsin anschließend mit FCS inaktiviert und die Zellen über ein 70 µm Zellsieb zu den Überständen gegeben. Die Zellen wurden bei 260xg pelletiert, in 15 ml STFV-S resuspendiert und für weitere drei Tage in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen expandiert (Ausnahme ESZ-HZ d7 Experimente, hier entfiel der zusätzliche Suspensionsexpansionsschritt). Die Zugabe von frischem Medium erfolgte bei Bedarf.

**Die Expansion im Kokultivierungsverfahren mit AFT024** wurde in Anlehnung an das oben beschriebene OP9-Protokoll durchgeführt. AFT024 wurden nach Standardprotokoll expandiert (Moore *et al.*, 1997a). Die Kultivierung erfolgte bei 33 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, 21% (v/v) O<sub>2</sub> in DMEM, substituiert mit 10% FCS, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), 1x nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA), 1x Natriumpyruvat, 5x10<sup>-5</sup> M 2-Mercaptoethanol, in 6-Wellplatten für adhärenente Zellen. 1x10<sup>5</sup> AFT024 wurden drei Tage vor der Kokultivierung in gelatinierte (0,1% Schweinegelatinelösung für 30 min. bei 4 °C in den Wells inkubiert, anschließend entfernt) 6-Wellplatten/Well ausgesät. Für die Kokultur wurde das Medium entfernt, die konfluenten Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 10 ng/ml Mitomycin C für 45-60 min. bei 37 °C inkubiert, anschließend drei Mal mit 1x PBS gewaschen und dann mit den ESZ-HZ d0 (bzw. d7 bei Doppelkokultivierung) in 2 ml STFV-S beschickt.

**Für die Medien der verlängerten Expansionen** wurde das STFV-S-Basismedium verwendet aber statt der dafür verwendeten Zytokine die publizierten Zytokinbedingungen für STIF (Zhang und Lodish, 2005) und STIF-A5 (Zhang *et al.*, 2008a) verwendet.

STIF: IMDM, 10% FCS (Gibco), 2mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), mSCF (10 ng/ml), mTPO (20 ng/ml), IGF-2 (20 ng/ml), rhFGF-1 (10 ng/ml), 1:1000 Heparin

STIF-A5: IMDM, 10% FCS (Gibco), 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), mSCF (10 ng/ml), mTPO (20 ng/ml), IGFBP-2 (100 ng/ml), rhFGF-1 (10 ng/ml), Angptl5 (100 ng/ml), 1:1000 Heparin

Expansionen die mit red.O<sub>2</sub> angegeben sind wurden bei 37 °C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub> und 5% (v/v) O<sub>2</sub> kultiviert.

Expansionen die mit norm.O<sub>2</sub> angegeben sind wurden bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub> kultiviert.

### 5.2.7 Generierung und Kultivierung von murinen induziert pluripotenten Stammzell-Klonen (iPS)

Der verwendete iPS-Klon LV2-5b wurde nach dem nachfolgenden Protokoll von Eva Wahrlich generiert.  $1 \times 10^5$  murine embryonale OG2-Fibroblasten (OG2-MEF) in 0,1% gelatinierten Wells einer 6-Wellplatte wurden mit den monocistronischen Vektoren pRRL.PPT.SF.Oct4.PRE (muriner Faktor), SF.Klf4 und SF.Sox2 kotransduziert (Warlich *et al.*, 2011). Verwendet wurden je 100  $\mu$ l eines aufkonzentrierten, nicht titrierten, viruspartikelhaltigen Zellkulturüberstandes. Zunächst wurden die Zellen in MEF Medium (niedrig-Glukose-DMEM, 10% FCS, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (PenStrep), 1% nicht essentielle Aminosäuren (NEAA), 100  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol) kultiviert, ab Tag 4 (d4) nach der Transduktion (pTD) in iPS-Medium (abgeleitet vom etablierten ESZ-Medium; Knockout-DMEM, 15% FCS (ESZ getestet) 2 mM L-Gln, 1% NEAA, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (PenStrep), 100  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol, 0.5 % mLIF konditionierter Zellkulturüberstand) weiterkultiviert, zwischen d2 und d9 wurde dieses mit 2 mM Valproat angereichert. An d6 wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA abgelöst und auf C3H Stromazellen (Feeder; im konfluenten Zustand mit Mitomycin C inhibiert) transferiert. An d20 und d24 wurden die Zellen erneut abgelöst und auf frische Feeder umgesetzt. Die ersten iPS-Klone wurden an d30 gepickt, dabei wurde LV2-5 etabliert, für fünf Tage wurden die Klone weiter expandiert und daraus Subklone gepickt. LV2-5b und weitere Klone wurden etabliert. Die expandierten Klone wurden dann anfänglich, in Anlehnung an das ESZ-Protokoll, im zweitägigen Rhythmus gesplittet, dabei immer auf frische, inaktivierte C3H-Feeder umgesetzt. An den splittfreien Tagen wurde das Medium gewechselt. Später wurden die Zellen nur noch alle zwei bis vier Tage gesplittet, falls nötig dazwischen nach zwei Tagen das Medium gewechselt. Die Kultur erfolgte bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub>.

### 5.2.8 Herstellung von murinem Leukämie inhibierenden Faktor (mLIF) als konditionierter Zellkulturüberstand

LIF- $\alpha$ 5-Zellen wurden bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub> in  $\alpha$ -MEM, substituiert mit 10% FCS, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (PenStrep), in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Eine initiale Flasche wurde nach zwei bis drei Tagen auf fünf weitere Flaschen aufgeteilt, jeweils 30 ml Medium/Flasche. Nach 72 h wurde das Medium abgenommen, über ein 0,20  $\mu$ m Flaschenfilteraufsatz steril filtriert, und bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden erneut mit je 30 ml Medium versetzt. Nach weiteren 48 h und 96 h wurde das konditionierte Medium erneut geerntet, steril filtriert,

vereinigt und in 10 ml-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Nach drei Überstandsernten wurden die Zellen entsorgt. Die biologische Wirksamkeit wurde auf ESZ im Vergleich zur bestehenden Charge getestet. Das neu produzierte mLIF wurde 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 in ESZ-Medium verdünnt und die Zellen darin für zwei Wochen kultiviert. Abschließend wurden in jeweils fünf Gesichtsfeldern differenzierte vs. nicht differenzierte Kolonien ausgewertet. Ein vergleichbares Verhältnis zur Referenz bestimmte den max. Verdünnungsfaktor für die neue Charge.

### **5.2.9 Zentrifugation von Zellen auf Objektträger (Shandon-Cytospin)**

Das Verfahren wurde gemäß Herstelleranleitung durchgeführt ([www.thermo.com/shandon](http://www.thermo.com/shandon)). Jeweils  $1 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$  Zellen in 150  $\mu\text{l}$  PBS wurden in die Cytofunnel pipettiert und dann für 9 min bei 900xg auf die Objektträger zentrifugiert. Die Zellspots wurden für 24-48 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend gefärbt.

### **5.2.10 May-Grünwald-GIEMSA-Färbung (Pappenheim-Färbung)**

Cytospins und Blutausstriche wurden nach Standardprotokoll gefärbt. Die Zellen für 5 min in der May-Grünwaldfärbelösung inkubiert, die Objektträger anschließend mit entionisiertem Wasser gespült und danach für 20 min in 1:20 verdünnter (mit entionisiertem Wasser) GIEMSA-Färbelösung inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift und 24 h Lufttrocknung erfolgte die Eindeckung mit Roti Histokit.

### **5.2.11 Hämatopoetischer Kolonieformierungsassay (CFU-Assay)**

Der Assay wurde in der zytokinsubstituierten Methylzellulose MethoCult-M3434 der Firma StemCell Technologies nach Protokoll durchgeführt ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). Jeweils 4 ml Methylzellulose wurden mit einer Spritze in 7 ml-Schraubgefäße aliquotiert und direkt verwendet oder wieder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.  $4 \times 10^4$  Zellen in 0,4 ml wurden zu den Aliquots pipettiert, mit einer Spritze gut durchmischt und dann in 1,1 ml-Triplikaten in 3,5 cm-Suspensionsschalen gegeben. Sechs dieser Zellschalen plus einer reinstwasserbefüllten offenen Schale wurden in einer geschlossenen 15 cm-Zellkulturschale bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  und 21% (v/v)  $\text{O}_2$  für 8-12 Tage inkubiert. Anschließend wurden die entstanden Kolonien über einem Raster bei 50-100facher Vergrößerung am Mikroskop ausgezählt.

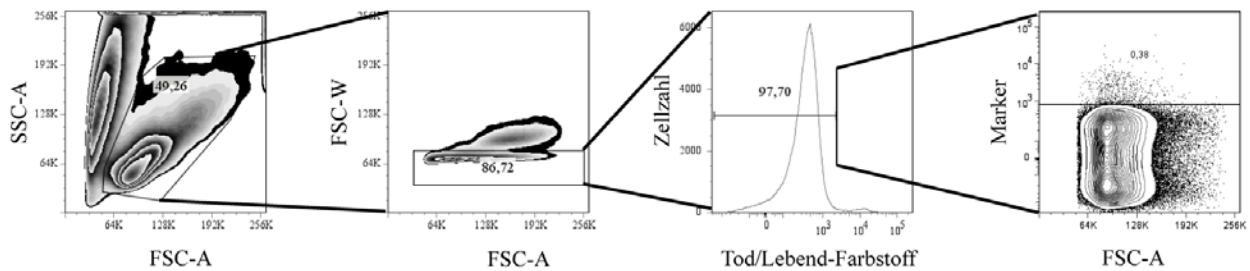
### 5.2.12 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)

FACS-Analysen, die bis zu vier Fluorochrome detektieren sollten, wurden zumeist am FACSCalibur (BD Biosciences), und Vielfarben-FACS-Analysen am LSRII (BD Biosciences) durchgeführt. (FACS-Sortierungen sind im Kapitel 5.1.3 gesondert angegeben)

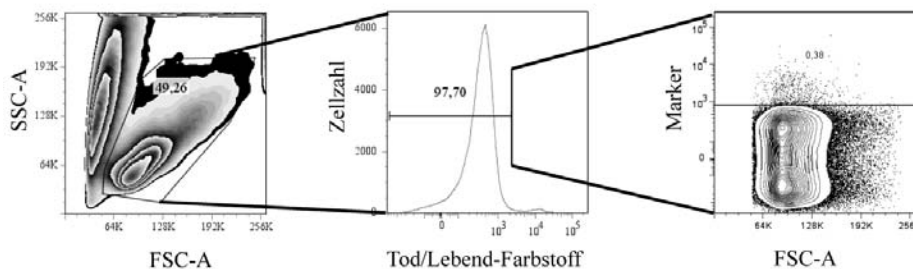
#### **Probenvorbereitung:**

Adhärenente Zellen wurden mittels Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) dissoziiert, der Verdau mit 1x PBS + 10% FCS abgestoppt, mit 1x PBS gewaschen, filtriert und in FACS-Puffer (1x PBS, 4% FCS, 2 mM EDTA) resuspendiert. Suspensionszellen wurden mit 1x PBS gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert.  $1-5 \times 10^6$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l FACS-Puffer zuerst mit 1  $\mu$ l FcR-Block (anti-CD16/32) für 15 min. bei 4 °C inkubiert und dann direkt mit den AK (Menge nach Herstellerempfehlung) für 30-45 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Zellen, die mit biotinylierten AK markiert wurden, wurden mit Streptavidin-gekoppelten Fluorochromen für 30 min. inkubiert, anschließend gewaschen und in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. DNS-interkalierende Farbstoffe wie DAPI, 7-AAD oder PI zur tot/lebend-Bestimmung wurden, den Herstellerangaben entsprechend, erst kurz vor der Messung den Proben zugesetzt. Eine ungefärbte Probe wurde zur Einstellung der FACS-Kanäle (PMTs) verwendet, mit einzeln gefärbten Zellen oder Kompensationsbeads wurden die Kompensationen vorgenommen. Zur sicheren Trennung von Negativ- und Positivpopulation wurden so genannte „*Fluorescence minus one*“ (FMO) Kontrollen mit gemessen. Dafür wurden Zellen (identisch zum analysierenden Zelltyp) mit jeweils allen AK/Fluoreszenzen markiert bis auf jeweils Eine, entsprechend der Anzahl der verwendeten Fluoreszenzen wurde für jede einzelne Fluoreszenz eine solche Kontrolle gefärbt. Zielpopulationen wurden bei der Messung durch das Setzen von Grenzen (Gates) ausgewählt, oder ausgeschlossen.

## Basis Gating-Strategie für LSRII Messungen



## Basis Gating-Strategie für FACSCalibur Messungen



**Abb. 5.1 Basis Gating Strategien für die durchflusszytometrischen Messungen am LSRII und am FACSCalibur.** Im Vorwärts-Seitwärts-Streuungs-Plot wurde in beiden Fällen die Zielpopulation mit einem Gate eingeschlossen. Diese ausgewählte Population wurde für die LSRII Messungen in einem Plot nach Pulsfläche vs. Pulsweite aufgetrennt und so die Einzelzellen von den Dubletten bzw. größeren Zellaggregaten getrennt. Diese Möglichkeit besteht technisch am FACSCalibur nicht. Im nächsten Schritt wurde die eingegrenzte Subpopulation in einem Histogramm gegen den verwendeten Tod-/Lebendfarbstoff aufgetragen, die farbstoffnegativen, also lebenden Zellen, wurden ausgewählt und diese eingegrenzte Subpopulation für die weiteren Analysen verwendet. In allen Fällen wurde das Gate zur Trennung von markerpositiver und markernegativer Population an FMO-Kontrollen eingestellt. FSC-A: Vorwärtsstreuung-Fläche („forward scatter area“); SSC: Seitwärts-Streuung-Fläche („side-scatter area“); FSC-W: Vorwärts-Streuung-Weite („forward scatter wide“); FMO: Fluoreszenz minus Eine („fluorescence minus one“)

### 5.3 Herstellung retroviraler Partikel

#### 5.3.1 Transfektion von 293T-Verpackungszellen per Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation

293T-Zellen wurden in DMEM, substituiert mit 10% FCS, 2 mM L-Gln, 1x Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub> kultiviert. 5x10<sup>6</sup> Zellen wurden 24 h vor der Transfektion (TF) pro 10 cm Zellkulturschale (für adhärenzte Zellen) ausgesät. Direkt vor der TF wurde das Medium über den Zellen erneuert und zusätzlich mit 20 mM Hapes und 25 µM Chloroquine (ergibt so das Transfektionsmedium) versetzt. Die zu transfizierenden Plasmide (5 µg retroviraler Vektor, 5 µg syngag, 3 µg Eco-env bzw. 2 µg VSVg-env) wurden in 450 µl destilliertem

Wasser verdünnt, dann 50 µl einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt. 500 µl 2x HBS wurden in einem 14 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt, und unter Erzeugung von Luftblasen mittels einer Pipette wurde das DNS-CaCl<sub>2</sub>-Gemisch dazu pipettiert. Das Gesamtgemisch wurde für 20min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in die 10 ml des Transfektionsmediums der 293T-Zellen pipettiert. Nach 6-12 h wurde das Medium gegen 293T-Kulturmedium, zusätzlich mit 20 mM Hepes substituiert, getauscht. Wenn möglich wurde der TF-Erfolg am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Weitere 36 h später wurde der virushaltige Überstand erstmalig geerntet.

Bei der Verwendung von VSVg ist darauf zu achten, dass es humaninfektiös ist. In Kombination mit den von uns verwendeten Transgenen war der Umgang damit als S2 eingestuft. Es musste zusätzlich ein Mundschutz getragen werden.

### **5.3.2 Ernte der Viruspartikel**

Die Zellkulturüberstände wurden 36 h pTF mit einer 10 ml Spritze abgenommen, durch einen 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter sterilfiltriert und in 1 ml-Aliquots bei -80 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde bis zur Titration bei 4 °C gelagert. 10 ml Transfektionsmedium ohne Chloroquine wurden wieder zu den Zellen gegeben. Nach 48 h und 72 h pTF wurde die Prozedur/Durchführung wiederholt. Die Transfektionseffizienz wurde nach der letzten Ernte mittels FACS analysiert und die Zellen dann verworfen.

### **5.3.3 Aufkonzentration der virushaltigen Zellkulturüberstände**

Im Falle der Verwendung des VSVg-Hüllproteins konnten die geernteten, virushaltigen Zellkulturstände durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden. Jeweils 30-32 ml des Überstandes wurden unter Vakuum bei 25.000xg und 4°C für 2 h zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände dekantiert und das Viruspellet im Medium der späteren Wirtszellen resuspendiert, dieses dann zusätzlich mit 20 mM Hepes versetzt. Das Volumen richtete sich dabei nach den erwarteten bzw. aus vorheriger Titration kalkulierten Titern und lag durchschnittlich bei 0,5-2 ml. Die aufkonzentrierten Überstände wurden in 20-50 µl-Aliquots bei -80 °C eingefroren.

### 5.3.4 Titration der virushaltigen Zellkulturüberstände

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl infektiöser Partikel im virushaltigen Zellkulturüberstand. SC1 Zellen, identisch zu den 293T Zellen kultiviert (siehe 5.3.1), wurden 24 h vor der Titration in einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/Well in einer 24-Wellplatte für adhärenz Zellen ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium erneuert und 20 mM HEPES und 1x Protaminsulfat zugesetzt. Für ein Well wurde die Zellzahl bestimmt. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden in vier verschiedenen Mengen zugesetzt (zumeist 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l und 50  $\mu$ l, bei erwarteten hohen Titern wurde bereits mit 0,5  $\mu$ l begonnen). Zwei Tage später wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,05% w/v, 0,02% w/v) dissoziiert, der Verdauung mit 1x PBS + 10% FCS abgestoppt, dann mit 1x PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. In der FACS-Analyse (Durchführung siehe 5.2.12) wurde der Anteil transduzierter Zellen gemessen.

Die Berechnung der Titer erfolgte nach folgender Formel:

$$x = \frac{0,01 \times \text{GFP+ [\%]} \times \text{Zellzahl bei TD} \times 2}{\text{Infektionsvolumen [ml]}}$$

Für den durchschnittlichen Titer einer Viruspräparation wurde der Mittelwert der Einzeltiter aus allen Konzentrationsstufen, deren Transduktionsraten 30% nicht überschritten, ermittelt.

## 5.4 Natürliche Killerzellen (NKZ)-Toxizitätsassay

### 5.4.1 Gewinnung primärer NKZ aus Mausmilzen

29S6/SvEvTac Mäuse im Alter von 2-6 Monaten wurden durch zervikale Dislokation getötet, unter der Sterilbank die Leibeshöhle geöffnet und die Milz entnommen. Für zwei bis drei zu testende Ansätze wurde die Milz einer Maus verwendet, bei vier parallelen Ansätzen wurden zwei Milzen präpariert. 10ml 1x PBS + 2% BSA wurden in eine Petrischale gegeben und ein 70  $\mu$ m Zellsieb darin äquilibriert. Die entnommenen Milzen wurden mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch dieses Zellsieb gerieben. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein weiteres Zellsieb in ein 50 ml Falcon gegeben, mit gleichem Volumen Lympholite M (Dichte: 1,0875 g/cm<sup>3</sup>) unterschichtet und anschließend für 20 min. bei 1500 xg (Bremse ausgeschaltet) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Interphaseschicht wurde entnommen und mit 15 ml MACS-Puffer vermischt und bei 800xg für 10 min. bei RT zentrifugiert. Dieser



Waschvorgang wurde einmal wiederholt, danach wurde das Zellpellet in 5 ml NKZ-Medium resuspendiert und auf Eis gestellt. Nach Auszählung wurden die erneut pelletierten Zellen in 90  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und 10  $\mu\text{l}$  DX-5-MicroBeads/ $1 \times 10^7$  Zellen zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 15 min. bei 4 °C bzw. 20 min. auf Eis inkubiert, alle 5 min. kurz durchmischt und danach mit 10-15 ml MACS-Puffer gewaschen, bei 300xg für 10 min. pelletiert und anschließend nach Herstellerprotokoll über eine Miltenyi LS-Säule magnetisch separiert. Die NKZ wurden mit ihrem Medium aus der Säule gespült, gezählt und mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 1 ml-Aliquots in eine 24 Well-Suspensionsplatte ausgesät. Dem NKZ-Medium wurden 1000 U/ml rhIL2 zugesetzt.

#### **5.4.2. Expansion und Aktivierung der primären NKZ**

Die primären NKZ wurden für eine Woche in Kultur genommen, dabei im NKZ-Medium (RPMI, 10% FCS, 2 mM L-Gln, 1% Hepes,  $2,5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin [PenStrep]) bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub> expandiert. Dem NKZ-Medium wurden alle zwei Tage erneut 1000 U/ml rhIL2 zugesetzt und bei Bedarf die Zellen auf weitere Wells aufgeteilt bzw. das Medium zur Hälfte getauscht.

#### **5.4.3 <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay**

Durch den <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay kann die NKZ-vermittelte Lyse von Zielzellen eruiert werden. Ein Aliquot der kultivierten NKZ wurde mit anti-NKp46 und anti-CD69 AK markiert und via FACS analysiert. Mittels der Expressionsdichte von CD69 kann überprüft werden, ob die NK-Zellen für den <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay ausreichend prästimuliert wurden. Der Assay wurde nach Standardprotokoll (Jacobs *et al.*, 2001) von Sabine Buyny (Technische Assistentin der Klinik für Immunologie und Rheumatologie der MHH) durchgeführt. <sup>51</sup>Cr ist ein Gammastrahler, die Arbeit damit erfolgte daher in einem Isotopenlabor hinter einer Bleiabschirmung.

Zusätzlich zu den eigentlichen Zielzellen wurde ein Parallelansatz mit YAC-1 Zellen als Positivkontrolle durchgeführt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemessen. Die Zielzellen wurden pelletiert und dann im Röhrchen mit jeweils 80  $\mu\text{Ci}$  <sup>51</sup>Cr versetzt (bereitgestellt durch die Abteilung für Nuklearmedizin der MHH) und für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es erfolgten anschließend zwei Waschungen mit RPMI + 5% FCS, die Zellen wurden jeweils 3 min. bei 140xg pelletiert. Die benötigte Menge an Zellen wurde auf  $1 \times 10^5$ /ml eingestellt und in 50  $\mu\text{l}$ -Aliquots zu den in einer Spitzboden-96-

Wellplatte vorgelegten NKZ pipettiert. Es wurden Effektor-Zielzellen-Verhältnisse beginnend bei 60:1 eingestellt, dafür wurden die kultivierten NKZ in ihrem Medium auf  $3 \times 10^6$ /ml eingestellt und dann jeweils 100  $\mu$ l in eine Spitzboden-96-Wellplatte pipettiert, für die geringeren Mischungsverhältnisse wurden die NKZ entsprechend verdünnt und weiterhin in 100  $\mu$ l Aliquots vorgelegt. Für die Bestimmung der Hintergrundradioaktivität wurde ein Dreifachansatz der Zielzellen ohne NKZ inkubiert. Zur Evaluierung der maximalen Radioaktivität bei vollständiger Lyse wurde ein weiterer Dreifachansatz der Zielzellen jeweils mit 100  $\mu$ l 1% TritonX-100 inkubiert. Die beladene 96-Wellplatte wurde für 3 min. bei 90xg zentrifugiert und das Effektor-Zielzellgemisch danach für 4 h bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die 96-Wellplatte für 5 min. bei 330xg zentrifugiert, von den Überständen wurden darauf je 25  $\mu$ l in eine 96-Well-Messplatte transferiert und jeweils mit 150  $\mu$ l Szintillationslösung (OptiPhase SuperMix) versetzt. Die Platte wurde mit einer Deckfolie versiegelt und anschließend für 15 min. auf dem Schüttler inkubiert. Die Bestimmung der freigesetzten Radioaktivität erfolgte am Szintillationszähler. Die relative Lyse/prozentualer Anteil an der totalen Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{\text{Freisetzung Probe- Hintergrund}}{(\text{Maximale Freisetzung- Hintergrund}) \times 100}$$

## 5.5. Molekularbiologische Arbeiten

### 5.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation kleinster Mengen von „*Template*“-DNS und gliedert sich in Denaturierung der DNS-Doppelstränge, Primerhybridisierung/Anlagerung („*Annealing*“) der Oligodesoxynukleotide (Primer) an die DNS und Elongation dieser zum vollständigen Gegenstrang (Saiki *et al.*, 1988). Es wurde nach Standardprotokoll verfahren.

Die verwendete Polymerase bestimmte dabei die Elongationstemperatur, die verwendeten Primer durch ihre Länge und ihren Guanin- und Cytosin- (GC) Gehalt die „*Annealing*“-Temperatur. Nach einer einleitenden Denaturierungsphase (5 min. bei 95 °C), wurden jeweils 35 Zyklen durchlaufen und mittels eines 10-minütigen, terminalen Vervollständigungsschrittes alle synthetisierten DNS-Moleküle fertig gestellt. Die jeweiligen Temperaturbedingungen sind in den Experimenten angegeben.

### 5.5.2 Quantitative PCR

Die Quantitative PCR (qPCR) wurde zur Bestimmung der Anzahl retroviraler Integrationen im Genom der Zielzellen verwendet. Die Reaktionen wurden im StepOnePlus-Cycler (Applied Biosystems) unter Verwendung von QuantiFast SYBR Green (Qiagen) durchgeführt. Vergleichend zu den zu testenden Proben wurde die DNS eines definierten Zellklons („Clone B“, ein muriner, hämatopoetischer Zellklon mit neun retroviralen Genomkopien) eingesetzt bzw. später auch ein Standard auf Plasmidebene verwendet. Die Standard-DNS wurde in vier verschiedenen Mengen (0,2 µg, 2 µg, 20 µg, 200 µg) eingesetzt, deren lineare Resultate der Qualitätskontrolle dienten. Zur Amplifikation wurde ein Primerpaar verwendet, das eine 96bp-Sequenz des wPRE der retroviralen DNS amplifiziert. Für die Ladekontrolle wurde ein Primerpaar verwendet, das eine Sequenz des ersten Introns des murinen *Flk1*-Gens (Gen ID AF061804) amplifiziert. Alle verwendeten Primer lagerten sich bei 60°C an die DNS. Die qPCR-Reaktionen wurden mit 50-100 ng „*Template*“-DNS gestartet. Die qPCR wurde in 96-Wellplatten nach Real-Time-PCR-Protokoll des QuantiFast SYBR Green-PCR-Kits (Qiagen) durchgeführt.

PCR – Mix:

Fast Sybr green master mix (2x)	7,5 µl
Primer 1 (100µM-Stock)	0,15 µl
Primer 2 (100µM-Stock)	0,15 µl
H <sub>2</sub> O	5,2 µl
“ <i>Template</i> “-DNS (50-100ng)	2 µl

Total	15 µl
-------	-------

Reaktionsbedingungen (“Two-Step“-PCR):

95°C →	5 min	}	1 x
95°C →	10 sec		
60°C →	30 sec	}	40 Zyklen

Zum Abschluss wurden die Schmelzkurven aufgenommen.

Die Berechnungen wurden nach der vergleichenden  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt (Pfaffl, 2001).

### 5.5.3 Ligationsvermittelte PCR (LM-PCR)

Die LM-PCR wurde zur Bestimmung der chromosomalen Umgebung einer retroviralen Intergrationsstelle verwendet. Es wurde nach dem bei Kustikova *et al.* publizierten Protokoll verfahren (Kustikova *et al.*, 2008). Hierfür wurden 500ng genomische DNS wurden mit *Hae*III oder *Tsp*509I verdaut. Verwendet wurden unter 4.3.2 angegebene Oligodesoxynukleotide sowie Polylinker.

### 5.5.4 Klonierungen

Restriktionsverdaus mit verschiedenen Restriktionsenzymen, Dephosphorylierungen von Plasmidfragmenten mit Kälberdarm alkalischer Phosphatase, Phosphorylierungen von Plasmidfragmenten mittels T4 Polynukleotid Kinase, Auffüllen von 5' Überhängen mittels Klenow sowie Ligationen mittels T4 DNA-Ligase erfolgten immer nach zugehörigem Herstellerprotokoll (Fermentas).

Mini- und Maxi-DNS-Präparationen aus transformierten *E.coli* (angeimpft wurden 3 ml LB-Medium +0,1% Ampicillin bzw. 200 ml LB- Medium +0,1% Ampicillin, Inkubation 6 h bzw. 16 h bei 37 °C im Schüttler) erfolgten mittels QIAprep Spin Miniprep Kit zw. QIAGEN Plasmid Maxi Kit und wurden nach Herstellerprotokoll für die Aufreinigung von Plasmid-DNS mit Hilfe einer Mikrozentrifuge durchgeführt.

Waren für aufeinanderfolgende Restriktionsverdaus von Plasmid-DNS unterschiedliche Enzympuffer nötig, wurde die geschnittene Plasmid-DNS mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach dem QIAquick Zentrifugations-PCR-Aufreinigungsprotokoll aufgereinigt und mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

DNS-Fragmente, die über ein Agarosegel (0,8-1,5%ig) elektrophoretisch (100V, 30-50 min.) aufgetrennt wurden, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach gleichnamigem Zentrifugationsprotokoll eluiert.

### 5.5.5 Die Klonierung von SRS11-SF m144fusmCherry.PRE im Detail

Ausgangsplasmide waren pBK-CMV, SRS11-dsRedExp.PRE, SRS11-mCherry.PRE. Der SRS11-dsRedExpress.PRE-Vektor wurde mit *Eco*47III und *Bst*XI geschnitten, das resultierende 5052bp Fragment diente dann als Basis (Vektor-Backbone). Es handelt sich hierbei um einen selbstinaktivierenden Vektor (SIN), der nach Integration ins Wirtsgenom sich nicht weiter replizieren kann (freundlicher Weise durch

Axel Schambach zur Verfügung gestellt). Das Transgen wird über den „Spleen-focus-forming-virus-Promotor“ (SFFV) getrieben. Das einzufügende m144-Fusionsfragment (Insert) wurde mittels überlappender Polymerase-Kettenreaktion (Overlap-PCR) generiert (Abb. 6.21 C). Hierzu wurden zwei modifizierende Oligonukleotide (Primer) generiert (M144-AgeI-a, AgeI-M144-s), die zu ~50% die jeweilige Plasmid-DNS banden, der Sequenzüberhang war für beide Primer identisch (Strang- und Gegenstrangsequenz) und schuf so homologe Sequenzen in den zwei synthetisierten PCR-Produkten. In den komplementären Sequenzen, die durch den Primerüberhang synthetisiert wurden, wurde die Basenabfolge so generiert, dass das m144-Stopcodon von TGA zu GGA mutiert wurde, zusätzlich die Erkennungssequenz für *AgeI* geschaffen wurde und eine kurze verbindende Sequenz (Linker). Für das PCR-Fragment1 diente pBK-m144 als Vorlage (Template), der 5'Primer, und damit auch die Startsequenz des generierten PCR-Produktes, war so gewählt, dass er bei „Blunt-End-Ligation“ in das Vektorbackbone die *Eco47III*-Schnittstelle wieder regenerieren würde. Der Gegenstrangprimer war der oben beschriebene modifizierende Primer M144-AgeI-a. Für das PCR-Fragment2 diente SRS11-dsRedExpress.PRE als Template, der modifizierende Primer AgeI-M144-s und der Gegenstrangprimer M144fus-dsRedEx-ende-a wurden verwendet. Das generierte Fragment beinhaltete die modifizierte Sequenz sowie die dsRedExpress-Sequenz von dessen Startcodon bis 100bp hinter die *BstXI*-Schnittstelle. Nach der Synthese der beiden modifizierten Fragmente wurden in einem zweiten PCR-Schritt die beiden hybridisierenden Fragmente mittels der 5' flankierenden Primer amplifiziert.

PCR1: Pro Reaktion:

Reaktionsbedingungen:

5µl	10x Pfu-Puffer (ohne MgSO <sub>4</sub> )	95°C	5 min	} 30 Zyklen
4µl	Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ) (25mM)	95°C	55 s	
1µl	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (100mM)	58,4; 60,8; 63,2; 65,6; 67,9; 70,7; 71,5; 72°C	55 s	
5µl	Oligonukleotid A (10pmol/µl)	72°C	3 min	
5µl	Oligonukleotid B (10pmol/µl)	72°C	10 min	
1µl	Pfu-DNA-Polymerase (2,5U/µl)	4°C	Pause	
1µl	100ng Plasmid-DNS			
28µl	destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)			

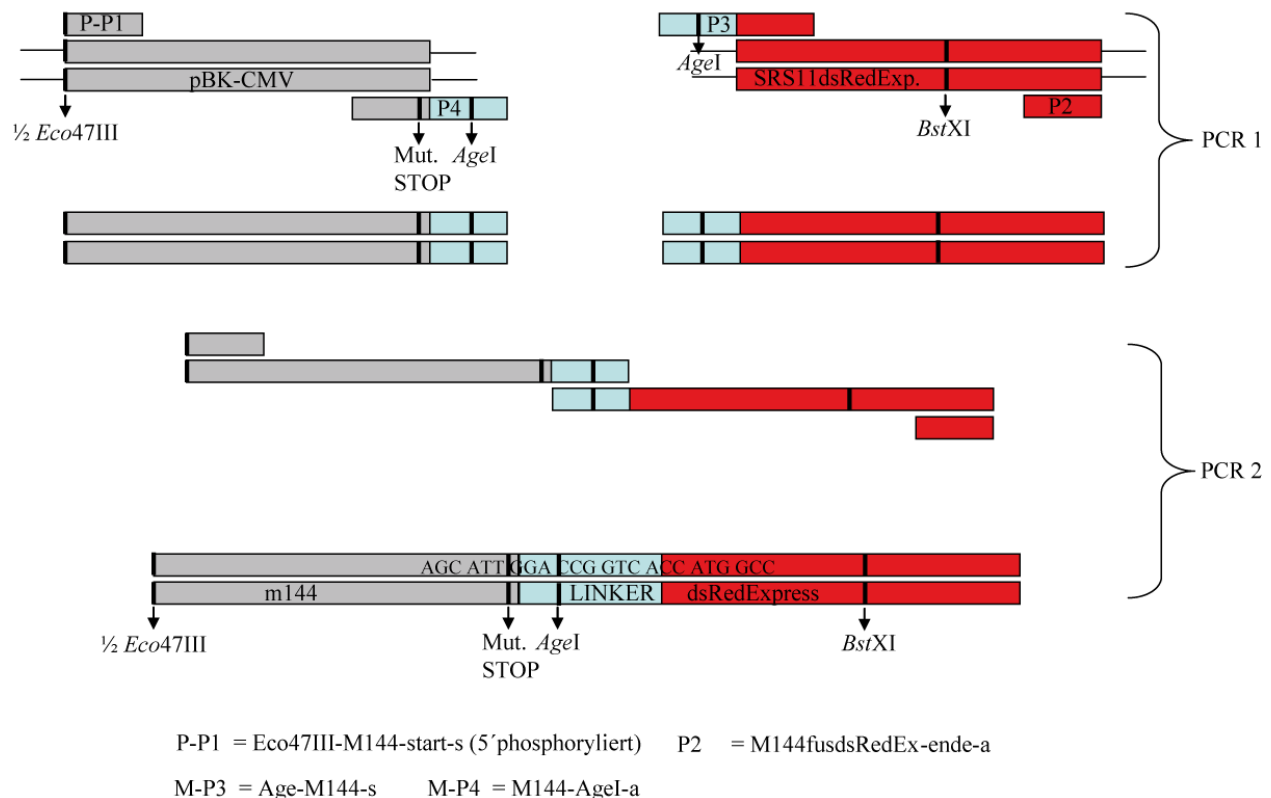
PCR2: Pro Reaktion:

Reaktionsbedingungen:

5µl	10x Pfu-Puffer (ohne MgSO <sub>4</sub> )	95°C	5 min	} 35 Zyklen
4µl	MgSO <sub>4</sub> (25mM)	95°C	55 s	
1µl	dNTPs (100mM)	68°C	55 s	
5µl	Eco47III-M144-Start-s (10pmol/µl)	72°C	4,5 min	
5µl	M144fusdsRedEx-Ende-a (10pmol/µl)	72°C	10 min	
1µl	Pfu-DNA-Polymerase (2,5U/µl)	4°C	Pause	
10µl	130ng PCR-Fragmente 1+2			
19µl	dH <sub>2</sub> O			

Das chimäre PCR-Produkt (SRS11-m144fusdsRedExp.PRE) wurde dann mit *Bst*XI-geschnitten, über eine Agarosegel aufgetrennt, und das Insert daraus eluiert, aufgereinigt und dann mittels T4-DNA-Ligase in das zuvor dephosphorylierte Vektorbackbone ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in XL-1blue *E.coli* Bakterien transformiert und auf „*Lysogeny Broth*“-Ampicillin-Platten (LB-Amp) ausplattiert. 47 Klone wurden mittels Kolonie-PCR (Primer SF-for und M144-AgeI-a) auf die korrekte Ligation überprüft. Ein Klon war positiv (#36), seine DNS wurde durch Minipräparation (Qiaprep) vervielfältigt und dann sequenziert. Für die Sequenzierungen wurden Primer gewählt, die es möglich machen sollten, die Sequenzen sowohl am Plus- als auch am Minusstrang zu überprüfen. Die verwendeten Primer waren SF-for, m144-a5, m144-s3, dsRedExp.StuI, dsRedExp.AA67rev und Red-anti. Die Sequenzierungsergebnisse erlaubten es nicht alle neugeschaffenen Sequenzen und Übergänge immer auf beiden Strängen zu überprüfen, aber immer zumindest auf einem Strang. Im generierten Linker kam es zu einem Austausch von Cytosin (C) zu Adenin (A), damit ist im Protein an dieser Stelle statt der Aminosäure (AS) Alanin ein Molekül Asparaginsäure. Des Weiteren stellte sich heraus, dass es diverse Abweichungen in der dsRedExpress-Sequenz gab, die nicht in der Vektorkarte von Axel Schambach auftauchten. Bei der Produktion retroviraler Partikel mit diesem Plasmid gab es bereits in den 293T-Produzentenzellen keine erkennbare Fluoreszenz. Die detektierten Sequenzänderungen führten also zu einer Inaktivität des Fluoreszenzproteins. Deshalb wurde in einem weiteren Klonierungsschritt die Fluoreszenzproteinsequenz im Vektor ausgetauscht. Mit der eingeführten *Age*I-Erkennungssequenz und der hinter den meisten Fluoreszenzproteinsequenzen in unseren Plasmiden liegenden *Not*I-Erkennungssequenz war ein leichter und beliebiger Austausch möglich. Wir führten darüber die Sequenz für mCherry ein, dieses Insert wurde auch über *Age*I und *Not*I aus dem SRS11-mCherry.PRE-Vektor (freundlicher Weise durch Tobias Mätzig zur Verfügung gestellt) geschnitten. Das neue Ligationsprodukt wurde auch in XL1-blue *E.coli*

transformiert, mehrere Klone expandiert, und die DNS mit *NotI* und *NcoI* kontrollverdaut. Zwei Klone zeigten die korrekten Produkte. Mit Klon 36-4 wurden dann wieder retrovirale Partikel mit ecotropem Hüllprotein in 293T-Zellen generiert. Parallel wurden auch Virupartikel mit dem Kontrollvektor SRS11-mCherry.PRE hergestellt. In beiden Fällen konnten funktionsfähige Fluoreszenzproteine in den 293T-Zellen nachgewiesen werden.



### Abb. 5.2 Klonierungsstrategie mittels Overlap-PCR.

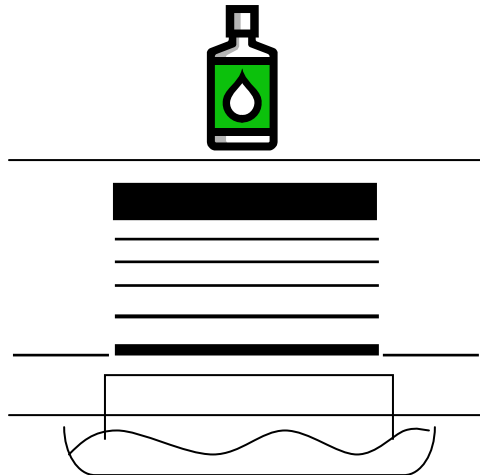
Die modifizierenden Primer M144-AgeI-a und AgeI-M144-s hybridisierten zu ~50% die jeweilige Plasmid-DNS (bBK-CMVm144 bzw. SRS11dsRedExp.PRE, ihre Sequenzüberhänge waren komplementär [Strang- und Gegenstrangsequenz]), damit entstanden homologe Sequenzen in den zwei synthetisierten PCR-Produkten. In diesen wurde die Basenabfolge mutiert, damit das m144-Stopcodon inaktiviert, zusätzlich eine *AgeI* Restriktionsschnittstelle geschaffen und ein kurzer Linker. P-P1 erzeugte 5' eine halbe *Eco47III*-Erkennungssequenz. Die synthetisierten Fragmente der PCR 1 wurden in einer zweiten PCR an den komplementären Sequenzen hybridisiert und dieses Produkt mittels der 5' flankierenden Primer amplifiziert. P-P1: 5' phosphorylierter Primer 1; M-P3/M-P4 : modifizierender Primer ¼ ; Mut.STOP: mutiertes Stopcodon

### 5.5.6 Southern Blot

Die spezifische Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden an Sequenzen genomischer DNS wurde zur Detektion der Anzahl retroviraler Integrate in der Zielzellen-DNS nach Standardprotokoll durchgeführt. Alle Schritte mit radioaktivem  $^{32}\text{P}$  wurden im Isotopenlabor hinter einem 1 cm dicken Plexiglasschirm durchgeführt. Der Restriktionsverdau der genomischen DNS erfolgte mit 30 U *Bgl*II oder *Age*I oder *Bam*HI gemäß Herstellerprotokoll, allerdings über Nacht. Am Folgetag wurden weitere 30U des verwendeten Enzyms zugesetzt und für weitere 5 h inkubiert. Unterdessen wurde ein 0.8%iges Agarosegel (inkl. EtBr) gegossen und für 1-2 h auspolymerisiert. Parallel wurde die als Größenstandard verwendete Lambda-*Hind*III-DNS radioaktiv markiert. Gemäß dem Protokoll des verwendeten DecaLabel DNA-Label Kits (Fermentas) wurden 5 µg Lambda-*Hind*III-DNS mittels Klenow-Enzym mit 30 µCi  $^{32}\text{P}$  dCTPs markiert, nach 20 min Inkubation wurde die Reaktion mit 5 µl 0,5 M EDTA und 75 µl TE abgestoppt. Die DNS wurde über „Mobi Spin Columns S300“ nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und anschließend bei 4 °C gelagert. 2 µl dieser DNS dienten zur Bestimmung der radioaktiven Markierung per Cerenkov-Zählung im Szintillationszähler. Entsprechend des späteren Bedarfs wurde die benötigte Menge des Markers abgefüllt und mit TE auf 10000cpm/10µl eingestellt und auch bei 4 °C gelagert. Die geschnittene genomische DNS wurde inkl. 10 µl Ladepuffer in das vorbereitete Gel geladen, sowie der radioaktive Marker. Die Auftrennung erfolgte für 10 min. bei 100 V und dann bei 30 V über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Gel fotografiert, die Taschen abgeschnitten und dann für 2 x 20 min. in einer Denaturierungslösung (0,5M NaOH + 1M NaCl in dH<sub>2</sub>O) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gespült und dann 2 x 20 min. in einer Renaturierungslösung (0,5 M Tris-HCl pH 7,4 + 3,0 M NaCl in dH<sub>2</sub>O) geschwenkt. Das Gel wurde dann erneut mit Wasser abgespült und für 30 min. in 10x SSC-Puffer geschwenkt. Auch die passend zugeschnittene und für 10 min. in dH<sub>2</sub>O eingeweichte Nylon-Membran wurde im 10x SSC-Puffer äquilibriert. Aus Whatman-Papier wurden unterdessen drei gleichgroße Stücke und eine Brücke ausgeschnitten. Anschließend wurde der Blot wie unter Abb. 5.3 gezeigt aufgebaut und dann über Nacht laufen gelassen, hierbei erfolgte die Übertragung der DNS mittels Kapillarkraft auf die Membran. Am Folgetag wurde der Blot abgebaut, die Membran für 30 min. in 500 ml 0,5 N NaOH und anschließend für 30 min. in 500 ml 0,2 M Tris-HCl pH7,5 geschwenkt. Nach einer kurzen Trocknungsphase auf frischem Whatman-Papier wurde die Membran mit dem Papier für 2 h bei 80 °C im Wärmeschrank gebacken. Unterdessen wurden 200 ml Prähybridisierungslösung angesetzt und auf 70 °C im Wasserbad vorgewärmt und der Hybridisierungssofen sowie die Hybridisierungsröhren auf 65 °C vorgeheizt. 12 ml Prähybridisierungslösung sowie 100 µl behandelte (5 min. bei 100 °C erhitzt, dann 5 min. auf Eis inkubiert) Heringssperma-DNS (SSDNA) wurden jeweils in eine Röhre gegeben und für 3 h prähybridisiert.



250 ml Flasche (nicht voll)  
 Glasplatte  
 Papiere  
 Whatman-Papier  
 Membran  
 Gel und Folie  
 Brücke  
 Glasplatte  
 Schale mit 10x SSC



**Abb. 5.3 Aufbau der Blotvorrichtung.** Eine Schale wurde mit 10x SSC-Puffer gefüllt, eine Glasplatte so darüber gelegt, dass an zwei gegenüberliegenden Seiten noch ein Spalt blieb, hier hinein wurden die Enden der Whatman-Papierbrücke gehängt, die Brücke selber gerade über die Glasplatte gelegt. Auf die Brücke wurde das Gel gelegt, die freibleibenden Brückenränder mit Frischhaltefolie, als Austrocknungsschutz, abgedeckt. Auf dem Gel wurde die Membran positioniert, diese mit drei Lagen Whatman-Papier bedeckt und darauf ein ca. 8 cm hoher Stapel Papierhandtücher gelegt. Zu oberst wurde wieder eine Glasplatte gelegt, die mit einer 250 ml Schott-Flasche beschwert wurde.

Unterdessen wurde die zu verwendende Sonde radioaktiv markiert. Verwendet wurden 50-100 ng der wPRE-Plasmidfragment-DNS, die wie oben für den Größenstandard beschrieben, nach Herstellerprotokoll mittels DecaLabel DNA-Label Kit (Fermentas) markiert und über die „Mobi Spin Columns S300“ nach Herstellerprotokoll aufgereinigt wurde. Wiederum am Szintillationszähler wurde die radioaktive Markierung gemessen. 50  $\mu$ l SSDNA wurden mit der hergestellten Sonde für 5 min. bei 100 °C gekocht, dann für 5 min. auf Eis gekühlt und zur Membran in die Hybridisierungsröhre geben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Am Folgetag wurde die Membran in vier Stufen zu je 10 min gewaschen, die jeweils 400 ml der Waschlösungen (2x SSC; 2x SSC + 0,1% SDS; 1x SSC + 0,1% SDS; 0,1x SSC + 0,1% SDS) wurden dafür auf 60 °C im Wasserbad vorgewärmt. Die Membran wurde nach jedem Waschschrift mit einem Geiger-Müller-Zähler auf Restradioaktivität überprüft. Unspezifische Markierungen waren erkennbar durch erhöhte radioaktive Signale an den Membranrändern. Die Waschungen wurden beendet, sobald keine vermehrten radioaktiven Zähler wahrzunehmen waren, auch wenn noch nicht alle Waschschriffe durchlaufen wurden. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien eingeschweißt und in eine  $\gamma$ -Strahlen-Filmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membranoberseite gelegt und die Kassette verschlossen. Die Belichtung erfolgte für 24 h bzw. mit einem neuen Film für drei Tage bei -80 °C. Nach erfolgter Belichtung wurde die Filmkassette im Dunkelraum geöffnet und der Film im X-OMAT 1000 Entwickler (Kodak) entwickelt.

### 5.5.7 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidabfolge in generierten Plasmid-DNS-Molekülen wurde die Didesoxymethode nach Sanger (Kettenabbruch-Synthese) verwendet (Sanger *et al.*, 1977). Im ersten Schritt wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurden 500 ng DNS mit H<sub>2</sub>O auf 12 µl eingestellt und mit 2 µl „Q-Solution“ und 2 µl Sequenzierprimer (10 pmol/µl) versetzt, dann für 1 min. in ein auf 96 °C vorgeheiztes PCR-Gerät gestellt und danach auf Eis gegeben. Es wurden 4 µl DTCS zugegeben und dann die PCR gestartet.

Reaktionsbedingungen:

96°C	→	2 min	}	1 x
96°C	→	20 sec	}	30 Zyklen
50°C	→	30 sec		
60°C	→	4 min		
4°C	→	Pause		

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und jeweils 5 µl frisch angesetzte Stop-Lösung (40% 3 M NaAc, 40% 100 mM EDTA, 20% Glycogen) zugesetzt. Anschließend wurden je 100 µl eiskalter, 96%iges Ethanol (EtOH) zugegeben, kräftig gevortext und dann bei 16800 xg für 20 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 150µl eiskaltem 70%igem EtOH resuspendiert, danach erneut bei 16800 xg für 10 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden wieder verworfen und die Pellets in der „SpeedVac“ für 10 min. bei 37 °C getrocknet. Zu den getrockneten DNS-Pellets wurden jeweils 40 µl SLS zugegeben, die Proben wurden gevortext und zweimal bei 16.800 xg für 5 min. gewaschen und dann jeweils 40 µl in die Sequenzierprobenplatte geladen und mit einem Tropfen Mineralöl abgedeckt. Leere Wells einer Reihe wurden mit je 40 µl SLS beladen. Eine Pufferplatte wurde an den identischen Wellpositionen mit Sequenzierpuffer beladen. Das Sequenziergerät wurde nach Herstellerprotokoll beladen und programmiert, die Sequenzierung erfolgte über Nacht. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte per CEQ-System 8000 Software.

### 5.5.8 Transformation von *E. coli*

Jeweils 50 µl Suspension kompetenter *E. coli* (Stämme: XL-1blue, DH5- $\alpha$ ) wurden auf Eis für 2-3 min. aufgetaut. Danach wurden die *E. coli* mit 0,1-1 µg DNS versetzt, für 15 min. auf Eis inkubiert, anschließend einem 90 sekündigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und dann in 500 µl EB-Medium aufgenommen. Die Ansätze wurden dann für 30-60 min. bei 37 °C inkubiert und danach auf vorgewärmte LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 5.5.9 Präparation genomischer DNS (gDNS)

gDNS wurde aus weißen Blutzellen (WBZ) sowie ESZ und ESZ-HZ nach Herstellerprotokoll gewonnen. Verwendet wurde das QIAamp-DNA Blood Mini Kit von Qiagen. Hier wurden jeweils 200 µl Zellsuspension (max.  $5 \times 10^6$  WBZ oder ESZ bzw. ESZ-HZ in PBS) eingesetzt und nach dem Zentrifugationsprotokoll für gDNS-Präparation aus Blut oder Körperflüssigkeiten aufbereitet. Die empfohlene zusätzliche Zentrifugation zur vollständigen Entfernung des zweiten Waschpuffers (Schritt 10 im Kit-Protokoll) wurde durchgeführt. Die Säulen wurden für 5 min. mit dem Eluierungspuffer (AE) inkubiert. Bei der Präparation aus ESZ und ESZ-HZ wurden 200 µl Eluierungspuffer verwendet, bei der Präparation aus WBZ nur 50 µl, um eine ausreichend hohe DNS-Konzentration zu erhalten. Die Konzentration der DNS wurde am Nanodrop gemessen. Hierfür wurde der AE-Puffer für den „Blank“ benutzt und jeweils 2 µl Probenvolumen verwendet.

### 5.5.10 Präparation von Metaphasechromosomen

Zur Durchführung einer spektralen Karyotypisierung (SKY) unserer ESZ-Klone wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. C. Rudolph, aus der Abteilung für Zell- und Molekularpathologie der MHH, zunächst Metaphasechromosomen nach dem folgenden Protokoll präpariert. In das Medium der ESZ-Kulturen wurde 0,035 µg/ml Colcemid gegeben und diese dann für 6-8 h bei 37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und 21% (v/v) O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, in ein Falcon-Röhrchen transferiert und für 10 min. bei RT und 260xg pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 2 ml dekantiert, das Zellpellet wurde in diesen 2 ml durch vortexen resuspendiert. Unter fortgesetztem Vortexen wurden 10-11 ml auf 37 °C vorgewärmtes KCl (75 mM) vorsichtig zu den Zellen getropft. Anschließend wurde das

verschlossene Röhrchen 2-3x geschüttelt, und nach 20 min. Inkubation bei 37 °C wurden ca. 2 ml frisch hergestelltes Fixativ (1:3 Essigsäure und Methanol) dazugegeben und das verschlossene Röhrchen für weitere 2-3 min. vorsichtig geschüttelt. Die Zellen wurden dann bei 260xg für 10 min. zentrifugiert, der Überstand wieder bis auf ca. 2 ml dekantiert und die Zellen durch vortexen darin resuspendiert. Während des Vortexens wurden 10-11 ml von dem frisch zubereiteten Fixativ zugegeben, das Röhrchen dann verschlossen und wieder für 2-3 min. vorsichtig geschüttelt. Die Wasch- und Zentrifugationsschritte wurden noch 4-5x wiederholt und danach die Zellsuspension auf „Superfrost“-Objektträger getropft. Die Präparate wurden im Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Viele gut ausgespreitete Methaphasen, mit wenigen Zytoplasmaresten waren für die anschließende SKY-Hybridisierung nötig. Positive Proben wurden zur Dehydratisierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt (70%, 90%, 100%), dabei 3 min. pro Stufe inkubiert und die Objektträger (OT) dann über Nacht bei 37 °C getrocknet.

### **5.5.11 Spektrale Karyotypisierung (SKY)**

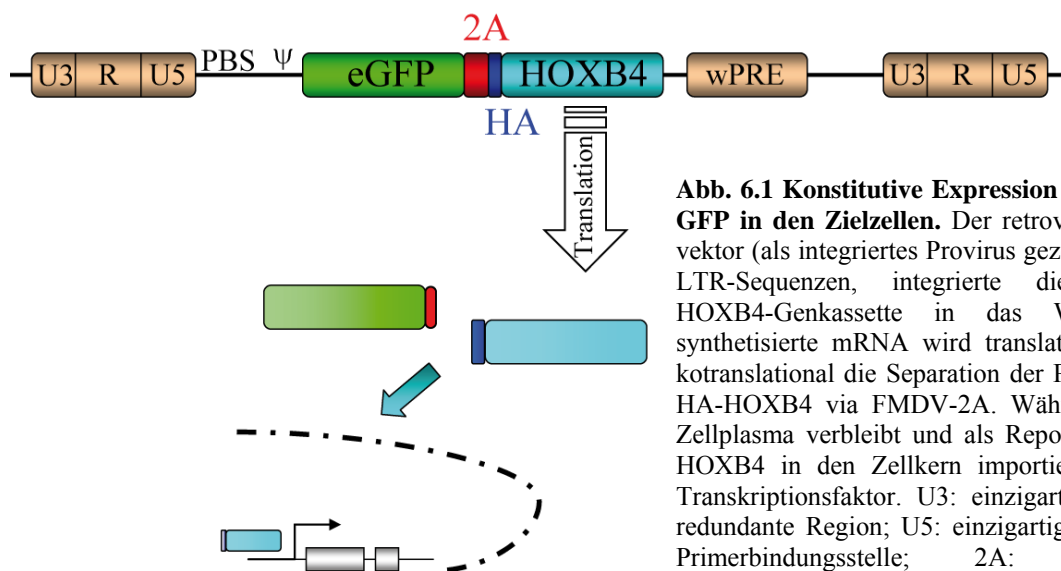
Aufgetrennte Metaphasenchromosomen wurden durch maximal fünf verschiedene Fluorochrome (Texas Red, FITC, Rhodamin, Cy5, Cy5.5) markiert und ermöglichten so eine simultane Visualisierung der Verteilung und Beschaffenheit aller Chromosomen. Durch die möglichen Farbkombinationen weist jedes Chromosomenpaar nach der Hybridisierung eine bestimmte Spektralfarbe auf. Die spektrale Bildverarbeitung erfolgte durch eine Kombination aus Epifluoreszenzmikroskop, CCD Kamera und Fourier-Transformation. Auf den getrockneten OT der Chromosomenpräparation wurden die zu hybridisierenden Bereiche gekennzeichnet und danach erneut durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit abschließender Trocknung geführt. Unterdessen wurde eine Denaturierungslösung angesetzt und diese bei 72-74 °C in einer Küvette erwärmt. Der SKYPaint-Mix wurde nach kurzer Zentrifugation in 10 µl je Hybridisierung aliquotiert, darauf für 7 min. im Wasserbad bei 80 °C denaturiert und für 1 h bei 37 °C prähybridisiert. Zur Halbzeit der Prähybridisierung wurden die OT für 1,5 min. zur 72 °C warmer Denaturierungslösung in die Küvette gegeben und anschließend sofort durch eine eiskalte, aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%, jeweils 3 min.) geführt. Nach erneuter Trocknung der OT wurden die 10 µl prähybridisierter SKYPaint-Mix darauf pipettiert und mit einem 18 mm x 18 mm Deckgläschen blasenfrei abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Für die Hybridisierung wurden die OT daraufhin in einer feuchten Kammer für 48-72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Fixogum von den OT wieder entfernt, und diese für 5 min. in eine vorgewärmte (45 °C) erste Waschlösung (50% Formamid, 2x SSC in H<sub>2</sub>O, pH7) getaucht, dabei das Deckgläschen mit einer Pinzette entfernt. Die OT wurden weitere zwei Mal für 5 min. durch die jeweils frische, vorgewärmte, erste Waschlösung geführt. Anschließend erfolgten drei Waschgänge für jeweils 5 min. in der vorgewärmten (45 °C) zweiten

Waschlösung (1x SSC in H<sub>2</sub>O, pH7) und danach für einmal 5 min. in der vorgewärmten (45 °C) dritten Waschlösung (4x SSC, 0,1% Tween20 in H<sub>2</sub>O, pH7). Auf 24 mm x 60mm Deckgläschen wurden jeweils 120 µl BSA gegeben, darauf wurden die OT gelegt, dann vorsichtig umgedreht und für 20 min. leicht angeschrägt in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die OT erneut mit der dritten Waschlösung gewaschen. Die verwendeten Antikörper wurden nach Herstellerangabe bzw. eigener Titration mit der dritten Waschlösung verdünnt, jeweils 120µl der AK-Lösung auf ein 24 mm x 60mm pipettiert, die OT darauf gelegt, umgedreht und in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank für 40 min. inkubiert. Die OT wurden anschließend drei Mal mit der dritten Waschlösung (45 °C) gewaschen. Das Protokoll wurde für alle weiteren AK wiederholt. Zuletzt erfolgte eine DAPI-Gegenfärbung für 10 min., die OT wurden für 5 min. mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann mit Vectashield eingedeckt. Daraufhin erfolgte die spektrometrische Analyse. Der am Epifluoreszenzmikroskop emittierte Strahl fällt durch eine Sammellinse und auf das Sagnac Interferometer, wobei ein optischer Wegunterschied produziert wird. Am Detektor kann dann ein Interferogramm für jeden Datenpunkt gemessen werden, das nach einer Fourier Transformation die spektrale Information jedes einzelnen Bildpixels zeigt. Pixel mit identischen Spektren ist eine spezifische Farbe zugewiesen, die die spektrale Eingruppierung und Charakterisierung der Chromosomen ermöglicht.

## 6. Ergebnisse

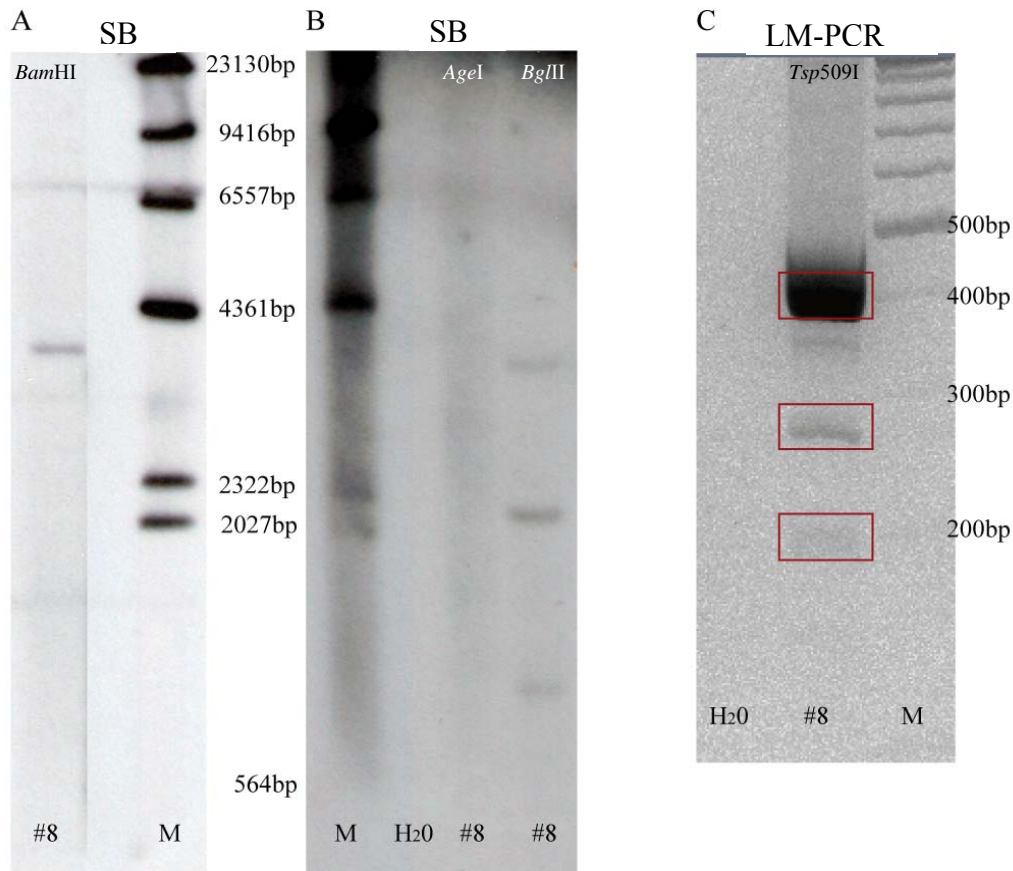
### 6.1 Charakterisierung des konstitutiv HOXB4 exprimierenden embryonalen Stammzell-Klons 8, als Ausgangszelllinie für die hämatopoetische Differenzierung

Ein erklärtes Ziel der regenerativen Medizin ist es, die *in vitro* Generierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) aus pluripotenten Stammzellen (zumeist embryonalen Stammzellen [ESZ]) in ihrer Effizienz deutlich zu steigern und Protokolle zu etablieren, die eine klinische Verwendbarkeit dieser HSZ zulassen. Für unsere Studien in diesem Feld wurde die aus dem 129S6/SvEv-Hintergrund abgeleitete mESZ-Linie CCE (Robertson *et al.*, 1986; Keller *et al.*, 1993) verwendet. Ein Großteil der Experimente wurde parallel mit unmanipulierten Zellen (im Folgenden auch als Wildtypzellen bezeichnet) sowie mit einem konstitutiv HOXB4 exprimierenden Einzelzellklon (Klon 8 [#8]) durchgeführt. Dieser Klon wurde von Sandra Pilat, Sebastian Carotta und Hannes Klump am „Institut für Molekulare Pathologie Wien“ etabliert (unpubliziert). Dazu wurde mittels retroviralem Gentransfer eine Expressionskassette in das CCE-Genom integriert, welche für die Proteine eGFP und HA-HOXB4 kodiert (Abb. 6.1). Mittels der 2A-Esterase des Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV-2A) kommt es während der Translation zu einer Trennung des GFP-Proteins und des HA-markierten HOXB4-Proteins, in einem stabil äquimolaren Verhältnis (Ryan *et al.*, 1991; Ryan und Drew, 1994; Donnelly *et al.*, 2001; Klump *et al.*, 2001; Schiedlmeier *et al.*, 2003; Will *et al.*, 2006). GFP konnte daher als zuverlässiger Reporter zur individuellen Quantifizierung der HOXB4-Expression in allen fluoreszenzbasierten Analysemethoden verwendet werden.



**Abb. 6.1 Konstitutive Expression von HOXB4 und GFP in den Zielzellen.** Der retrovirale Expressionsvektor (als integriertes Provirus gezeigt), flankiert von LTR-Sequenzen, integrierte die eGFP-2A-HA-HOXB4-Genkassette in das Wirtsgenom. Die synthetisierte mRNA wird translatiert, dabei erfolgt kotranslational die Separation der Proteine eGFP und HA-HOXB4 via FMDV-2A. Während das GFP im Zellplasma verbleibt und als Reporter fungiert, wird HOXB4 in den Zellkern importiert und agiert als Transkriptionsfaktor. U3: einzigartiges 3' Ende; R: redundante Region; U5: einzigartiges 5' Ende; PBS: Primerbindungsstelle; 2A: Esterasesequenz; ψ: Verpackungssignal; wPRE: „woodchuck“-post-regulatorives Element; HA: Hämagglutinin-Markierung

Aus der transduzierten Massenkultur wurden per fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) GFP-positive Einzelzellen abgelegt und diese dann expandiert. Aufgrund der Expressionshöhe und des erfolgreichen Engraftments in Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäusen wurde der #8 für weitere Experimente der Gruppe (Pilat *et al.*, 2005a; Hannes Klump, persönliche Kommunikation) und auch für die Experimente der vorliegenden Studie ausgewählt. In der zum Ende der vorliegenden Arbeit durchgeführten Charakterisierung des #8 wurden für die Quantifizierung der retroviralen Integrate Southern Blot und quantitative Polymerase-Kettenreaktionsanalysen (qPCR) durchgeführt. Weiterhin wurden die Integrationsstellen und ihre chromosomale Nachbarschaft mittels ligationsvermittelter- (LM) PCR eruiert. Zwei getrennt durchgeführte Southern Blot Analysen, mit drei unterschiedlichen Restriktionsenzymen für den Verdau der genomischen DNS, ergaben keine eindeutigen Resultate. Der Verdau der genomischen DNS mit *AgeI* führte zu keinem Ergebnis, bei dem Verdau mit *BamHI* wurde eine Integrationsstelle detektiert und bei dem Verdau mit *BglIII* wurden hingegen drei Integrationsstellen, jedoch in unterschiedlicher Intensität, detektiert. Die Quantifizierung mittels qPCR ergab ebenfalls kein eindeutiges Resultat. Zur weiteren Abklärung wurde eine LM-PCR durchgeführt. Hierbei konnten wiederum drei Banden im Gel detektiert werden, die auch hier von unterschiedlich starker Intensität waren. Die angeschlossene Sequenzierung lieferte nur für die mittlere Bande ein Result bei einem Sequenzabgleich mit der BLAST-Datenbank (Version: MouseNCBI\_37) (Zhang *et al.*, 2000). Die Integrationsstelle liegt auf dem Chromosom 4 im Intron 7 des „Metall-regulatorischen Transkriptionsfaktors-1“ (*Mtf-1*). Zum jetzigen Zeitpunkt konnte somit keine sichere Quantifizierung der retroviralen Integrate erreicht werden.



**Abb. 6.2 Quantifizierung retroviraler Insertionsstellen des ESZ-HOXB4 #8.** Zwei unabhängige Southern Blot (SB) Analysen erzielten kein eindeutiges Resultat. (A) Der Verdau der genomischen DNS erfolgte mit *Bam*HI, es konnte ein Integrationsstelle detektiert werden. (B) Bei dem Verdau mit *Age*I konnte keine spezifische Bande detektiert werden, bei dem Verdau mit *Bg*III wurden drei Banden unterschiedlicher Intensität detektiert. In allen Fällen erfolgte die Detektion mittels <sup>32</sup>P-dCTP markierter PRE-Sonde. Der Marker (M) *lambda-Hind*III (M) wurde ebenso radioaktiv markiert und ist als Größenstandard in beiden Blots aufgetragen. Die Blots wurden für drei Tage auf einen Röntgenfilm aufgelegt und dann entwickelt. (C) Die genomische DNS wurde mit *Tsp*509 geschnitten, das LM-PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die detektierbaren Banden ausgeschnitten und direkt sequenziert. H<sub>2</sub>O: Wasser; bp: Basenbaare

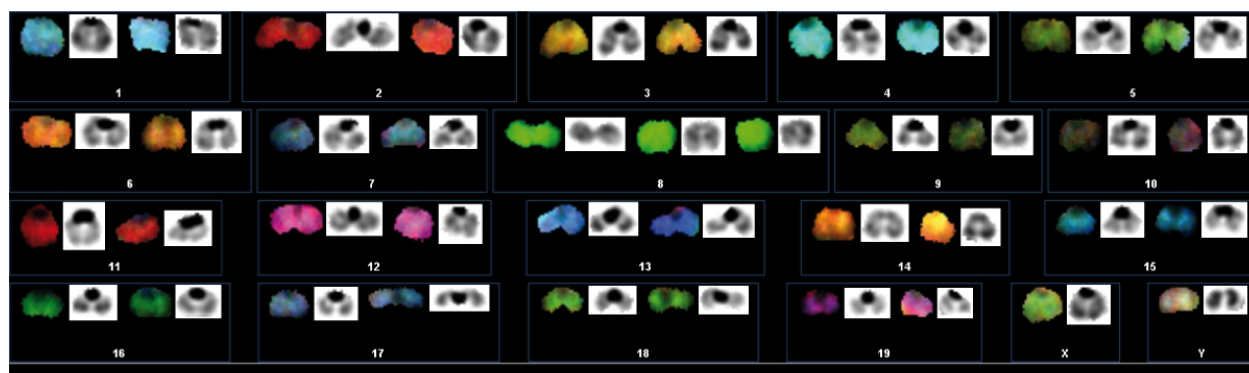


Im Zuge der chromosomalen Charakterisierungen wurden im September 2010 sowohl die verwendeten CCE als auch die von ihnen abgeleiteten HOXB4 Klone mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht. Die SKY-Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Cornelia Rudolph aus der Abteilung der Zell- und Molekularpathologie der MHH durchgeführt. Für den konstitutiven HOXB4 #8 handelte es sich um eine wiederholte Karyotypisierung. Bereits nach der Etablierung des HOXB4 #8 wurde eine Chromosomenfärbung durchgeführt, die keine Auffälligkeiten aufwies (Daten nicht gezeigt). Der weiterhin mitgetestete Klon F6 ist ein generierter „Tet-on“-regulierbarer HOXB4-Einzelzellklon und wird im Kapitel 6.7 beschrieben. Die untersuchten Metaphasen wiesen alle einen unterschiedlichen Anteil tetraploider Zellen auf (Tab. 6.1). Unabhängig von der Ploidie wurde mittels der hochsensitiven SKY-Analyse die Trisomie des Chromosoms 8 in allen drei Zelllinien (blind getestet) detektiert. Das Vorliegen der Trisomie bereits in den untransduzierten Zellen (CCE) schloss durch Insertionsmutagenese bzw. HOXB4-Überexpression induzierte chromosomale Veränderungen als Ursache in den Klonen aus. Aufgrund der gleichen Karyotypen von Wildtypzellen und den HOXB4-Klonen sind die im Nachfolgenden beschriebenen Unterschiede auf die HOXB4-Überexpression zurückzuführen.

**Tab. 6.1 Ploidiebestimmung und SKY-Analyse von Metaphasen der verwendeten ESZ**

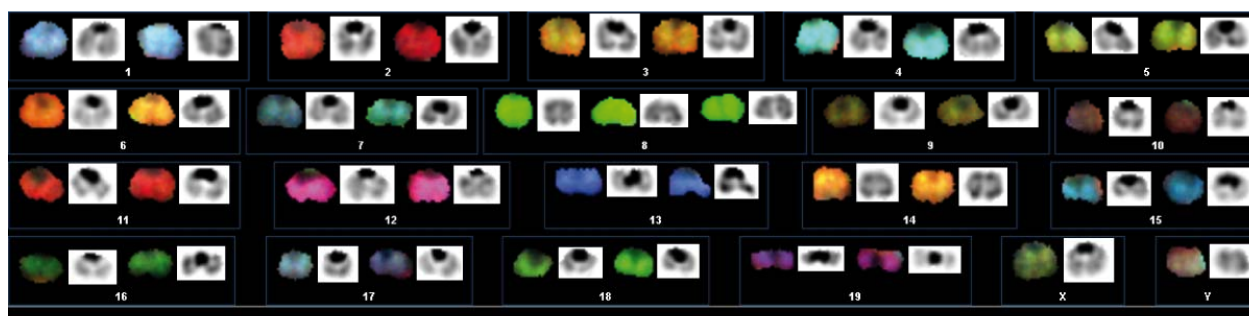
Probe	analyzierte Metaphasen	diploid /tetraploid	chromosomale Auffälligkeiten
CCE	10	5/5	Trisomie 8
CCE-eGFP2AHAHOXB4 #8	12	7/5	Trisomie 8
CCE-eGFP2AHAHOXB4-TET #F6	11	9/2	Trisomie 8

A



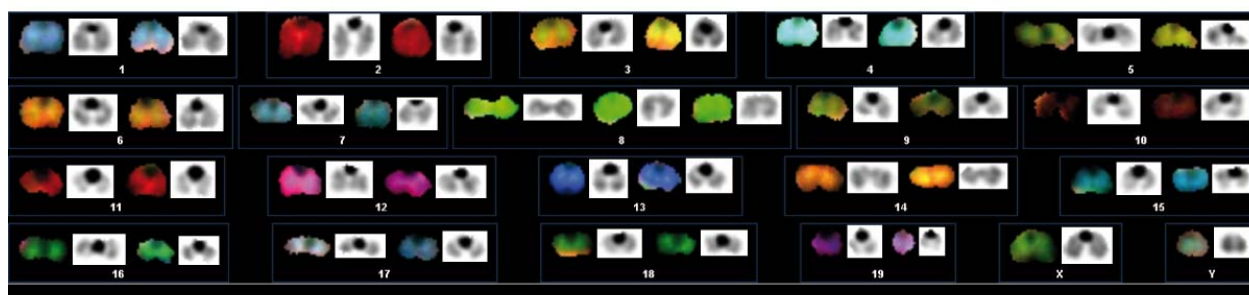
CCE

B



CCE-eGFP2AHAHOXB4 #8

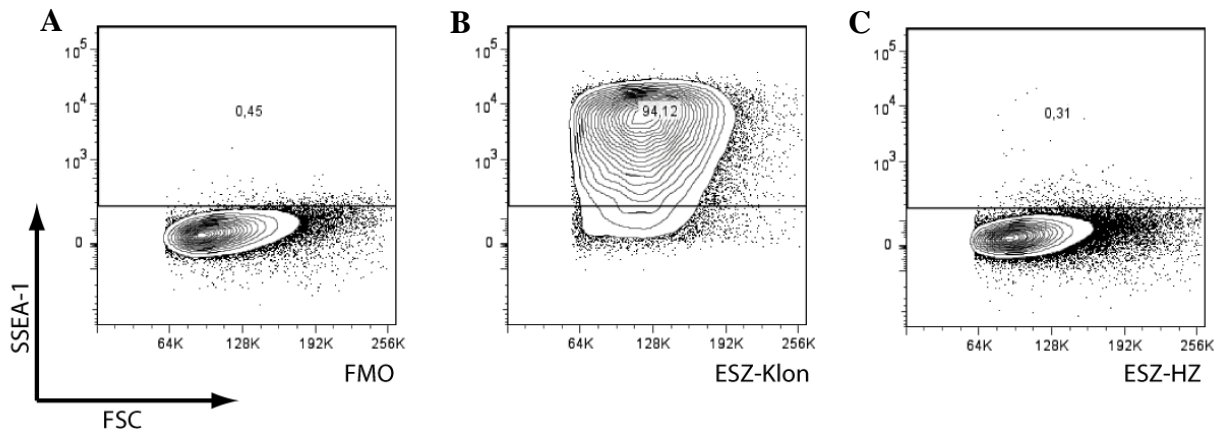
C



CCE-eGFP2AHAHOXB4-TET #F6

**Abb. 6.3 SKY-Analysen zeigten eine Trisomie des Chromosoms 8 in allen Proben. (A) untransduzierte CCE (B) HOXB4-exprimierenden ESZ-Klone #8 (C) #F6. Sonstiger Chromosomenstatus in allen Proben unauffällig.**

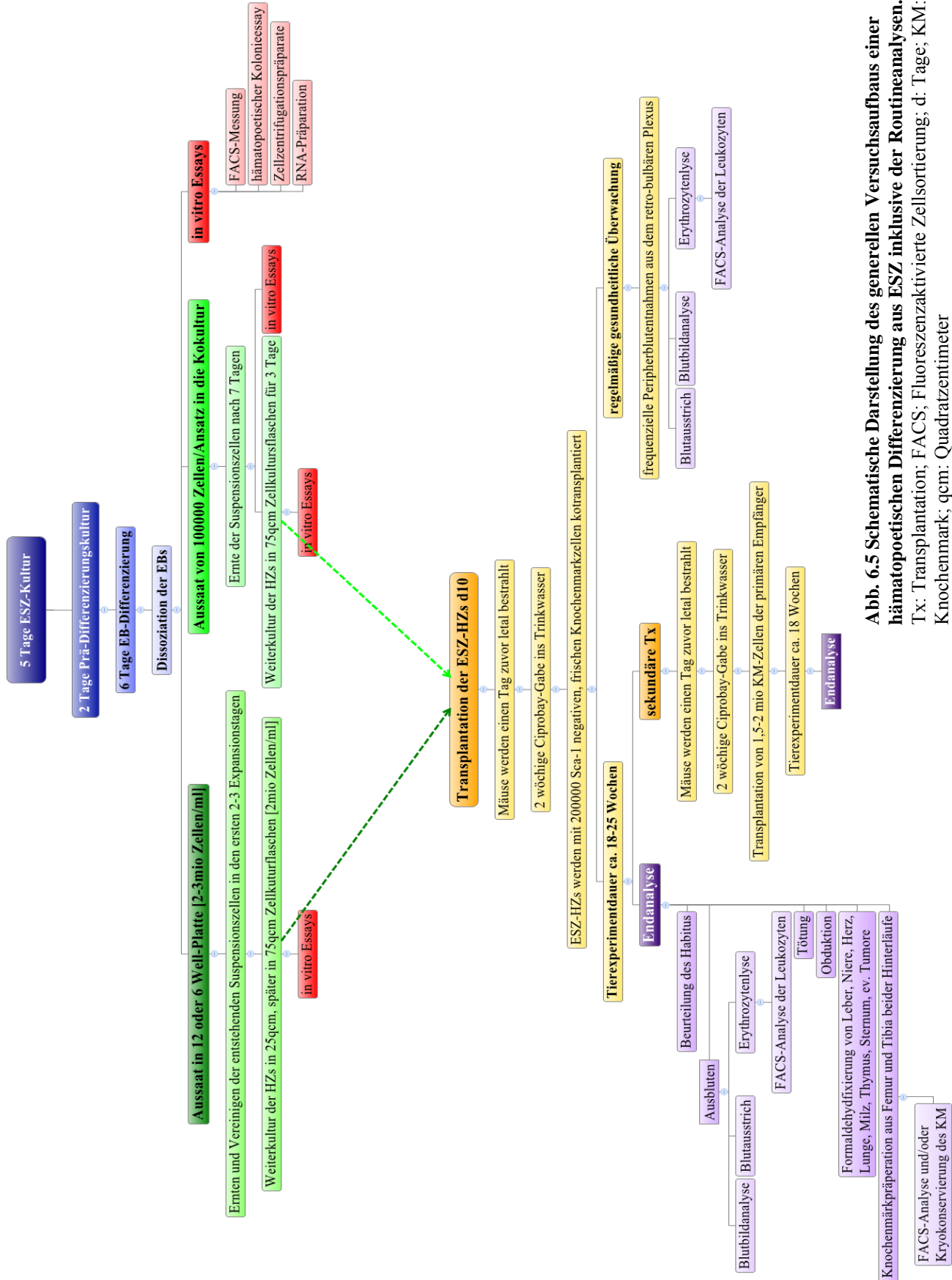
Im Vorfeld der Differenzierungsexperimente wurde der pluripotente Status der ohne Stroma-Unterstützung, im Folgenden auch als feederfrei bezeichnet, kultivierten ESZ (Wildtyp und HOXB4-Klone) mittels FACS-Messung nachgewiesen. Rund 95% der ESZ (Passage [p] 11) exprimierten den murinen ESZ-Marker SSEA-1 (Stadium spezifisches embryonales Antigen-1). Diese robuste undifferenzierte ESZ-Kultur ist entscheidend für eine optimale hämatopoetische Differenzierung.



**Abb. 6.4 Undifferenzierte HOXB4-ESZ exprimieren SSEA-1.** (A) Die ESZ wurden mit biotinyliertem SSEA-1-Antikörper primär und Streptavidin-Pacific-Orange sekundär markiert und danach via FACS analysiert. Die dargestellten Populationen sind auf lebende Einzelzellen (LEZ) vorgegattet und die Gates nach FMO-Kontrolle gesetzt. (B) Gezeigt sind ESZ der 11. Passage sowie (C) ESZ-HZ nach der EB-Differenzierung und 10 Tagen Expansion. FMO: Fluoreszenz minus Eine („fluorescence minus one“); FSC: Vorwärtsstreuung („Forward Scatter“)

## 6.2 Generierung ESZ-abgeleiteter hämatopoetischer Zellen (ESZ-HZ) unter Serumbedingungen

Zur Etablierung der hämatopoetischen Differenzierung in unserem Labor, wurde die von Dr. Hannes Klump mit etablierte Methode (Pilat *et al.*, 2005b) als Grundlage verwendet und weiter optimiert. Der prinzipielle Ablauf eines solchen Differenzierungs- und Expansionsexperiments, inklusive der anschließenden Analysen, ist in Abbildung 6.2. schematisch dargestellt.



**Abb. 6.5 Schematische Darstellung des generellen Versuchsaufbaus einer hämatopoetischen Differenzierung aus ESZ inklusive der Routineanalysen.**  
 Tx: Transplantation; FACS; Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung; d: Tage; KM: Knochenmark; qcm: Quadratcentimeter

### 6.2.1 STD-SF-Zytokinbedingungen expandieren ESZ-HZ robuster als STIF-A5-SF-Bedingungen

Um eine gleichmäßige und konstante HOXB4-Expression in allen differenzierenden Zellen dauerhaft zu gewährleisten, wurde, im Gegensatz zur publizierten Verwendung einer HOXB4-transduzierten Massenkultur, der von S. Pilat, S. Carotta und H. Klump generierte ESZ-Klon CCE-eGFP2AHAHOXB4 #8, (Morphologie siehe Abb. 6.6 A+B) sowie unmanipulierte CCE als Kontrolle verwendet. Der klonale Ansatz bot weiterhin den Vorteil, dass ein insertionsbedingtes Auswachsen mutierter Subklone im Differenzierungsverlauf ausgeschlossen werden konnte.

Sowohl die CCE als auch der #8 wurden in FCS-haltigem Differenzierungsmedium für sechs Tage zu „Embryoid Bodies“ (EBs) (dt.: embryonale Körperchen) differenziert (Morphologie Abb. 6.6 C). Der bei Pilat *et al.*, 2005 publizierte semifeste Zustand des Mediums (50% Methylcelluloseanteil) wurde allerdings zur „vollständigen“ Flüssigkultur geändert, dazu wurde die Methylcellulose durch IMDM ersetzt. Nach sechs Tagen der EB-Differenzierung (EB d6) wurden die EBs dissoziiert (Morphologie Abb. 6.6 D), wobei die Zellausbeute der CCE-Kultur ca. 20% höher war als für #8 (Tab. 6.3). Die anschließende Expansion der hämatopoetischen Suspensionszellen erfolgte erstmals unter serumfreien STIF-A5-Zytokinbedingungen (STIF-A5-SF; ohne Dexamethason [DEX]) und vergleichend mit den etablierten serumfreien Standardbedingungen (STD-SF) +/- DEX (siehe Methoden 5.2.6; nahezu identische Bedingungen wie bei Pilat *et al.*, 2005 publiziert) für mehrere Wochen. Gestartet wurde mit jeweils  $2,7 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz. STIF-A5 ist ein Zytokincocktail für den ein stark fördernder Effekt auf die Selbsterneuerung adulter HSZ beschrieben wurde (Zhang *et al.*, 2008a). Ob mit diesen Zytokinbedingungen auch eine stärkere Anreicherung von ESZ-HSPZ erreicht werden kann, sollte in diesen Untersuchungen eruiert werden. Die Expansion wurde im Verlauf bezüglich ihres Proliferationspotenzials (Tab. 6.3) beurteilt und weiterhin morphologisch charakterisiert (Abb. 6.6 E-J). Im Gegensatz zu Peripherblut- oder Knochenmarkproben traten bei den ESZ-HZ verschiedenste myeloische Reifungsformen (in veränderlichen Anteilen) nebeneinander auf. An ESZ-HZ d19 (Abb. 6.6 J) bestanden alle Ansätze zu 70-80% aus frühen Myeloblasten, ausgenommen die CCE-Kultur unter STD-SF ohne DEX, hier bestand die gesamte Kultur nur noch aus Mastzellen (Abb. 6.6 H). Die etablierten STD-SF Bedingungen (inkl. DEX) ließen nur ca. 10% Mastzellen in den CCE entstehen. Die Überexpression von HOXB4 verhinderte unter STD-SF Bedingungen sowohl mit als auch ohne DEX das Auswachsen von Mastzellen, lediglich unter den DEX-freien STIF-A5-SF-Bedingungen konnten trotz HOXB4 Überexpression ~5% Mastzellen entstehen. Die Expansion unter STD-SF führte von Anfang an zu einer wesentlich robusteren und stärkeren Proliferation der ESZ-HZ, als die Expansion unter STIF-A5-SF-Bedingungen (Tab. 6.2). STIF-A5-SF hatte auf die ESZ-HZ-Mischkultur in den ersten 13 Expansionstagen keinen proliferationsfördernden Effekt. Die untransduzierten CCE konnten unter diesen

Bedingungen nicht am Leben erhalten werden. Die ESZ-HZ des #8 starben auch größtenteils, knapp 1% der Zellen überlebten und begannen erst ab d13 stabil zu proliferieren. Ob diese proliferationschwache Phase eine Selektion auf ESZ-HSPZ bedeutete, war und ist zurzeit morphologisch nicht detektierbar, da sich die HSPZ-Population nicht von der Myeloblastenpopulation unterscheiden lässt. Aufgrund der drastisch reduzierten Zellzahl waren FACS-Analysen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Auch im weiteren Verlauf konnte unter STIF-A5-SF ein vermehrter Anteil toter Zellen nicht vermieden werden. Unter STD-SF-Bedingungen gab es dagegen praktisch kein Zellsterben (Abb. 6.6 J). Nach Erreichen einer stabilen Proliferation in allen fortgeführten Ansätzen wurde die immunphänotypische Charakterisierung mittels beschriebener, hämatopoeseassoziiierter Oberflächenproteine (siehe auch 3.2.2), markiert via spezifischen Antikörpern, per FACS durchgeführt (Abb. 6.6 K). Für die CCE STD-SF -DEX konnte der morphologisch festgestellte Mastzellphänotyp bestätigt werden. Die Zellen waren stark CD45+ und exprimierten vollständig ckit und CD150, ein Phänotyp der in vorangegangenen Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) bereits für Mastzellen evaluiert wurde. Die CCE STD-SF + DEX lagen in ihrer hämatopoetischen Entwicklung deutlich hinter den HOXB4-Ansätzen zurück, nur geringe Anteile CD41 und/oder CD45+ Zellen waren vorhanden. Die STD-SF expandierten HOXB4 Zellen zeigten in ihrer Ausreifung und dem Anteil der HSPZ-Fraktion, der CD41hochexprimierenden, ckit-positiven (CD41hi ckit+) Subpopulation (diese Subpopulation beinhaltet den höchsten Anteil an Langzeit-multilinenrepopulierenden Zellen; Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009) keine wesentlichen Unterschiede. Eine Vervierfachung dieser potenten Fraktion konnte zu diesem Zeitpunkt allerdings unter STIF-A5-SF-Bedingungen erreicht werden. Die derart kultivierten Zellen zeichneten sich bereits durch einen rund 40% höheren Anteil an CD41+ Zellen und darin einem vierfachen Anteil von CD41hi Zellen aus. Der Anteil CD41+CD45- Zellen war vergleichbar mit den STD-SF-Bedingungen, allerdings konnte unter STIF-A5-SF eine stärkere Ausreifung zum CD41+CD45+ Phänotyp erreicht werden. Eine weitere Ausreifung zum CD41-CD45+ Phänotyp war allerdings nur unter STD-SF-Bedingungen möglich. Somit konnte eine optimale Wachstumsbedingung für frisch dissoziierte EBs nicht mit STIF-A5-Bedingungen erreicht werden. Allerdings führte eine verlängerte Expansionsphase unter diesen Bedingungen zu einer bedeutenden Steigerung der ESZ-HSPZ-Fraktion, deren endgültige Ausreifung zum CD41-CD45+ Phänotyp allerdings inhibiert zu sein schien - eine Fähigkeit die die STD-SF expandierten Zellen besaßen auch wenn der HSPZ Anteil zu diesem fortgeschrittenen Expansionszeitpunkt deutlich reduziert war.

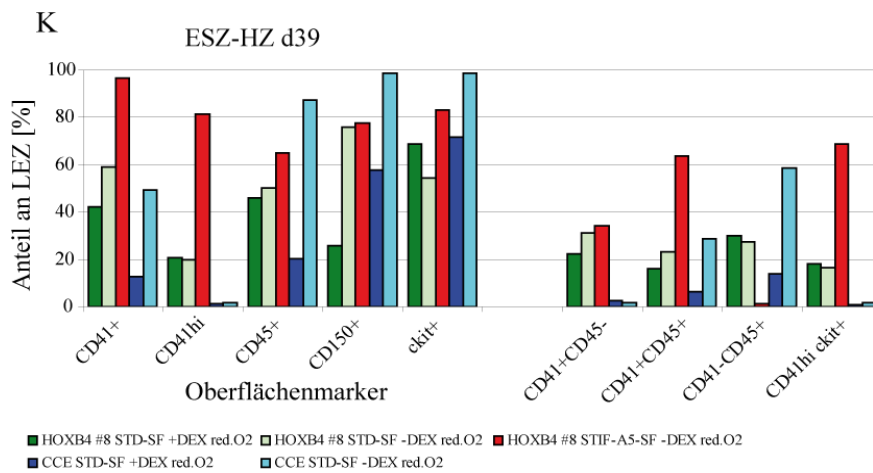
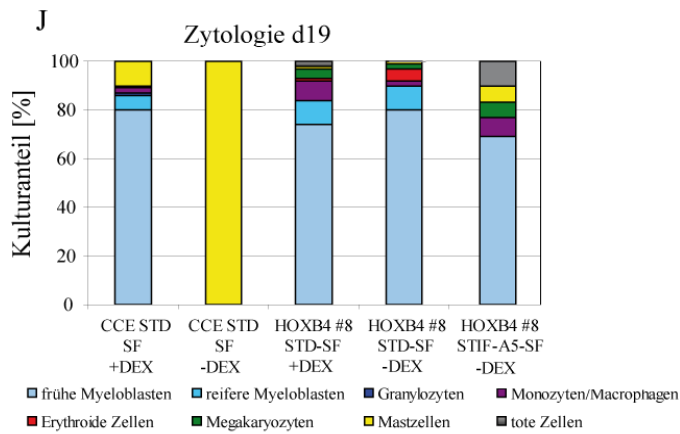
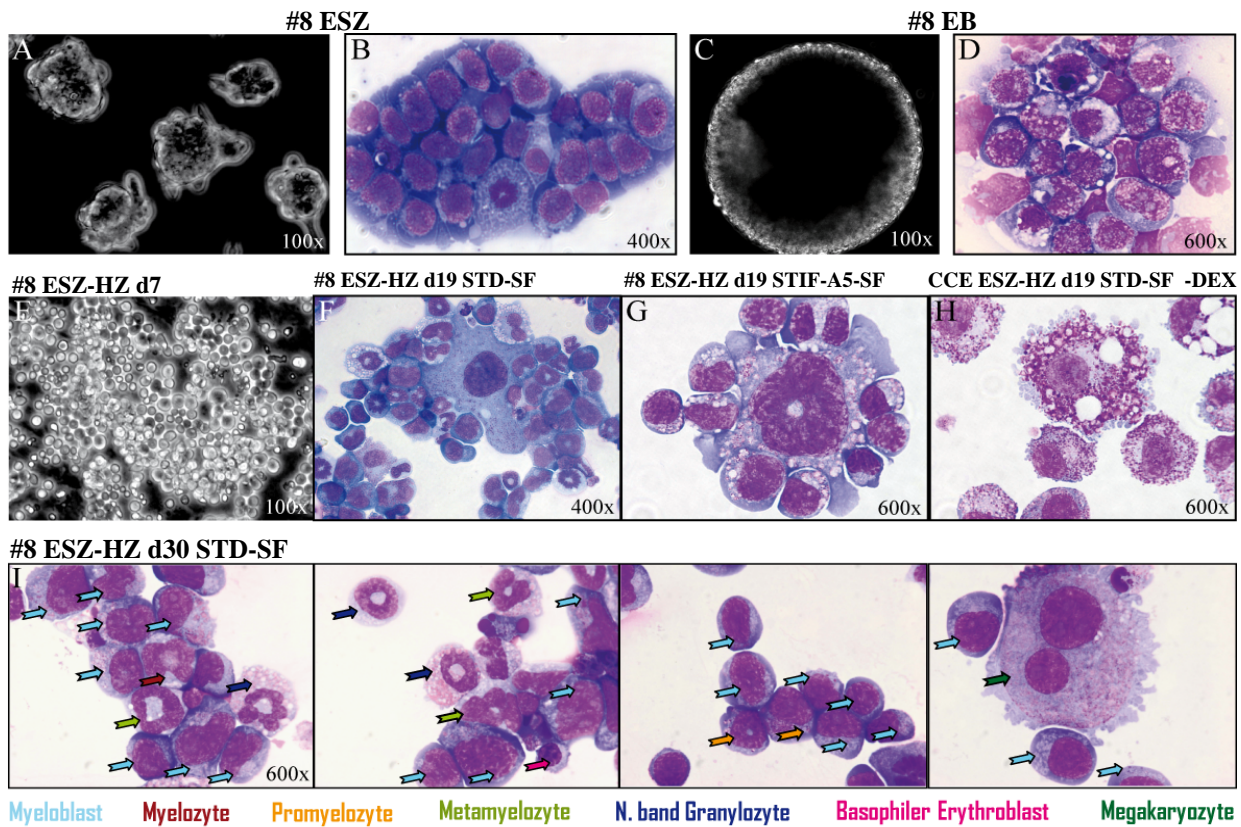
**Tab. 6.2 Zellzahlentwicklung während der EB-Differenzierung und anschließenden Expansion der resultierenden hämatopoetischen Zellen (ESZ-HZ) in zwei verschiedenen Zytokincocktails.**

+++ : starke Proliferation, ++ mäßige Proliferation; +: geringe Proliferation; -: keine Proliferation; --: vermehrtes Absterben; ---: starkes Absterben

	CCE		CCE-HOXB4 #8	
ESZ für EB-Differenzierung	1,20 x 10 <sup>5</sup>		1,20 x 10 <sup>5</sup>	
Zellausbeute an EB d6	1,36 x 10 <sup>8</sup>		1,07 x 10 <sup>8</sup>	
ESZ-HZ Expansion in verschiedenen Zytokincocktails	<b>STD-SF</b>	<b>STIF-A5-SF</b>	<b>STD-SF</b>	<b>STIF-A5-SF</b>
anfängliche Expansionszellzahl (3x10 <sup>6</sup> /ml)	2,7x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>
ESZ-HZ d5 erreichen einer stabilen Suspensionskultur	++	-	+++	-
Proliferation ab d6 (weiter mit 2x10 <sup>6</sup> /ml)	++	--- d10 alle Zellen tot	+++	--- bis d13 absinken bis auf 3x10 <sup>5</sup>
mittlere Verdopplungszeit zw. ESZ-HZ d10-15	39,3 h	/	31,8h	ab d13: 32h

**Abb. 6.6 (nächste Seite) STD-SF- und STIF-A5-SF-Zytokinbedingungen modulieren die Linienverteilung, die Reifung und besonders die HSPZ-Proliferation im Differenzierungsverlauf unterschiedlich.** (A) #8 ESZ-Kultur Phasenkontrastaufnahme (B) #8 ESZ-Kolonie, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt, (C) #8 EB als Phasenkontrastaufnahme, (D) #8 EBd6 dissoziiert, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt (E) #8 ESZ-HZ d7 im Phasenkontrast aufgenommen, (F) #8 ESZ-HZ 19 Tage unter STD-SF-Bedingungen expandiert, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt (G) #8 ESZ-HZ 19 Tage unter STIF-A5-SF-Bedingungen expandiert, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt, (H) CCE ESZ-HZ 19 Tage unter STD-SF -DEX-Bedingungen expandiert, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt, (I) #8 ESZ-HZ 30 Tage unter STD-SF-Bedingungen expandiert, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt, verschiedene Reifestadien der unterschiedlichen Zelllinien sind mit entsprechend farbigen Pfeilen markiert. (J) ESZ-HZ wurden 19 Tage unter drei verschiedenen Zytokinbedingungen expandiert, Zellzentrifugationspräparat May-Grünwald-GIEMSA gefärbt, jeweils fünf mikroskopische Gesichtfelder wurden bei 400facher Vergrößerung ausgezählt und die Zellen in die aufgeführten Populationen unterschieden. (K) Ca. 1x10<sup>6</sup> ESZ-HZ wurden nach 30 Tagen Expansion mit Antikörpern markiert und so via FACS phänotypisch charakterisiert. DEX: Dexamethason



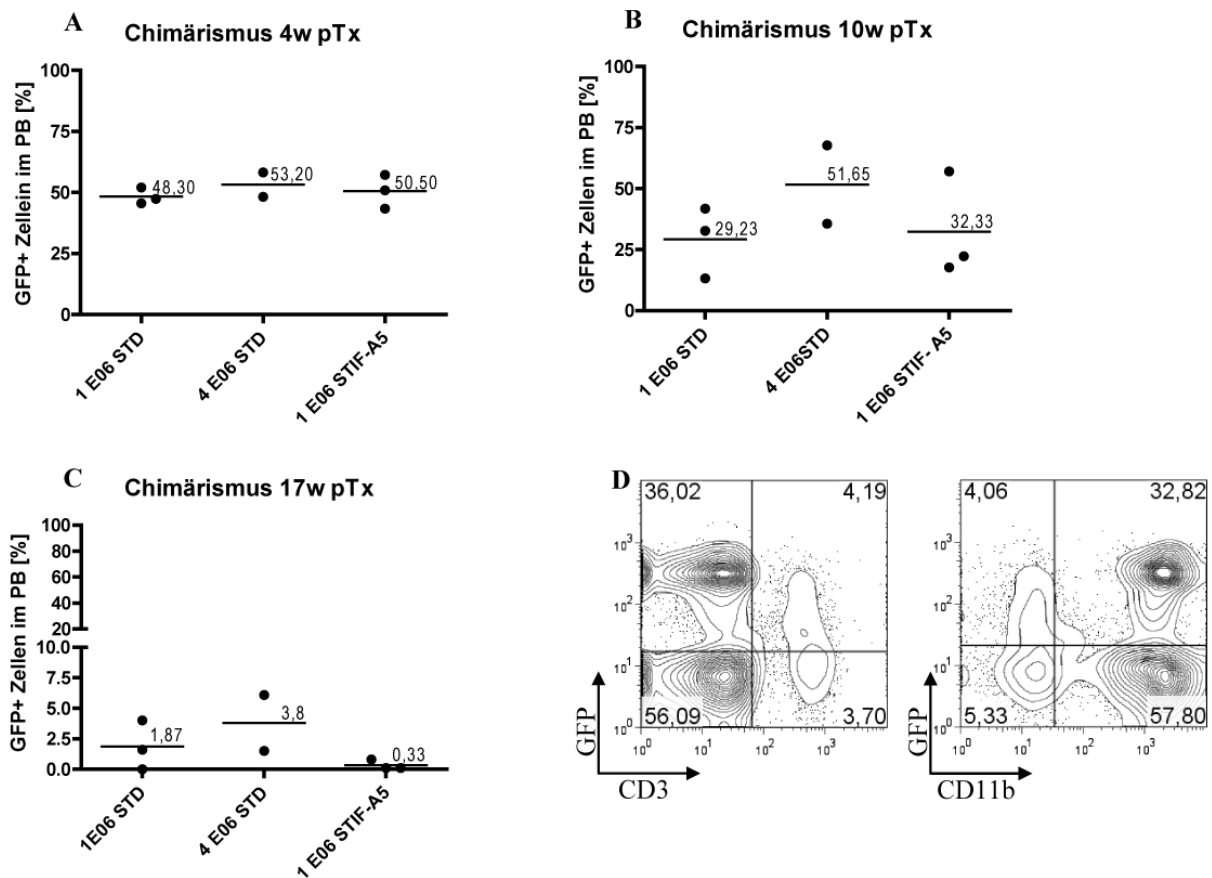




### 6.2.2 Transplantierte ESZ-HZ der STD-SF und STIF-A5-SF Expansionen erzielen Multiliniengraftment in Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäusen

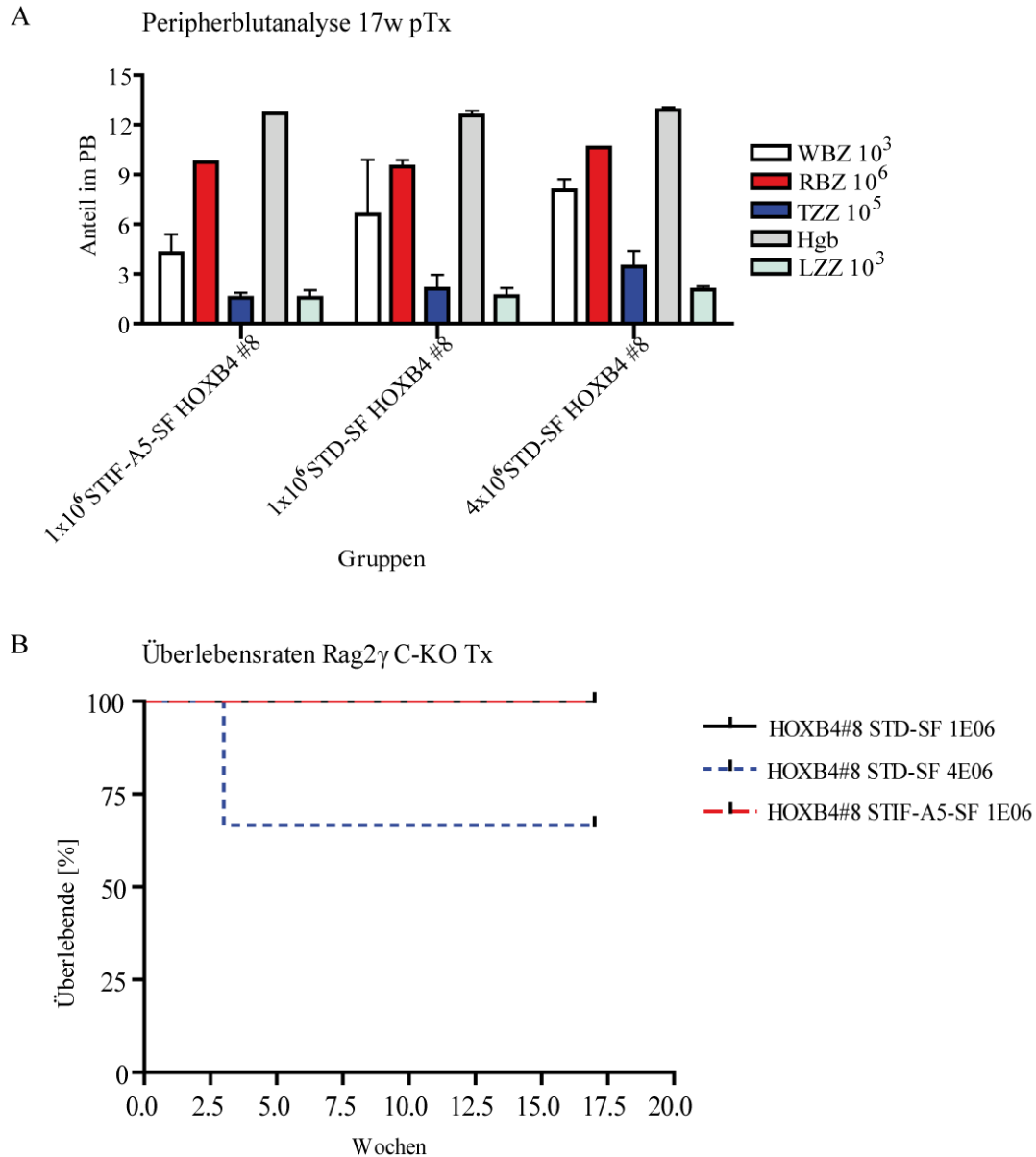
Konnten Pilat *et al.* nach der Transplantation in Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäuse vorerst nur ein Anwachsen (wird im folgenden als Engraftment bezeichnet) mit HOXB4-Massenkulturen und nicht mit klonalen ESZ-HZ erreichen, so konnte in späteren Experimenten dieser Gruppe auch mit unterschiedlichen HOXB4-Klonen (u.a. Klon 8) Engraftment erzielt werden (Pilat *et al.*, 2005a) und ein erforderlicher Schwellenlevel der HOXB4-Expressionshöhe für engraftmentfähige ESZ-HZ definiert werden (Hannes Klump, persönliche Kommunikation). Für die vorliegende Arbeit wurde anfänglich der gleiche Mausstamm verwendet. Die Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäuse wurden 24 h vor der Tx mit 9,5 Gy letal bestrahlt. Es wurden jeweils drei Tiere pro Gruppe mit  $1 \times 10^6$  bzw.  $4 \times 10^6$  ESZ-HZ und jeweils  $2 \times 10^5$  Kompetitorzellen (Knochenmarkzellen [KM] aus Rag2 $\gamma$ C-KO) transplantiert. Mittels ESZ-HZ (Differenzierungstag 18 nach EB-Dissoziation = d18) des HOXB4-Klons 8 (#8) konnten wir ein deutliches Engraftment erzielen (Abb. 6.7 A) und 10 Wochen nach Transplantation (pTx) eine Multilinenrepopulation der Rezipienten nachweisen (Abb. 6.7 D).

Bisher generierte ESZ-HZ sind funktionell unterschiedlich zu adulten HSZ und sind daher nicht voll kompetitiv mit wt-HSZ (McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Stärker kompetitive ESZ-HSPZ waren durch die Expansion unter STIF-A5-SF zu erwarten und damit einhergehend eine gesteigerte und stabilere Chimärismusrate (prozentualer Anteil GFP-positiver Zellen an der gemessenen Zellpopulation, wie z.B. im peripheren Blut [PB]). Diese Erwartungen konnten nicht erfüllt werden. Alle Tiere verzeichneten im Verlauf ein Absinken der Chimärismusrate (Abb. 6.7 B), bis zu einem finalen Anteil von durchschnittlich 0,33-3,8% (Abb. 6.7 C). Auch im Knochenmark (KM) blieb kein höherer Chimärismus erhalten (Daten nicht gezeigt). Dieser endgültige Chimärismus liegt zwar noch im Bereich zurzeit publizierter Durchschnittswerte (Matsumoto *et al.*, 2009) und kann somit auch als Langzeitchimärismus im primären Rezipienten (1 $^{\circ}$ R) gewertet werden, er liegt jedoch deutlich unter den Anforderungen für therapeutisch nutzbare Transplantate.



**Abb. 6.7 ESZ-HZ aus Standard- und STIF-A5 Expansion führten zu Langzeit-Multiliniengraftment in immundefizienten Mäusen (1°R), aber mit stark sinkender Chimärismusrate über die Zeit.** Die Rag2γC-KO-Mäuse wurden einen Tag nach der letalen Bestrahlung (9,5Gy) mit  $1 \times 10^6$  HOXB4 #8-ESZ-HZ aus STD-SF- bzw. STIF-A5-SF und  $4 \times 10^6$  HOXB4 #8-ESZ-HZ aus STD-SF Bedingungen i.v. transplantiert,  $2 \times 10^5$  Kompetitorzellen aus Rag2γC-KO-Maus-Knochenmark wurden kotransplantiert. **(A)** GFP-Chimärismus im PB 4 Wochen nach Tx. **(B)** GFP-Chimärismus im PB 10 Wochen pTx. **(C)** GFP-Chimärismus im PB 17 Wochen pTx. **(D)** FACS-Analysen zeigen PB-Phänotyp 10 Wochen pTx in der Fraktion PI-negativer Zellen. STD-SF: Standard; w: Wochen; CD3: T-Zell-Marker; CD11b: Marker myeloischer Zellen; pTx: nach Transplantation

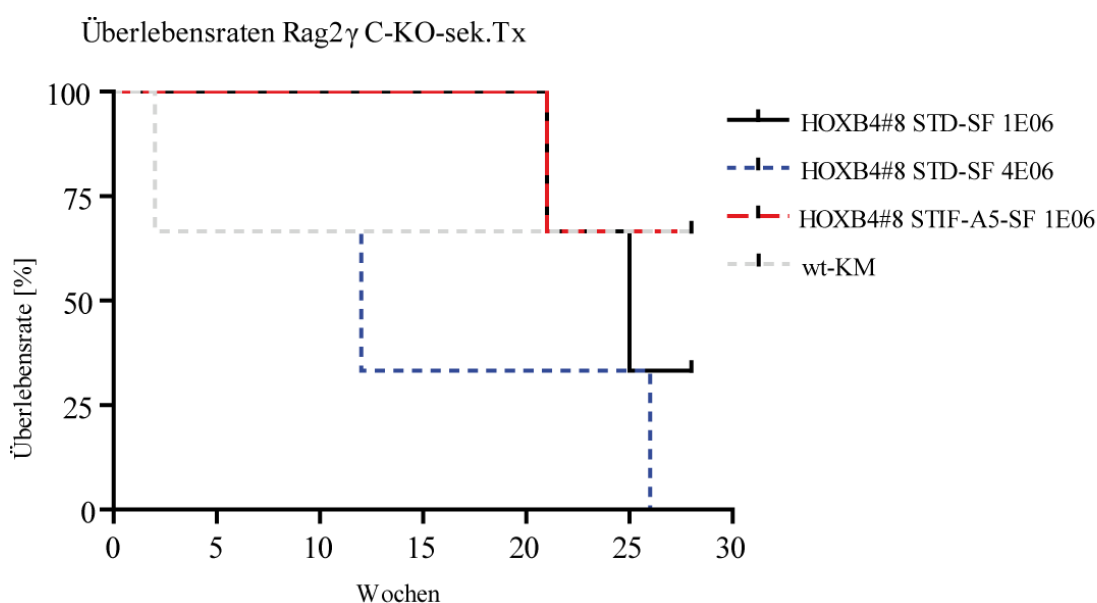
Trotz der stark gesunkenen Chimärismusrate im Beobachtungszeitraum der transplantierten Tiere konnte in allen Tieren ein normwertiges Blutbild aufrechterhalten. Weiterhin konnte in den Rezipienten *de novo* eine stabile Lymphozytenpopulation etabliert werden. Todesfälle konnten durch die stabile Rekonstitution vermieden werden (Ausnahme: das drei Wochen pTx durch fehlendes Engraftment verstorbene Tier) (Abb. 6.8). Die hämatopoetische Langzeitrekonstitution war somit erfolgreich.



**Abb. 6.8 Erfolgreiche Langzeit-Multilinenrekonstitution letal bestrahlter Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäuse (1 $^{\circ}$ R) mittels transplantiertter ESZ-HZ.** Transplantiert wurden je 3 Tiere pro Gruppe mit angegebener Zellzahl ESZ-HZ d18, jeweils  $2 \times 10^5$  Kompetitorzellen aus Rag2 $\gamma$ C-KO-Maus-Knochenmark wurden kotransplantiert, die Endanalyse erfolgte 17 Wochen pTx. **(A)** Blutbildanalyse des PB 17 Wochen pT; Fehlerbalken zeigen SEM. **(B)** Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Todesursache der einen gestorbenen Maus war fehlendes Engraftment. WBZ: Weiße Blutzellen-Zahl; RBZ: Rote Blutzellen-Zahl; TZZ: Thrombozytenzahl; Hgb: Hämoglobin; LZZ: Lymphozytenzahl; STD-SF: Standard; w: Wochen

### 6.2.3 Sekundäre Transplantation (sek.Tx)

Zur Analyse der *in vivo* Langzeitselbsterneuerungsfähigkeit der ESZ-HSZ wurde eine sekundäre Transplantation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Knochenmark nach 17 Wochen aus den primären Rezipienten (1°R) gewonnen, innerhalb der Gruppen vereint, und wiederum pro Gruppe in jeweils drei letal bestrahlte Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäuse transplantiert (2°R). Pro Maus wurden  $3 \times 10^6$  KM-Zellen transplantiert. Allerdings konnten im 2°R zu keinem Zeitpunkt GFP-positive Zellen im PB oder KM nachgewiesen werden. Somit waren die in 6.2.1 generierten ESZ-HZ zwar zu einem Langzeitengraftment im 1°R fähig, konnten einen 2°R allerdings nicht erneut repopulieren. Die hämatopoetische Rekonstitution und somit das Langzeitüberleben der sekundären Rezipienten (Abb. 6.9) konnte teilweise durch Rag2 $\gamma$ C-KO-HSZ sichergestellt werden.



**Abb. 6.9** Das Überleben der sekundär transplantierten Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäuse konnte größtenteils durch wiederhergestellte Rag2 $\gamma$ C-KO-HSZ gesichert werden. Jeweils  $3 \times 10^6$  KM-Zellen der primären Empfänger aus den vorherigen Ansätzen wurden in jeweils drei letal bestrahlte (9,5Gy) Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäuse i.v. transplantiert. Die Endanalyse erfolgte nach 28 Wochen.

### 6.3 Neugestaltung des Differenzierungs- und Expansionsverfahrens

Unter den Bedingungen der vorangegangenen Experimente konnten keine zufriedenstellenden *in vivo* Resultate erzielt werden. Für alle weiterführenden Experimente ist aber eine optimale Differenzierung hin zu einem signifikanten Stamm- und Progenitorzellanteil (HSPZ) Voraussetzung. Daher wurde in den folgenden Versuchen eine gezielte Verbesserung des Differenzierungsverfahrens und eine ebenso auf neuesten Erkenntnissen beruhende Optimierung der Expansionsphase angestrebt.

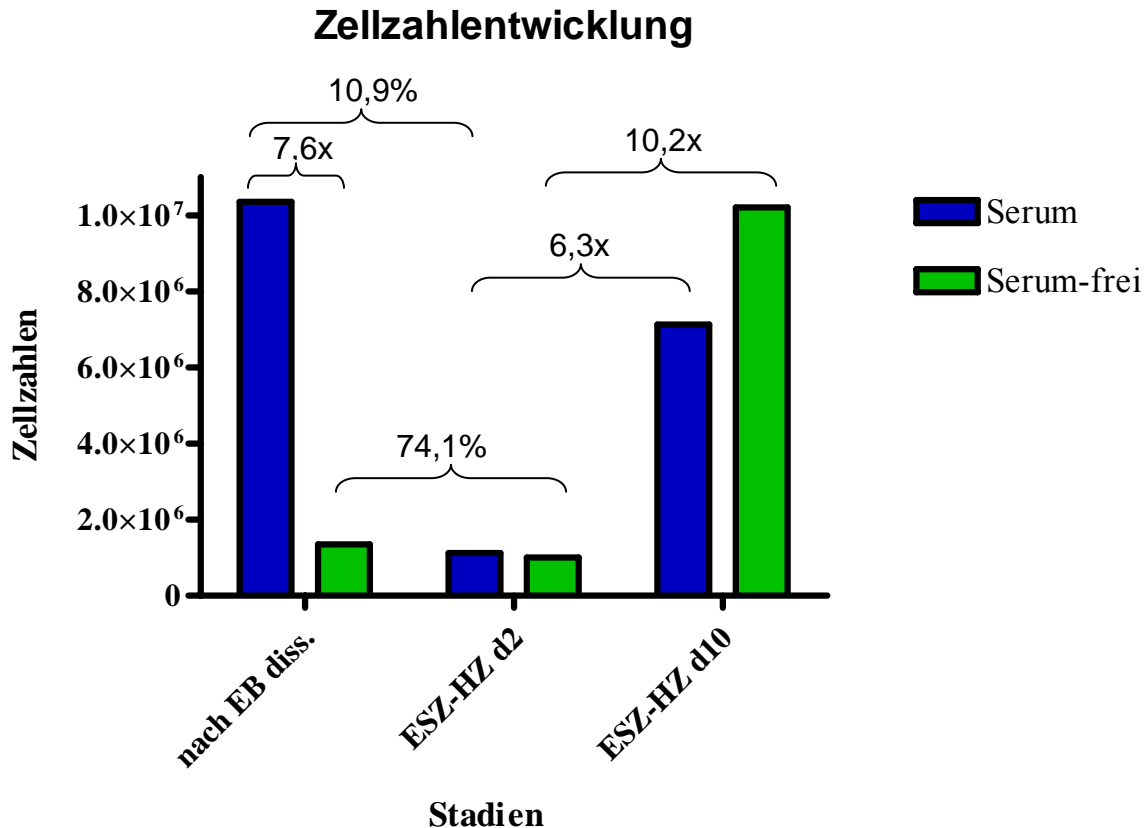
#### 6.3.1 Die schrittweise serumfreie „Embryoid-Body“- (EB)-Differenzierung forciert die hämatopoetische Entwicklung stärker als die EB-Differenzierung mit Serum

Die unter 6.1 beschriebene Serum-EB-Differenzierung wurde im Folgenden parallel zu dem von Pearson *et al.* (2008) publizierten serumfreien, schrittweisen Differenzierungsverfahren durchgeführt. In diesem Verfahren wird zum Differenzierungsstart BMP4, zur Induktion der Mesodermbildung, dem Medium zugesetzt und dann zweieinhalb Tage später Activin A, bFGF und VEGF zugegeben. In dieser zweiten Phase der Differenzierung wird durch die zugegebenen Zytokine die Hämangioblastenbildung und letztlich die Generierung hämatopoetischer Zellen initiiert. In der von uns durchgeführten serumfreien EB-Differenzierung wurde das Verfahren hinsichtlich einer Zugabe der Zytokine SCF und TPO in der zweiten Phase der EB-Differenzierung abgeändert. Denn es wurde gezeigt, dass die Rezeptoren dieser Zytokine bereits sehr früh in der embryonalen Entwicklung auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (Zeigler *et al.*, 1994; Era *et al.*, 1997) sowie während der EB-Differenzierung (Challier *et al.*, 2002). Daher erwarteten wir uns durch die Zugabe von SCF und TPO zu diesem Zeitpunkt eine verstärkte Entwicklung der HSZ-Fraktion. Ebenso besteht die Vermutung, dass eine so zeitige Unterstützung entstehender Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) die spätere Ausreifung zu definitiven, möglicherweise adulten HSZ ermöglicht. Wie die Gruppe um G.Daley im Jahr 2009 zeigte, besteht bei *in vitro* generierten Stammzellen, trotz CDX4- und HOXB4-Überexpression sowie OP9-Stromaunterstützung, das Problem, dass diese EPOCH/ESZ-HZ in ihrer Entwicklung anscheinend zwischen primitiver und definitiver HSZ „hängen bleiben“, sich phänotypisch und funktionell nicht genau zuordnen lassen. Außerdem waren bisher immer mehrere Millionen ESZ-HZ nötig um letal bestrahlte Mäuse zu rekonstituieren, so dass angenommen wurde, dass im generierten ESZ-HZ-Kompartiment HSZ entweder nur in sehr geringer Frequenz vorkommen oder aber in ihrer Engraftmentkapazität geschwächt sind und daher mit adulten Wildtyp-HSZ schlecht konkurrieren können (McKinney-Freeman *et al.*, 2009).

Im Zuge dieses Experimentes sollte die Auswirkung einer die üblichen sechs Tage übersteigenden EB-Differenzierungsphase auf den Anteil an HSPZ in der hämatopoetischen Mischkultur zusätzlich evaluiert

werden. Da gezeigt wurde, dass die embryonale Entwicklung der Maus konform mit dem ablaufenden Entwicklungsprogramm im *in vitro* System EB-Differenzierung geht (Leahy *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2007), ist der EB d6 vergleichbar mit dem embryonalen Entwicklungstag 10,5 (E10,5). Zu diesem Zeitpunkt entstehen erste HSZ in der Plazenta (Gekas *et al.*, 2005; Mikkola *et al.*, 2005; Rhodes *et al.*, 2008; McKinney-Freeman *et al.*, 2009) und der Aorto-Gonad-Mesonephros-Region (AGM-Region) (de Bruijn *et al.*, 2000; Taoudi *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2010). Zum Zeitpunkt E12,5 der embryonalen Entwicklung ist dann allerdings schon ein Stadium erreicht, in dem es nach HSZ-Infiltration der fetalen Leber zu einer starken Vermehrung der HSZ gekommen ist (Mikkola *et al.*, 2005), dieser lässt sich mit dem EB-Differenzierungstag 8 gleich setzen. Daher sollte überprüft werden, ob dies einen weiteren Vorteil im Differenzierungsverfahren darstellen könnte.

Die EB-Formierungseffizienz war unter Serumbedingungen deutlich höher als im serumfreien Ansatz, daraus resultierte dann auch die 7,6fach höhere Zellzahl der Serumdifferenzierung am sechsten Tag der EB-Differenzierung (EBs an Tag 6 bestehen aus rund  $3 \times 10^5$  Zellen/EB; Dang *et al.*, 2002). Bereits am zweiten Expansionstag (zwei Tage nach Dissoziation der EBs) kam es allerdings zur Angleichung der Zellzahlen hämatopoetischer Suspensionszellen, womit eine Ausbeute hämatopoetischer Zellen von über 74% aus den dissoziierten EB-Zellen unter serumfreien Bedingungen hervorging, hingegen aber nur ca. 11% in der Vergleichsgruppe. Nach 10 Tagen der Expansion unter STD-SF Bedingungen konnte eine über 10fache Vermehrung der hämatopoetischen Zellen aus der schrittweisen serumfreien EB-Differenzierung erreicht werden, die serumexponierten Zellen lagen mit einer nur gut sechsfachen Expansion deutlich zurück (Abb. 6.10).



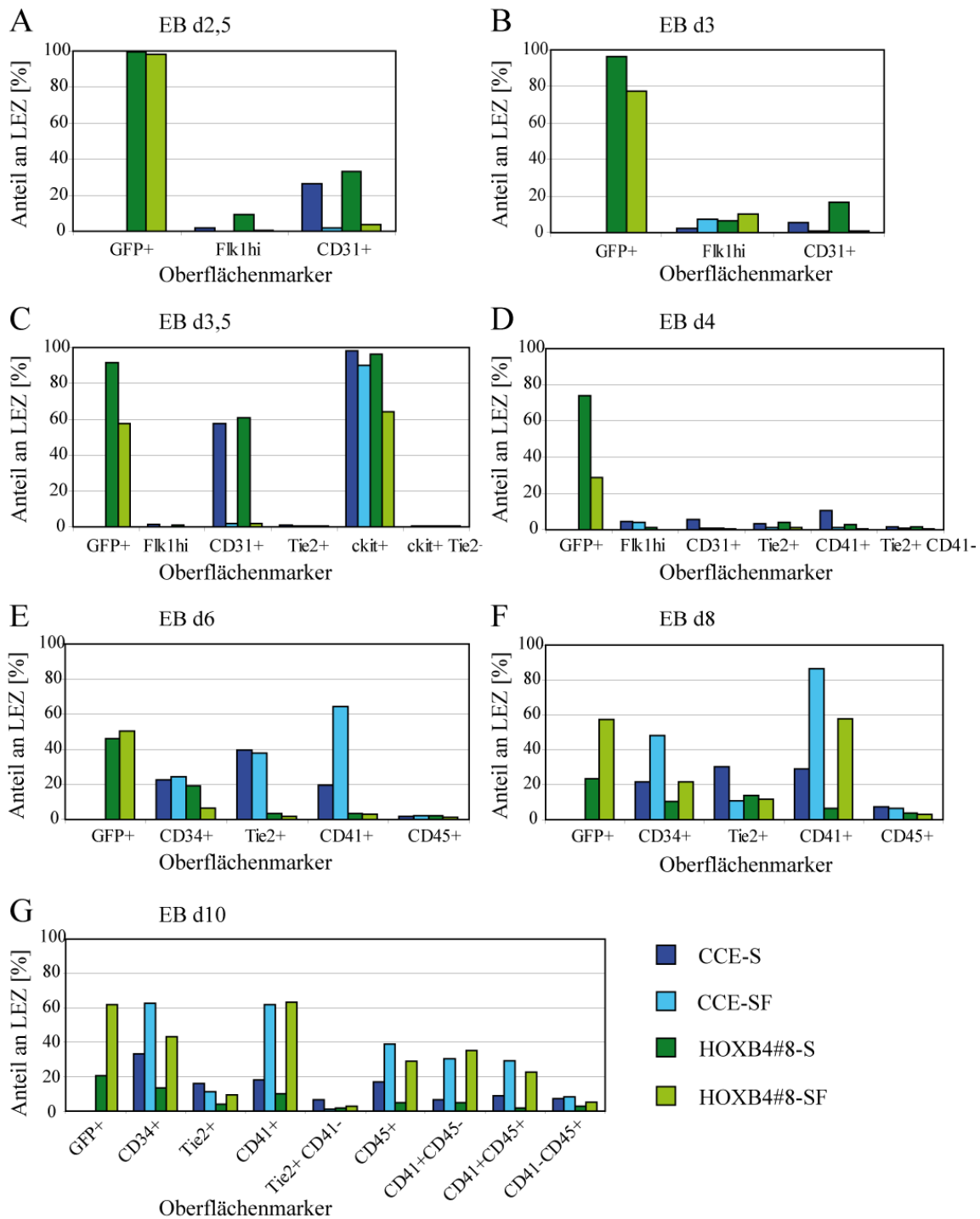
**Abb. 6.10 Das schrittweise, serumfreie Differenzierungsverfahren forciert die hämatopoetische Entwicklung.** Aus deutlich weniger generierten EBs der serumfreien Differenzierung des #8 resultieren nach der Expansionsphase in STD-SF-Kultur deutlich mehr ESZ-HZ als aus dem Serum-Differenzierungsansatz. Endpunkte der geschweiften Klammern benennen die miteinander verglichenen Zellzahlen. Die resultierenden Verhältnisse sind über den Klammern angegeben, die linke Seite verhält sich dabei wie angegeben zur rechten Seite.

Da Zellzahlentwicklungen allein noch keine ausreichende Aussage über die Zusammensetzung und den Reifegrad der entstehenden, hämatopoetischen Mischkultur geben können, wurden für eine genauere phänotypische Charakterisierung die sich entwickelnden EBs und die resultierenden ESZ-HZ durchflusszytometrisch (FACS) analysiert. Hierfür wurde auf lebende Einzelzellen (LEZ) voreingestellt und diese Population auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht. Die Resultate wurden in Balkendiagrammen zusammengefasst (Abb. 6.11 + Abb. 6.12). Die FACS-Analysen zeigten, bestätigend zu den Ergebnissen von Pearson *et al.* (2008), die eindeutige mesodermale Entwicklung in den frühen EBs (CD31+) sowie die Entstehung von Hämangioblastenzellen (Flk-1hi) ab EB d2,5. Diese Entwicklung setzte in den Serumansätzen deutlich früher ein, die Populationen waren daher an EB d2,5 schon stärker vorhanden (Abb. 6.11 A). Erst nach Zugabe von Activin A, bFGF und VEGF entstanden auch unter serumfreien Bedingungen Zellen mit Hämangioblastenphänotyp (Abb. 6.11 B). Bereits einen Tag später markierten Tie2-positive, CD41-negative (Tie2+ CD41-) Zellen das Vorhandensein

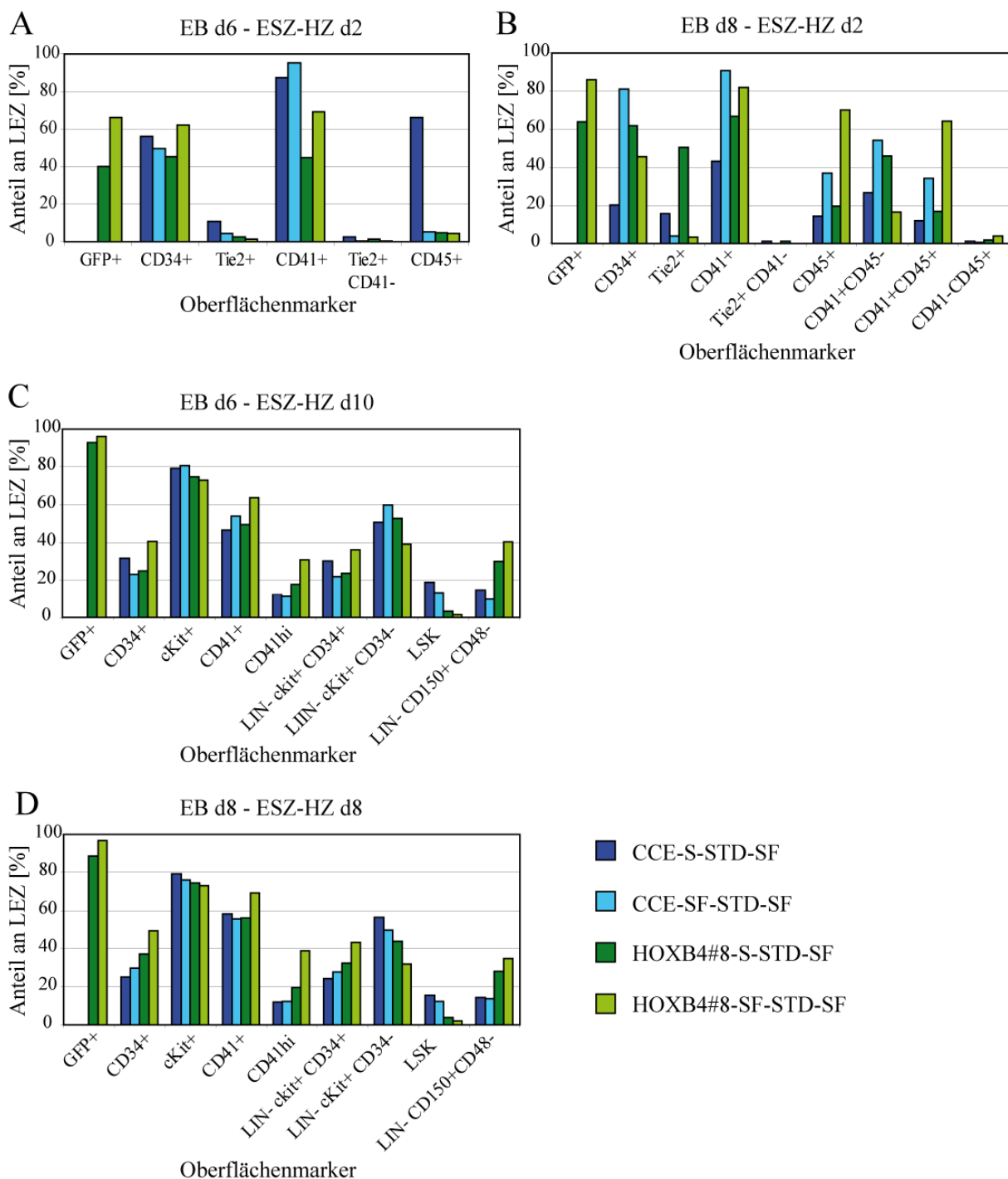
hämogenen Endothels (Lancrin *et al.*, 2009), was auch bis EB d10 erhalten blieb. Zusätzlich konnten zu diesem Zeitpunkt die ersten frühen hämatopoetischen Zellen (CD41+; Abb. 6.11 D) detektiert werden. Den größten Anteil CD41+ Zellen wiesen zunächst die unmanipulierten CCE unter Serumbedingungen auf, wurden zum EB d6 dann aber deutlich vom serumfreien Ansatz überholt. Die HOXB4-Zellen brauchten deutlich länger, um einen entsprechenden Anteil an CD41+ Zellen zugenerieren. In beiden Zelllinien wurde bereits EB d8 ein wesentlich größerer Anteil CD41+ Zellen sowie auch reiferer, hämatopoetischer Zellen (CD41+ CD45+ bzw. CD41- CD45+) unter serumfreien EB-Bedingungen erreicht. Eine Verlängerung auf 10 Tage EB-Differenzierung steigerte den hämatopoetischen Zellanteil nicht weiter (Abb. 6.11 G). Da EBs die für 10 Tage kultiviert wurden, zunehmend ihre kompakte Struktur verloren und ihre Dissoziation sich nur mit Oberflächenprotein-schädigenden Enzymen, wie beispielsweise Dispase, bewerkstelligen ließ, wurde dieser Verlängerungsschritt vorerst nicht weiterverfolgt. Die an EB d6 und EB d8 dissoziierten EB-Zellen wurden im Standardexpansionscocktail für 8-10 Tage expandiert, und nach jeweils zwei Tagen der Expansion per Vielfarben-FACS analysiert. Die EB d8 dissoziierten Zellen wiesen zunächst noch einen Reifungsvorsprung (Anteil CD45+ Zellen) auf. Nach 8 bzw. 10 Tagen der Expansion gab es keine großen Unterschiede zwischen beiden Dissoziationszeitpunkten mehr, sodass für die folgenden Experimente der klassische Dissoziationstag EB d6 beibehalten wurde.

Insgesamt zeigte sich deutlich, dass die serumfreie Differenzierung, mit ihrem gezielten Zytokineinsatz, der bisherigen Standardmethode, mit 15% Serumanteil, in nichts nachstand. Im Gegenteil: die serumfreie Differenzierung förderte die CD41hi-Fraktion deutlich stärker und auch die Fraktion mit dem höchsten HSPZ-Anteil (LIN- CD150+ CD48-). Allerdings gelingt die phänotypische Festlegung auf spezielle Oberflächenmarker für die *in vitro*-generierten HSPZ noch nicht genau, da sie sich weder embryonalen noch adulten HSZ genau zuordnen lassen. Wie die Arbeitsgruppe um G.Q. Daley kurz nach Abschluss dieses Experiments zeigen konnte, exprimiert die HSPZ-Fraktion CD41hi ein Charakteristikum früher HSZ (Dottersack/AGM/Plazenta), aber diese HSPZ sind auch CD34- sowie CD150+, dies entspricht Charakteristika von HSZ der fetalen Leber bzw. adulten KM-HSZ. Transplantationsstudien der Arbeitsgruppe evaluierten, dass die HSPZ-Fraktion der ESZ-HZ mit CD41hi ckit+ CD34- am Besten charakterisiert wird (McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Dies wurde in den nächsten Analysen berücksichtigt.





**Abb. 6.11 EB d2,5 markiert mit der beginnenden mesodermalen Entwicklung und Bildung des Hämangioblasten den Startpunkt der voranschreitenden hämatopoetischen Entwicklung im EB.** Gezeigt sind die durchflusszytometrisch ermittelten Subpopulationen von jeweils ca.  $1 \times 10^6$  gefärbten Zellen. Das Vorgating erfolgte auf LEZ, Populationsgates wurden nach FMO-Kontrolle gesetzt. (A) CD31 markiert die Ausprägung einer mesodermalen Subpopulation, Flk-1hi die Generierung von Hämangioblastenzellen, (B) hämatopoetische Entwicklung zieht unterer serumfreien Bedingungen nach (C) erster Nachweis hämogenen Endothels (D) CD41 markiert erste hämatopoetische Zellen (E) hämatopoetischer Vorsprung für unmanipulierte CCE, besonders unter serumfreien Bedingungen, (F) serumfreie Bedingungen produzieren wesentlich stärkere, hämatopoetische Fraktion (G) hämatopoetische Fraktion der HOXB4 Zellen holt unter serumfreien Bedingungen auf, zunehmende Reifung der HZ. LEZ: lebende Einzelzellen; S: Serum; SF: serumfrei; EB: Embryoid Bodies; d:Tag



**Abb. 6.12 Serumfrei generierte EBs beginnen die Expansion mit einem deutlich größeren Anteil hämatopoetischer Zellen (CD41+) und liefern langfristig die stärkste ESZ-HSPZ-Fraktion.** Gezeigt ist die phänotypische Charakterisierung der ESZ-HZ-Expansion nach 2, 8 und 10 Tagen (ESZ-HZ d2, d8, d10) von Tag 6 (EBd6) bzw. Tag 8 (EBd8) dissoziierten EBs. Jeweils ca.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden gefärbt. Das Vorgating erfolgte auf LEZ, Populationsgates wurden nach FMO-Kontrolle gesetzt. (A) CD41 markiert die frühe hämatopoetische Fraktion (B) die fortschreitende Reifung wird durch CD41+CD45+ charakterisiert (C+D) Der hämatopoetische Entwicklungsvorteil bleibt für die Zellen aus dem serumfreien Ansatz bestehen, eine Verlängerung der EB-Phase hat keinen wesentlichen Vorteil, und ist für die HSPZ (LIN- CD150+ CD48-) eher kontraproduktiv. LEZ: lebende Einzelzellen; S: Serum; SF: serumfrei, STD-SF: Standard (Zytokinbedingungen); EB: Embryoid Bodies; d: Tag

### 6.3.2 Die Kultivierung der ESZ-HZ auf Stromazellen unter normoxischen Bedingungen führt nur in einer aufeinanderfolgenden Kokultivierung mit AFT024 und OP9 zu einer verstärkten HSPZ-Expansion

Um die aus der serumfreien EB-Differenzierung resultierenden Vorteile weiter auszubauen, wurde in der anschließenden Expansionsphase neben der STD-SF-Suspensionsexpansionskultur (Pilat *et al.*, 2005b) auch der als begünstigend beschriebene Effekt einer Kokultivierung mit Stromazellen ausgetestet (Hackney *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Stromazellen, die auch im natürlichen Umfeld der HSZ vorliegen, sollen *in vitro* für die Proliferation und Selbsterneuerung der generierten HSZ sorgen. Da die fetale Leber der erste Expansionsort für definitive HSZ in der Entwicklung ist, wurde die von K.A. Moore etablierte Stromazelllinie AFT024 für die Kokultur ausgewählt (Moore *et al.*, 1997a). Hierbei handelt es sich um eine mittels temperatursensitivem SV-40 T-Antigen immortalisierte Zelllinie aus dem Leberstroma von Mausembryonen (E14-E14,5). Ihr unterstützender Effekt auf adulte murine und humane HSZ wurde bereits mehrfach beschrieben. AFT024 exprimieren Delta-like1-homolog (Dlk1; Alternativbezeichnung: Präadipozyten-Faktor-1 [pref-1]), ein positiven Stammzellregulator (Moore *et al.*, 1997b; Hackney *et al.*, 2002). Eine weitere, etablierte Stromazelllinie ist die OP9. Sie stammt aus dem Knochenmarkstroma neugeborener Mäuse und wurde von T. Nakano etabliert. Aufgrund einer Mutation produzieren diese Zellen kein funktionsfähiges M-CSF, welches inhibierend auf die Entwicklung anderer Blutzelllinien, außer der Makrophagen, wirken würde, und haben somit einen unterstützenden Effekt bei der Generierung myeloischer, erythroider, und B-Zellen aus ESZ, sogar ohne vorherige EB-Struktur (Nakano *et al.*, 1994; Suzuki und Nakano, 2001).

Positive Resultate bei der Ableitung von HSZ aus ESZ haben auch die Arbeitsgruppen um G.Q. Daley und H. Ema erzielt. Von ihnen wurden die dissoziierten EBs in einem zytokinhaltigen Medium (Daley: SCF, TPO, Flt3L, VEGF => STFV/ Ema: SCF, TPO) für vier bis sieben Tage auf den OP9 Zellen kokultiviert (Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden nun erstmalig das AFT024- und das OP9-System gegenübergestellt sowie auch miteinander verbunden. Unabhängig von den Stromazellen wurde auch der verwendete Kokultivierungs-Zytokincocktail in einer Suspensionskultur getestet. In Anlehnung an die publizierten Kokultivierungsprotokolle wurden auch von uns die dissoziierten EB-Zellen unter STFV-Serum-Bedingungen (STFV-S) für sieben Tage auf den Stromazellen kultiviert und für drei weitere Tage in Suspension expandiert. Dass dieses Medium auch allein für die Expansion von ESZ-HZ nicht nur sehr geeignet war, sondern sogar eine deutliche Steigerung (Verdopplung) des absoluten und prozentualen Anteils der frühesten hämatopoetischen Vorläuferzellfraktion (CFU-GEMM, Abb. 6.13 oben) unterstützte, konnte im hämatopoetischen Kolonieassay bei einem vergleichenden Vortest mit dem bisherigen STD-SF-Expansionsmedium (Pilat *et al.*, 2005b) gezeigt werden (Abb. 6.14 C+D).

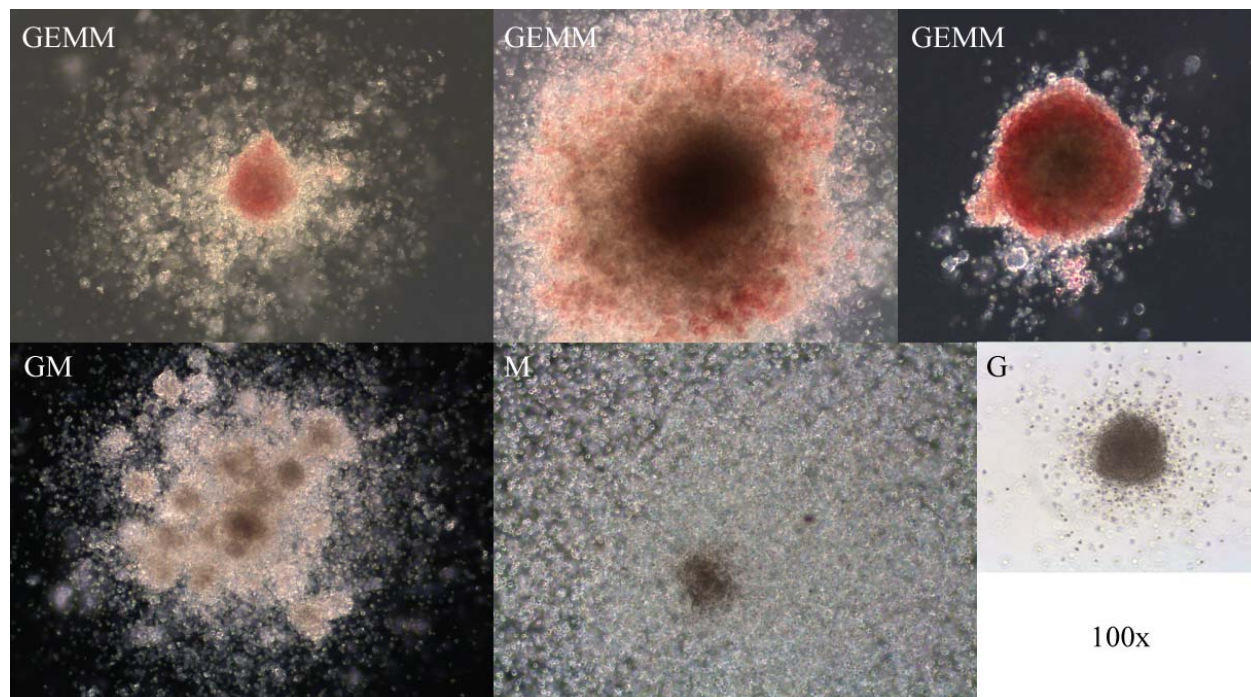
In einem neuen, unabhängigen Differenzierungsexperiment wurden dissoziierte EBs d6 des HOXB4 #8 auf AFT024- und OP9-Stromazellen in STFV-S sowie CCE und HOXB4 #8 auch ohne Stroma in STFV-S für 10 Tage expandiert (Expansion unter Luftsauerstoffbedingungen - norm.O<sub>2</sub>; Abb. 6.14 E+F). Der mittlere, prozentuale CFU-GEMM-Anteil an der gesamt generierten Kolonienmenge unter STFV-S-Bedingungen lag fast doppelt so hoch wie in den Kokulturen. Die mittlere, absolute CFU-GEMM-Anzahl der Suspensionskultur war allerdings gleich zur OP9-Kokultur. Das Gesamtkoloniegenerierungspotenzial war in den OP9-kokultivierten ESZ-HZ am stärksten, gefolgt von ESZ-HZ der STFV-S-Suspensionskultur. Auf AFT024 generierte ESZ-HZ produzierten die wenigsten Kolonien und den geringsten Anteil der unreifsten Kolonien (CFU-GEMM). Waren HOXB4 und CCE Zellen an EB d6 noch gleichpotent (Abb. 6.14 A+B), so konnten für die in den STFV-S expandierten CCE nach 10 Tagen keine koloniebildenden Zellen mehr nachgewiesen werden.

Da in der embryonalen Hämatopoese die generierten und expandierten HSZ unterschiedliche Nischen passieren, lag für uns die Schlussfolgerung nahe, dies auch in unserm *in vitro* System zu berücksichtigen. Dazu wurden die ESZ-HZ erst für sieben Tage auf den AFT024- und danach für sieben Tage auf den OP9-Stromazellen kultiviert und parallel in der umgekehrten Reihenfolge. Dies verlängerte die Kulturzeit um vier Tage, hier wurde vergleichend auch die STFV-S-Suspensionskultur für 14 Tage expandiert.

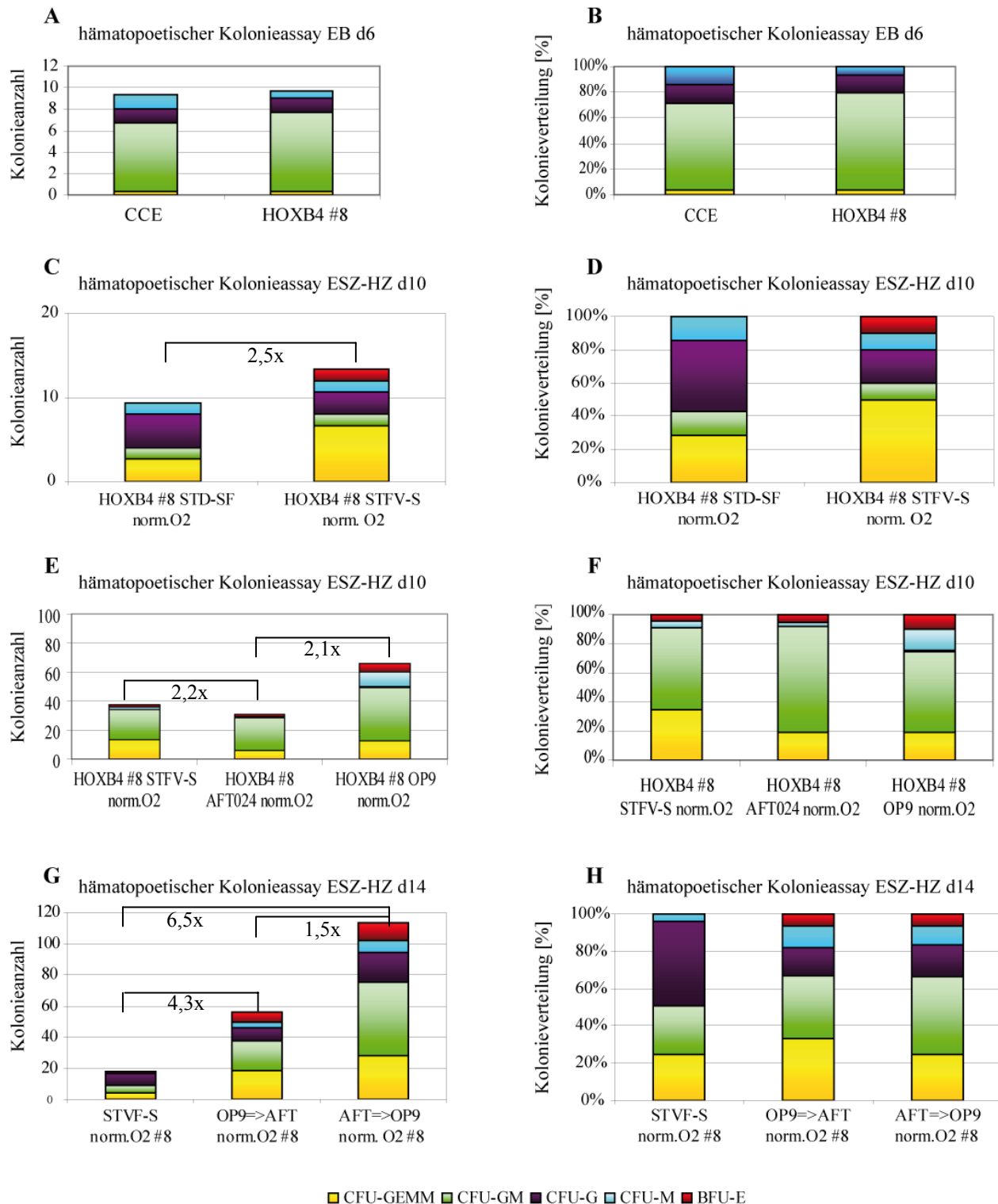
Bei wiederum 1000 eingesetzten ESZ-HZ/Ansatz (in Triplikaten; Mittelwerte gezeigt) im Kolonieformierungsassay (Abb. 6.14 G+H) büßten die ESZ-HZ der STFV-S-Kultur in der verlängerten Expansionsphase am Gesamtkoloniebildungspotenzial ein, einhergehend mit einer gleichermaßen reduzierten Anzahl an CFU-GEMM. Die physiologische Reihenfolge (erst AFT024- dann OP9-Kokultur) der Stromakokultur verdreieinhalbfachte in den generierten ESZ-HZ im Mittel den Gesamtanteil koloniebildender Zellen und verfünffachte den CFU-GEMM-Anteil, verglichen mit der alleinigen AFT024 Kokultur (Abb. 6.14 E+F), bzw. erzielte eine Verdopplung im Vergleich zur OP9-Kokultur (Abb. 6.14 E+F). Der umgekehrte Kultivierungsansatz erzielte derartige Steigerungen nicht, generierte aber trotzdem potentere ESZ-HZ als die Einzelkokulturen. Trotz unterschiedlicher CFU-GEMM- und Gesamtkoloniezahlen erreichten alle drei Ansätze im Mittel einen ähnlichen prozentualen Anteilswert der CFU-GEMMs an ihren generierten Kolonien (Abb. 6.14 H). Der hämatopoetische Kolonieassay ist ein gutes Mittel die hämatologische Potenz einer Kultur zu zeigen, doch hat er seine Grenze in der genaueren Phänotypisierung der Kulturzusammensetzung. Daher wurden alle oben genannten Experimente zum gleichen Zeitpunkt auch per FACS vermessen. Hämatopoetisch, entwicklungsphysiologisch assoziierte Oberflächenproteine wurden dafür mit spezifischen Antikörpern markiert und in Vielfarben-FACS-Analysen parallel gemessen. So lagen alle Ansätze im ersten Experiment (Abb. 6.15 A) in den gemessenen Subpopulationen dicht beieinander, lediglich der STD-SF-Expansionscocktail zeigte einen deutlichen Zugewinn an CD41hi Zellen und auch in der HSPZ-Fraktion (CD41hi ckit+ CD34-), ein

Vorsprung der im Kolonieassay nicht ersichtlich war. Auch die Analyse des zweiten, unabhängigen Experiments (Abb. 6.15 B), in dem der STFV-S-Ansatz und die Kokultivierungsansätze reproduziert wurden, zeigte erneut nur geringe Unterschiede zwischen den Ansätzen, dies galt auch für unsere Zielsubpopulation CD41hi ckit+ CD34-. Der Vorteil der Stromakokultivierung kam erst dann zum Tragen, als die Zellen in entwicklungsphysiologischer Reihenfolge, zuerst auf den AFT024- und dann auf den OP9-Zellen, kokultiviert wurden. Der schon im Kolonieassay eruierte, deutlich gesteigerte Anteil an CFU-GEMM und des Gesamtkoloniebildungspotenzials konnte wiederum in der FACS-Analyse bestätigt werden. Der Anteil, der als stammzellpotenteste Gruppe charakterisierten Zellen, der CD41hi ckit+ CD34-Zellen, war um das Vierfache höher als in den Ansätzen der Einzelkokultur bzw. der 10tägigen STFV-S-Expansion (Abb. 6.15 C). Die doppelte Kokultivierung in umgekehrter Kulturreihenfolge zeigte im Kolonieassay eine geringere Steigerung in der Fraktion der frühesten Vorläuferzellen (Abb. 6.14 G+H) als die physiologische Kultivierungsreihenfolge. Diese geringere Potenz wurde auch in den FACS-Analysen bestätigt. Dennoch konnte in den FACS-Analysen fast noch eine Verdreifachung der HSPZ Fraktion gemessen werden, jeweils im Vergleich zu den etwa gleichpotenten Einzelkokultivierungen oder auch der STFV-S-Suspensionskultur (Abb. 6.15 B+C).

Folglich ließ sich unter norm.O<sub>2</sub> die größte Steigerung der HSPZ-Subpopulation (CD41hi ckit+ CD34-) durch eine stufenweise Kokultivierung mit AFT024- und OP9-Stromazellen in physiologischer Reihenfolge erzielen, gefolgt von der Kokultur in entgegengesetzter Reihenfolge. Als Einzelkokultivierungssystem waren weder die AFT024 noch die vielseitig verwendeten OP9 expansionsunterstützender als die STFV-S-Suspensionskultur und lagen hinter der STD-SF-Kultur sogar deutlich zurück. Bei der CD41hi ckit+ CD34- Fraktion handelt es sich um eine heterogene Population, die HSZ und frühe Progenitoren in veränderlichen Anteilen beinhaltet. Je nach Differenzierungs- und Expansionskultur konnte eine unterschiedliche Frequenz frühester Progenitoren (CFU-GEMM) im Kolonieassay detektiert werden. Auch hier erreichte die Doppelkokultivierung in physiologischer Reihenfolge die stärkste Expansion der frühesten Vorläufer. Dennoch lassen Kolonieassays keinen konkreten Rückschluss auf die tatsächliche HSZ-Frequenz sowie eine direkte Korrelation mit der Größe der CD41hi ckit+ CD34- Fraktion zu.



**Abb. 6.13 Das hämatopoetische Potenzial der ESZ-HZ-Kultur wurde im Methylzellulose-Kolonieformierungsassay eruiert.** Früheste hämatopoetische Vorläuferzellen formen Kolonien mit Zellen aller Linien – CFU-GEMM: Granulozyten, Erythroide Zellen, Monozyten, Megacaryozyten. Weiter differenzierte Vorläuferzellen bilden nur noch Granulozyten, Monozyten – CFU-GM; reifere Vorläuferzellen generieren nur noch Kolonien eines Zelltyps: Granulozyten – CFU-G, Monozyten – CFU-M, Erythroide Zellen – BFU-E (ohne Abbildung). Die Kolonien sind in 100facher Vergrößerung gezeigt. CFU: „colony forming unit“ (Kolonieformierende Einheit); BFU: „burst forming unit“ (zerberstende kolonieformierende Einheit)

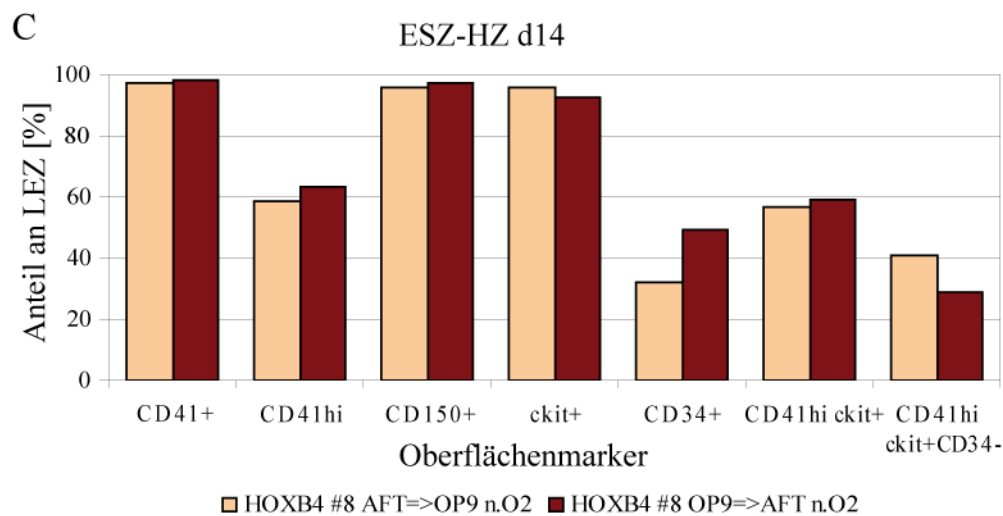
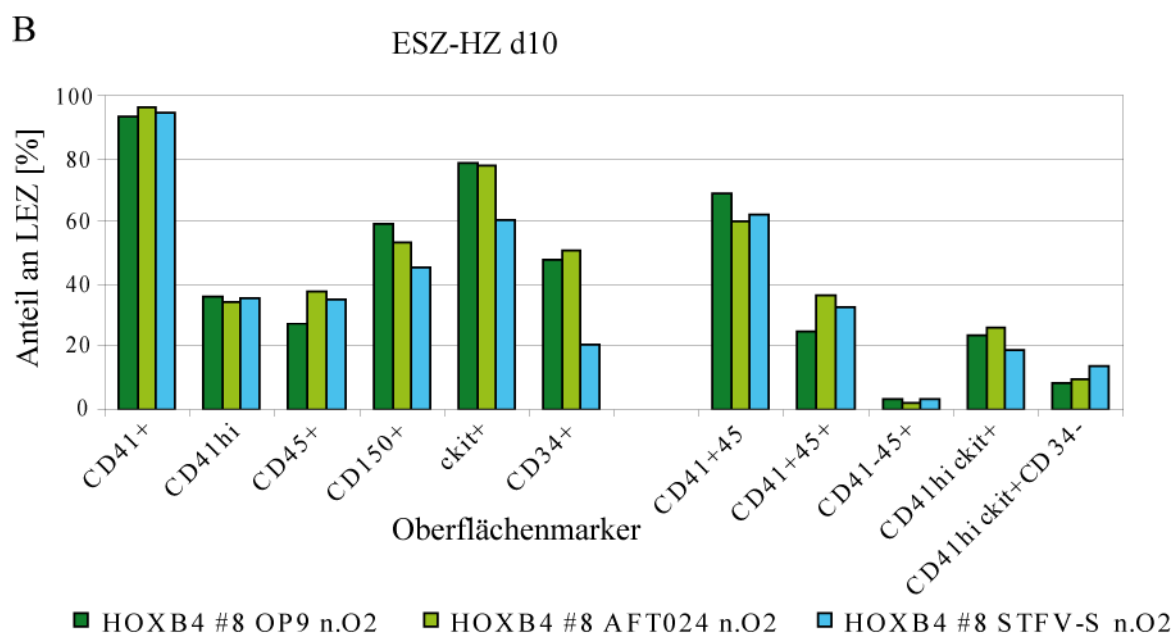
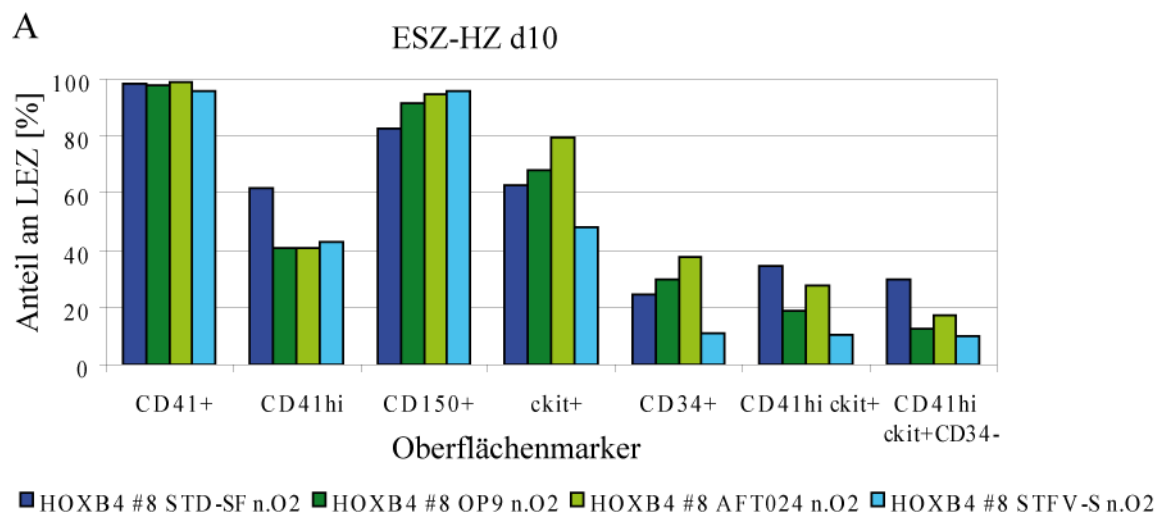


**Abb. 6.14** ESZ-HZ der verschiedenen Expansionsvarianten zeigten ein unterschiedliches hämatopoetisches Potenzial im Methylzellose-Kolonieformierungsassay. Validiert wurden unter Luftsauerstoffpartialdruck in STD-SF, STVF und/oder Kokultivierungsbedingungen generierte ESZ-HZ zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. Jeweils 1000 Zellen (in E+F nur 250Zellen/Ansatz, für die Auswertung auf 1000Zellen/Ansatz hochgerechnet) wurden in Triplikaten in MethoCult M3434 (StemCell Technologies) ausgesät und die Kolonien nach 8-10 Tagen ausgezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte. Klammern geben x-fache CFU-GEMM-Anzahländerung an, linker Wert ist Vergleichswert für alle rechts markierten Gruppen einer Mehrfachklammer. Die

Diagramme links zeigen die durchschnittliche Anzahl der generierten Kolonien pro Typ und insgesamt, die rechten Diagramme jeweils den mittleren errechneten, prozentualen Anteil der Kolonietypen an der Gesamtkolonienzahl. **(A+B)** Zum Zeitpunkt EB d6 ist das hämatopoetische Potenzial von unmanipulierten CCE (wt) und dem HOXB4 exprimierenden Klon 8 noch gleich. **(C-F)** Expansionszeitpunkt ESZ-HZ d10; der Wildtyp generiert keine Kolonien mehr (Daten nicht gezeigt). **(G+H)** Doppelkokultivierung und STFV-S an ESZ-HSZ d14. STFV-S: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; STD-SF: Standard IL3, IL6, SCF, Flt3L, IGF-1, Dexamethason; norm.O2: Luftsauerstoffgehalt; AFT: AFT024; CFU-GEMM: „colony forming unit granulocytic-erythroid-monocytic-megakaryocytic“; CFU-GM: „colony forming unit granulocytic-monocytic“; CFU G: „colony forming unit granulocytic“; CFU-M: „colony forming unit monocytic“; BFU-E: „blast forming unit erythroid“; S: Serum; SF: serumfrei

**Abb. 6.15 (nächste Seite) Die STD-SF- und die Doppelkokultivierungen expandierten den HSPZ-Anteil der ESZ-HZ unter norm.O<sub>2</sub> am stärksten.** Aus den unterschiedlichen Kultivierungsansätzen, zum Endentwicklungstag 10 bzw. 14 (nach EB-Dissoziation), wurden jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Zellen mit Antikörpern markiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulation der vermessenen, lebenden Einzelzellen (LEZ). **(A)** 10 Tage nach EB-Dissoziation, hämatopoetische Stammzell- und Vorläuferzell- (HSPZ) Marker-Expression definieren unterschiedliche Entwicklung der ESZ-HZ expandiert im STD-SF- oder STFV-S-Medium, sowie auf OP9 oder AFT024 Stromazellen. **(B)** Nach sieben Tagen der Kokultivierung auf der ersten Stromazelllinie wurden die ESZ-HZ auf die jeweilige 2. Stromazelllinie umgesetzt und dann dort weitere sieben Tage kultiviert und anschließend FACS-analysiert. **(C)** Unabhängiges Experiment wiederholt die Ansätze aus A, ohne Standard-Ansatz, FACS-Messung hier zusätzlich mit CD45. STFV: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; STD-SF: Standard IL3, IL6, SCF, Flt3L, IGF-1, Dexamethason; n.O2: Luftsauerstoffgehalt; S: Serum; SF: serumfrei





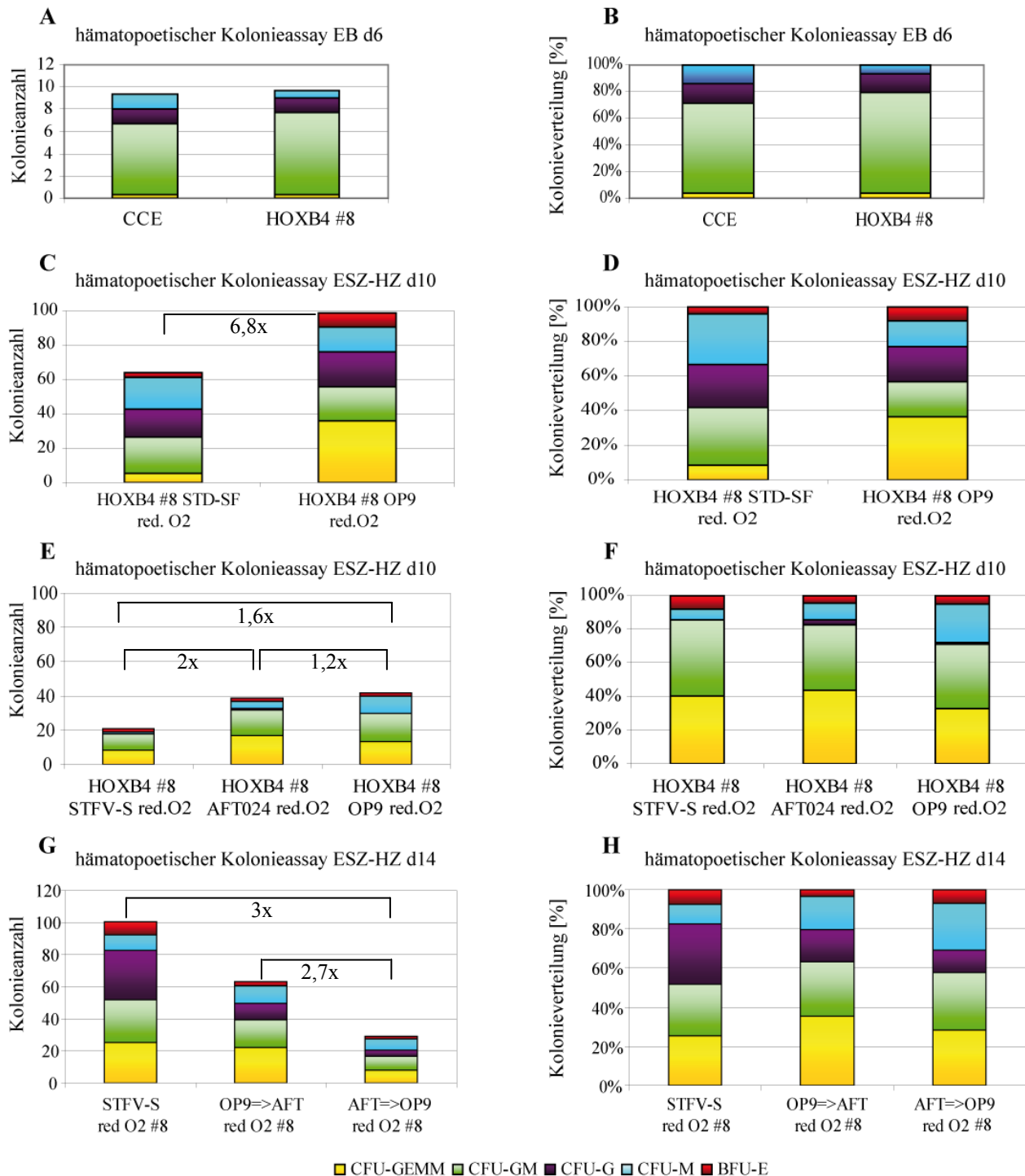
### 6.3.3 ESZ-HZ Expansionen unter reduziertem Sauerstoffniveau (5% [v/v]) führen zu einer veränderten HPSZ-Frequenz

Nicht nur für die ESZ ist seit einigen Jahren bekannt, dass sie unter physiologischem Sauerstoffniveau (ca. 5%-0,1% [v/v]) stabiler undifferenziert zu kultivieren sind (Forsyth *et al.*, 2006). Auch andere Stammzellen reagieren sehr sensitiv auf Sauerstoffpartialdrücke (Akita *et al.*, 2003; Ingram *et al.*, 2007; Burgers *et al.*, 2008; Rosova *et al.*, 2008). Epigenetische Veränderungen mit geänderten Transkriptionsprofil sind die Folge einer hyperoxischen Kultur (Forsyth *et al.*, 2008). Daher ist es nahe liegend, dass auch die *in vitro* Generierung von ESZ-HZ sensibel für die herrschenden Sauerstoffbedingungen ist. In unseren Ansätzen, wurden daher zusätzlich zu den verschiedenen Zytokin- und Kultivierungsbedingungen die Expansionen auch bei reduziertem Sauerstoffniveau (5% [v/v]) durchgeführt. Die Kultur der ESZ und die EB-Differenzierung fanden immer unter reduziertem Sauerstoffniveau statt. Die Ausgangsbedingungen EB d6 (= ESZ-HZ d0) waren daher identisch mit dem Expansionsexperiment unter normoxischen Bedingungen, also auch wieder gleiche Ausgangsbedingungen im Kolonieassay von wt-Kontrolle und HOXB4 #8 (Abb. 6.16 A+B). Auch hier wurde in einem ersten Versuch die bisherige Standardexpansion (STD-SF) gegen einen Kultivierungsansatz, in diesem Fall die OP9-Kokultur, im Kolonieassay getestet. Die Kolonieformierungskapazität der ESZ-HZ unter STD-SF-Bedingungen betrug rund 65% der Kapazität der OP9-Kokultur, und der darin enthaltene Anteil an CFU-GEMM betrug ca. 20% der CFU-GEMM-Anzahl der OP9-Kokultur (Abb. 6.16 C). Trotzdem lag die Effizienz der Gesamtkolonieformierung der Standardkultur damit unter red.O<sub>2</sub> gut sechsfach höher als unter normoxischen Bedingungen, bei verdoppeltem Anteil an CFU-GEMM (Abb. 6.16 C und Abb. 6.14 C). Im nächsten, unabhängigen Experiment konnten die erzielten Koloniezahlen für die OP9-Kokultur nicht wieder erreicht werden (Abb. 6.16 C+E), doch war das Verhältnis an geformten GEMM-Kolonien stabil zur generierten Gesamtkoloniezahl (Abb. 6.16 C+E). Somit lag in beiden OP9-Ansätzen der prozentuale Anteil der CFU-GEMM an der Gesamtkoloniemenge unter red.O<sub>2</sub> fast doppelt so hoch wie unter normoxischen Bedingungen. In absoluten GEMM-Koloniezahlen konnten allerdings keine größeren Unterschiede festgestellt werden (Abb. 6.16 E und Abb. 6.14 E). Einen starken Einfluss hatte das reduzierte Sauerstoffniveau auf die ESZ-HZ in der AFT024 Kokultur. Hier wurden nicht nur mehr CFU-GEMM geformt als im parallelen OP9-Ansatz, sondern verglichen mit der Kokultur unter normoxischen Bedingungen wurde eine dreifache Anzahl an CFU-GEMM gebildet, bei allerdings nur geringfügig gesteigerter Gesamtkoloniebildungseffizienz. In der Verbindung der beiden Kokultivierungssysteme zeigte die ESZ-HZ-Kultur aus der entwicklungsphysiologisch entgegengesetzten Doppelkokultivierung (OP9=>AFT024) unter red.O<sub>2</sub> kein anderes Koloniegenerierungspotenzial als unter norm.O<sub>2</sub> (Abb. 6.16. G+H und Abb. 6.14 G+H). In der entwicklungsphysiologischen Reihenfolge der Doppelkokultivierung (AFT024=>OP9) unter red.O<sub>2</sub> war die Gesamtkoloniegenerierungspotenz sowie der CFU-GEMM-Gehalt

der ESZ-HZ allerdings deutlich geringer als in den Einzelkokulturen und auch der Pendant-Kultur unter norm.O<sub>2</sub> (Abb. 6.16. E+F, G+H; Abb. 6.14 G+H). Die stromafreie Expansion in STFV-S erzielte unter red.O<sub>2</sub> deutlich weniger Kolonien als aus den Kokultivierungen resultierten. Der prozentuale CFU-GEMM-Anteil war jedoch vergleichbar zur OP9-Kokultur (Abb. 6.16 F) und zur normoxischen STFV-S-Kultur (Abb. 6.14.F). In der 10tägigen Expansionsphase der Serum-supplementierten STFV-Kultur konnte kein erheblicher Einfluss der verschiedenen Sauerstoffbedingungen auf die CFU-GEMM-Frequenz und die gesamte ESZ-HSPZ- (CD41hi ckit+ CD34-) Subpopulation festgestellt werden. Bei einer Verlängerung der Expansionsphase um vier Tage konnten hingegen deutliche sauerstoffniveauabhängige Unterschiede festgestellt werden (Details unter 6.3.4). Zur Validierung der Kolonieassaydaten wurden auch in den Versuchen unter reduziertem Sauerstoffniveau Vielfarben-FACS-Analysen durchgeführt.

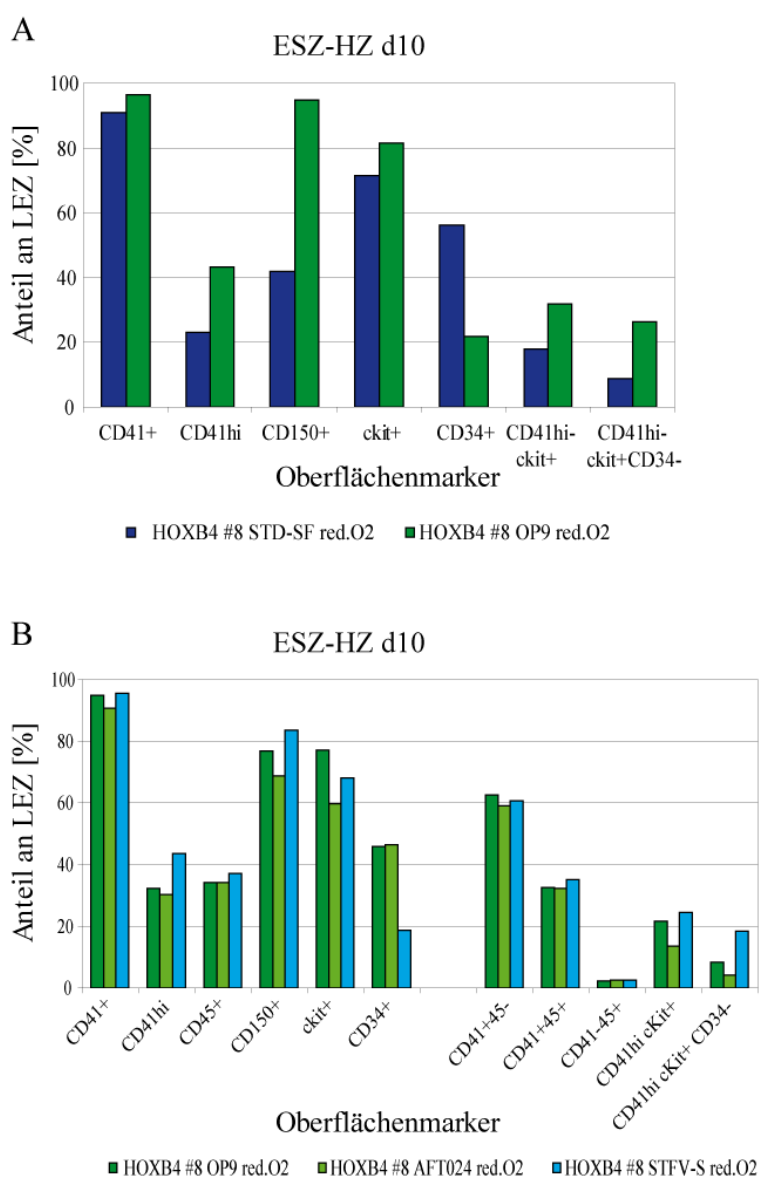
Die FACS-Analysen des ersten Experimentes bestätigten die deutlich höhere HSPZ-Fraktion in der OP9-Kokultur, schon verdeutlicht durch den CFU-GEMM-Anteil im Kolonieassay, durch eine zweieinhalbfach stärker vertretene CD41hi ckit+ CD34- Subpopulation (Abb. 6.17 A) gegenüber der STD-SF-Expansion. Die geminderte Koloniegenerierungs-effizienz und der damit verbundenen geringere CFU-GEMM-Gehalt des zweiten OP9-Kokultur-Experimentes spiegelte sich auch in den FACS-Analysen durch eine reduziertere CD41hi ckit+ CD34- Subpopulation wieder (Abb. 6.16 C+E und Abb. 6.17 A+B). Deutliche Auswirkungen der unterschiedlichen Sauerstoffniveaus ließen sich in den FACS-Analysen für die Kokultivierungsansätze nicht feststellen. Die ESZ-HZ d14 gesteigerte CFU-GEMM-Frequenz der STFV-S-Kultur (red.O<sub>2</sub>; Abb. 6.16 G) deutete sich, im Unterschied zu den Kolonieassays, in den FACS-Analysen bereits d10 an. Hier konnte, verglichen mit der OP9-Kokultur beider Sauerstoffniveaus sowie der STFV-S-Kultur unter normoxischen Bedingungen, eine Verdopplung der HSZP-Fraktion (CD41hi ckit+ CD34-) erreicht werden (Abb. 6.17, Abb. 6.15).

Zusammengefasst erzielten wir in einer 10tägigen Expansionsphase unter red.O<sub>2</sub> einen Proliferationsvorteil für die HSPZ-Fraktion (CD41hi ckit+ CD34-) in der STFV-S sowie der OP9-Kokultur gegenüber der mittleren Ausbeute ihrer Pendants unter norm.O<sub>2</sub>. Expansionen unter STD-SF-Bedingungen hingegen zeigten einen deutlichen hämatopoetischen Entwicklungsnachteil unter red.O<sub>2</sub> gegenüber norm.O<sub>2</sub> und büßten stark an HPSZ ein. Diese Expansionsbedingung zeigte in den FACS-Analysen als einzige ein genau entgegengesetztes Bild zur Progenitorenverteilung im Kolonieassay. Die FACS-Resultate der Einzelkokultivierungen und STFV-S korrelierten weitestgehend mit den Kolonieassays. Die gegenläufigen Koloniezahlen und -verteilungen der Doppelkokultivierungen und 14tägigen STFV-S-Expansionen zwischen norm.O<sub>2</sub> und red.O<sub>2</sub> zeigen die Dynamik der ESZ-HZ-Expansion sowie deren Kopplung von Kultivierungsbedingungen und Sauerstoffniveau sehr deutlich. Neben den Doppelkokultivierungen konnte unter STFV-S in Synergie mit red.O<sub>2</sub> eine effiziente, stromafreie Expansionsbedingung für früheste Vorläuferzellen geschaffen werden.



**Abb. 6.16 Die Kombination verschiedener Expansionskulturen mit einem reduzierten Sauerstoffniveau (5% [v/v]) steigerte deutlich den Anteil früher Progenitoren (CFU-GEMM) in den ESZ-HZ.** Jeweils 1000 Zellen (in C+D nur 250 Zellen/Ansatz, für die Auswertung auf 1000 Zellen/Ansatz hochgerechnet) wurden in Triplikaten in MethoCult M3434 (Stemcell Technologies) ausgesät, die Kolonien nach 8-10 Tagen ausgezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte. Klammern geben x-fache CFU-GEMM-Anzahländerung an, linker Wert ist Vergleichswert für alle rechts markierten Gruppen einer Mehrfachklammer. Die Diagramme links zeigen die durchschnittliche Anzahl der generierten Kolonien pro Typ und insgesamt, die rechten Diagramme jeweils den errechneten, prozentualen Anteil der Kolonietypen an der Gesamtkolonienzahl. (A+B) Zum Zeitpunkt EB d6 ist das hämatopoetische Potenzial von unmanipulierten CCE (wt) und dem HOXB4 exprimierenden Klon 8 noch gleich. (C-F) Expansionszeitpunkt ESZ-

HZ d10, der Wildtyp generiert keine Kolonien mehr (Daten nicht gezeigt), #8 zeigte kulturabhängige Veränderung des Koloniebildungspotenzials. (G+H) Doppelkokultivierung und STFV-S an ESH-HZ d14. STFV-S/STFV-SF: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; STD-SF: Standard IL3, IL6, SCF, Flt3L, IGF-1, Dexamethason; red.O2: reduziertes Sauerstoffniveau – 5% (v/v); AFT: AFT024; CFU-GEMM: „colony forming unit granulocytic-erythroid-monocytic-megakaryocytic“; CFU-GM: „colony forming unit granulocytic-monocytic“; CFU G: „colony forming unit granulocytic“; CFU-M: „colony forming unit monocytic“; BFU-E: „blast forming unit erythroid“; S: Serum; SF: serumfrei



**Abb. 6.17 Die Reduktion des Umgebungssauerstoffs ~21% (v/v) auf 5% (v/v) steigerte im Mittel die Expansion der HPSZ-Subpopulation der ESZ-HZ in der OP9-Kokultur und STFV-S- und STFV-SF-Kultur.** Ca.  $1 \times 10^6$  antikörpermarkierte ESZ-HZ wurden via FACS analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulation der lebenden Einzelzellen (LEZ). (A) 10 Tage nach EB-Dissoziation, hämatopoetische Stammzell- und Vorläuferzell- (HSPZ) Marker-Expression definieren unterschiedliche Entwicklung der ESZ-HZ expandiert im Standard-Medium sowie in STFV-S auf OP9 Stromazellen. (B) Unabhängiges Experiment wiederholt OP9-Ansatz aus A, ergänzt durch die Gruppen STFV-S und AFT024-Kokultur, FACS-Messung hier zusätzlich mit CD45. STFV-S/ STFV-SF: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; STD-SF: Standard IL3, IL6, SCF, Flt3L, IGF-1, Dexamethason; red.O2: reduziertes Sauerstoffniveau – 5% (v/v); S: Serum; SF: serumfrei

#### **6.3.4 Verlängerte Expansionsphasen sind trotz verschiedenster Zytokin- und Kulturbedingungen nur bedingt HSPZ-proliferationsfördernd**

Ein formuliertes Ziel dieser Arbeit war es, bei der Optimierung der Differenzierungs- und Expansionsprotokolle den Einsatz von undefinierten Bedingungen wie z.B. FCS und auch die Kokultur mit Stromazellen zu vermeiden. Die STFV-Serum-Suspensionskultur (STFV-S) erreichte unter reduziertem Sauerstoffniveau eine HSPZ-Kapazität sowohl im Kolonieassay als auch in den FACS-Analysen, die gleichwertig zu der von den meisten Arbeitgruppen favorisierten OP9-Kokultur war. Dies wurde bei einer leicht verlängerten Expansionsphase (14 Tage nach EB-Dissoziation; Abb. 6.16 G) besonders deutlich. Daher sollte versucht werden eine zusätzliche Steigerung der ESZ-HSPZ-Frequenz durch eine weiter verlängerte Expansionsphase in diesem potenten Zytokincocktail zu erreichen. Außerdem sollte dieser Zytokincocktail auch unter serumfreien Expansionsbedingungen etabliert werden. Im serumfreien Expansionsmedium wurde das IMDM-Basismedium des serumhaltigen Expansionsmediums durch StemPro34 plus „*Nutrition Supplement*“ ersetzt. Für die Etablierung dieser Kulturbedingung wurden auch wieder beide Sauerstoffniveaus (21% [v/v] und 5% [v/v]) ausgetestet.

Hatte die ESZ-HZ Expansion im STFV-S-Medium unter normoxischen Bedingungen ihre maximale Kapazität an den frühesten hämatopoetischen Vorläuferkolonien (CFU-GEMM) bereits am Expansionstag 10 im Methylzelluloseassay gezeigt (Abb. 6.14 E), so lag die STFV-S Expansion unter reduziertem Sauerstoffniveau (red.O<sub>2</sub>) zu diesem Zeitpunkt im Kolonieassay noch leicht zurück (Abb. 6.16 E) und erreichte erst zum Expansionstag 14 eine starke Steigerung der Gesamtkoloniegenerierung und des CFU-GEMM-Anteils. Die Koloniebildungseffizienz vervielfachte sich fast und der CFU-GEMM-Anteil verdreieinhalbfachte sich. Diese Expansion frühester Progenitoren konnte in dem Umfang bisher nur in der Doppelkokultur AFT024=>OP9 unter norm.O<sub>2</sub> erreicht werden (Abb16.6 G und Abb16.4 G). Unter normoxischen Bedingungen konnte in der vier Tage verlängerten Expansionsphase die Progenitorfraktion nicht aufrecht erhalten werden, ein Prozess der bis zum nächsten Kontrollpunkt, nach 21 Tagen Expansion, so rapide voranschritt, dass die Kultur über diesen verlängerten Zeitraum nicht am Leben gehalten werden konnte. Auch für die STFV-S Expansion der ESZ-HZ unter red.O<sub>2</sub> war eine Ausdehnung auf 21 Expansionstage nicht förderlich. Der CFU-GEMM-Gehalt ging weit unter die an Expansionstag 14 und auch unter die an d10 erreichten Werte zurück (Abb. 6.18 A). Es ließ sich eine eindeutige Verschiebung zu den reiferen Kolonietypen (hauptsächlich CFU-M) dokumentieren. Eine Synergie gab es in der serumfreien STFV (STFV-SF) Expansion der ESZ-HZ nur mit dem red.O<sub>2</sub>. Hier zeigte sich nach 10tägiger Expansion eine 12fach höhere Koloniegenerierungseffizienz und 10fache Steigerung der aus 1000 eingesetzten Zellen/Ansatz generierten CFU-GEMM im Vergleich zur STFV-SF Expansion unter normoxischen Bedingungen (Abb. 6.18. A). Doch auch hier konnte in beiden STFV-SF-Ansätzen eine verlängerte Expansionsphase (auf 21 Tage) keine Steigerung der CFU-GEMM-Fraktion erzielen. Bei

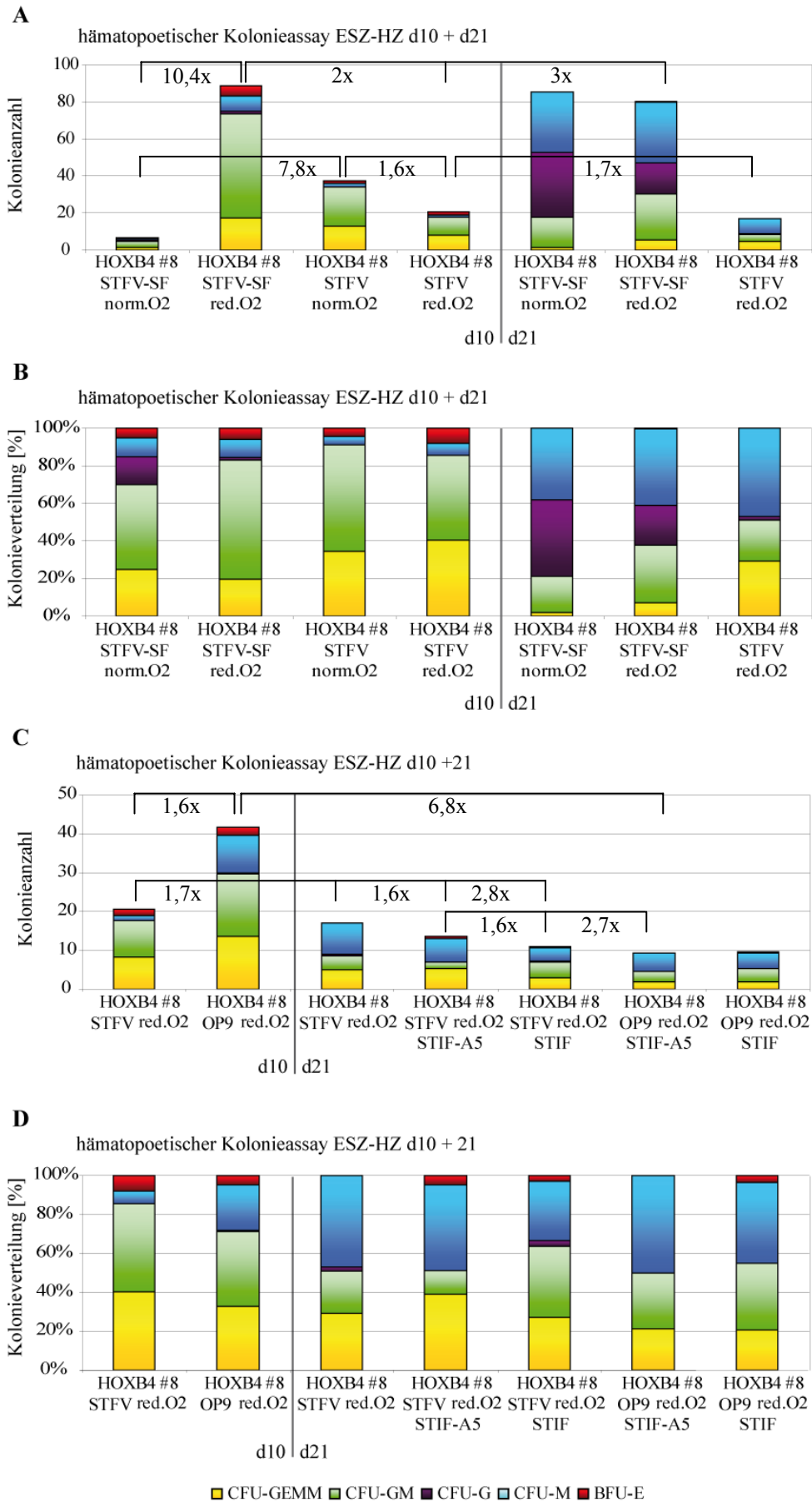
hoher Koloniegenerierungseffizienz wurden fast ausschließlich reifere Kolonietypen (CFU-G, CFU-M) gebildet (Abb. 6.18 A+B). Genau diese Ausreifung war auch in den durchgeführten FACS-Analysen der unter red.O<sub>2</sub> expandierten Zellen messbar. Es konnte eine deutliche, prozentuale Verschiebung der Zellen weg von CD41+CD45<sup>-</sup> hin zu vermehrt CD41+CD45<sup>+</sup> zwischen Expansionstag 10 und 20 gemessen werden (Abb. 6.19 A-C). Der Anteil reifer hämatopoetischer Zellen (CD41<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) blieb in der STFV-S Kultur konstant klein, allerdings verdoppelte er sich in der STFV-SF fast über die zusätzliche Expansionsphase, war aber auch bereits am Expansionstag 10 deutlich höher als in allen bisher gemessenen Vergleichskulturen (Abb. 6.19 B+C). Ob dies Merkmale einer Ausreifung zu adulteren Stammzellen mit dann gesteigertem Engraftmentpotenzial oder nur zur Linienspezialisierung sind, wird zurzeit in *in vivo* Experimenten untersucht. Aufgrund dieser Ausreifung zum CD45<sup>+</sup> Phänotyp, und damit stark reduziertem CD41<sup>hi</sup>-Anteil, konnte in den FACS-Analysen der STFV-SF-Kultur schon an d10 nur noch eine kleine Fraktion AGM-HSZ-ähnlicher ESZ-HPSZ (CD41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>) detektiert werden, die an d20 dann ganz verschwunden war (Abb. 6.19 C). Unter STFV-S Bedingungen reduzierte sich diese Fraktion im Verlauf um mehr als ein Drittel. Diese Reduktion deckte sich auch mit den reduzierten frühen Progenitoren im hämatopoetischen Kolonieassay (Abb. 6.19 B und Abb. 6.18 A+B). Eine weitere Ausreifung der hämatopoetischen Zellen, aber ohne weitere Expansion der CD41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> Subpopulation, zeigten die durchgeführten FACS-Analysen für die OP9-Kokultur (red.O<sub>2</sub>) (Abb. 6.19A). Die in den Kolonieassays und korrelierenden FACS-Messungen gezeigten Ausreifungen der ESZ-HZ in den verlängerten Expansionskulturen legten den Schluss nahe, dass eine Expansion der Zellen im gleichen Zytokincocktail, der die Zellen direkt nach der EB-Dissoziation expandierte, über einen so langen Zeitraum anscheinend ungünstig war. Ein Wechsel in Zytokinbedingungen die adulte Stammzellen gut *in vitro* expandieren ließen war die logische Konsequenz. Daher wurden die auch in unserem Labor erfolgreich für die Expansion von Knochenmarkstammzellen eingesetzten Zytokincocktails STIF (Zhang und Lodish, 2005) und STIF-A5 (Zhang *et al.*, 2008a) in einer verlängerten Expansion getestet. Beide Zytokincocktails hatten in Vorversuchen gezeigt, dass sie die ESZ-HZ direkt nach der EB-Dissoziation nicht optimal expandieren konnten (STIF-A5-SF: Tab. 6.2; STIF-S: Daten nicht gezeigt). In einer verlängerten Expansionsphase eines früheren Versuchs konnten wir unter STIF-A5-SF-Bedingungen dann aber doch die Expansion der ESZ-HSPZ-Fraktion erreichen (Abb. 6.6 K). Für die weiteren Experimente wurde sowohl der STIF- als auch der STIF-A5-Zytokincocktail im identischen Basismedium des STFV-S-Mediums verwendet.

Wie die durchgeführten Kolonieassays sehr gut veranschaulichten, konnte für die STFV-S und OP9-Kokultur (beide red.O<sub>2</sub>) weder im STIF noch im STIF-A5 Medium eine Expansion der HSPZ-Fraktion in der verlängerten Expansionsphase erreicht werden. In allen Ansätzen reduzierte sich die Anzahl der gebildeten Kolonien und verstärkte der CFU-GEMM-Anteil (Abb. 6.18 C+D). Einen Expansionseffekt auf

die frühesten Vorläuferpopulation unter STIF-A5 und noch stärker unter STIF-Bedingungen konnten wir in einzelnen Ansätzen der Doppelkokultivierungen erzielen. Unter normoxischen Bedingungen war die Doppelkokultivierung in physiologischer Reihenfolge (AFT=>OP9) in STFV-S am potentesten, unter red.O<sub>2</sub> die umgekehrte Reihenfolge. In der verlängerten Expansion unter STIF-A5 und besonders unter STIF vermittelte die Doppelkokultivierung unter red.O<sub>2</sub> und physiologischer Reihenfolge den größten Expansionschub für die CFU-GEMM, gefolgt von den Ansätzen der umgekehrten Kokultivierungsreihenfolge (red.O<sub>2</sub>; Abb. 6.18 E+F). Für eine Expansion der HSPZ aus der ESZ-HZ Kultur unter normoxischen Bedingungen waren weder STIF noch STIF-A5 geeignet, alle Kolonieassays zeigten einen starken Rückgang der CFU-GEMM-Fraktion in diesen Ansätzen (Abb. 6.18 E+F).

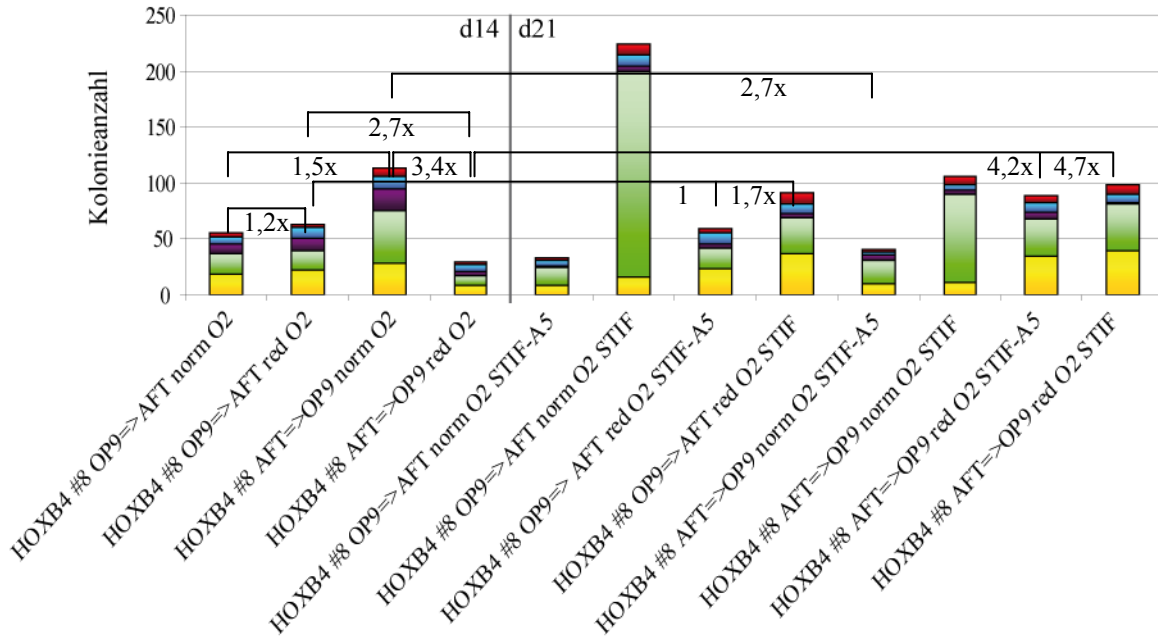
Zusammengenommen war es uns also möglich, eine starke Expansion von HSPZ unabhängig von Serum und Stromazellen mittels STFV-SF innerhalb einer 10tägigen Expansionsphase zu erzielen. Dies war allerdings nur in Synergie mit einem reduzierten Sauerstoffniveau möglich. Eine Verlängerung der Expansionsphase auf 21 Tage führte unter STFV-SF und auch unter der serumhaltigen STFV-Kultur zu einem Absinken der Anzahl frühester Progenitoren (CFU-GEMM) und resultierte in einer zunehmenden Ausreifung und Linienspezialisierung der ESZ-HZ. Dieser Prozess lief in verstärktem Maße unter norm.O<sub>2</sub>-Bedingungen ab. Der Wechsel an ESZ-HZ d10 in STIF-A5 und STIF-Zytokinbedingungen - beides Zytokincocktails, die adulte Stammzellen gut *in vitro* expandierten - konnte unter keinem der beiden Sauerstoffniveaus die Reduktion der HPSZ-Fraktion aus den STFV-S- oder OP9-expandierten ESZ-HZ in der verlängerten Expansionsphase verhindern. Doch ESZ-HSPZ, die in einer 14tägigen Doppelkokultivierung generiert worden waren, konnten in einer anschließenden 7tägigen STIF-A5- oder STIF-Suspensionskulturphase weiter expandiert werden, allerdings wiederum nur in Verbindung mit einem red.O<sub>2</sub>. Die Kokultivierung in physiologischer Reihenfolge (AFT024=>OP9) bildete dabei die beste Ausgangsbedingung.





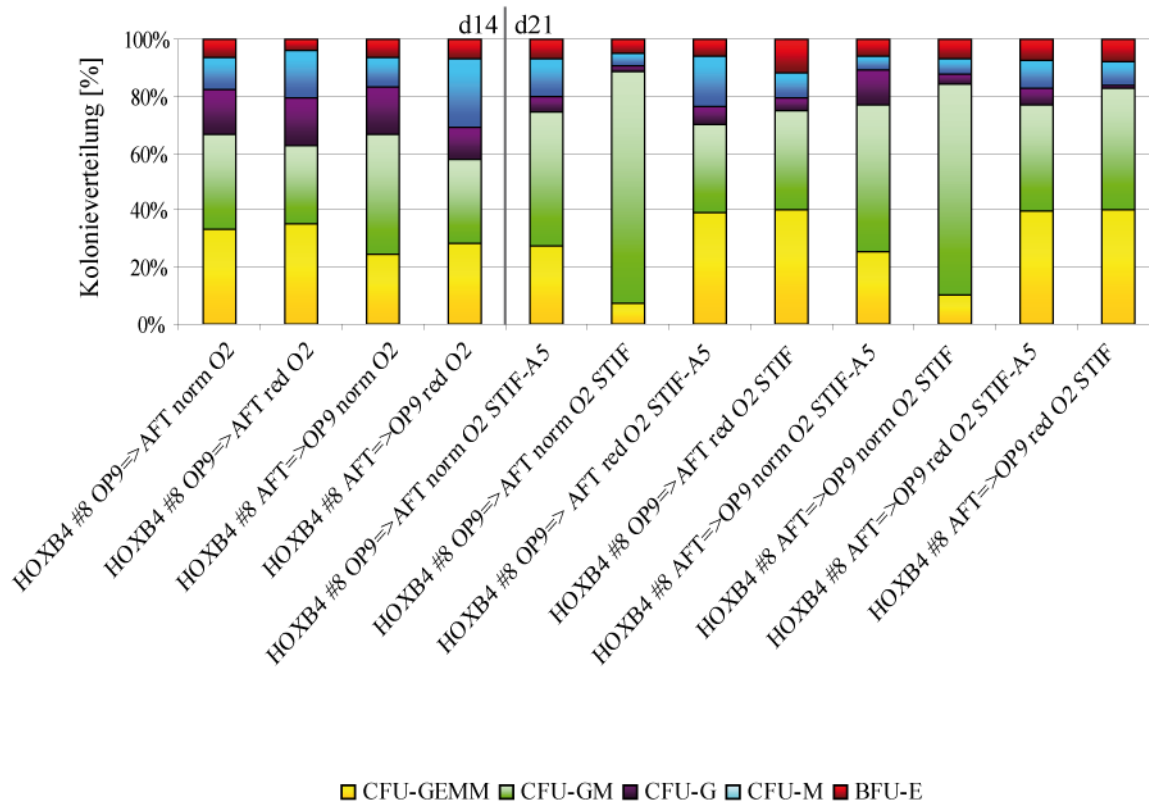
**E**

hämatopoetischer Kolonieassay ESZ-HZ d14 + d21

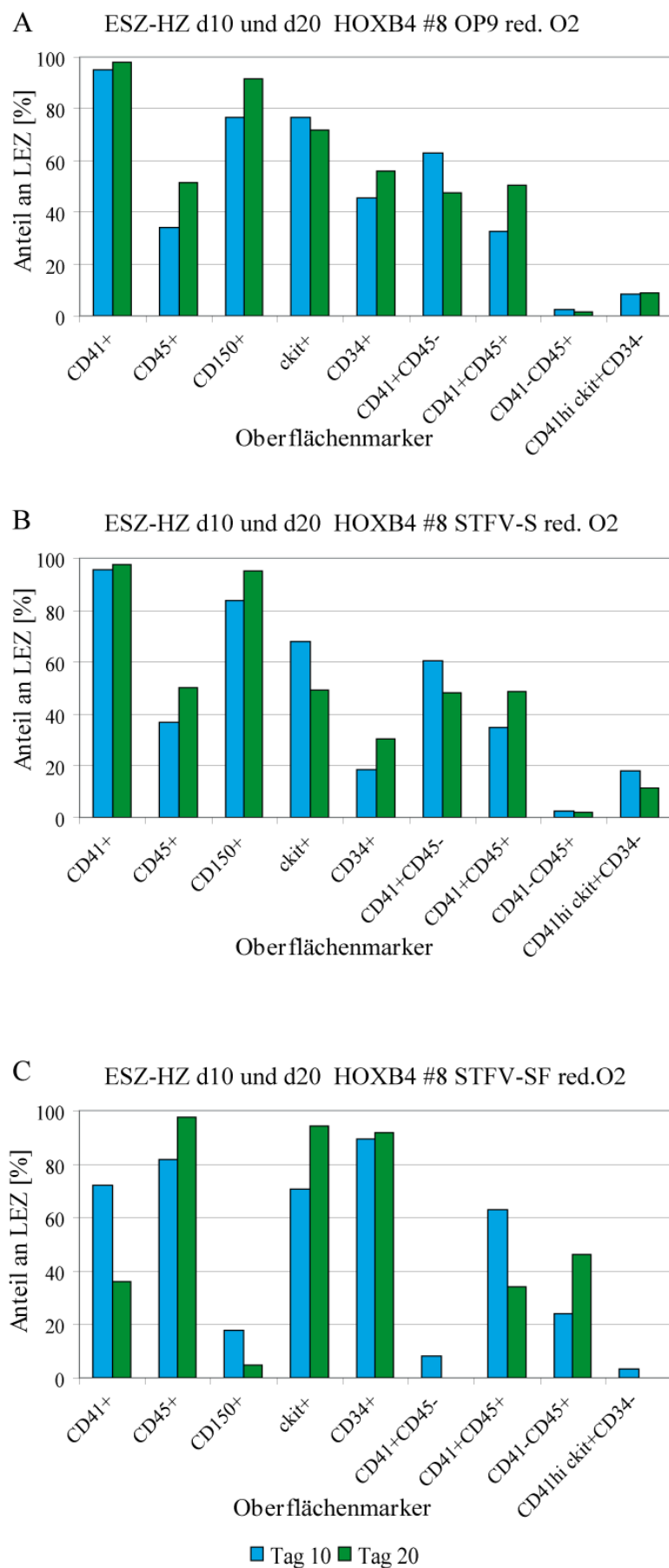


**F**

hämatopoetischer Kolonieassay ESZ-HZ d14 + d21



**Abb. 6.18 Eine Verlängerung der Expansionsphase reduzierte sowohl unter den fortgeführten Ausgangskulturbedingungen als auch in STIF-SF und STIF-A5-SF den Anteil frühester Progenitoren (CFU-GEMM) in den ESZ-HZ der unterschiedlichen Expansionsbedingungen, mit Ausnahme derer aus den Doppelkokultivierungen unter red.O<sub>2</sub>.** Im Methylzellulose-Kolonieformierungsassay wurde das hämatopoetische Potenzial länger kultivierter (21 Tage nach EB-Dissoziation) ESZ-HZ eruiert. Serumfreie Ansätze sind durch SF gekennzeichnet. Alle übrigen Ansätze wurden unter Serum-Bedingungen expandiert und sind in der Abbildung nicht gesondert gekennzeichnet. Die Diagramme A,C,E zeigen die durchschnittliche Anzahl der generierten Kolonien pro Typ und insgesamt generierte Kolonien. Die Diagramme B,D,F verdeutlichen jeweils den errechneten, prozentualen Anteil der Kolonietypen an der Gesamtkolonienzahl. Jeweils 1000 Zellen wurden in Triplikaten in MethoCult M3434 (Stemcell Technologies) ausgesät und die Kolonien nach 8-10 Tagen ausgezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte. Klammern geben x-fache CFU-GEMM-Anzahländerung an, linker Wert ist Vergleichswert für alle rechts markierten Gruppen einer Mehrfachklammer. **(A+B)** Die Versuche wurden sowohl unter Luftsauerstoffniveau sowie reduziertem Sauerstoffniveau (red.O<sub>2</sub>) durchgeführt. Es wurden STFV-Expansionskulturen die in FCS-haltigem bzw. FCS-freiem (serumfrei – SF) Medium kultiviert worden waren an ESZ-HZ d10 und d21 für den Assay eingesetzt. **(C+D)** Unter reduziertem Sauerstoffniveau (5% [v/v]) generierte ESZ-HZ wurden nach 10 Tagen STFV (mit FCS) bzw. OP9-Kokultur für weitere 11 Tage in STIF und STIF-A5-Expansionsmedium kultiviert und der STFV-Ansatz parallel über diese Zeit weitergeführt. **(E+F)** Die Doppelkokultivierungsansätze wurden nach 14 Tagen der Stromakokultur für 7 Tage in STIF bzw. STIF-A5, unter red.O<sub>2</sub> und norm.O<sub>2</sub> weiterkultiviert. STFV: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; STIF: SCF, TPO, IGF-2 bFGF, Heparin; STIF-A5: SCF, TPO, IGFBP-2, bFGF, Angptl5; norm.O<sub>2</sub>: Luftsauerstoffgehalt; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau – 5% (v/v); AFT: AFT024; CFU-GEMM: „colony forming unit granulocytic-erythroid-monocytic-megakaryocytic“; CFU-GM: „colony forming unit granulocytic-monocytic“; CFU G: „colony forming unit granulocytic“; CFU-M: „colony forming unit monocytic“; BFU-E: „blast forming unit erythroid“; SF: serumfrei



**Abb. 6.19** Gegenüberstellung der phänotypischen Charakteristika der ESZ-HZ aus drei verschiedenen Kultivierungsansätzen der Versuchsreihen unter reduziertem Sauerstoffniveau (red.O2) von Expansionstag 10 und 20 (nach EB-Dissoziation). Für die FACS-Messungen wurden jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Zellen mit Antikörpern markiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulation der vermessenen, lebenden Einzelzellen (LEZ). (A) ESZ-HZ der OP9-Kokultivierung 10 und 20 Tage nach EB-Dissoziation, (B) ESZ-HZ der FCS-haltigen STFV-Kultur 10 und 20 Tage nach EB-Dissoziation, (C) ESZ-HZ der serum-freien STFV-Expansion 10 und 20 Tage nach EB-Dissoziation. STFV: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; red.O2: reduziertes Sauerstoffniveau – 5% (v/v); S: Serum; SF: serumfrei

#### 6.4 Induziert pluripotente Stammzellen (iPS) lassen sich serumfrei EB-differenzieren und mittels STFV-S expandieren

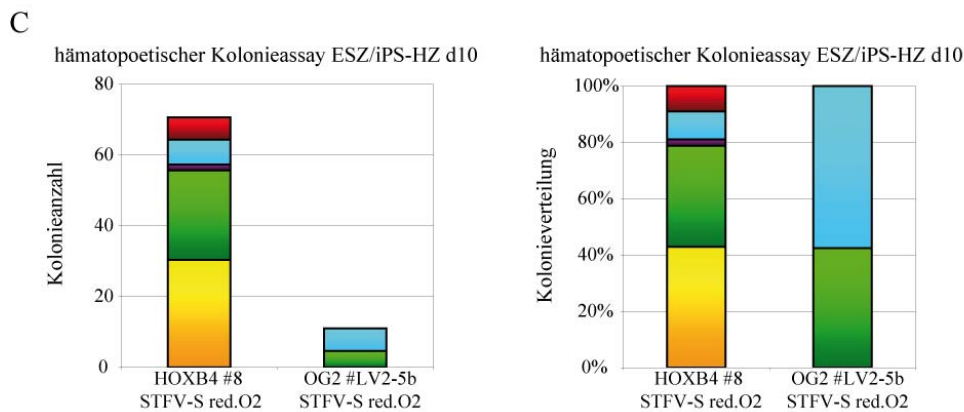
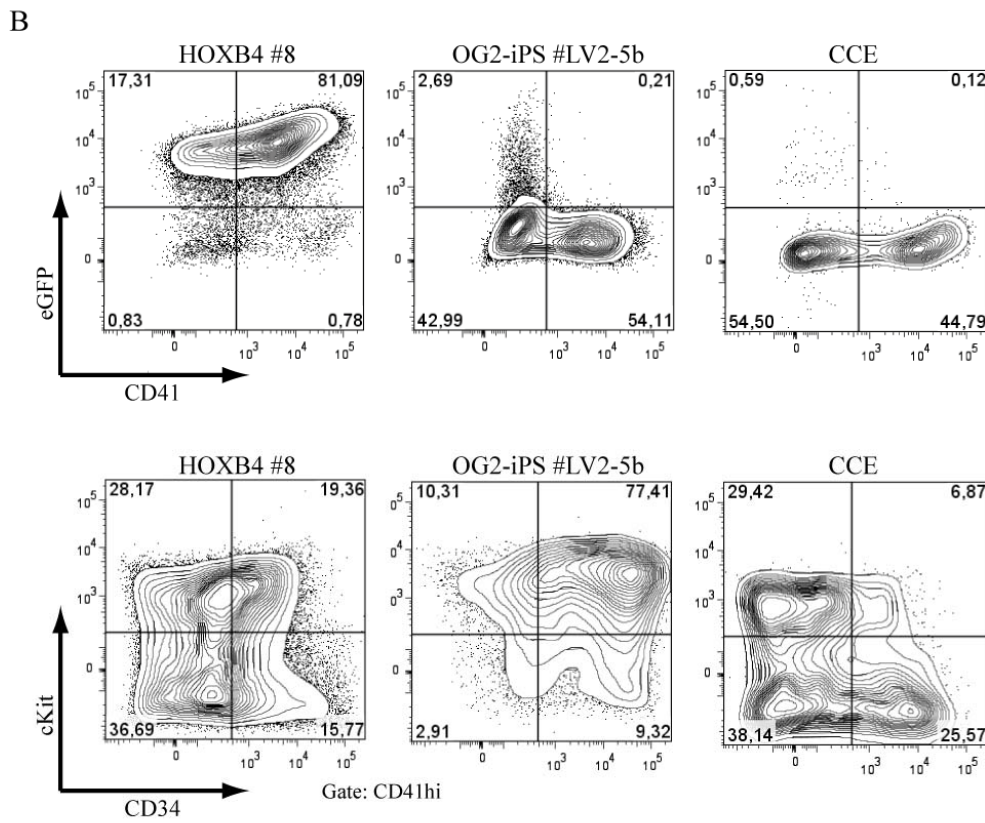
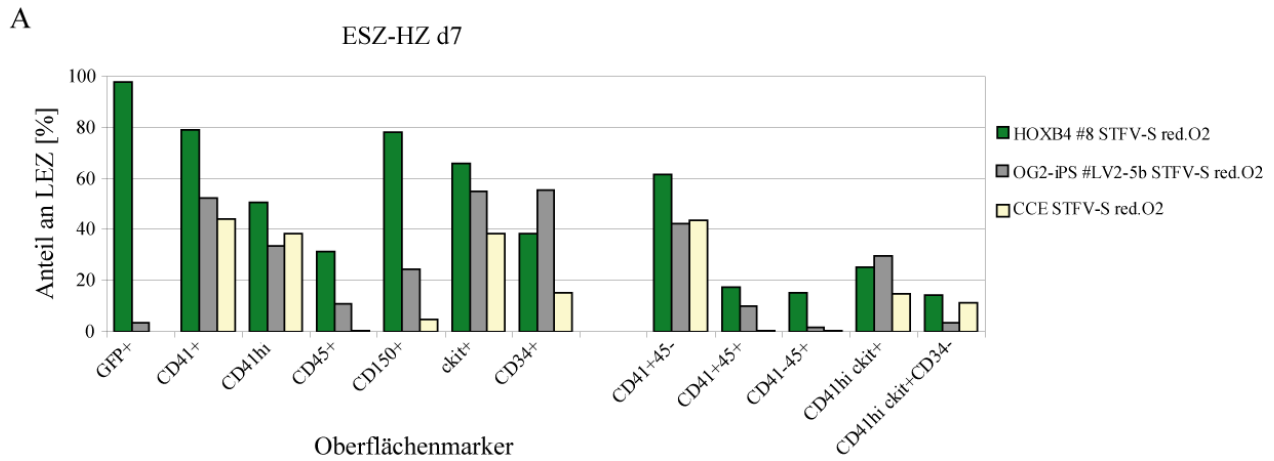
Ein weiterer Schritt in Richtung translationale Anwendung des nun robust etablierten Differenzierungs- und Expansionsprotokolls ist der Schritt weg von ESZ hin zu iPS als Ausgangsmaterial. Diese in den letzten fünf Jahren etablierte Zellquelle macht es für die Zukunft sehr wahrscheinlich, direkt auf Individuen zugeschnittene Zelltherapien zu entwickeln, da diese zugleich Spender und Empfänger sein können und somit immunologische Risiken minimiert werden können.

Verwendet wurde der von Eva Wahrlich etablierte iPS-Klon LV2-5b. Generiert wurde der Klon aus OG2-MEF mittels Insertion dreier monocistronischer Vektoren: pRRL.PPT.SF.mOct4.PRE, pRRL.PPT.SF.Klf4.PRE und pRRL.PPT.SF.Sox2.s.PRE (Warlich *et al.*, 2011). Die iPS-Generierung wurde für sieben Tage mit 2mM Valproat unterstützt, die Kultivierung erfolgte dann dauerhaft auf C3H-Stromazellen. Nach erfolgter Reprogrammierung exprimierten die iPS-Zellen GFP, welches durch die Aktivierung des endogenen Oct4-Promotors transkribiert wird. Dieser nur in undifferenzierten Zellen aktive Promotor kann daher in erfolgreich hämatopoetisch differenzierten iPS Zellen nicht mehr aktiv sein und folglich sind die generierten iPS-abgeleiteten hämatopoetischen Zellen (iPS-HZ) nicht mehr GFP+.

Die zweitägige Prädifferenzierungsphase erfolgte noch auf den C3H-Stromazellen. Es wurden 8000 Zellen/ml in die serumfreie EB-Differenzierung ausgesät. Vergleichend wurden ESZ des HOXB4 #8 und untransduzierte CCE mitgeführt. Die abgeschätzte EB-Frequenz war im iPS-Ansatz zwar geringer als in den ESZ-Ansätzen aber dennoch ausreichend für eine Expansion. Die iPS-HZ und die ESZ-HZ wurden für sieben Tage im STFV-Medium unter reduziertem Sauerstoffniveau (red.O<sub>2</sub> - 5% [v/v]) expandiert und anschließend der Vielfarben-FACS-Analyse unterzogen sowie jeweils 1000 Zellen/Ansatz (in Triplikaten) in Methylzelloassays ausgesät. Eine 97%ige Differenzierung des iPS-Klons konnten wir durchflusszytometrisch nachweisen, nur ca. 3% der expandierten Zellen waren noch GFP+. Die CD41-positive Fraktion wurde komplett von den GFP-negativen Zellen gebildet. Der Anteil an hämatopoetischen Zellen lag im differenzierten iPS-Klon 10 % höher als in der CCE-Vergleichsgruppe. Der HOXB4-transgene ESZ-Klon erzielte erwartungsgemäß einen nahezu 100%igen Anteil hämatopoetischer Zellen (Abb. 6.20 A+B oben). In der FACS-Charakterisierung wurde für die iPS-HZ ein ähnlicher Phänotyp wie für die CCE erwartet. In der phänotypischen Annäherung an die HSPZ-Fraktion konnten wir eine deutliche CD41hi ckit+ Subpopulation in den iPS-HZ detektieren (Abb. 6.20 A), die CD41hi ckit+ CD34- Population selber war dann aber deutlich unterrepräsentiert. Ursächlich dafür war die starken CD34 Positivität der iPS-HZ (Abb. 6.20 A+B unten). Bestätigend zu den FACS-Analysen spiegelten die Kolonieassays das reduzierte Progenitorenpotenzial der iPS-HZ gegenüber den ESZ-HZ des #8 wieder (Abb. 6.20C). Die CCE-ESZ-HZ generierten gar keine Kolonien, die iPS-HZ einige des reiferen Typs und der #8 wieder das ganze Spektrum mit zuvor charakterisierter Verteilung.

Somit ließ sich der iPS-Klon LV2-5b erfolgreich in hämatopoetische Zellen differenzieren, die nach einer 7tägigen Expansionsphase in STFV-S und ohne HOXB4-Überexpression rund 60% der Kultur bildeten und auch im Kolonieassay ein geringes Koloniebildungspotenzial besaßen. Diese Ergebnisse zeigten aber auch, dass die Expression von CD41 und von CD150 stark von HOXB4 abhängig ist und dass für den Erhalt und die Expansion der HSPZ/CFU-GEMM HOXB4 in der Expansion benötigt wird.

**Abb. 6.20 (nächste Seite) Auch induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) konnten serumfrei in hämatopoetische Zellen differenziert und in STFV-S Bedingungen expandiert werden. (A)** Für FACS-Analysen wurden jeweils ca.  $1 \times 10^6$  iPS-HZ d7 des #LV2-5b sowie ESZ-HZ d7 der parallel differenzierten CCE und dem konstitutiv HOXB4 exprimierenden ESZ #8 mit Antikörpern markiert und per FACS phänotypisch charakterisiert. **(B)** Die FACS-Analysen zeigten einen hämatopoetischen Phänotyp (CD41+) für den Großteil aller Ansätze. In den GFP+ Zellen des differenzierten iPS-Klones war der Oct4-Promotor noch aktiv und somit waren diese Zellen nicht in der Lage hämatopoetisch zu differenzieren (CD41-). Die generierten CD41hi ckit+ Zellen der iPS-HZ sind im Gegensatz zu den ESZ-HZ deutlich in die CD34+ Fraktion verschoben. **(C)** Das hämatopoetische Koloniebildungspotenzial der drei Ansätze wurde im Methylzelluloseassay (MethoCult M3434 - StemCell-Technologies) eruiert. Dafür wurden jeweils 1000 Zellen/Ansatz in Triplikaten ausgesät und nach 8 Tagen ausgezählt. Die ESZ-HZ der untransduzierten CCE formten keine Kolonien. STFV: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; red.O2: reduziertes Sauerstoffniveau – 5% (v/v); CFU-GEMM: „colony forming unit granulocytic-erythroid-monocytic-megakaryocytic“; CFU-GM: „colony forming unit granulocytic-monocytic“; CFU G: „colony forming unit granulocytic“; CFU-M: „colony forming unit monocytic“; BFU-E: „blast forming unit erythroid“; S: Serum; LEZ: Lebende Einzelzellen



## 6.5 Überwindung der NKZ-vermittelten Transplantatabstoßung via mCMV-m144

Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass ESZ-HZ bei Transplantation in immunkompetente Empfänger NKZ-vermittelt abgestoßen werden und somit ein Langzeitengraftment unmöglich ist (Rideout *et al.*, 2002; Tabayoyong *et al.*, 2009). Eine Dysbalance zwischen inhibitorischen und aktivierenden NKZ-Liganden, durch die ganz oder größten Teils auf den Zelloberflächen fehlenden NKZ-inhibitorischen MHC-I-Moleküle bei fortbestehender Expression verschiedener aktivierender NKZ-Liganden wie z.B. H60, wurde als Ursache eruiert (Tabayoyong *et al.*, 2009). Zur Vermeidung der NKZ-vermittelte Lyse der ESZ-HZ sollte das virale Protein m144 (Farrell *et al.*, 1997), das das murine Cytomegalovirus (mCMV) auf der Zelloberfläche infizierter Zellen exprimiert um diese so der NKZ-Abstoßung unzugänglich zumachen (Kubota *et al.*, 1999), auf den ESZ-HZ überexprimiert werden. Die NKZ-inhibierende Wirkung von m144 ist dabei nicht allein auf die Ly49-Rezeptoren beschränkt, CD94 und andere Mitglieder der „C-type-lectin“ Superfamilie besitzen auch eine relativ breite Spezifität für MHC-I sowie für das Homolog (Kubota *et al.*, 1999; Voigt *et al.*, 2007).

### 6.5.1 Klonierung des MHC-I-Mimetikum-Expressionsvektors

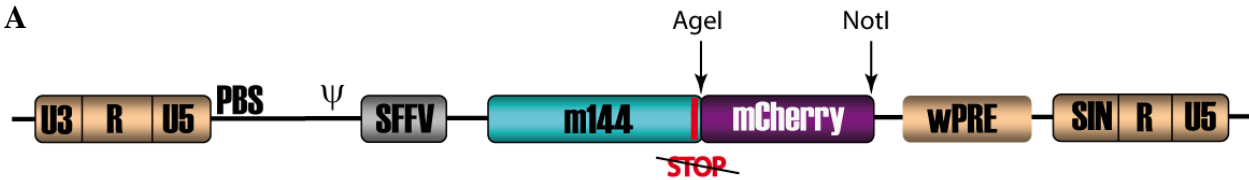
MCMV-m144 sollte auf der Oberfläche der ESZ-HZ exprimiert werden, um diese nach Transplantation vor der Abstoßung durch eine NKZ-vermittelte Immunantwort zu schützen. Um eine gleichmäßige Expression von m144 in den ESZ-HZ zu gewährleisten, sollten bereits die HOXB4-transgenen CCE-ESZ mit einem m144-kodierenden retroviralen Vektor transduziert werden und gut exprimierende Klone expandiert werden. Die Fusion eines Fluoreszenzproteins mit m144 sollte die Detektion ermöglichen.

In das *Eco47III* und *BstXI* geschnittene *SIN-Backbone* SRS11-dsRedExpress.PRE (freundlicher Weise durch Axel Schambach zur Verfügung gestellt) wurde dazu die, mittels Overlap PCR modifizierte, m144- (aus pBK-CMV)-mutSTOP-dsRedExp.*BstXI*-Sequenz ligiert. Das mutierte Stopcodon gewährleistet dabei die Transkription der Sequenz in eine einzige mRNA. Ein kurzer Linker soll die korrekte Faltung beider „Proteinteile“ im Fusionsprotein zulassen. Über die zusätzlich geschaffene Erkennungssequenz für *AgeI* und der den Fluoreszenzproteinsequenzen nachgeschalteten *NotI*-Erkennungssequenz wurde das punktmutierte und daher inaktive dsRedExp. gegen mCherry (aus SRS11-mCherry.PRE) ausgetauscht (Details siehe 5.5.4.1). Mit dem fertig gestellten Vektor SRS11-m144fusmCherry.PRE (Abb. 6.21 A) wurden retrovirale Partikel in 293T-Zellen generiert. Parallel wurden auch Viruspartikel mit dem Kontrollvektor SRS11-mCherry.PRE hergestellt. Die Kontrolle der Produzentenzellen am Fluoreszenzmikroskop ergab detektierbare Fluoreszenz in beiden Ansätzen. Während das mCherry-Protein gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorlag (Abb. 6.21 B unten) ließ sich die membranassoziierte

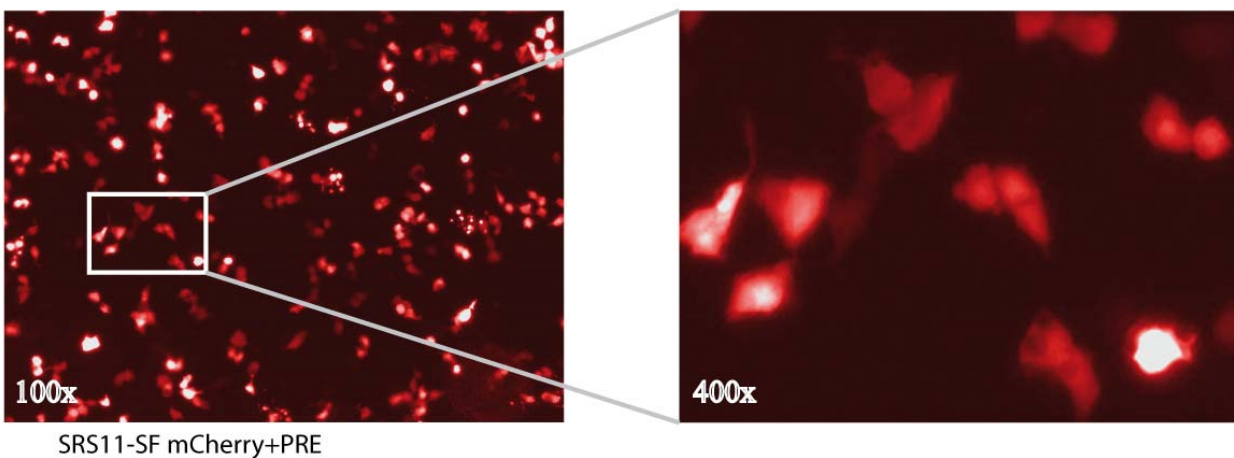
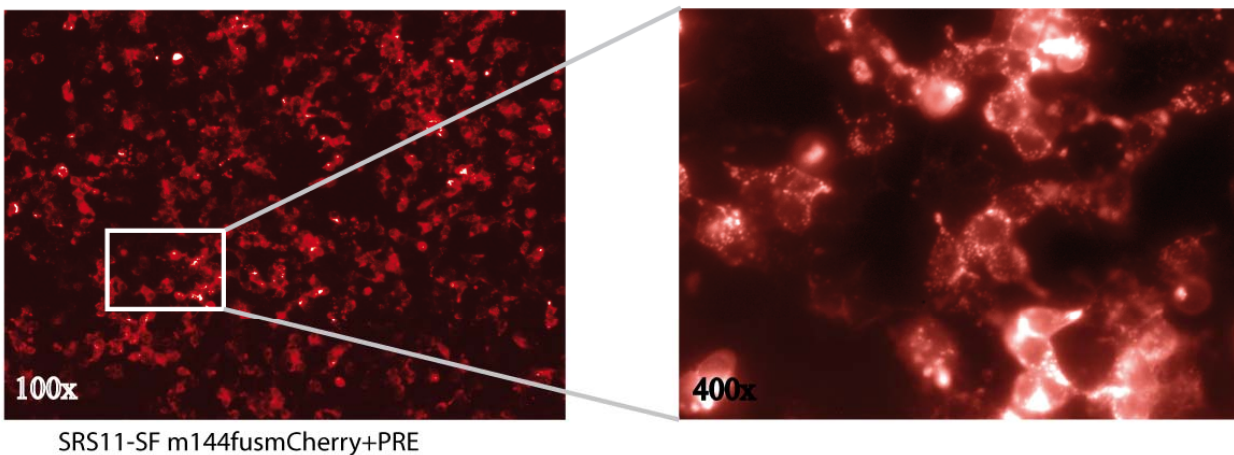


Fluoreszenz des generierten Fusionsproteins erkennen (Abb. 6.21 B oben). Somit konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein funktionell korrekt war, die Reporterfluoreszenz lag vor und das Protein wurde, wie es für m144 bekannt ist, zur Membran transportiert.

**A**



**B**

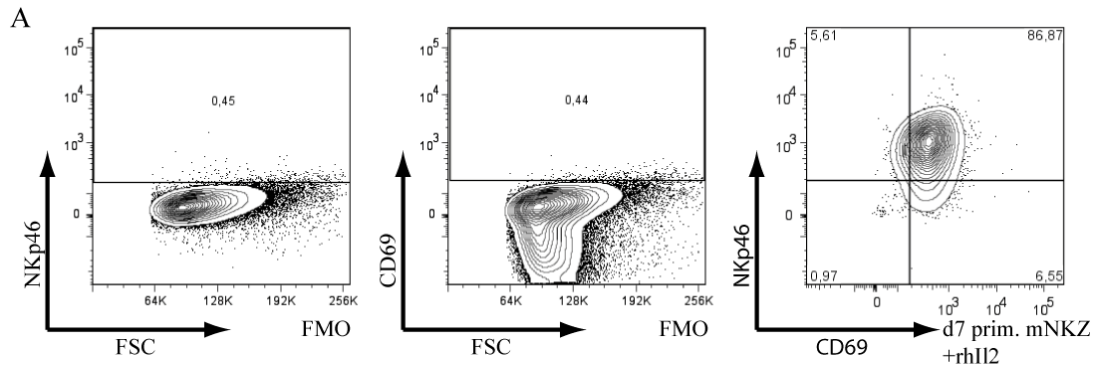


**Abb. 6.21 Das Fusionsprotein aus mCMV-m144 und mCherry wurde in den Virusproduzentenzellen exprimiert und in ihre Zellmembranen integriert.** (A) Aufbau des gamma-retroviralen Expressionsplasmids SRS11-m144fusmCherry.PRE. (B) Für die Generierung der infektiösen Viruspartikel wurden 293T-Zellen mit diesem Plasmid bzw. dem SRS11-mCherry.PRE Kontrollplasmid sowie einem Plasmid kodierend für gag-pol und einem Plasmid kodierend für das ecotrope Hüllprotein kotransfiziert. Die Aktivität der exprimierten Proteine konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Während das mCherry-Protein im Zytoplasma der Produzentenzellen verteilt war (Abb. unten) wurde das m144-mCherry-Fusionsprotein wie erwartet zur Zellmembran transportiert (Abb. oben).

### 6.5.2 ESZ aber nicht ESZ-HZ sind NKZ-Ziele *in vitro*

Während der Konstruktion des MHC-I-Mimetikums wurden die ESZ und die daraus abgeleiteten hämatopoetischen Zellen (ESZ-HZ) einem *in vitro* Assay unterzogen, der ihre Zugänglichkeit für NKZ zeigen sollte. Im Chrom-Freisetzungssassay („*chrome release assay*“) werden Zellen mit <sup>51</sup>Chrom markiert und dann mit aktivierten NKZ für kurze Zeit kokultiviert. Können die NKZ die chrommarkierten Zellen lysieren, wird das radioaktive Chrom frei und kann detektiert werden. Für diese Assays wurden NKZ aus den Milzen von 129S6/SvEvTac-Mäusen gewonnen, für sieben Tage expandiert und mit rekombinatem Interleukin 2 (IL2) stimuliert. Bevor die Zellen in die Lyse-Assays gingen wurde ihre Reinheit und Aktivität in einer FACS-Analyse kontrolliert. Dafür wurden die Zellen mit dem NKZ-spezifischen Antikörper anti-NKp46 markiert, dieser ist auch auf kultivierten Zellen detektierbar. Zusätzlich wurde anti-CD69 verwendet, dies markiert alle aktivierten Lymphozyten. Nachweislich gingen immer stark angereicherte, aktivierte NKZ in die Assays (Abb. 6.22 A). Um die „Nebenwirkungen“ unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen bzw. Medienzusätze zu eruieren, wurden für den ersten Assay YAC-1 Zellen mit den verwendeten Zusätzen bzw. Medien kultiviert. Yac-1 Zellen sind „*Moloney murine leukemia virus*“ (Mo-MuLV) induzierte Lymphomazellen aus der Maus (*Mus musculus*). Sie sind sensitiv für die zytotoxische Aktivität von NKZ (Kiessling *et al.*, 1975a; Kiessling *et al.*, 1975b) und dienten daher als Positivkontrolle in den Chrom-Freisetzungssassays. Tatsächlich reduzierten die geänderten Kultivierungsbedingungen die NKZ-Empfindlichkeit der Yac-1 Zellen geringfügig, trotzdem blieben sie deutlich zugänglich für die NKZ-vermittelte Lyse (Abb. 6.22 B). Im nächsten Assay wurden die undifferenzierten ESZ parallel zu den Yac-1 Zellen im Chrom-Freisetzungssassay getestet. Sowohl die unmanipulierten CCE als auch zwei verschiedene HOXB4-transgene ESZ-Klone (Tet-on induzierbare Klone A6 und F6, siehe dazu 6.7) wurden lysiert. Der Anteil an der maximalen Lyse war zwar etwas schwächer als bei der Positivkontrolle, aber dennoch sehr deutlich (Abb. 6.2 C). Unter STD-SF-Bedingungen expandierte ESZ-HZ der induzierten HOXB4-Klone A6 und F6, sowie unter gleichen Bedingungen expandierte CCE konnten von den NKZ nicht mehr lysiert werden (Abb. 6.22. D). Wiederholte Assays mit ESZ-HZ aus anderen Kulturbedingungen führten ebenfalls zu diesem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst konnten wir die NKZ-Zugänglichkeit der ESZ sowie die Unzugänglichkeit der ESZ-HZ, unabhängig von HOXB4-Überexpression und Kultivierungsbedingungen, *in vitro* zeigen. Ein möglicher NKZ-protektiver Effekt des MHC-I-Mimetikums m144 für die ESZ-HZ erschien somit nicht erforderlich und wäre aufgrund der vorhandenen NKZ-Unzugänglichkeit im Chrom-Freisetzungssassay auch nicht detektierbar gewesen. Daher wurde eine Transduktion zurückgestellt. Stattdessen wurden die ESZ-HZ auf ihren MHC-I-Phänotyp via FACS analysiert (folgendes Kapitel), und *in vivo* in immunkompetenten Empfängern getestet (siehe Kapitel 6.5).



B <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay für YAC-1 Kontrollen

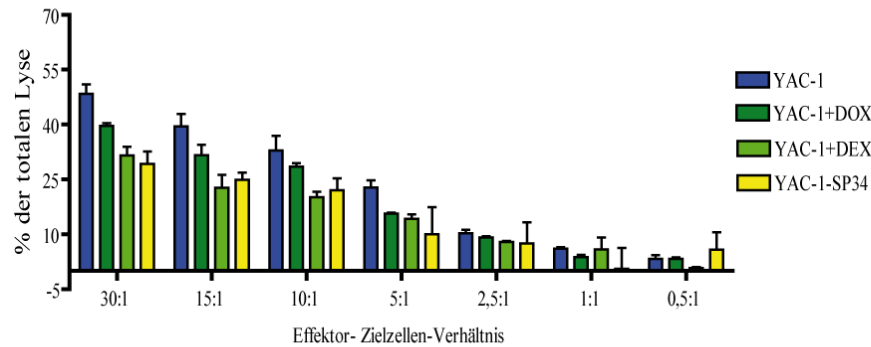
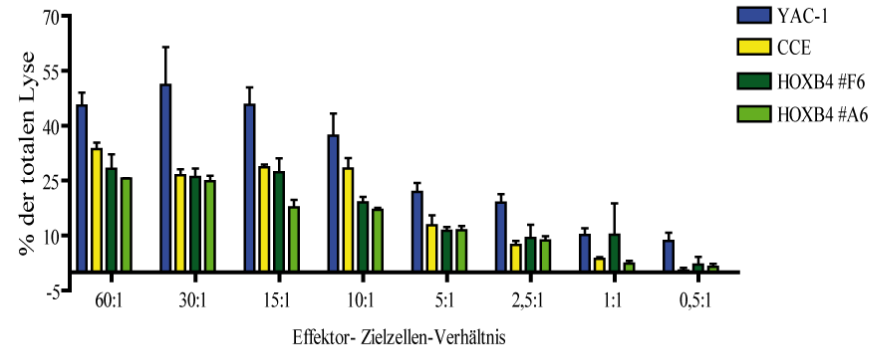


Abb. 6.22 Aktivierte primäre NKZ aus der Milz von 129S6/SvEvTac-Mäusen lysieren ESZ aber keine ESZ-HZ *in vitro*.

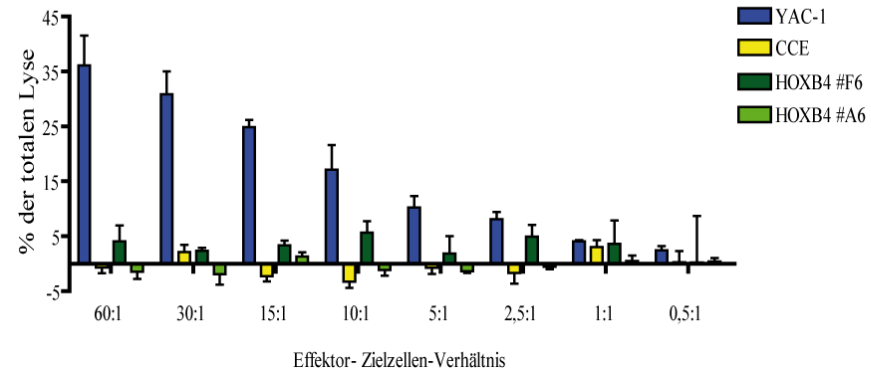
Die NKZ wurden für sieben Tage *in vitro* expandiert und mit rekombinantem humanem Interleukin-2 (rhIL2) aktiviert. (A) Die Koexpression des spezifischen NKZ-Markers NKp46 mit CD69 konnte am Tag des <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassays via FACS nachgewiesen werden. Damit gingen vollaktivierte NKZ in den Lyse-Assay. (B-D) Die erzielte Chromfreisetzung wurde als prozentualer Anteil an der maximalen Lyse angegeben. Es handelte sich um jeweils unabhängige Experimente. (B) Chromfreisetzungssassay mit unterschiedlich kultivierten YAC-1 (mit Doxycyclin [DOX], Dexamethason [DEX] oder in Stem-Pro34 [SP34] schloss kulturbedingte Lyse-inhibition aus. (C) ESZ wurden durch die aktivierten NKZ lysiert. (D) ESZ-HZ waren kein Ziel der aktivierten NKZ mehr.

FMO: *fluorescence-minus-one*; d: Tag; mNKZ: murine Natürliche Killerzellen; <sup>51</sup>Cr: Chrom 51

C <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay für ESZ

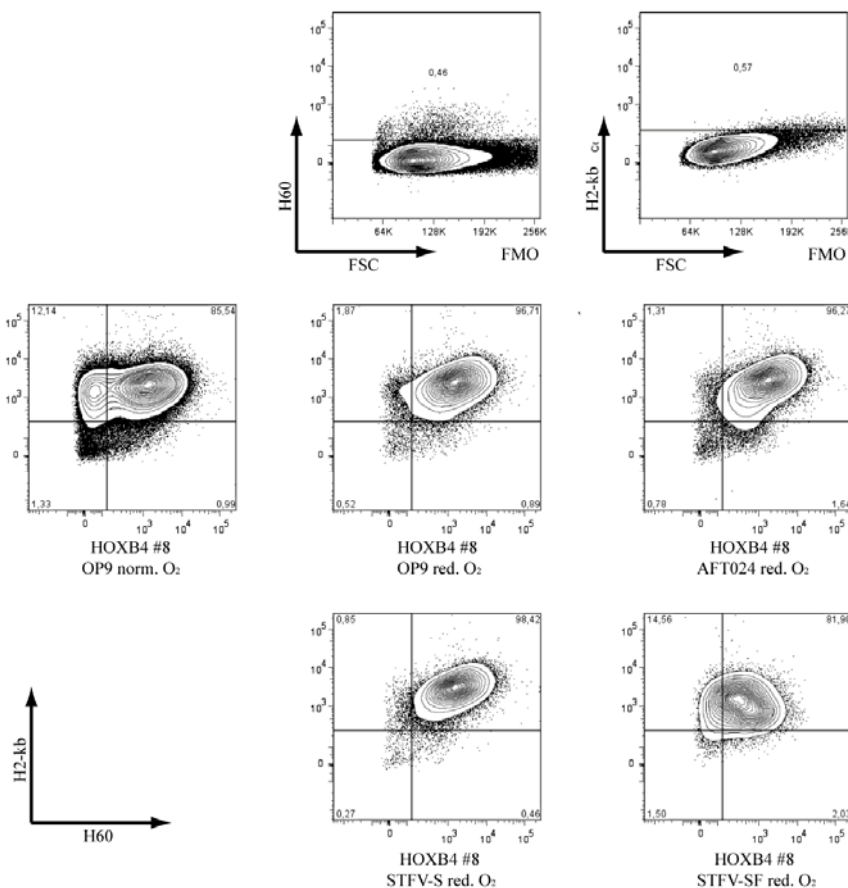


D <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay für ESZ-HZ



### 6.5.3 ESZ-HZ sind immunkompetent, sie exprimieren MHC-I

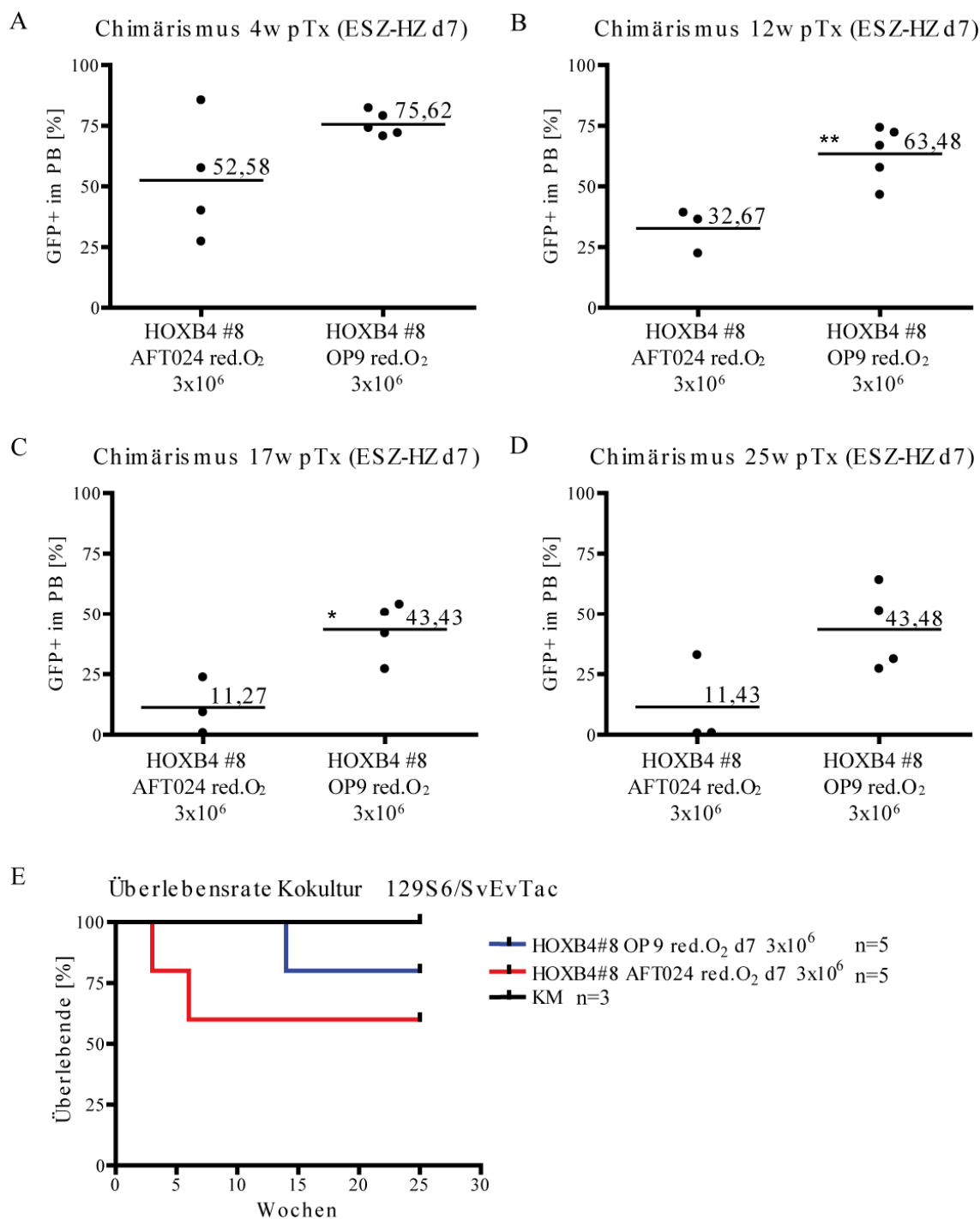
Da die generierten ESZ-HZ aus den unterschiedlichen Kultivierungsansätzen keine NKZ-vermittelte Lyse im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay zeigten, war unsere Annahme, dass sie ein verändertes Profil von Oberflächenmolekülen aufweisen müssen, welches sie unempfindlich für NKZ macht. Frühere und auch jüngere Arbeiten zeigten, dass den ESZ-HZ die MHC-I-Moleküle fehlen und sie zusätzlich NKZ-aktivierende Moleküle, wie z.B. H60, exprimieren (Tabayoyong *et al.*, 2009). Unsere FACS-Analysen konzentrierten sich daher auf MHC-I und H60. Der MHC-I Haplotyp der CCE H2-kb. Alle ESZ-HZ d14 aus den untersuchten Kultivierungsbedingungen waren zu fast 100% H2-kb positiv (Abb. 6.23). Auch der aktivierende NKZ-Ligand H60 wurde von den ESZ-HZ exprimiert. Eine deutliche H60-negative Population zeigten nur die ESZ-HZ aus der STFV-SF Kultur, sowie die unter norm.O<sub>2</sub> kultivierten ESZ-HZ der OP9-Kokultur. Den gleichen Phänotyp wiesen die ESZ-HZ bereits am zehnten Expansionstag auf (Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass unsere Differenzierungs- und Expansionsprotokolle MHC-I kompetente ESZ-HZ generierten, die durch die signifikante Expression des inhibitorischen Schlüsselliganden MHC-I kein Ziel der NKZ-Abstoßung mehr waren.



**Abb. 6.23 ESZ-HZ verschiedener Expansionskulturen exprimierten zu fast 100% das NKZ-inhibitorische MHC-I auf ihrer Oberfläche, aber auch den aktivierenden NKZ-Liganden H60.** Für die FACS-Analysen wurden ca.  $1 \times 10^6$  ESZ-HZ d14 mit anti-H2-Kb und anti-H60 markiert. Es wurde auf lebende Einzelzellen voreingestellt und die Populationen nach FMO Kontrolle (auf ESZ-HZ gefärbt) gesetzt. FMO: *fluorescence minus one*; STFV: SCF, TPO, Flt3L, VEGF; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v]); norm.O<sub>2</sub>: Luftsaurestoffniveau (21% [v/v]); S: Serum; SF: serumfrei

## 6.6. Transplantierte ESZ-HZ repopulieren immunkompetente Rezipienten

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Differenzierungs- und Expansionsprotokolle soweit zu optimieren, dass wir robust ESZ-HZ generieren konnten, die sich durch Multilinen-Langzeitengraftment in immunkompetenten Empfängern auszeichnen und somit dann Ausgangsmaterial für Gen- und Zelltherapie sein können. Daher wurden die in den vorangegangenen Kapiteln *in vitro* charakterisierten, generierten hämatopoetischen Zellen auch dem *in vivo* Funktionstest unterzogen und in Mäuse transplantiert. Da wir in unseren *in vitro* Analysen keine NKZ-vermittelte Reaktion auf unsere ESZ-HZ messen konnten, wurden die Zellen in immunkompetente Wildtypmäuse (129S6/SvEvTac) transplantiert. Bei diesem Maustamm handelt es sich um den nächst verwandten Mausstamm des Etablierungsmausstammes der CCE-Linie. Damit sollte eine T-Zell-vermittelte Transplantatabstoßung ausgeschlossen werden. Allerdings fiel in immunphänotypischen Charakterisierungen dieses Mausstammes eine 4-5fach verringerte HSZ-Frequenz gegenüber anderen Wildtypstämmen auf (Papathanasiou *et al.*, 2010). Transplantiert wurde von uns *intra venös* (i.v.) in die Schwanzvene. Es wurden immer unsortierte Zellen in verschiedenen Zellzahlen, jeweils mit  $2 \times 10^5$  Sca-1 depletierten Knochenmarkzellen (KM) aus 129S6/SvEvTac-Mäusen als Kompetitoren transplantiert. Die Mäuse wurden einen Tag vor der Tx mit 11Gy letal bestrahlt. Jeweils  $3 \times 10^6$  ESZ-HZ d7 der AFT024- und der OP9-Kokultur (red.O<sub>2</sub>) wurden im ersten Transplantationsexperiment in jeweils fünf immunkompetente Empfänger transplantiert, sowie als Positivkontrolle  $1 \times 10^6$  frische 129S6/SvEvTac-Knochenmarkzellen in drei Tiere. Rechnerisch wurden somit ca. 5700 CD41hi ckit+ CD34- Zellen aus der AFT024-Kokultur und ca. 14400 aus der OP9-Kokultur transplantiert. Zur Überprüfung des Engraftments und der Bestimmung des Chimärismus im Peripherblut (PB) wurde den Mäusen erstmalig vier Wochen nach Tx und dann in mehrwöchigen Abständen Blut aus dem retro-bulbären Plexus entnommen. Nach Erythrozytenlyse wurden die weißen Blutzellen (WBZ) per FACS analysiert. In beiden Gruppen konnte keine Abstoßung durch NKZ beobachtet werden, alle Tiere wiesen einen GFP-Chimärismus von mind. 25% auf, im Gruppendurchschnitt lag der Chimärismus noch deutlich höher, 52% in der AFT024 Gruppe und 75% (bei geringster Streuung) in der OP9-Gruppe (Abb. 6.24 A). Über den gesamten Beobachtungszeitraum lag der Chimärismus der OP9-Kohorte deutlich höher als in der AFT024-Gruppe. Dieser höhere Langzeitchimärismus korrelierte mit dem höheren Anteil an CD41hi ckit+ CD34- Zellen in der transplantierten Zelldosis der OP9-Kokultur. Signifikanz konnte mittels zweiseitigem, ungepaarten t-Test nachgewiesen werden (Abb. 6.24 A+B Welch-Korrektur; B  $p < 0,002$ ; C  $p < 0,05$ ; D  $p = 0,0657$ ). Ein über die üblichen 16-18 Wochen hinaus verlängerter Beobachtungszeitraum konnte die Stabilität des durchschnittlichen Chimärismus nachweisen, sowie das gesicherte Langzeitüberleben der repopulierten Empfänger (Abb. 6.24 E).



**Abb. 6.24 ESZ-HZ d7 aus der OP9 und AFT024-Kokultur (red.O<sub>2</sub>) erzielten Langzeitengraftment in letal bestrahlten, immunkompetenten 129S6/SvEvTac-Mäusen.** Einen Tag Prä-Tx wurden die Tiere mit 11Gy letal bestrahlt und am Folgetag mit je 3x10<sup>6</sup> ESZ-HZ und jeweils 2x10<sup>5</sup> Sca-1-depletierten Knochenmarkszellen aus dem gleichen Mausstamm, als Kompetitoren, transplantiert. (A) 4 (B) 12 (C) 17 (D) 25 Wochen nach Tx wurde Peripherblut (PB) aus dem retro-bulbären Plexus der Mäuse entnommen und auf GFP-Expression via FACS vermessen. Prozentuale Anteile GFP-positiver Zellen im PB sind pro Tier, pro Gruppe aufgetragen, Mittelwerte der Gruppen sind angezeigt. Gezeigte Chimärismuswerte immer >0,5 %. Signifikanz mittels zweiseitigem, ungepaarten t-Test ermittelt; A+B Welch-Korrektur; B \*\* p< 0,002; C \* p< 0,05; D p=0,0657 (E) Kaplan-Meier Graph zeigt Langzeitüberleben ESZ-HZ-transplantiert, immunkompetenter Mäuse, sowie der KM-Kontrollgruppe. pTx: post-Transplantation; w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau

Mit diesen neuartig differenzierten Zellen konnten wir Langzeitengraftment in immunkompetenten Mäusen erreichen, das mit einer mittleren Chimärismusrate von 43% in der OP9-Kohorte 11x höher lag als der maximal erreichte Langzeitchimärismus in immundefizienten Tieren unter Ausgangs-Standardbedingungen. Aufgrund der überzeugenden Chimärismusraten dieses Transplantations-experiments wurden ESZ-HZ d10 aus der OP9-Kokultur (red.O<sub>2</sub>) in einer Verdünnungsreihe („limiting dilution“), zur Bestimmung der Stammzellfrequenz in jeweils fünf letal bestrahlte, immunkompetente Wildtypiere transplantiert. In einer weiteren Transplantationsreihe wurden die ESZ-HZ d10 aus der STFV-S-Suspensionskultur, sowie erneut ESZ-HZ aus der AFT024-Kokultur (red.O<sub>2</sub>) in jeweils fünf letal bestrahlte Wildtypmäuse transplantiert. Zwei letal bestrahlte Tiere wurden als Positivkontrolle mit 1x10<sup>6</sup> frischen Knochenmarkzellen aus dem gleichen Stamm transplantiert. Wir haben im Gegensatz zu anderen Gruppen (Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009) Aliquots der generierten Gesamtkultur transplantiert und keine Anreicherung einzelner Populationen mittels FACS-Sortierung vorgenommen. Wir konnten aber bereits im letzten Experiment eine annähernde Korrelation zwischen Chimärismushöhe und transplantiertem CD41hi ckit+ CD34- Anteil feststellen, daher sind in Tab. 6.3 die in den Transplantaten enthaltenen Subpopulationen auf Basis der durchgeführten FACS-Analysen errechnet und aufgelistet worden.

**Tab. 6.3 Errechnete Anteile einzelner Subpopulationen in den transplantierten ESZ-HZ-Dosen**

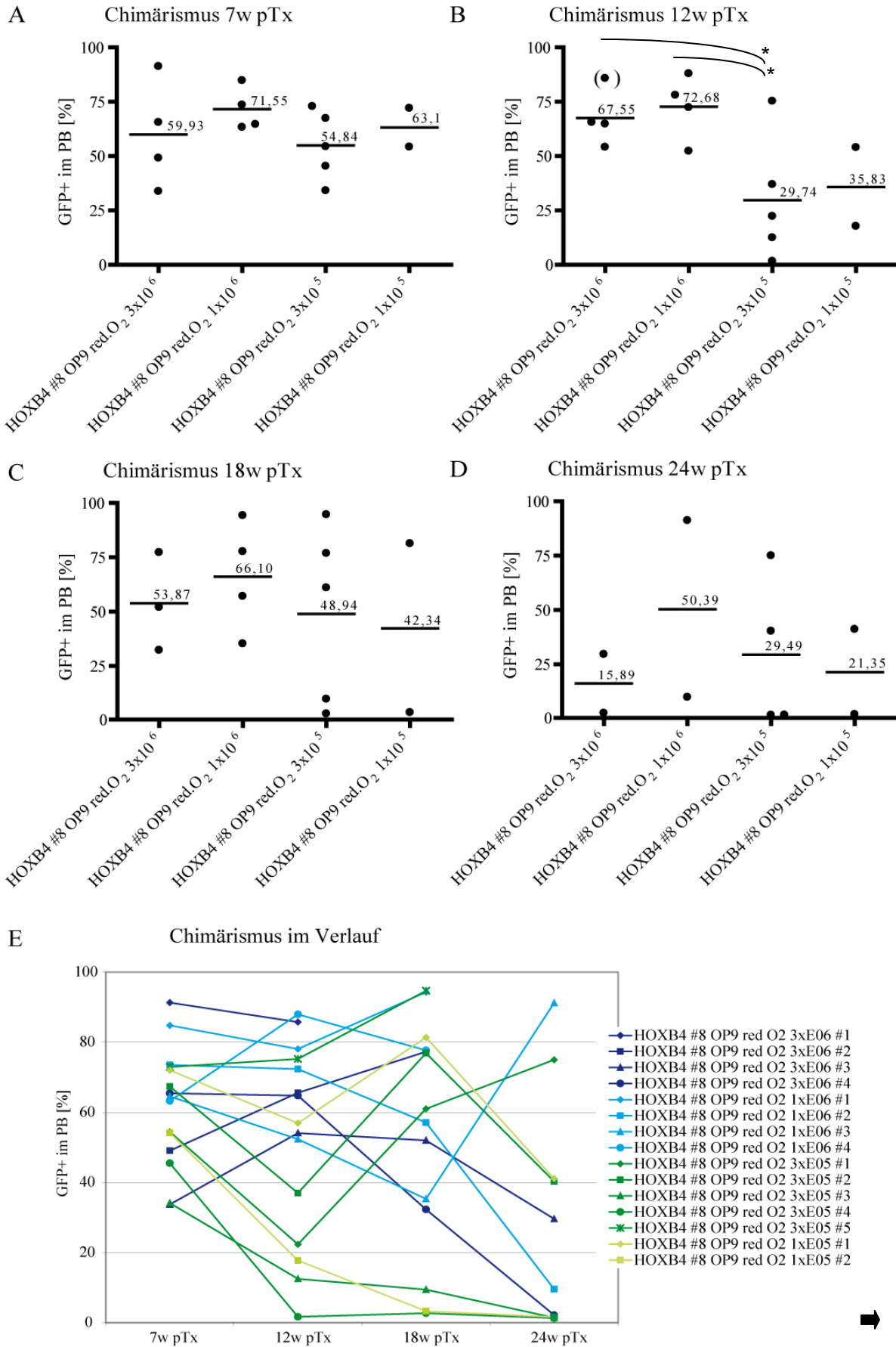
Sub-population	HOXB4 #8 OP9 red.O <sub>2</sub> [%]	transpl. Zellzahlen				HOXB4 #8 STFV red.O <sub>2</sub> [%]	transpl. Zellzahl	HOXB4 #8 AFT024 red.O <sub>2</sub> [%]	transpl. Zellzahl
		3x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>				
		3x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>		3x10 <sup>6</sup>		3x10 <sup>6</sup>
CD41+	94,82	2,85x10 <sup>6</sup>	9,50x10 <sup>5</sup>	2,85x10 <sup>5</sup>	9,50x10 <sup>4</sup>	95,43	2,85x10 <sup>6</sup>	90,8	2,73x10 <sup>6</sup>
CD41hi	32,27	1,02x10 <sup>6</sup>	3,40x10 <sup>5</sup>	1,02x10 <sup>5</sup>	3,40x10 <sup>4</sup>	43,45	1,30x10 <sup>5</sup>	30,48	9,10x10 <sup>5</sup>
CD45+	34,31	1,03x10 <sup>6</sup>	3,43x10 <sup>5</sup>	1,03x10 <sup>5</sup>	3,43x10 <sup>4</sup>	36,96	1,10x10 <sup>6</sup>	34,1	1,02x10 <sup>6</sup>
CD150+	76,71	2,30x10 <sup>6</sup>	7,67x10 <sup>5</sup>	2,30x10 <sup>5</sup>	7,67x10 <sup>4</sup>	83,6	2,51x10 <sup>6</sup>	68,6	2,06x10 <sup>6</sup>
ckit+	76,96	2,31x10 <sup>6</sup>	7,70x10 <sup>5</sup>	2,31x10 <sup>5</sup>	7,70x10 <sup>4</sup>	68,2	2,04x10 <sup>6</sup>	59,7	1,80x10 <sup>6</sup>
CD34+	45,73	1,37x10 <sup>6</sup>	4,57x10 <sup>5</sup>	1,37x10 <sup>5</sup>	4,57x10 <sup>4</sup>	18,8	5,64x10 <sup>5</sup>	46,5	1,40x10 <sup>6</sup>
CD41+CD45-	62,66	1,88x10 <sup>6</sup>	6,27x10 <sup>5</sup>	1,88x10 <sup>5</sup>	6,27x10 <sup>4</sup>	60,72	1,82x10 <sup>6</sup>	59,1	1,77x10 <sup>6</sup>
CD41+CD45+	32,68	9,80x10 <sup>5</sup>	3,27x10 <sup>5</sup>	9,80x10 <sup>4</sup>	3,27x10 <sup>4</sup>	35,14	1,05x10 <sup>6</sup>	32,3	9,70x10 <sup>5</sup>
CD41- CD45+	2,26	6,78x10 <sup>4</sup>	2,26x10 <sup>4</sup>	6,78x10 <sup>3</sup>	2,26x10 <sup>3</sup>	2,58	7,74x10 <sup>4</sup>	2,7	8,10x10 <sup>4</sup>
CD41hi ckit+	21,57	6,45x10 <sup>5</sup>	2,15x10 <sup>5</sup>	6,45x10 <sup>4</sup>	2,15x10 <sup>4</sup>	24,59	7,34x10 <sup>5</sup>	13,65	4,10x10 <sup>5</sup>
CD41hi ckit+ CD34-	8,33	2,50x10 <sup>5</sup>	8,33x10 <sup>4</sup>	2,50x10 <sup>4</sup>	8,33x10 <sup>3</sup>	18,31	5,50x10 <sup>5</sup>	4,04	1,21x10 <sup>5</sup>



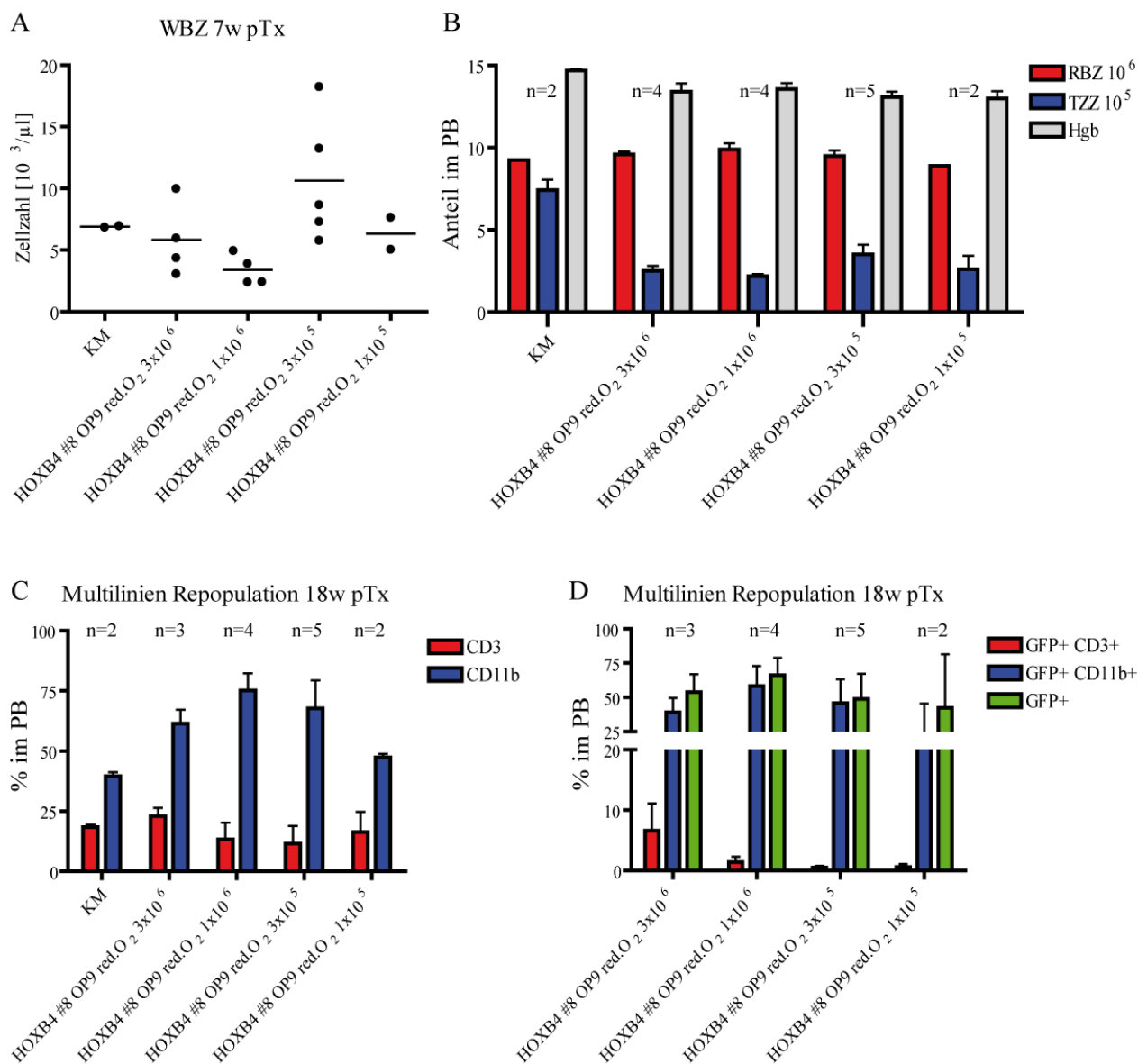
Die erste Blutanalyse im OP9-„Limiting-Dilution“-Tx-Versuch, sieben Wochen nach Tx, ergab wiederum einen mittleren Chimärismus von über 50% in allen Gruppen (Abb. 6.25 A). In der Gruppe mit nur  $1 \times 10^5$  transplantierten, unsortierten ESZ-HZ starben bereits drei Tiere in der 2. Woche pTx (Abb. 6.25 A+E), damit waren wir mit dieser Zelldosis am transplantierbaren Limit. In den übrigen Tieren konnte bereits zu diesem Zeitpunkt eine normwertige Blutrekonstitution mit noch etwas schwankenden WBZ-Werten nachgewiesen werden (Abb. 6.26 A+B). Zum zweiten Blutungszeitpunkt lagen die Chimärismuswerte für die  $3 \times 10^6$  und  $1 \times 10^6$  transplantierten Tiere signifikant höher als in den beiden Gruppen mit den niedrigeren Zelldosen ( $p < 0,05$ ; Abb. 6.25B), doch kam es im weiteren Verlauf zu einer Angleichung der durchschnittlichen Chimärismusraten, mit Zunahme der Streuung. Signifikante Unterschiede konnten nicht mehr errechnet werden (Abb. 6.25 C+D). Im Verlauf dominierte keine Zelldosis mit besonders schwankungsarmer Chimärismusrate (Abb. 6.25.E). Zu dem oft für Endanalysen gewählten Zeitpunkt 18w pTx konnten wir in allen Gruppen ein hohes und stabiles Multiliniengraftment mit Beteiligung der GFP+ Zellen sowohl in den lymphoiden als auch in den myeloischen Zellen für alle Gruppen (Abb. 6.26 C+D) nachweisen. Dass es sich dabei um Langzeit-Multiliniengraftment handelte konnten unsere Endanalysen 24w pTx durch den deutlichen Chimärismus (Abb. 6.25 D), sowie die fortbestehende Beteiligung der GFP+ Zellen am myeloischen und lymphatischen Kompartiment (Abb. 6.27.A+B), bestätigen. Der reduzierte Anteil GFP+ Zellen in der rekonstituierten lymphatischen Fraktion begründete sich wahrscheinlich im bekannten „Vektorsilencing“ dieser Zellpopulation (Cherry *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2008) (Abb. 6.27 B). Eine stabile myeloische, lymphatische und erythroide Rekonstitution konnte auch durch die normwertigen Blutwerte bestätigt werden (Abb. 6.27 C+D). Eine Maus entwickelte gegen Versuchsende eine granulozytäre Leukämie (Abb. 6.27 C), die bisher noch nicht weiter untersucht wurde. In unserem verlängerten Beobachtungszeitraum zeigte sich, dass eine erhöhte Sterblichkeit ca. 20w pTx einsetzte (Abb. 6.27 E). Während frühe Tode (unter fünf Wochen pTx) auf fehlendes Engraftment zurückzuführen waren, konnte für die späteren Todesfälle nur selten eine Todes- bzw. Krankheitsursache festgestellt werden. Die Tiere verstarben trotz einer guten Transgenmarkierung im PB.

Somit konnte auch mit den ESZ-HZ d10 aus der OP9-Kokultur (unter red.O<sub>2</sub>) Langzeit-Multiliniengraftment erzielt werden, das erneut im Langzeitergebnis eine Korrelation zwischen durchschnittlicher Chimärismushöhe und transplantierte CD41hi ckit+ CD34- Zelldosis zeigte (Abb. 6.25 D und Tab. 6.3), mit Ausnahme der unerwartet niedrigen Chimärismusrate der Kohorte mit höchster, transplantierte Zelldosis. Mittels der erstmals mit ESZ-HZ durchgeführten Limiting-Dilution-Tx-Reihe konnten wir zwar durch die Chimärismusverteilung und Sterbefälle (besonders in der Gruppe mit der höchsten Zelldosis) die LT-HZS-Frequenz nicht mittels L-Calc oder ELDA berechnen, aber aufgrund der 2/5 überlebenden, langzeitengrafteten Tiere der untersten Verdünnungsstufe eine Stammzellfrequenz von mind. einer LT-HZS in  $1 \times 10^5$  ESZ-HZ, respektive Einer in 8330 CD41hi ckit+ CD34- Zellen, bestimmen.

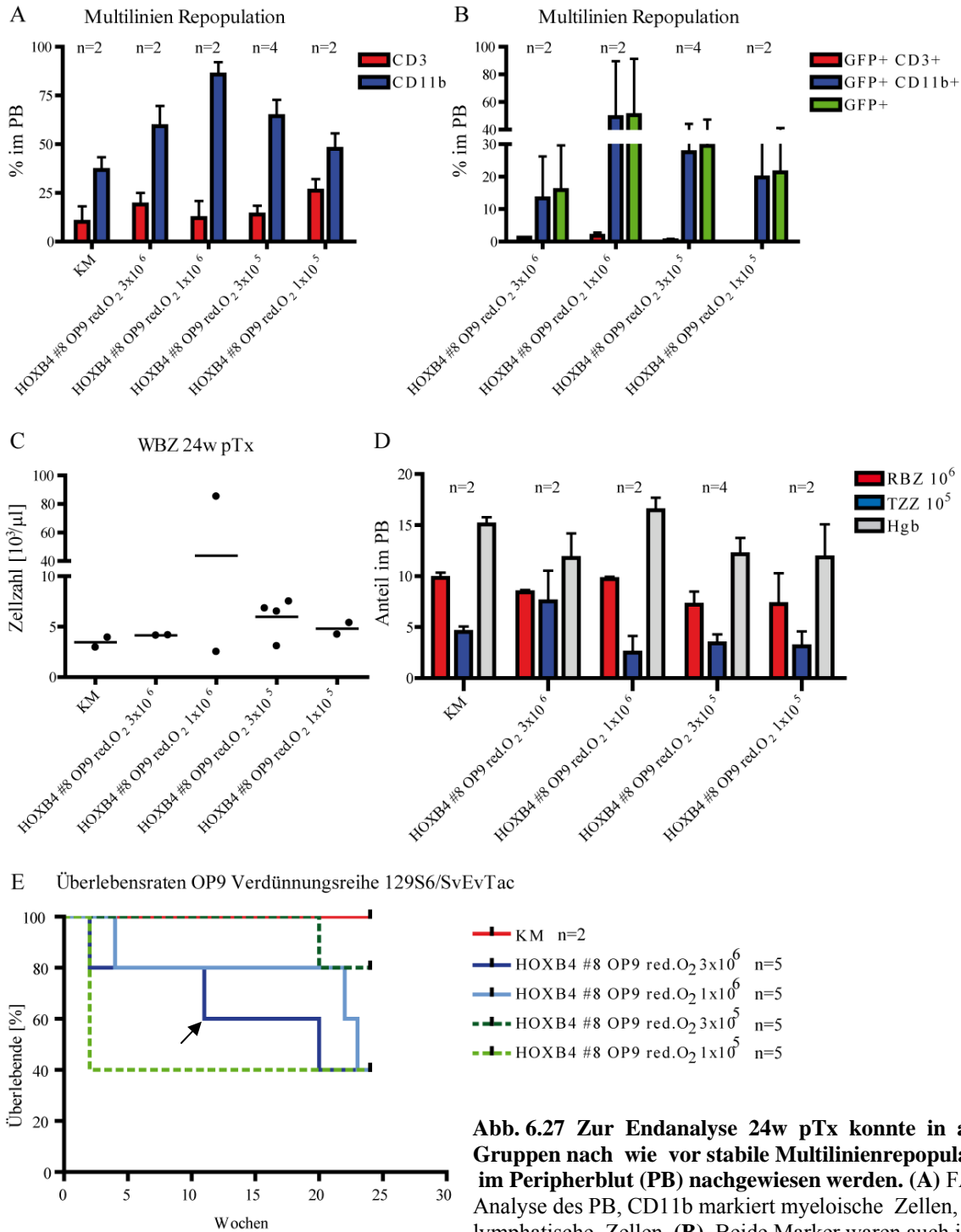




**Abb. 6.25 ESZ-HZ d10 aus der OP9-Kokultur (red.O<sub>2</sub>) erzielen in einer „Limiting-Dilution“-Transplantationsreihe Langzeitengraftment mit signifikantem Chimärismus in letal bestrahlten, immunkompetenten 129S6/SvEvTac-Mäusen.** 3x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 3x10<sup>5</sup> und 1x10<sup>5</sup> ESZ-HZ wurden in jeweils fünf Tiere/Gruppe transplantiert, jeweils 2x10<sup>5</sup> Sca-1-depletierte Knochenmarkzellen (gleichen Mausstamm) wurden als Kompetitoren kotransplantiert. Als Positivkontrolle wurden zwei 129S6/SvEvTac-Mäuse mit je 1x10<sup>6</sup> Knochenmarkzellen transplantiert. **(A)** 7 **(B)** 12 ; Wert in Klammern wurde zwei Tage vor Analysedatum erhoben, da das Tier wegen einer Augeninfektion abgetötet werden musste **(C)** 18 **(D)** 24 Wochen nach Tx wurde Peripherblut (PB) aus dem retro-bulbären Plexus der Mäuse entnommen und auf GFP-Expression via FACS vermessen. Prozentualer Anteil GFP+ Zellen im PB sind pro Tier, pro Gruppe aufgetragen, Mittelwerte sind angezeigt. Gezeigte Chimärismuswerte immer >1%. Signifikanz mittels zweiseitigem, ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur gruppenweise geprüft, \* p< 0.05. **(E)** Anteil GFP positiver Zellen im PB in den einzelnen Tieren im zeitlichen Verlauf dargestellt. pTx: post-Transplantation; w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v])



**Abb. 6.26 Zwischenanalysen des Peripherblutes (PB) ESZ-HZ d10 (OP9-Kokultur, red.O<sub>2</sub>) transplantiert, immunkompetenter 129S6/SvEvTac-Mäuse konnten 7w pTx bereits ein rekonstituiertes Blutbild sowie erfolgreiches Langzeit-Multilinienengraftment (18w pTx) aufzeigen. (A)** Die Anzahlen der weißen Blutzellen (WBZ) unterliegen 7 Wochen nach Tx noch größeren, individuellen Schwankungen, **(B)** erythroide Blutparameter stabil rekonstituiert, Thrombozytenzahl (TZZ) generell in den ESZ-HZ transplantierten Tieren erniedrigt, Mittelwerte aufgetragen, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). **(C)** FACS-Analyse des PB 18w pTx, CD11b markiert myeloische Zellen, CD3 lymphatische Zellen. **(D)** beide Marker auch in der GFP-positiven Fraktion des PB präsent. Mittelwerte sind in C+D aufgetragen, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). pTx: post-Transplantation; w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v]); RBZ: Rote Blutzellzahl; Hgb: Hämoglobin; KM: Knochenmark



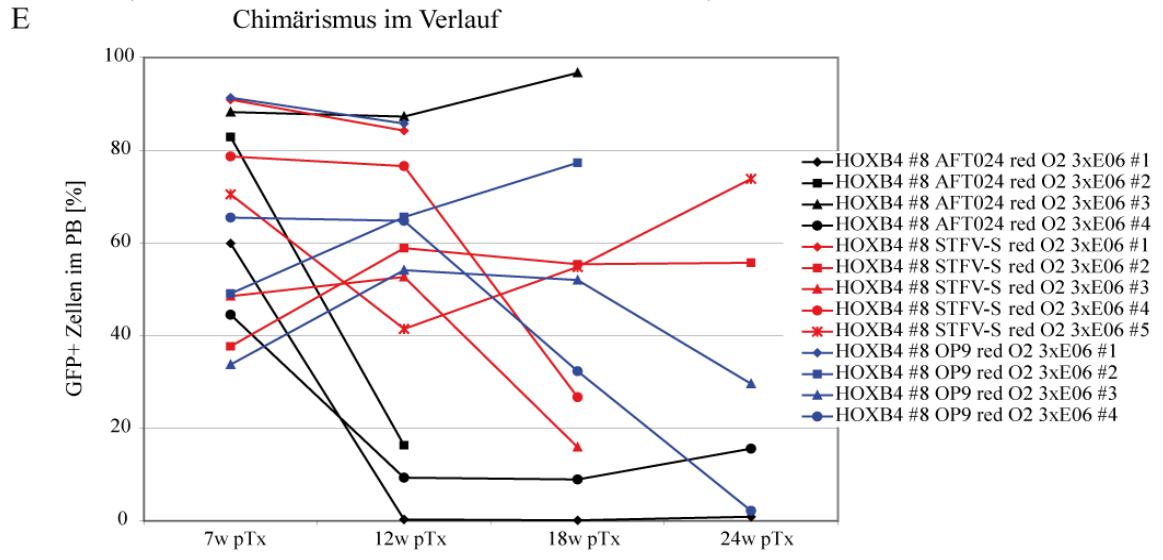
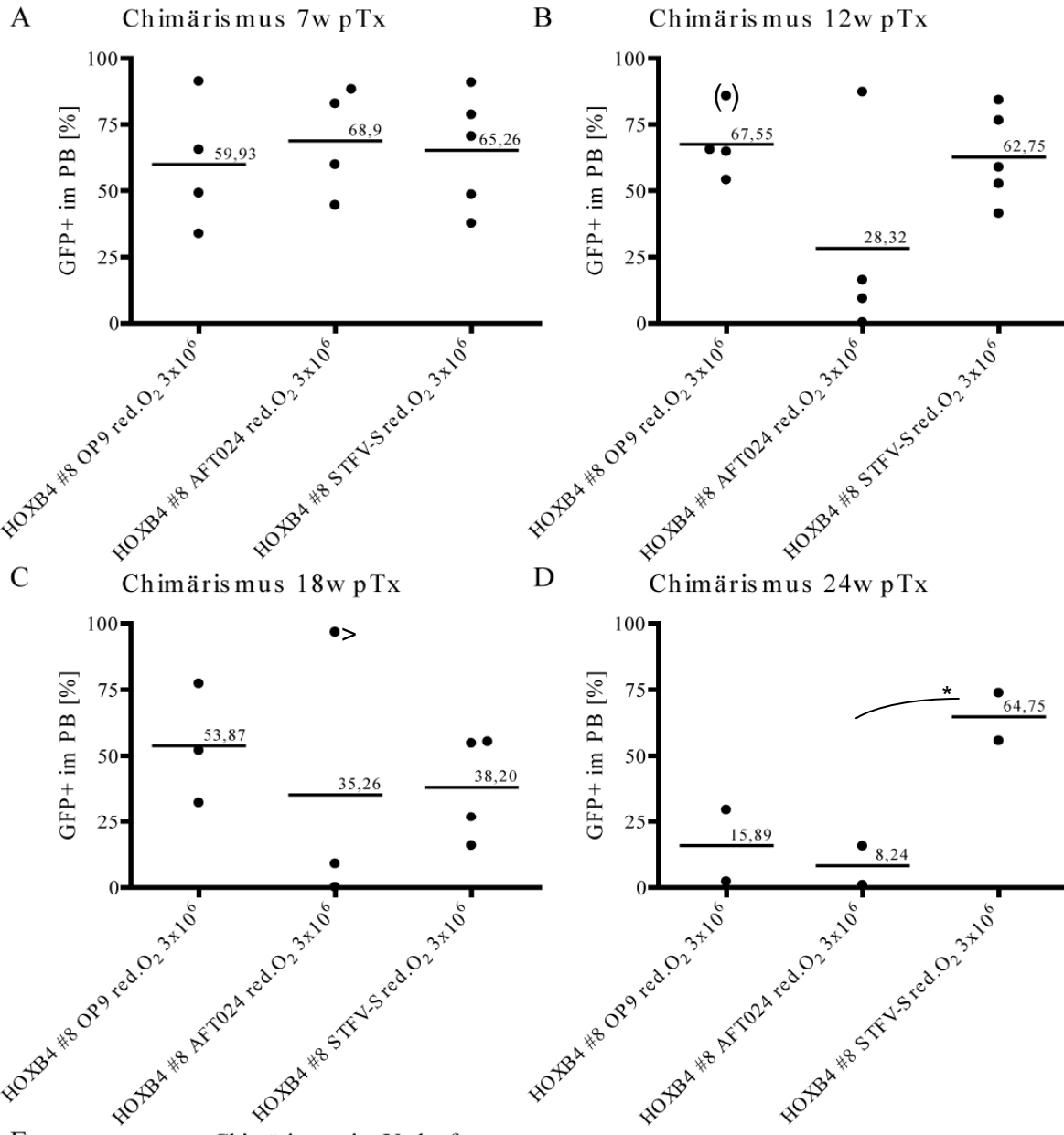
**Abb. 6.27 Zur Endanalyse 24w pTx konnte in allen Gruppen nach wie vor stabile Multilinenrepopulation im Peripherblut (PB) nachgewiesen werden.**

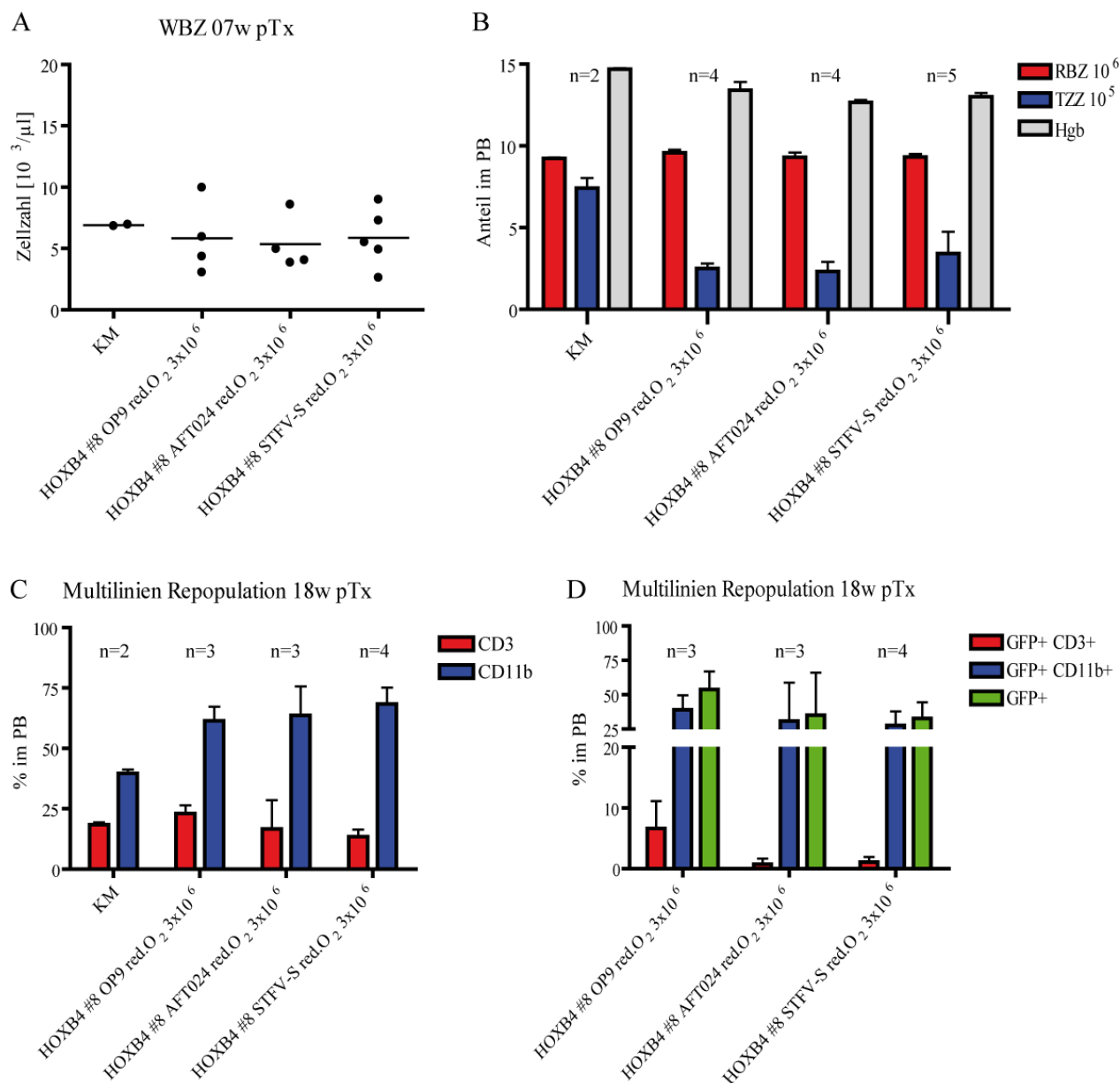
(A) FACS-Analyse des PB, CD11b markiert myeloische Zellen, CD3 lymphatische Zellen. (B) Beide Marker waren auch in der GFP+ Fraktion des PB präsent. (C) Normale Leukozytenzellzahl (WBZ) (bis auf ein Tier mit AML); Mittelwerte sind angezeigt. (D) aufgetragene Mittelwerte der gemessenen PB-Parameter zeigen normalewertige Rekonstitution mit leicht erniedrigter Thrombozytenzahl (TZZ). (E) Kaplan-Meier Graph zeigt Langzeitüberleben ESZ-HZ-transplantiertes, immunkompetenter Mäuse, sowie der transplantierten Knochenmark-Kontrollgruppe (KM), Pfeil markiert wegen Augeninfektion abgetötetes Tier. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) pTx: post-Transplantation; w: Wochen; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v]); RBZ: Rote Blutzellzahl; Hgb: Hämoglobin;

Neben der reproduzierten Engraftmentfähigkeit OP9-kokultivierter ESZ-HZ konnten wir in einer weiteren Transplantationsreihe ebenso die Engraftmentfähigkeit der AFT024 kokultivierten ESZ-HZ in letal bestrahlten, immunkompetenten Empfängermäusen bestätigen (Abb. 6.28 A). Die hier erstmals transplantierten ESZ-HZ aus der STFV-S Kultur (red.O<sub>2</sub>) waren *in vitro* auch ohne Stromaaunterstützung soweit ausgereift, dass sie letal bestrahlte immunkompetente Tiere effizient repopulieren konnten und eine Chimärismusrate von durchschnittlich 65% nach der ersten PB-Analyse aufwiesen (Abb. 6.28 A). Im gesamten Beobachtungszeitraum ergab sich kein Chimärismuschaden der STFV-S-transplantierten Mäuse gegenüber den OP9-Kokultur-transplantierten Mäusen (Abb. 6.28 A-E). Die mit ESZ-HZ der AFT024-Kokultur transplantierten Tiere wiesen hingegen wieder einen stärkeren Chimärismusverlust über die Zeit auf (Abb. 6.28 A-E). PB-Zwischenanalysen zeigten die schnelle Rekonstitution des Blutbildes in allen Gruppen bereits 7 Wochen pTx (Abb. 6.29 A+B) sowie ein Langzeit-Multiliniengraftment mit Beteiligung der GFP+ Zellen in myeloiden als auch lymphoiden Zellen 18 Wochen pTx (Abb. 6.29 C+D). In der über diesen Zeitpunkt hinaus verlängerten Beobachtungsphase konnten wir auch für die STFV-S und AFT024-Kohorten die schon zuvor im OP9-Limiting-Dilution-Experiment beobachtete erhöhte Sterblichkeit ab ca. 20w pTx feststellen (Abb. 6.30 E), wobei in der AFT024 Gruppe ein Tier 18 w pTx wegen einer Augeninfektion abgetötet werden musste, wie schon zuvor ein Tier in der OP9-Kohorte ca. 12w pTx ( in Abb. 6.30 E mit Pfeilen markiert). 24w pTx wiesen alle endanalysierten Tiere nach wie vor Multiliniengraftment (Abb. 6.30 A+B) und normwertige Blutbilder auf (Abb. 6.30 C+D). Die dokumentierten geringen GFP-Level in der rekonstituierten lymphoiden Fraktion (Abb. 6.29 D und 6.30 B) waren wahrscheinlich auf das für Lymphozyten bekannte „Vektorsilencing“ (Cherry *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2008) zurückzuführen, qPCR-Analysen zu dieser Beobachtung stehen momentan noch aus.

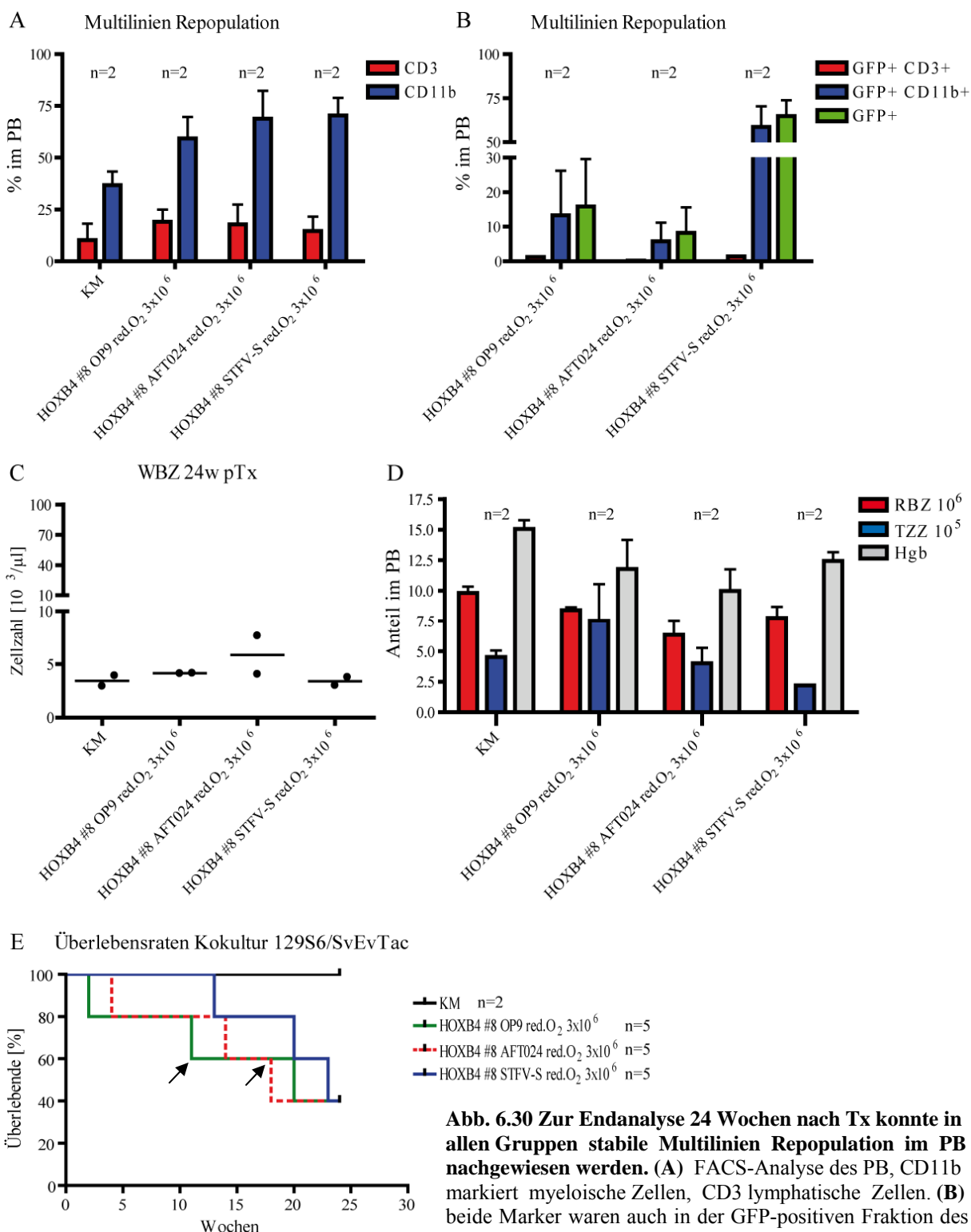
Wiederholt zeigten die AFT024-kokultivierten ESZ-HZ den geringsten Langzeitchimärismus, einen stärkeren Langzeitchimerismus konnten wir erneut mittels OP9-kokultivierten ESZ-HZ erreichen, doch den signifikantesten Chimärismus im PB wiesen die Tiere auf, die ein ESZ-HZ-Transplantat aus der STFV-S-Kultur erhalten hatten. Damit konnte die angestrebte Loslösung vom Kokultivierungssystem durch die STFV-S-Kultur bewerkstelligt werden, in der neu etablierten *in vitro*-Expansion konnten erfolgreich Langzeit-Multiliniengraftment-kompetente ESZ-HSZ generiert werden.

**Abb. 6.28 (nächste Seite) ESZ-HZ d10 aus der OP9- und AFT024-Kokultur, sowie der STFV-S-Suspensionskultur (red.O<sub>2</sub>) erzielen hohen Langzeitchimärismus in immunkompetenten 129S6/SvEvTac-Mäusen.** Jeweils  $3 \times 10^6$  ESZ-HZ sowie  $2 \times 10^5$  Sca-1-depletierte Knochenmarkzellen als Kompetitoren wurden kotransplantiert. (A) 7 (B) 12; Wert in Klammern wurde zwei Tage vor Analysedatum erhoben, da das Tier wegen einer Augeninfektion abgetötet werden musste (C) 18; > markiertes Tier musste zum Analysetag wegen schwerer Augeninfektion getötet werden (D) 24 Wochen nach Tx wurde Peripherblut (PB) aus dem retro-bulbären Plexus der Mäuse entnommen und auf GFP-Expression via FACS vermessen. Prozentualer Anteil GFP positiver Zellen im PB sind pro Tier, je Gruppe aufgetragen, Mittelwerte der Gruppen sind angezeigt. Gezeigte Chimärismuswerte immer >0,1%. Signifikanz mittels zweiseitigem, ungepaarten t-Test (D) mit Welch-Korrektur (A-C) paarweise geprüft; \*:  $p < 0.05$ , Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) (E) Anteil GFP positiver Zellen im PB in den einzelnen Tieren ist im zeitlichen Verlauf dargestellt. pTx: post-Transplantation; w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v])





**Abb. 6.29 Zwischenanalysen des Peripherblutes (PB) 7 bzw. 18 Wochen pTx zeigen frühzeitige Blubild-Rekonstitution durch erfolgte Multilinen-Repopulation.** (A) 7w pTx wurde normwertige weiße Blutzellfraktion in allen Gruppen gemessen (B) 7 pTx waren auch übrigen Blutbildparameter stabil; Mittelwerte aufgetragen (C) FACS-Analyse des PB 18w pTx, CD11b markiert myeloische Zellen, CD3 lymphatische Zellen (D) beide Marker sind auch in der GFP-positiven Fraktion des PB präsent; Mittelwerte sind in C+D aufgetragen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). pTx: post-Transplantation; w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v]); RBZ: Rote Blutzellzahl; Hgb: Hämoglobin; KM: Knochenmark



**Abb. 6.30 Zur Endanalyse 24 Wochen nach Tx konnte in allen Gruppen stabile Multilinen Repopulation im PB nachgewiesen werden. (A)** FACS-Analyse des PB, CD11b markiert myeloische Zellen, CD3 lymphatische Zellen. **(B)** beide Marker waren auch in der GFP-positiven Fraktion des PB präsent. **(C)** Erhalt einer normalen Leukozytenzellzahl (WBZ) zum Endanalysezeitpunkt, Mittelwerte sind angezeigt. **(D)** aufgetragene Mittelwerte der gemessenen PB-Parameter zeigen normalwertige Rekonstitution. **(E)** Kaplan-Meyer-Graph zeigt Langzeitüberleben ESZ-HZ-transplantierte Mäuse, sowie der Knochenmark-Kontrollgruppe (KM), Pfeile markieren wegen Augeninfektion abgetötete Tiere. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) pTx: post-Transplantation; w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; red.O<sub>2</sub>: reduziertes Sauerstoffniveau (5% [v/v]); RBZ: Rote Blutzellzahl; TZZ: Thrombozytenzellzahl; Hgb: Hämoglobin;

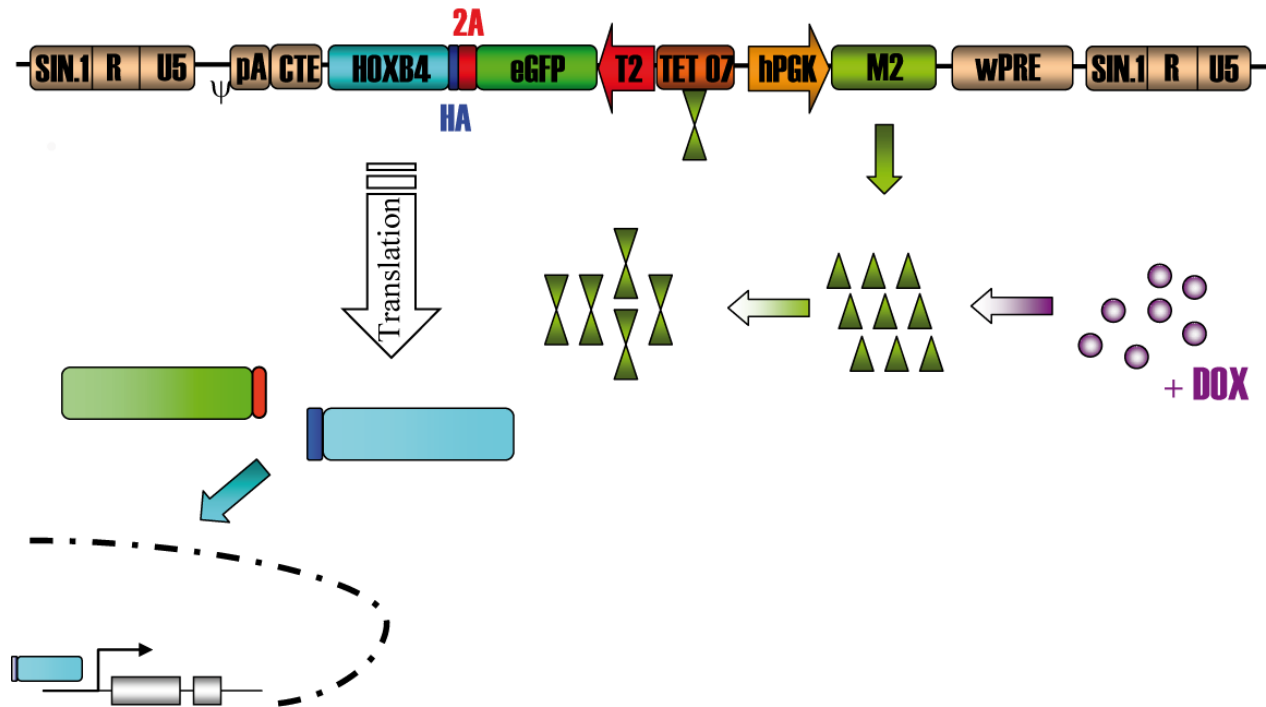


## 6.7 Generierung von Tet-on regulierbaren HOXB4-ESZ-Klonen

Dass das hämatopoetische Potenzial der ESZ-HZ von der HOXB-Expression abhängig ist, konnten Experimente an verschiedenen HOXB4-Klonen von der Arbeitsgruppe um Hannes Klump zeigen (Pilat *et al.*, 2005a). Auch die in den ersten Kapiteln dieser Arbeit gezeigten *in vitro* Ergebnisse bewiesen, dass expandierte ESZ-HZ ohne HOXB4-Transgen keine Kolonien im hämatopoetischen Kolonieessay bildeten. Somit ist die HOXB4-Überexpression für die Expansion der ESZ-HSPZ-Fraktion erforderlich. Allerdings ist noch nicht bekannt, ob HOXB4 auch für die Phase der EB-Differenzierung essentiell ist. Weiterhin verursacht eine dauerhafte HOXB4-Überexpression in den ESZ-HSZ im Rezipienten eine Verschiebung der Rekonstitution in die myeloische Richtung und eine Störung der Lymphopoese (Pilat *et al.*, 2005b). Daher ist es erforderlich ein zeitliches Fenster zu definieren, in dem HOXB4 aktiv sein muss, um eine optimale *in vitro*-Expansion der ESZ-HSPZ zu ermöglichen sowie deren „Homing“ und Engraftment im Rezipienten zu erreichen, das dann aber eine ausgeglichene Rekonstitution zulässt. Die Tet-regulierbare HOXB4-Expression sollte dafür in ESZ etabliert werden. Da eine gezielte und dichte Regulierung für die Definierung von Zeit- und Dosisfenstern unablässig ist, musste eine Selektion auf gut regulierbare ESZ-Einzelklone durchgeführt werden, die dies auch noch nach der hämatopoetischen Differenzierung stabil blieben.

### 6.7.1 All-in-one Vektor

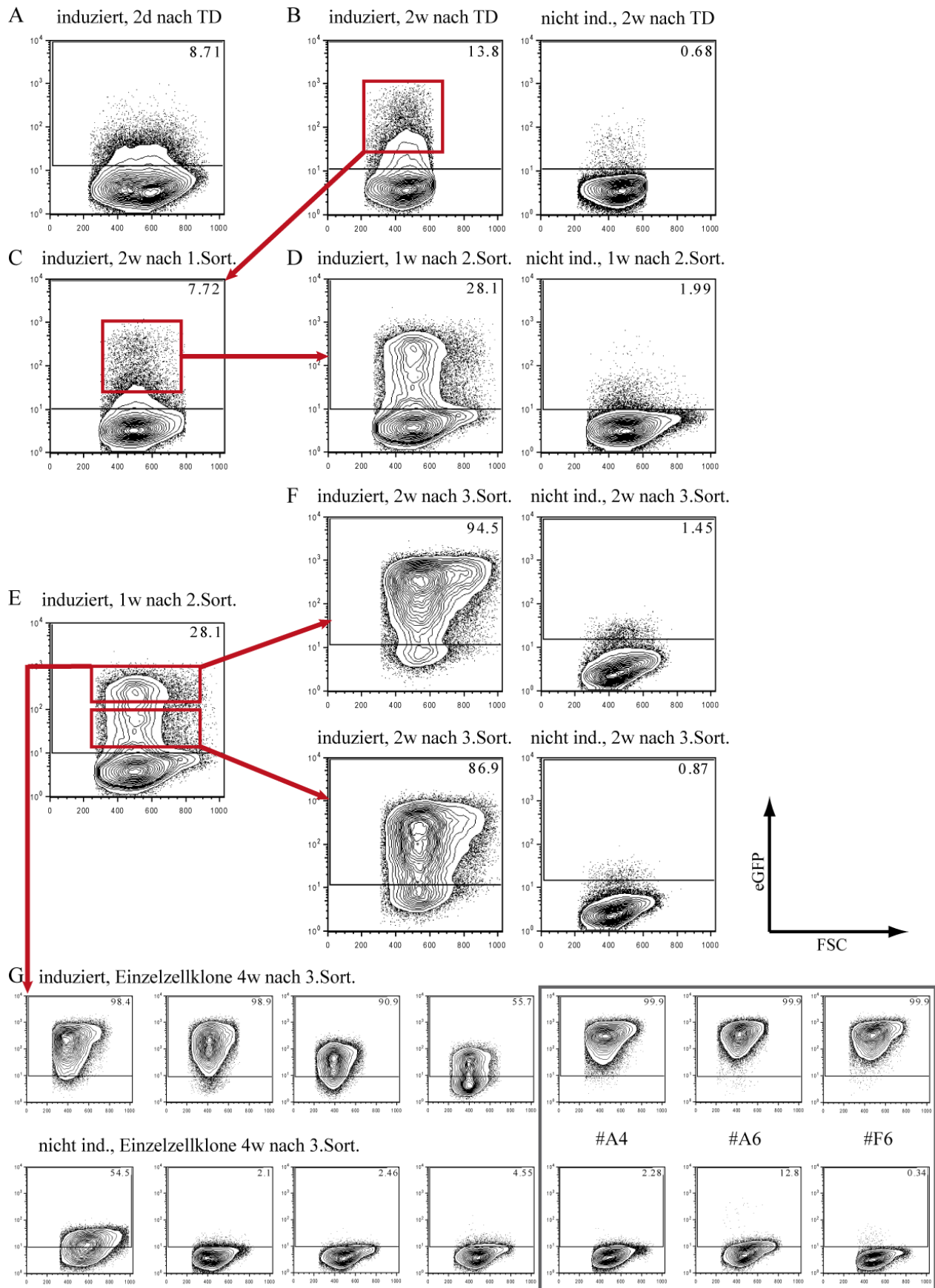
Für die Transduktion der ESZ wurde ein gamma-retroviraler SIN-Vektor verwendet, der zwei entgegengesetzt gerichtete Expressionskassetten beinhaltet (Abb. 6.31). In der 3' Richtung wird unter der Kontrolle des humanen Phosphoglycerat-Kinase-Promotors (hPGK) der Tet-Transaktivator M2 konstitutiv exprimiert, welcher unter Doxycyclin dimerisiert und so den Tet-Operator der 5' orientierten Genkassette binden und aktivieren kann. Hier wird dann der T2-Minimalpromotor aktiviert über den die Expression der eGFP-2A-HA-HOXB4-Genkassette gesteuert wird. Bei der Translation der Transgenkassette kommt es zur 2A-vermittelten äquimolaren Separation der Proteine eGFP und HA-HOXB4. Während eGFP im Zytoplasma verbleibt und dort als Reporter dient, wird der Transkriptionfaktor HOXB4 in den Zellkern transportiert. Dieser „All-in-one-Vektor“ wurde von Niels Heinz generiert und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt (Heinz *et al.*, 2010).



**Abb. 6.31** Dargestellt ist das integrierte Provirus des gamma-Retro-, „Tet-on-All-in-one-Vektors“ (Heinz *et al.*, 2010). In 3' Richtung kodiert es für eine Sequenz die mittels des humanen Phosphoglycerat-Kinase-Promotors (hPGK) für eine konstitutive Synthese des Tet-Aktivators-M2 sorgt, dieser dimerisiert bei Doxycyclinzugabe, kann so das „Tet-responsive-element-TetO7“ binden, welches dann in 5' Richtung den Minimalpromotor-T2 aktiviert, welcher die Transkription der eGFP-2A-HA-HOXB4-Transgenkassette initiiert. Während der Translation der mRNA der Transgenkassette kommt es zur kotranslationalen Separation der Proteine eGFP und HA-HOXB4 über die FMDV-2A Sequenz, die Proteine liegen im äquimolaren Verhältnis in den Zellen vor. eGFP verbleibt im Zytoplasma und fungiert als Reporter für die HOXB4-Expression, HOXB4 wird in den Zellkern transportiert. GFP: Grün fluoreszierendes Protein; pA: Polyadenylierungssignal; DOX: Doxycyclin; CTE: konstitutives Transportelement; U3: einzigartiges 3' Ende; R: redundante Region; U5: einzigartiges 5' Ende; 2A: Esterasesequenz;  $\psi$ : Verpackungssignal; wPRE: „woodchuck“-post-regulatives Element; HA: Hämagglutinin-Markierung

### 6.7.2 Retrovirale Transduktion (TD)

Ecotrop verpackte Viruspartikel des gamma-Retro-Tet-on-All-in-One-Vektors wurden mit 10 infektiösen Partikeln/Zelle (MOI 10) im Zentrifugationsverfahren in  $3 \times 10^5$  CCE-ESZ transduziert. Direkt nach der Transduktion mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Doxycyclin (DOX) induziert und zwei Tage später auf GFP-Expression via FACS vermessen. Dabei wurde eine Transduktionsrate von rund 9% erreicht (Abb. 6.32 A).



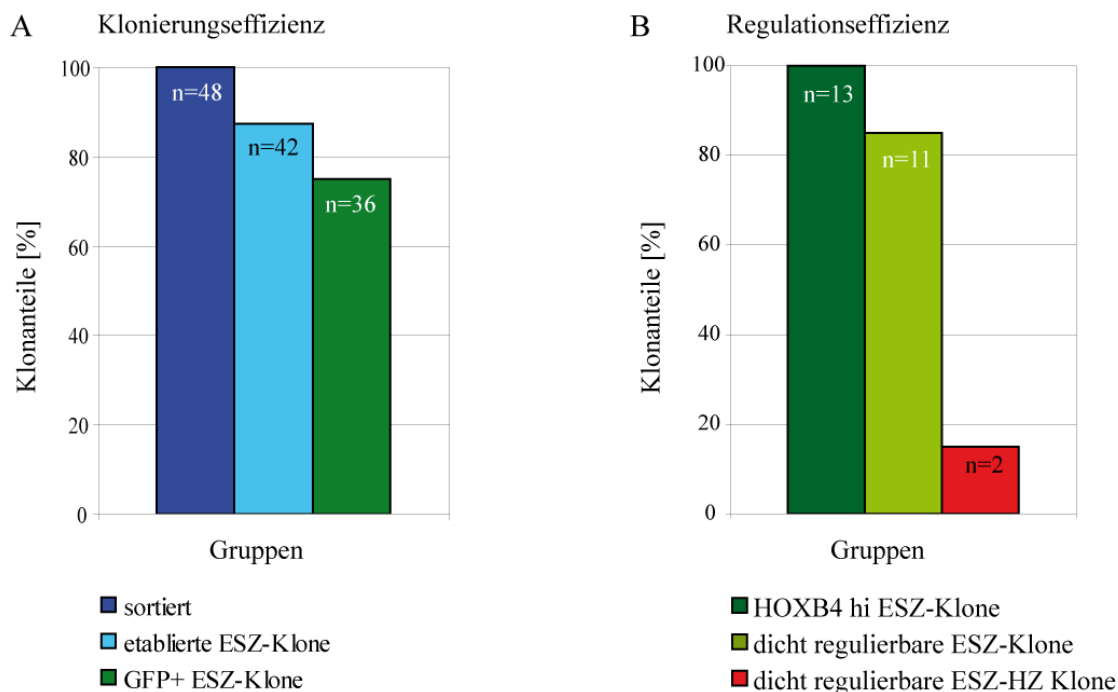
**Abb. 6.32 Doxycyclin-induzierbare HOXB4-transgene ES-Einzell-Klone konnten nach drei FACS-Sortierungszyklen etabliert werden.** CCE-Zellen wurden mit ecotropen Viruspartikeln des Tet-on „All-in-One“ Vektors (Abb. 6.31) transduziert und mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. Die Transduktionseffizienz wurde zwei Tage später per FACS gemessen (A). Die ESZ wurden für zwei Wochen induziert weiterkultiviert, ein Splitt 3 Tage vor der anstehenden FACS-Messung „ausgeschaltet“ (Doxycyclin wurde aus dem Medium entfernt). (B) FACS-Messung auf GFP-Expression. Die GFP-hochexprimierenden Zellen (rotes Rechteck in B) wurden per FACS sortiert, für weitere zwei Wochen induziert und expandiert, dann wieder GFP-Level per FACS gemessen. (C) Erneut wurden die GFP-hochexprimierenden Zellen (rotes Rechteck in C) per FACS herausortiert, induziert expandiert, ein Splitt 3 Tage vor nächster FACS-Kontrolle „ausgeschaltet“. (D) Eine Woche nach der letzten Sortierung erneut im FACS vermessen. (E) Die GFP-positiven ESZ aus D wurden mittels FACS als hoch und niedrig GFP-exprimierende Fraktionen sortiert (rote Rechtecke in E) sowie 48 Einzelzellen aus der GFP hochexprimierenden Fraktion in eine 48 Well-Platte sortiert. Die sortierten Massenkulturen wurden für 2 Wochen induziert expandiert, ein Splitt 3 Tage vor FACS-Messung „ausgeschaltet“, (F) GFP-Level in den ESZ-Massenkulturen, nach dreimaliger FACS-Sortierung. (G) Sortierte Einzelzellen wurden 4 Wochen expandiert, währenddessen mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert, ein Splitt drei Tage vor FACS-Messung „ausgeschaltet“. GFP-Expressionslevel sind in induzierten Klone unterschiedlich, sowie die Hintergrundexpression in den „ausgeschalteten“ Parallelkulturen. Die 3 Klone im grauen Rahmen zeigen 100% GFP-Expression, sowie geringen Hintergrund im „ausgeschalteten“ Zustand. w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; TD: Transduktion; ind.: induziert; Sort.: Sortierung

### 6.7.3 Einzellsortierung, Expansion und Klonstatistik

Der Anteil GFP+ Zellen betrug zwei Wochen nach TD unter induzierter Expansion rund 14%, ein Splitt der Massenkultur wurde drei Tage vor der FACS-Analyse ohne DOX weiterkultiviert, er ließ sich bis auf einen geringen Hintergrund „ausschalten“ (Abb. 6.32 B). Bis zu einer stabil transgenen Subpopulation in der Massenkultur mussten die transduzierten ESZ noch zweimal sortiert werden (Abb. 6.32 B+E). Danach wurden die ESZ in einer weiteren Sortierung nach ihrer GFP-Expressionshöhe in zwei Gruppen aufgeteilt, hoch- und niedrigexprimierende ESZ, zusätzlich wurden aus der hochexprimierenden Fraktion 48 Einzelzellen in eine 48 Well-Platte sortiert (Abb. 6.32.E). Beide Massenkulturen blieben nun nach zweiwöchiger Expansion fast vollständig GFP+, der Hintergrund war in den „ausgeschalteten“ Splitts gering (<1%; Abb. 6.32 F). Die sortierten Einzelzellen wurden vier Wochen lang zu einer klonalen Kultur expandiert, die Klonierungseffizienz lag bei 87,5% und bei 75% für GFP+ Klone (Abb. 6.33 A). Diese wiesen ein großes Spektrum an unterschiedlicher Regulierbarkeit auf (Abb. 6.32 G). Von den 13 GFP/HOXB4 hochexprimierenden ESZ-Klonen (HOXB4hi) wiesen nur 11 eine dichte Regulierbarkeit auf (darunter auch die drei 100% GFP-positiven Klone A4, A6 und F6 [Abb. 6.32 G grauer Rahmen]). Sie wurden ausgewählt und im induzierten Zustand einer EB-Differenzierung (unter Serum-Bedingungen) unterzogen. Die an Ebd6 dissoziierten Zellen wurden auf GFP-Expression im FACS vermessen, auch hier wiesen die Zellen unterschiedliche Level der GFP-Expression auf, wobei nur noch vier Klone einen signifikanten Anteil aufwiesen (Abb. 6.34 A). Diese Klone wurden für 30 Tage induziert unter Standardbedingungen expandiert, jeweils ein Splitt drei Tage vor der Analyse“ ausgeschaltet“. Klon C4 wies gar keine und Klon A4 nur noch einen geringen Teil GFP+ Zellen im induzierten Zustand auf. Lediglich die zwei Klone A6 und F6 wiesen eine dominante (über 87%) GFP-positive, induzierte

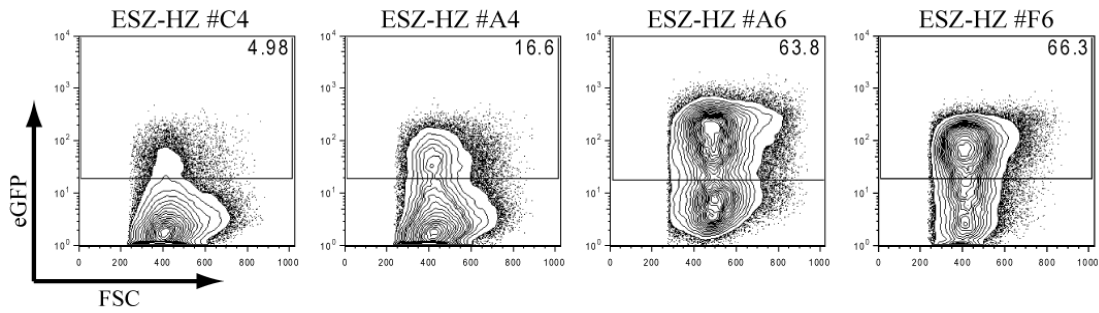
Zellpopulation auf, die sich bis auf einen schwachexprimierenden Hintergrund auch wieder „ausschalten“ ließen (Abb. 6.33 B und Abb. 6.34 B). Diese beiden Klone wurden im induzierten und nicht induzierten Zustand für weitere 29 Tage expandiert. Die anschließende FACS-Analyse ergab stabile Regulation in beiden Klonen, wobei sie im Klon F6 dichter reguliert war (Abb. 6.34 C oben). Eine starke hämatopoetische (CD41hi) Population konnte im induzierten Zustand in beiden Kulturen detektiert werden. Im nicht induzierten Zustand fehlte die CD41hi-Subpopulation, nur mittelhoch exprimierende ESZ-HZ wurden detektiert. Für den Klon A6 wurde eine Reifungsblockade, besonders im induzierten Zustand, festgestellt, er konnte keine/kaum CD45+ Zellen bilden, welche im Klon F6 deutlich vorhanden waren (Abb. 6.34C unten).

Es konnten aus den 48 sortierten Einzelzellen 42 Klone etabliert werden, von denen 36 auf ESZ-Ebene GFP+ waren, 11 davon gut regulierbar. Aber lediglich zwei dieser Klone waren auch auf ESZ-HZ Ebene dauerhaft regulierbar und nur Einer wies eine normale hämatopoetische Entwicklung *in vitro* auf (Abb. 6.33 und 6.34 C).

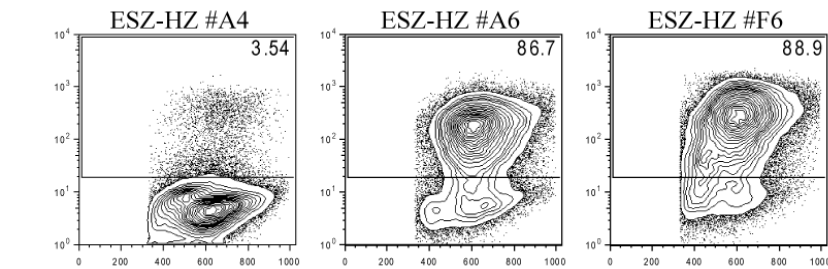


**Abb. 6.33 Effizienz der Ausklonierung von Doxycyclin-regulierbaren HOXB4-transgenen ESZ-Klonen, und davon abgeleiteten ESZ-HZ.** (A) Per FACS-Sortierung wurden 48 Einzelzellen in eine 48-Well-Platte abgelegt. 42 Klone sind angewachsen wovon 36 transgenpositiv (GFP/HOXB4) waren. Die resultierende Klonierungseffizienz lag damit bei 75%. (B) 13 GFP/HOXB4 hochexprimierende ESZ-Klone wurden ausgewählt, mit und ohne Doxycyclin kultiviert und ihre Regulierbarkeit via FACS überprüft. Die 11 dicht regulierbaren ESZ-Klone wurden der hämatopoetischen Standard-Differenzierung unterzogen, die ESZ-HZ mit und ohne Doxycyclin weiterkultiviert und ihre Regulierbarkeit per FACS analysiert. Zwei Klone wiesen eine gute Regulierbarkeit auch noch nach der Differenzierung auf, damit lag die Regulationseffizienz bei 15%. n: Anzahl; hi: hoch exprimierend; GFP: Grün fluoreszierendes Protein;

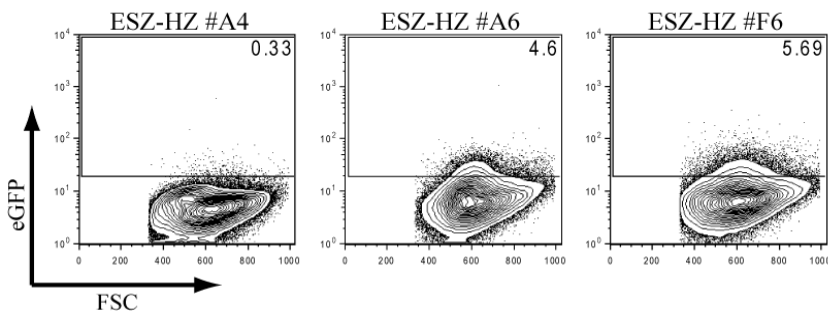
A induziert, ESZ-HZ d0/EBd6



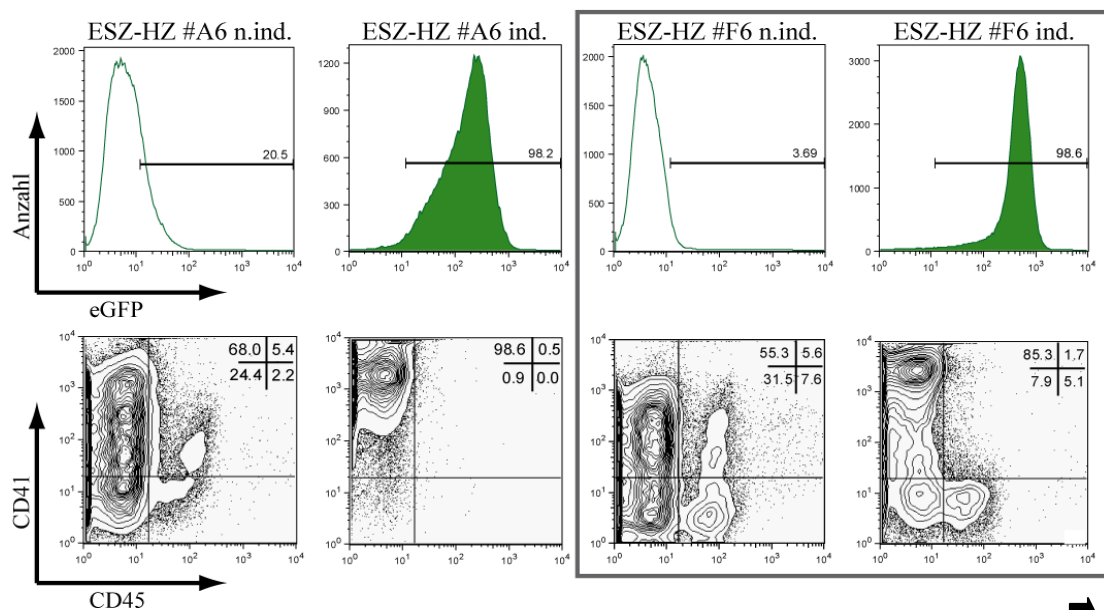
B induziert, ESZ-HZ d30/EBd6



nicht ind., ESZ-HZ d30/EBd6



C nicht ind. vs. induziert ESZ-HZ d59/EBd6

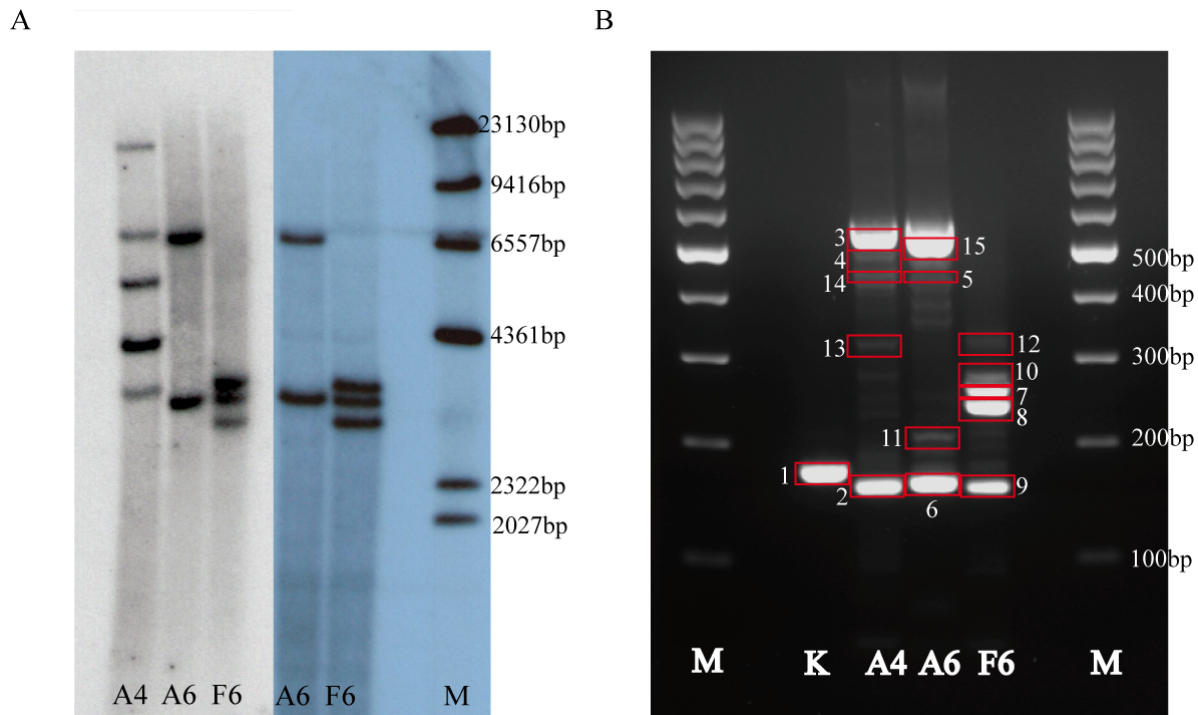


**Abb. 6.34 Zwei von elf Doxycyclin-induzierbaren HOXB4-ESZ-Klonen blieben auch nach der hämatopoetischen Differenzierung gut regulierbar.** (A) Die GFP-Expressionslevel sind an EBd6 sehr unterschiedlich, vier repräsentative Klone sind gezeigt, die höchste Expression zeigen die auf ESZ-Ebene auch am höchsten exprimierenden Klone (Abb. 6.x grauer Rahmen). (B) Nach 30 Tagen Expansion unter Standardbedingungen blieben drei Klone regulierbar, davon nur 2 auf zufrieden stellendem Niveau. (C) FACS-Analyse der weiter expandierten ESZ-HZ-Klone (d59) zeigt dichte Regulation nur für den Klon F6 (Histogramme). Hämatopoetische Zellen (CD41+) werden in allen Fällen generiert, die CD41 hoch exprimierende Zellen (CD41<sup>hi</sup>) bevorzugt unter HOXB4-Induktion. Allerdings kommt es im Klon A6 besonders im induzierten Zustand nicht zur Ausreifung der Zellen, CD45 kann kaum bis gar nicht detektiert werden. Klon F6 (grauer Rahmen) entspricht den Erwartungen und wurde daher für die weiteren Experimente verwendet. w: Wochen; d: Tag; GFP: Grün fluoreszierendes Protein; TD: Transduktion; ind.: induziert

#### 6.7.4 Integrationsstellenanalyse

Aufgrund der unterschiedlichen Regulierbarkeit der generierten Tet-on HOXB4-ESZ-Klone und der nur zwei verbliebenen auf ESZ-HZ-Ebene dicht regulierbaren Klone, war unsere Hypothese ein sehr unterschiedliches retrovirales Integrationsmuster, dass anfällig für die chromosomalen Umarrangierungen während und nach der Differenzierung ist und zum Abschalten des integrierten Vektors („*silencing*“) führen kann. Daher haben wir während der Expansionsphase der Klone A4, A6 und F6 eine Southern-Blot-Analyse hinsichtlich der Integrationsstellen durchgeführt. Die Analysen für die Klone A6 und F6 wurden zu einem späteren Zeitpunkt reproduziert (Abb. 6.35 A). Der Verdau der gDNS erfolgte im ersten Lauf mit *Bgl*III und im Zweiten mit *Bam*HI, beide Analysen haben eindeutig zwei Integrationsstellen für #A6 und drei Integrationsstellen für #F6 detektiert. Auch die anschließend durchgeführte ligationsvermittelte PCR (LM-PCR) bestätigte die Anzahlen der Integrationen und über die sequenzierten, subklonierten PCR-Fragmente ermittelten wir die genaue Position der Integrationen (Abb. 6.35 B). Im Abgleich der Sequenzen mit der BLAST-Datenbank (Version: MouseNCBI\_37) war es möglich die chromosomale Umgebung der Integrationsstellen zu ermitteln (Zhang *et al.*, 2000). Keiner der untersuchten drei Klone wies eine Integration in einem Gen auf.





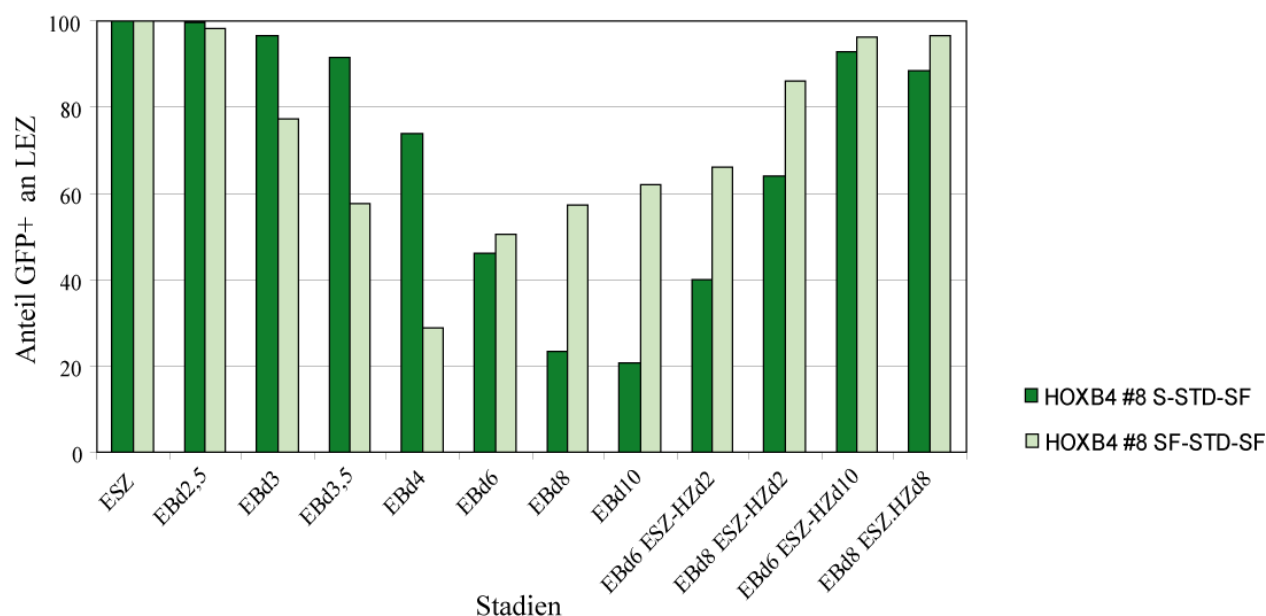
**Abb. 6.35** In den ausgewählten regulierbaren ESZ-Klonen konnten die retroviralen Integrationsstellen mittels Southern Blot und LM-PCR quantifiziert werden. (A), linker Blot – genomische DNS wurde mit *Bgl*II geschnitten, rechter Blot mit *Bam*HI, Detektion erfolgte mittels  $^{32}$ P-dCTP markierter PRE-Element-Sonde, der Marker lambda-*Hind*III (M), wurde ebenso radioaktiv markiert und ist als Längenstandard im rechten Blot aufgetragen. Die Blots wurden für 24h auf einen Röntgenfilm aufgelegt und dann entwickelt. (B) Die Lokalisation der Integrationsorte wurde mittels LM-PCR mit anschließender Subklonierung der ausgewählten Fragmente (rote Boxen) in den pCR2.1-Vektor und anschließender Sequenzierung und Abgleich mit der BLAST-Datenbank (Version: MouseNCBI\_37) ermittelt. Die genomische DNS wurde hierfür mit *Hae*III geschnitten, als Marker wurde ein 100bp-Längenstandard aufgetragen. Die prominente Bandenanzahl stimmte für die Klone A6 und F6 mit dem Southern Blot Ergebnis überein, die Sequenzierung der schwachen Banden ergab, dass es sich um kürzere PCR-Fragmente, der bereits in den starken Banden detektierten Integrationen handelte. In der Kontrolle (K) ist es zur Generierung eines zufälligen Polynukleotids während der PCR gekommen, das keine Sequenzübereinstimmung in der BLAST-Datenbank aufwies.

## 6.8. HOXB4 wird während der EB-Differenzierung nicht benötigt, ist aber für die hämatopoetische Entwicklung in der Expansionsphase essentiell

Im Experiment, das die Serum-EB-Differenzierung mit der serumfreien-EB-Differenzierung verglich, wurden auch während der EB-Entwicklung engmaschige FACS-Analysen durchgeführt. Dabei beobachteten wir, dass der Anteil GFP+ Zellen und damit respektive auch HOXB4+ Zellen in den sich entwickelnden EBs im Verlauf reduziert wurde und in der angeschlossenen Expansionsphase (nach der EB-Dissoziation) wieder anstieg. Dabei gab es eine unterschiedliche Kinetik in den beiden Ansätzen (Abb 6.36). Die Reduktion GFP+ Zellen erfolgte unter serumfreien Bedingungen schneller als unter Serumeinfluss. Das erneute Ansteigen der GFP+ Population setzte unter serumfreien Bedingungen bereits



um den EB d5 wieder ein und damit wesentlich zeitiger als unter Serumbedingungen. Ein vermehrtes Zellsterben hatte es aber zu keinem Zeitpunkt in den Kulturen gegeben. Diese Beobachtungen machten wir mit dem #8, damit handelte es sich um eine Gegenregulation gegen konstitutiv überexprimiertes HOXB4. Dies bestärkte die Hypothese, dass HOXB4 während der EB-Differenzierung nicht benötigt wird, seine Expression vielleicht sogar eher kontraproduktiv ist.



**Abb. 6.36 GFP/HOXB4 wurde während der EB-Differenzierung im Serum- sowie serumfreien-System herunterreguliert und in der anschließenden Expansionsphase wieder in allen Zellen exprimiert.** FACS-Analysen zu den angegebenen Entwicklungsstadien zeigten eine zeitigere und schnellere Reduktion der GFP+ Zellen in der serumfreien EB-Kultur, sowie eine zeitigere und stärkere Rekonstitution der GFP/HOXB4-Expression in der angeschlossenen Expansion. Die Expansion der an EB d6 bzw. EB d8 dissoziierten Zellen wurde in allen Fällen unter Standardbedingungen (STD-SF) durchgeführt. (LEZ: lebende Einzelzellen; S: Serum; SF: serumfrei; GFP: Grün fluoreszierendes Protein)

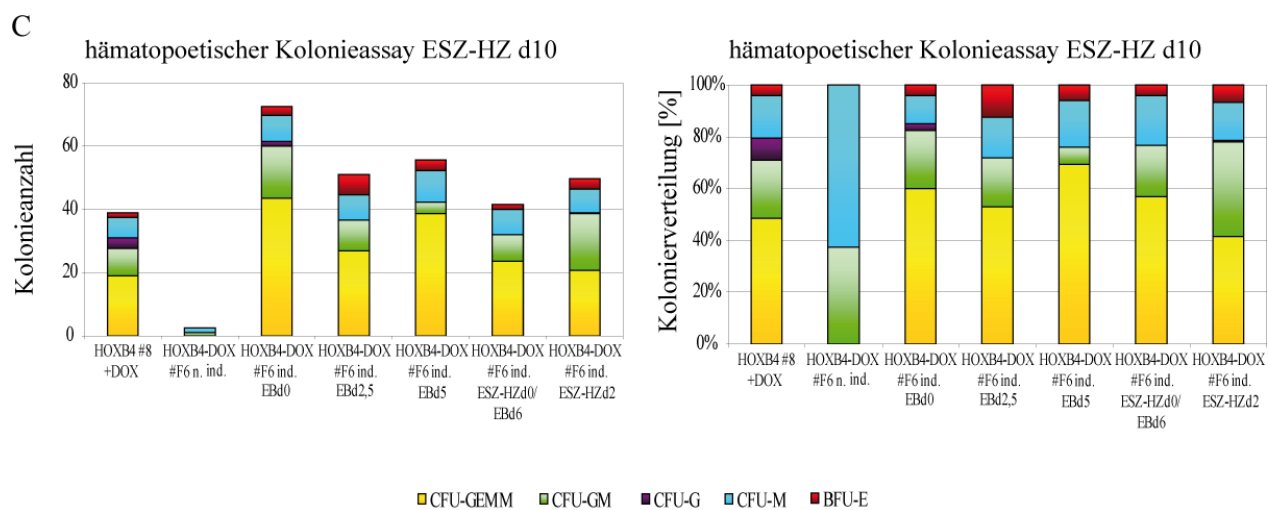
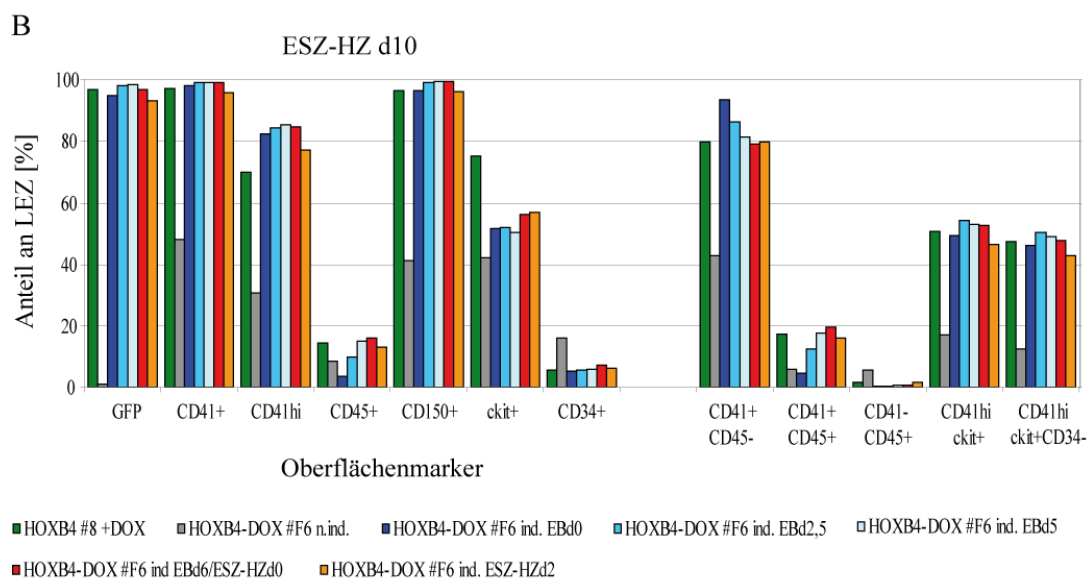
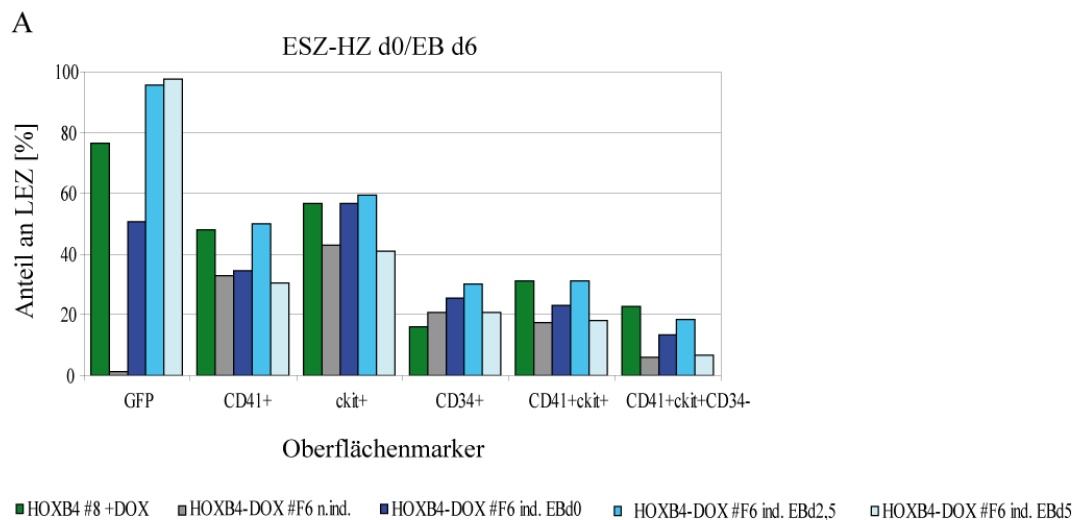
Aus diesem Grund wurde in einer weiteren hämatopoetischen Differenzierung der Tet-on regulierbare #F6 verwendet, der es ermöglichte die HOXB4-Expression vor, während oder nach der EB-Differenzierung zu induzieren, oder eben auch nicht. Um etwaige Doxycyclineffekte auszuschließen wurde der konstitutive #8 unter DOX-Zugabe parallel mitgeführt. Für die Differenzierung des Tet-on- regulierbaren #F6 verwendeten wir die neu etablierte serumfreie EB-Differenzierung mit anschließender Expansion in STFV-S-Suspensionskultur unter reduziertem Sauerstoffniveau. Wir konnten in den vorangegangenen Kapiteln zeigen, dass dieses potente Verfahren ESZ-HZ generiert die einen großen Anteil HSPZ beinhalten und in der Lage sind, in letal bestrahlten immunkompetenten Empfänger-mäusen Langzeit-Multiliniengraftment mit einer signifikanten Chimärismusrate zu erzielen.

Nach der EB-Dissoziation d6 wurden die Ansätze erstmalig per FACS analysiert, dazu wurde wieder das etablierte Set an Antikörpern verwendet, um die frühe hämatopoetische Entwicklung zu charakterisieren (Abb. 6.37 A). Der konstitutive #8, sowie der induziert in die EB-Differenzierung gegangene #F6 (ind. EBd0) zeigten wieder die erfolgte HOXB4-Gegenregulation (erniedrigte GFP-Level), diese Herunterregulation fand nicht in den an EB d2,5 und EB d5 induzierten Ansätzen statt. Der Anteil an CD41+ Zellen war in den Ansätzen #8 und #F6 induziert an EB d2,5 am größten, doch die hämatopoetische Entwicklung war auch in allen übrigen Ansätzen initiiert worden. Zu diesem frühen Analysezeitpunkt gibt es noch keine CD41 hochexprimierende Subpopulation, daher wurde die Subpopulation CD41+ ckit+ CD34- statt CD41hi ckit+ CD34- untersucht. Die größten Defizite in dieser Subpopulation wiesen dabei der gar nicht induzierte und der spät (EBd5) induzierte Ansatz auf. Die dissoziierten EB-Zellen wurden dann der STFV-S-Expansion unter red.O<sub>2</sub> unterzogen, dabei wurde ein weiterer Parallelansatz geschaffen, in dem zuvor nicht induzierte ESZ-HZ des #F6 am zweiten Expansionstag induziert wurden, alle übrigen Ansätze wurden seit ihrer erstmaligen Induktion induziert weitergeführt. Nach der 10tägigen Expansionsphase wurden die ESZ-HZ in Methylzelluloseassays ausgesät sowie erneut per FACS analysiert, auch hier wurde das etablierte Oberflächenmarker-Profil untersucht. Die verschiedenen Ansätze erreichten zu diesem Zeitpunkt eine relative Uniformität mit nur kleineren Schwankungen, mit Ausnahme des nicht induzierten Ansatzes (Abb. 6.37 B). Dieser wies eine schwächere und weniger reife hämatopoetische Entwicklung auf. Die fehlende HOXB4-Überexpression führte zu einer drastischen Reduzierung der CD41hi-Fraktion, sowie einer deutlichen Reduktion der CD150 Expression und somit zu einem besonders deutlichen Rückstand in der HSPZ (CD41hi ckit+ CD34-)-Fraktion. Die acht Tage später ausgewerteten Kolonieassays bestätigten das geringe Progenitorenpotenzial der nicht HOXB4-induzierten Kultur (Abb. 6.37 C). Die zum Zeitpunkt der EB-Dissoziation noch herrschenden unterschiedlichen Entwicklungsgrade konnten nach einer 10tägigen Expansionsphase weitestgehend ausgeglichen werden. Selbst die späte HOXB4-Induktion an ESZ-HZ d2 führte noch zu einer fast gleichwertigen hämatopoetischen Entwicklung wie in den früher induzierten Ansätzen. Allerdings war zu beobachten, dass mit immer späterer Induktion sich besonders die HSPZ-Fraktion schrittweise reduzierte. Dies spiegelte sich verstärkt durch den stetig absinkenden CFU-GEMM-Gehalt der später induzierten Ansätze in den Kolonieassays wieder (Abb. 6.37 C). Auch wenn der ESZ-HZ d2 induzierte Ansatz des #F6 noch ebenso viele CFU-GEMM generierte wie der konstitutive #8, so handelte es sich doch um eine Halbierung der frühesten Progenitoren im Vergleich zum dauerhaft induzierten oder spätestens EB d5 induzierten Ansatz. Dieses wesentlich stärkere Progenitorenpotenzial des #F6 gegenüber dem #8 war den FACS-Analysen nicht zu entnehmen.

Insgesamt wurde trotz einer an EB d6 ungleichen Ausgangslage der zeitlich unterschiedlich induzierten Ansätze, nach einer 10tägigen Expansionsphase eine annähernd gleich große HSPZ-Population generiert,

mit leicht sinkender Tendenz je später (EB d6, ESZ-HZ d2) die HOXB4-Induktion erfolgte. In den Kolonieassays konnten wir aber zeigen, dass diese heterogene CD 41<sup>hi</sup> ckit<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> Subpopulation trotz relativ gleicher Größe ein unterschiedliches hämatopoetisches Potenzial aufwies. Der #F6 (induziert EB d0) erreichte einen mehr als doppelt so hohen Anteil frühester Progenitoren als der #8. Entsprechend reichte eine Induktion der HOXB4-Expression im #F6 an ESZ-HZ d2 noch aus, um das gleiche hämatopoetische Potenzial des #8 zu erreichen. Keine wesentlichen Unterschiede im CFU-GEMM-Anteil konnten zw. der dauerhaften Induktion bzw. der Induktion an EB d5 ermittelt werden. Eine HOXB4-Induktion an EB d6 reduzierte hingegen den CFU-GEMM-Anteil deutlich. Das Fehlen der HOXB4-Überexpression reduzierte die HSPZ-Subpopulation sowie das Koloniebildungspotenzial drastisch und führte zum vollständigen Verlust von CFU-GEMM.

**Abb. 6.37 (nächste Seite) Ohne HOXB4-Überexpression war die hämatopoetische Entwicklung gestört, konnte aber effizient gewährleistet werden bei einer HOXB4-Induktion spätestens ESZ-HZ d2.** Im Doxycyclin-regulierbaren HOXB4-Klon F6 wurde die HOXB4-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten initiiert, der konstitutiv HOXB4-exprimierende ESZ-Klon 8 wurde parallel mitgeführt. Ansatz HOXB4-DOX #F6 EBd0 wurde bereits auf ESZ-Ebene induziert und ist voll „aktiviert“ in die EB-Differenzierung gegangen, die übrigen Ansätze wurden zum angegebenen Zeitpunkt mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert. **(A)** Die EBs wurden am Tag 6 der Differenzierung dissoziiert, jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Zellen mit Antikörpern markiert und per FACS vermessen. **(B)** ESZ-HZ d0 wurden anschließend in STFV-S (red.O2) für 10 Tage expandiert und dann wieder je  $1 \times 10^6$  Zellen mit Antikörpern markiert und per FACS vermessen. **(C)** Je 1000 Zellen/Ansatz wurden in Triplikaten in den hämatopoetischen Methylzellulose-Kolonieformierungsassay (MethoCult M3434 – StemCell Technologies) ausgesät. Kolonien nach 8 Tagen ausgezählt, das linke Diagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl der generierten Kolonien pro Typ und insgesamt generierte Kolonien, das Diagramm rechts jeweils den errechneten, prozentualen Anteil der Kolonietypen an der Gesamtkolonienzahl. LEZ: lebende Einzelzellen; ind. induziert; n.ind.: nicht induziert; red.O2: reduziertes Sauerstoffniveau – 5% (v/v); CFU-GEMM: „colony forming unit granulocytic-erythroid-monocytic-megakaryocytic“; CFU-GM: „colony forming unit granulocytic-monocytic“; CFU G: „colony forming unit granulocytic“; CFU-M: „colony forming unit monocytic“; BFU-E: „blast forming unit erythroid“; S: Serum;



## 7. Diskussion

Die *in vitro* Entwicklung von HSZ aus pluripotenten Stammzellen ermöglicht den Einblick in die Entstehung und Entwicklung der embryonalen Hämatopoese. Die Synchronität der embryonalen Entwicklung *in vivo* mit der EB-Differenzierung *in vitro*, vom frühen Stadium der Mesodermentwicklung bis hin zur Generierung repopulationsfähiger HSZ (Doetschman *et al.*, 1985; Keller, 1995; Weiss und Orkin, 1996; Guan *et al.*, 1999; Leahy *et al.*, 1999; Rohwedel *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2007), ermöglicht unzählige Möglichkeiten mechanistischer *in vitro* Analysen zum Ablauf der Hämatopoese. Aber besonders der Ausblick *de novo* generierte, genetisch korrigierte HSZ als neue Quelle histokompatibler Transplantate für die autologe Zell- und Gentherapie hämatopoetischer Erkrankungen einsetzen zu können, und damit die Suche nach geeigneten Spendern für eine allogene Stammzelltransplantation vermeiden zu können, macht dieses System so interessant. Von vielen Arbeitsgruppen wurden dafür Differenzierungs- und Expansionsprotokolle etabliert und weiterentwickelt (Schmitt *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 1993; Inamdar *et al.*, 1997; Kyba *et al.*, 2003; Pilat *et al.*, 2005b; Pearson *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009), Transgenexpressionssysteme genutzt (Kyba *et al.*, 2002; Pilat *et al.*, 2005b) und Kokultivierungen mit Stromazellen der unterschiedlichen hämatopoetischen Nischen validiert (Nakano *et al.*, 1994; Yoder *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1997a; Oostendorp *et al.*, 2002). Die entstandenen Subpopulationen wurden phänotypisch charakterisiert und mit *in vivo* Populationen des Embryo verglichen sowie ihre Repopulationskapazität in Transplantationsexperimenten eruiert (Mikkola und Orkin, 2006; McKinney-Freeman *et al.*, 2009).

Mit der vorliegenden Arbeit haben wir im Mausmodell einen wichtigen Beitrag zur Etablierung von Differenzierungs- und Expansionsprotokollen geleistet, die ohne Stromaunterstützung effizient LT-HSZ aus HOXB4-transgenen ESZ generieren können, die letal bestrahlte immunkompetente Empfänger langfristig mit einem signifikanten Chimärismus multilinierekonstituieren. Mit der Übertragung der stromafreien Expansion in serumfreie Bedingungen konnten wir die vollständige Loslösung von undefinierten Kulturbedingungen erreichen sowie eine deutliche Ausreifung der Kultur ermöglichen. Wir konnten erstmalig zeigen, dass eine zytokingesteuerte Differenzierung embryonaler Stammzellen unter reduziertem Sauerstoffniveau (red.O<sub>2</sub>; 5% [v/v]) das Differenzierungsgleichgewicht signifikant zur hämatopoetischen Entwicklung verschiebt. Derart generierte ESZ-HSZ konnten dann in einem 14tägigen, der Embryonalentwicklung nachempfundenen, Kokultivierungsprozess oder eben auch in einer 10tägigen serum- und stromafreien Kultur unter definierten Zytokinbedingungen effizient expandiert werden. Dabei konnten Stammzellfrequenzen von mindestens einer ESZ-abgeleiteten hämatopoetischen Stammzelle in  $1 \times 10^5$  ESZ-abgeleiteten hämatopoetischen Zellen ( $1:1 \times 10^5$  ESZ-HSZ:ESZ-HZ) erreicht werden. Da außerdem die Expressionshöhe von HOXB4 entscheidenden Einfluss auf seine biologische Wirkung hat

(Schiedlmeier *et al.*, 2003; Klump *et al.*, 2005; Pilat *et al.*, 2005a; Pilat *et al.*, 2005b; Will *et al.*, 2006; Unger *et al.*, 2008) wurden die Experimente der vorliegenden Arbeit mit zwei ausgewählten, gut charakterisierten HOXB4-transgenen ESZ-Klonen (#8 konstitutive-, #F6 Doxycyclin-regulierbare HOXB4-Expression) durchgeführt.

### **7.1 ESZ-HSPZ sind immunphänotypisch CD41hi ckit+ CD34-**

Trotz vielfältiger, bestehender *in vitro* ESZ-Differenzierungs- und Expansionsprotokolle ist die Identität der generierten LT-HSZ nach wie vor nur unzureichend charakterisiert. Für unser Vorhaben, der gezielten Generierung und Expansion transplantierbarer LT-HSZ, war es aber wichtig eine Abschätzung entstehender Stamm- und Vorläuferzellfrequenzen *in vitro*, noch vor der Evaluierung durch Transplantationen in Empfängertiere, vornehmen zu können. Daher war es eine Zielsetzung dieser Arbeit die Subpopulation der ESZ-HZ die das Gros der LT-HSZ beinhaltet zu identifizieren. Einen großen Beitrag zur Phänotypisierung dieser Subpopulation leisteten McKinney-Freeman *et al.* bereits 2009 durch parallele *in vitro*-Charakterisierungen und Transplantation von HSPZ aus unterschiedlichen embryonalen, hämatopoeseassoziierten Kompartimenten und *in vitro* differenzierten ESZ-HSPZ (sogenannte EPOCH-Zellen, die CDX4 und HOXB4 ektop exprimieren). Sie zeigten, dass ESZ-HSPZ/EPOCH auf Ihrer Zelloberfläche CD41hi, ckit und CD150 exprimieren, heterogen für die CD45 und CD48 Antigenexpression und CD34- sind. Damit lassen sie sich phänotypisch weder genau den HSZ aus der AGM-Region (CD41hi ckit+ CD34+ CD150- CD48- CD45-) noch denen der fetalen Leber (CD41+/- Sca1+ ckit+ CD34+ LIN- CD150+ CD48-) zuordnen. Sie sind eine heterogene, noch nicht voll ausgereifte Population mit primitiven und reifen HSZ-Merkmalen. Da HSZ der fetalen Leber ein größeres Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial zu haben scheinen als HSZ Neugeborener (Nabelschnurblut) oder aus dem KM (Verfaillie, 2002), könnte sich die relative Unreife solcher *in vitro* entwickelten ESZ-HSPZ für die Anwendung eventuell sogar als Vorteil erweisen, vorausgesetzt dass wenigstens dieser Reifegrad *in vitro* erreicht werden kann.

In unseren Experimenten konnten wir die CD41hi ckit+ CD34- Fraktion als LT-HSZ beinhaltende Subpopulation bestätigen. Denn nur der kalkulierte Anteil der CD41hi ckit+ CD34- Fraktion, innerhalb der transplantierten Zelldosen, korrelierte sowohl mit den erreichten Langzeitchimärismen im PB immunkompetenter Empfängertiere (Abb. 6.24; Tab. 6.3; Abb. 6.28), als auch größtenteils mit dem Anteil frühester koloniebildender Progenitoren, den CFU-GEMM. Aufgrund der Heterogenität der CD41hi ckit+ CD34- Subpopulation muss es aber nicht notwendigerweise eine Kopplung zwischen LT-HSZ und CFU-GEMM/MPP-Gehalt geben.

## 7.2 Die serumfreie, zytokingesteuerte EB-Differenzierung forciert die hämatopoetische Entwicklung

Die bisher publizierten Differenzierungsprotokolle liefern ESZ-HSZ die nur mit sehr hoher Zelldosis (mehrere Millionen) letal bestrahlte Mäuse repopulieren, weil die enthaltenen HSZ entweder in einer zu geringen Frequenz vorliegen oder ein Entwicklungsdefizit aufweisen das ihr Langzeitengraftment erschwert. Die Resultate des auch zu Beginn dieser Arbeit genutzten Standard-Differenzierungs- und Expansionsprotokolls (ähnlich zu Pilat *et al.*, 2005b; Tabayoyong *et al.*, 2009) reihten sich darin ein.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es daher eine signifikante Quantitätssteigerung der ESZ-HSZ in der Mischkultur zu erreichen und gleichzeitig einen KM-HSZ-komparablen Entwicklungsstatus herbeizuführen. Dabei musste an der Basis der HSZ *de novo* Synthese, der EB-Differenzierung, begonnen werden. Die zuvor verwendete und weit verbreitete EB-Differenzierung in serumhaltigem Medium (Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009; Tabayoyong *et al.*, 2009) führt zum ungesteuerten Ablauf des endogenen Differenzierungsprogramms während der EB-Bildung und EB-Entwicklung. Der Einsatz von Serum erschwert durch seine relativ undefinierte Zusammensetzung aus Wachstumsfaktoren, Lipiden etc. die gezielte hämatopoetische Differenzierung und dadurch auch die Reproduzierbarkeit der Experimente. In einer serumfreien, zytokingesteuerten Differenzierung kann die Differenzierungsrichtung kontrolliert und forciert werden, so wie es Pearson *et al.* durch den zeitlich definierten Einsatz von BMP4, ActivinA, bFGF und VEGF für die hämatopoetische Differenzierung unmanipulierter ESZ bereits zeigen konnten (Pearson *et al.*, 2008). Allerdings waren die so entstanden hämatopoetischen Vorläuferzellen noch nicht auf dem Entwicklungsniveau adulter LT-HSZ. Dies ist weder mit BMP4 möglich, obwohl dieses nach ventral-posterialer Mesoderminduktion die Hämatopoese, durch Aktivierung des Wnt3a-Signalweges und Hochregulation endogener *Cdx* und *Hox* Gene *in vivo* initiiert (Lengerke *et al.*, 2008), noch durch weitere Zytokine zurzeit erreichbar. Für die Ausreifung und den Erhalt von ESZ-HSZ *in vitro* ist die Überexpression von HOXB4 nötig (Pilat *et al.*, 2005b; Bonde *et al.*, 2008). Denn für HOXB4, ein 3' im Cluster lokalisiertes *HOX* Gen und daher selektiv im frühen Stammzellkompartiment exprimiert (Buske und Humphries, 2000), ist gezeigt, dass es bei ektopter Expression in der Lage ist HSZ *in vivo* und *in vitro* einen kompetitiven Wachstumsvorteil zu verleihen (Sauvageau *et al.*, 1995; Schiedlmeier *et al.*, 2003), sowie *in vitro* die Generierung von LT-HSZ aus ESZ überhaupt zu ermöglichen (Kyba *et al.*, 2002; Pilat *et al.*, 2005b).

Zur gerichteten hämatopoetischen Entwicklung haben wir das von Pearson *et al.* beschriebene schrittweise zytokingesteuerte EB-Differenzierungsprotokoll nach zusätzlicher Modifikation verwendet (Pearson *et al.*, 2008). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Faktoren wurden von uns ab EB d2,5 die Zytokine SCF und TPO zugesetzt. Ihre Rezeptoren werden bereits auf frühen embryonalen hämatopoetischen Zellen (Zeigler *et al.*, 1994; Era *et al.*, 1997) und auch EB-Zellen (Challier *et al.*, 2002) exprimiert. Eine Stimulation des

TPO-R/Mpl führt zur Expression des Transkriptionsfaktors *Runx1*, einem Schlüsselregulator bei der Etablierung der definitiven Hämatopoese, sowie einer Hochregulierung von Genen die HSZ-Expansion und Selbsterneuerung unterstützen, wie beispielsweise *Meis1* und *Hoxb4* (Kaushansky, 2005; Fleury *et al.*, 2010). SCF und sein Rezeptor sind für das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von HSPZ unabdingbar (McKinstry *et al.*, 1997). Wir konnten erstmals im direkten Vergleich der serumhaltigen Differenzierung mit der modifizierten, serumfreien Differenzierung der EBs zeigen, dass die EB-Generierungseffizienz ohne Serum zwar deutlich geringer war als mit Serum, dass es aber ohne Serum eine forcierte hämatopoetische Entwicklung gab. Diese hämatopoetische Entwicklung setzte im gesteuerten Differenzierungsansatz nach Zugabe der Zytokine (Activin A, bFGF, VEGF, TPO, SCF) an EB d2,5 und damit ca. einen Tag später ein, als in den unter Serum generierten EBs, gemessen über die Expression von Flk1. Doch bereits ab EB d6 war der Anteil früher hämatopoetischer Zellen (HZ; CD41+) in den serumfrei generierten Zellen wesentlich höher. Bei der Trennung der Suspensionszellen von den adhären Zellen, zwei Tage nach der EB-Dissoziation (ESZ-HZ d2), waren 75% der serumfrei generierten EB-Zellen hämatopoetische Zellen, im Serum-Differenzierungsansatz betrug der Anteil HZ nur 10% (Abb. 6.10). In einer für weitere acht Tage fortgesetzten Expansion unter serumfreien Standardbedingungen (STD-SF; Pilat *et al.*, 2005b) konnte eine Verzehnfachung der serumfrei generierten ESZ-HZ erreicht werden, wohingegen die ungesteuert entstanden ESZ-HZ sich nur versechsfachten. Neben dem enormen Zugewinn an allen hämatopoetischen Zellen konnte besonders in Kombination mit der HOXB4-Überexpression eine selektive Steigerung der CD41-hochexprimierenden Zellen sowie ein ca. 25%iger Zuwachs immunphänotypisch reifer, adulter HSPZ (LIN- CD150+ CD48-) erreicht werden (Abb. 6.12). Die serumfreie Bedingung mit definierter „Zytokinprogrammierung“ führte daher *in vitro* zu einer quantitativen Zunahme reifer HSZ. Aufgrund der zeitlichen Synchronität von frühen Entwicklungsvorgängen während der *in vitro*-EB-Differenzierung und im Embryo, *in vivo*, nahmen wir an, dass eine Verlängerung der EB-Differenzierungsphase die Ausgangslage noch deutlicher zu Gunsten einer reiferen und größeren HSZ-Population verschieben könnte. Eine Analyse der nach 8 bzw. 10 Differenzierungstagen dissoziierten EBs zeigte zwar vorläufig höheren Anteil CD41+ und CD45+ Zellen gegenüber EB d6 dissoziierten Zellenn auf, wiederum deutlich stärker in der gesteuerten Differenzierung, allerdings glichen sich nach gleicher Gesamtkulturdauer (8 Tage EB + 8 Tage Expansion vs. 6 Tage EB + 10 Tage Expansion) die Populationen an und es konnte kein weiterer Expansionsvorteil für die HSPZ-Subpopulation gegenüber EB d6 dissoziierten Zellen erreicht werden. Eine Bestätigung für den zumeist gewählten EB d6 als Dissoziationszeitpunkt auch für serumfrei generierte EBs.

In physiologisch gut perfundierten Geweben herrscht ein reduziertes Sauerstoffniveau von ca. 5% (v/v). In den hämatopoetischen Nischen der embryonalen Entwicklung, aber auch im adulten Knochenmark (in der Osteoblasten-Nische) herrschen Sauerstoffgradienten bis in den hypoxischen Bereich (ca. 3%-0,1% (v/v)



O<sub>2</sub>) (Parmar *et al.*, 2007). Die EB-Differenzierung wurde von uns immer unter physiologisch niedrigem Sauerstoffpartialdruck durchgeführt und nun auch für die serumfreie EB-Differenzierung etabliert. Gründe dafür lagen zum einen in der Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; sogenannte Sauerstoffradikale), die in jedem biologischen System Schäden durch oxidativen Stress verursachen, Alterungsprozesse fördern und zur Apoptose führen (Sies, 1985, 1986, 1991). Dies ist gerade im serumfreien System wichtig, da hier zusätzlich die ROS-protaktiven Inhaltsstoffe des Serums wegfallen (Sies, 1985; Sies und Cadenas, 1985; Sies, 1991). Zum anderen wollten wir uns aber auch den beschriebenen Effekt zunutze machen, dass unter Hypoxie der so genannte Hypoxie induzierte Faktor (HIF) exprimiert wird, der in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor direkten Einfluss auf die Anzahl und die Kinetik von Hämangioblasten/BL-CFCs im EB-Differenzierungssystem nimmt (Ramirez-Bergeron *et al.*, 2004). So werden *Bry* und *BMP4*, wichtige Regulatoren der Mesodermentwicklung, unter Hypoxie früher induziert und auch *VEGF*, ein Schlüsselregulator der Gefäßentwicklung und Hämatopoese, ist direktes transkriptionelles Ziel von HIF. Flk1, der Rezeptor für VEGF, wichtig für die Entwicklung von Hämangioblasten/BL-CFC aus mesodermalen Vorläufern, aber auch noch präsent auf reiferen Zellen (z.B. Endothelzellen), wird unter Hypoxie ebenfalls verstärkt exprimiert (Ramirez-Bergeron *et al.*, 2004).

### **7.3 Die Frequenz der ESZ-HSPZ ist modulierbar durch die Kombination von Expansionssystem, Expansionsdauer und gewähltem Sauerstoffpartialdruck**

In der der EB-Differenzierungsphase angeschlossenen Expansionsphase geht es um die bestmögliche Unterstützung der Reifung zu funktionellen LT-HSZ und deren Selbsterneuerung und Proliferation. Wir konnten eindeutig zeigen, dass es, abhängig von der Kombination aus Expansionssystem, Expansionsdauer und herrschenden Sauerstoffniveaus, sowohl zu unterschiedlichem Proliferationsverhalten der gesamten Kulturen, als auch im Besonderen zu einem deutlichen Effekt auf die ESZ-HSPZ-Fractionen kam. ESZ-HSPZ aus Serum-Expansionsbedingungen konnten im 10tägigen Expansionsverfahren auch unter atmosphärischem O<sub>2</sub>-Gehalt (21% [v/v]; normoxisch – norm.O<sub>2</sub>) proliferieren (Abb. 6.14 E+F), während ESZ-HZ aus serumfreien Expansionsbedingungen unter normoxischen Bedingungen stark an frühesten Vorläuferzellen (CFU-GEMM) einbüßten (Abb. 6.18 A+B). Doch auch die serumhaltigen Expansionen zeigten in einer verlängerten Expansionsphase einen deutlichen Proliferationsvorteil für früheste Progenitoren (CFU-GEMM) wenn sie unter red.O<sub>2</sub> (5% [v/v]) kultiviert wurden, vor allem in stromafreier Kultur. Unter norm.O<sub>2</sub> waren der HSPZ Anteil (CD41hi cKit+ CD34-) und das CFU-GEMM Potenzial vergleichbar zwischen STFV-S-Suspensionskultur, OP9- oder AFT024-Kokulturen. Unter reduzierten Sauerstoffbedingungen trat dieser Effekt noch stärker hervor.

Zum Einen konnte die Effizienz der OP9-Kokultur gesteigert werden, eine Potenzialsteigerung die von z.B. G.Q Daley, H. Ema und vielen anderen Arbeitsgruppen die die OP9-Kokultur unter norm.O<sub>2</sub> durchführen nicht genutzt wird (Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Zum anderen hatten wir in der angestrebten Loslösung von der Kokultur mit der STFV-S-Suspensionskultur unter red.O<sub>2</sub> nun ein System erzeugt, das die CD41hi ckit+ CD34- Subpopulation der ESZ-HZ in 10 Tagen stärker expandierte, als dies im Zusammenwirken mit den OP9- oder gar AFT024-Kokulturen möglich war. Dies korrelierte direkt mit dem erzielten Langzeitchimärismus in transplantierten, immunkompetenten Empfängern, allerdings nicht zwangsläufig mit den CFU-GEMM Frequenzen der Kolonieassays. Dies könnte auf eine verstärkte Selbsterneuerung sehr früher HSZ hindeuten. Hoch aufgereinigte Stammzellfraktionen der Maus bilden kaum noch CFU-GEMM Kolonien (Kiel *et al.*, 2005). Wir schließen aus unseren Ergebnissen, dass der STFV-S-Zytokincocktail für sich bereits eine stark proliferationsfördernde und ESZ-HSPZ-expandierende Potenz aufweist und bei einem Sauerstoffniveau von 5% (v/v) eine einfache Stromakokultivierung ersetzt.

Eine noch stärkere ESZ-HSPZ Expansion kann durch die Verbindung des STFV-S mit der sequenziellen Kokultivierung mit AFT024- und OP9-Stromazellen erreicht werden. Hierbei führte die Kokultivierung von d6 dissoziierten EB-Zellen des #8 in entwicklungsphysiologischer Reihenfolge, nämlich erst fetales Leberstroma (AFT024) und anschließend Knochenmarkstoma (OP9) für jeweils sieben Tage unter normoxischen Bedingungen zur stärksten Entstehung und Expansion ESZ-HSPZ (CD41hi ckit+ CD34-; CFU-GEMM). Eine umgekehrte Kultivierungsreihenfolge (erst OP9, dann AFT024) war zwar weniger potent, jedoch immer noch potenter als 10tägige Einzelkokultivierungen (Abb. 6.15, Abb. 6.16). Unter red.O<sub>2</sub> war das CFU-GEMM-Potenzial der ESZ-HZ nach der Doppelkokultivierung zwar deutlich reduziert gegenüber der normoxischen Expansion. Dennoch zeigten nur die unter red.O<sub>2</sub> Bedingungen generierten ESZ-HZ der Doppelkokultivierungen, besonders aus der entwicklungsphysiologischen Stromareihenfolge, bei einer für weitere sieben Tage fortgesetzten Expansion in STIF-S- und besonders STIF-A5-S-Suspensionskultur eine nochmalige Steigerung des Anteils frühster Progenitoren (CFU-GEMM) und damit wahrscheinlich auch der ESZ-HSZ (Abb. 6.18 E+F). Wir hatten dokumentiert, dass weder der STIF- (Zhang und Lodish, 2005) noch der STIF-A5- (Zhang *et al.*, 2008a) Zytokincocktail in der Lage waren direkt dissoziierte EB-Zellen proliferieren und reifen zu lassen, ältere und wahrscheinlich reifere ESZ-HZ aber expandieren konnten. Diese Reifung konnte anscheinend durch die schrittweise Exposition zu den Stromazellen zweier, entwicklungsbiologisch aufeinanderfolgender, hämatopoetischer Nischen erreicht werden. Damit kommt der Doppelkokultur eine Sonderrolle zu, denn die übrigen Expansionsbedingungen, unabhängig vom Kultivierungsmedium und der Kokultur, erreichten in einer über 10-14 Tage hinaus verlängerten Expansionsphase unter red.O<sub>2</sub> maximal einen Erhalt ihres HSPZ-Anteils aber keine weitere Expansion (Abb. 6.18 C+D, Abb. 6.19). In Verbindung mit einer normoxischen

Kulturumgebung konnte in diesen verlängerten Expansionsphasen die HSPZ-Subpopulation oder z.T. die gesamte Kultur nicht aufrecht erhalten werden (Abb. 6.18 A+B). Unabdingbar für die Expansion der ESZ-HSPZ über eine 21tägige Kulturphase, auch in Gegenwart von Serum, war ein reduziertes Sauerstoffniveau. Verschiedenste Serumfaktoren bieten zwar Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Sato *et al.*, 1996; Zhuge und Cederbaum, 2006; Lee *et al.*, 2010), daher ist auch eine kurzzeitige (~10d) Expansion der sauerstoffempfindlichen HSPZ-Fraktion unter norm.O<sub>2</sub> möglich, aber nur eine Kombination mit red.O<sub>2</sub> bietet langfristig ausreichend Radikalschutz. Der Serumeffekt ist allerdings noch wesentlich weitreichender. Hatten G.Q. Daley und Kollegen noch angenommen, dass die für frühe CD41+ ESZ-HZ untypische Koexpression von CD150 von der OP9-Kokultur induziert sein könnte oder aber ein Effekt einer ablaufenden Reifung wär (McKinney-Freeman *et al.*, 2009), so konnten wir hier zeigen, dass es sich um einen serumvermittelten Effekt handelt. Alle ESZ-HZ die unter Serumbedingungen expandiert wurden, in Kokultur mit OP9 und/oder AFT024 sowie in STFV-S, exprimierten zu 80% bis fast 100% CD150 (Abb. 6.15, Abb. 6.17, Abb. 6.19), ein Anteil der ausschließt, dass es sich um reifende HSZ handelt. Die ESZ-HZ der serumfreien Expansionen (STD-SF und STFV-SF) unter red.O<sub>2</sub> exprimierten hingegen nur noch in einer kleinern Subpopulation (20-40%) CD150 (Abb. 6.17 A, Abb. 6.19 C). Damit bewegte sich der Anteil CD150+ ESZ-HZ mehr in der Größenordnung gemessener HSPZ-Subpopulationen (~20% CD41hi ckit+ CD34-). Unter serumfreien Bedingungen ist daher eine Korrelation zwischen CD150-Expression und reifenden ESZ-HSPZ wahrscheinlich. Unterstützend für diese Annahme konnten wir feststellen dass unter serumfreien STFV-Bedingungen (red.O<sub>2</sub>) die ESZ-HZ erstmals einen deutlich reiferen Phänotyp erlangten. Besonders der Anteil CD41-hochexprimierenden Zellen reduzierte sich deutlich, einhergehend wurde CD45 verstärkt exprimiert, und führte so zu einer annähernden Verdopplung der CD41+CD45+ Subpopulation und Verfünffachung der CD41-CD45+ Fraktion. Diese Ausreifung betrifft höchstwahrscheinlich liniendeterminierte Zellen und die HSPZ-Fraktion gleichermaßen. Mit der phänotypischen Charakterisierung durch CD41hi ckit+ CD34-, annähernder phänotypischer Status primitiverer AGM-HSZ, konnte nur noch eine kleine Subpopulation (< 5%) in der STFV-SF (red.O<sub>2</sub>) detektiert werden. Wir vermuten, dass die ausgereifteren ESZ-HZ und damit auch HSPZ nun eher den phänotypischen Charakteristika fetaler Leber-HSZ (CD41+/- Sca1+ ckit+ CD34+ LIN- CD150+ CD48-) entsprechen und ein weniger gemischtes Expressionsmuster von Oberflächenmarkern unterschiedlicher Reifestadien, wie es ESZ-HSPZ aus Serum-Expansionsbedingungen bisher immer gezeigt hatten, tragen. Detailliertere Phänotypisierungen sowie die Evaluierung des resultierenden *in vivo*-Potenzial der STFV-SF ESZ-HSZ werden zurzeit vorgenommen. Somit konnte zwar unter STFV-S in Verbindung mit der Doppelkokultivierung und angeschlossener Expansion in STIF-S bzw. STIF-A5-S unter red.O<sub>2</sub> die maximalste Expansion der ESZ-HSPZ erreicht werden, doch formuliertes Ziel war es, ein Protokoll zu generieren, das losgelöst von undefinierten

Bedingungen wie Stromakokultur und Serum eine effiziente Expansion generierter ESZ-HSPZ ermöglicht. Die Unabhängigkeit von der Stromakokultivierung konnten wir durch die Etablierung des STFV-S-Suspensionsexpansionsverfahrens unter red.O<sub>2</sub> ermöglichen. Im zweiten Schritt konnten wir das STFV-S-System erfolgreich in serumfreie Bedingungen übertragen und in Synergie mit red.O<sub>2</sub> sogar eine über das Potenzial der Serum-Kultur hinausgehende Steigerung der HSPZ-Fraktion erreichen. Zusätzlich erzielten wir unter STFV-SF (red.O<sub>2</sub>) eine Ausreifung der gesamten Kultur mit einer bisher unerreichten Frequenz von ~25% adulten hämatopoetischen (CD41-CD45+) Zellen. Unsere serumfreie, zytokingesteuerte EB-Differenzierung mit anschließender Expansion in STFV-SF unter red.O<sub>2</sub> bietet eine ideale Vorlage für eine Translation in klinisch anwendbare Protokolle. Variierende Zytokinkombinationen aus SCF, TPO, Flt3L, VEGF und Weiteren wurden auch für eine verbesserte Generierung hämatopoetischer Zellen aus humanen EBs eingesetzt, z.T. in Kombination mit Stroma (Wang *et al.*, 2005a) und ohne Stroma (Srivastava *et al.*, 2007) sowie serumfrei (Tian *et al.*, 2004; Chicha *et al.*, 2011).

#### **7.4 ESZ-HZ werden nicht von natürlichen Killerzellen (NKZ) abgestoßen, und vermitteln in immunkompetenten Rezipienten eine dauerhafte Multiliniere-Repopulation**

Die NKZ-vermittelte Abstoßung von ESZ-abgeleiteten HSPZ stellte bisher ein unüberwindbares Hindernis zur Etablierung eines signifikanten Langzeitchimismus nach Tx in immunkompetente Tiere dar (Tabayoyong *et al.*, 2009). Ursächlich für diese Abstoßung ist die fehlende bzw. zu niedrige MHC-I Expression der ESZ-HSPZ (Bix *et al.*, 1991; Rideout *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005). Wir konnten zeigen, dass ESZ-HZ, generiert aus der gleichen ESZ-Linie wie auch bei Tabayoyong *et al.* verwendet, mittels unserer Differenzierungs- und Expansionsprotokolle *in vitro* und *in vivo* kein NKZ-Ziel mehr sind. Alle ESZ-HZ exprimierten nahezu 100% MHC-I auf ihren Zelloberflächen und wurden daher im NKZ-Zytotoxizitätsassay (<sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay) nicht von aktivierten NKZ lysiert, im Gegensatz zu den undifferenzierten Ausgangs-ESZ, die keine nachweisbare MHC-I Expression auf ihrer Zelloberfläche zeigten. Zwar wurde auch H60, der Ligand des aktivierenden NKZ-Rezeptors NKG2D auf den ESZ-HZ exprimiert, jedoch im balancierten aktivierenden und hemmenden Rezeptor/Liganden-Zusammenspiel ist der dominierende Reiz der „Selbst“-MHC-I vermittelte NKZ-Block. Ly-49 Interaktion mit einem als „Selbst“ erkannten MHC-I-Molekül auf der Zielzelle beendet den NKZ-Zellkontakt (Ljunggren und Karre, 1990; Karre, 2002; Raulet, 2006). Auch *in vivo* konnte nach Transplantation in immunkompetente Empfängertiere keine Abstoßung von ESZ-HZ beobachtet werden, die mittels unseres optimierten Differenzierungs- und Expansionssystems *in vitro* entwickelt worden sind. Wir nehmen an, dass bereits der EB-Differenzierungsschritt den Grundstein für die Immunkompetenz legte, denn unterschiedlichste Expansionsverfahren, beispielsweise auch die vielseitig verwendete OP9-Kokultur unter normoxischen

Bedingungen, bewirkten keine unterschiedlichen MHC-I Expressionen. Möglicherweise tragen auch ESZ-abgeleitete NKZ im ESZ-HZ-Pool zum erfolgreichen Engraftment in immunkompetenten Empfängern bei. In KM-Transplantationen begünstigt eine Kotransplantation aktivierter Donor-NKZ das Engraftment des Transplantats und stimuliert die Hämatopoese und immunologische Rekonstitution des Wirtes (Murphy *et al.*, 1992a; Murphy *et al.*, 1993; Ruggeri *et al.*, 2002; Ruggeri *et al.*, 2008). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die *in vitro* generierten ESZ-HZ denkbar. Da reife NKZ schon früh in der embryonalen Hämatopoese entstehen (Carlyle *et al.*, 1998), ist ihre Entstehung der EB-Differenzierung nicht auszuschließen. Durchflusszytometrische Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen NKZ-Oberflächenmarker stehen zurzeit noch aus.

Die unterschiedliche Frequenz der heterogenen ESZ-HPSZ-Subpopulation in den untersuchten Expansionsbedingungen konnte durch die *in vitro* Analysen evaluiert werden. Das Vorhandensein von LT-HSZ in dieser Population kann aber nur durch die Charakterisierung des *in vivo* Potenzials bestätigt werden. Die bisher von uns und anderen publizierten Differenzierungsprotokolle (Pilat *et al.*, 2005a; Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009) führten nur zu einer relativ geringen Ausbeute an ESZ-HSZ, dies und ein möglicherweise vorhandenes Entwicklungsdefizit erschwert ihr Langzeitengraftment. Auch wenn wir mit HOXB4-hochexprimierenden Klonen unter STD-SF (norm.O<sub>2</sub>) hohen Langzeitchimärismus erreichen konnten (Pilat *et al.*, 2005a), so war es nicht möglich diese Resultate in der vorliegenden Arbeit zu reproduzieren. Unter STD-SF (red.O<sub>2</sub>) (ähnlich zu Pilat *et al.*, 2005b; Tabayoyong *et al.*, 2009) generierte LT-HSZ aus #8 HOXB4-ESZ erzielten nur einen niedrigen Langzeitchimärismus (durchschnittlich ~2-4%) in immundefizienten Rag2 $\gamma$ C-KO-Mäusen. Es besteht die Möglichkeit, dass die transplantierten ESZ-HSZ einen Mangel an Adhäsionsmolekülen oder auch Chemokinrezeptoren wie z.B. CXCR4 aufweisen die das Einwandern ins KM (fortan als Homing bezeichnet) vermitteln (Peled *et al.*, 1999) und damit eine reduzierte Homingfähigkeit besitzen. Ein Chimärismusvergleich intrafemural transplantiertter HSZ zur Standard intravenösen Tx sowie Expressionsanalysen Homing-vermittelnder Moleküle könnten Aufschluss über eventuelle Homingdefizite geben.

Die zurzeit am weitesten verbreitete Expansionsmethode ist die Kokultur der ESZ-HZ mit OP9 (u.a. Matsumoto *et al.*, 2009; McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Um die LT-HSZ Frequenz unserer neuartig generierten ESZ-HZ zu bestimmen, wurden ESZ-HZ nach 10 Tagen Kokultur auf OP9 unter red.O<sub>2</sub> in limitierender Verdünnungsreihe (Limiting-Dilution-Assay) entsprechend dem publizierten „Gold-Standard“ (Szilvassy *et al.*, 1990) in immunkompetente Mäuse transplantiert. Unter der „klassischen“ Annahme, dass eine einzige HSZ eine vollständige hämatopoetische Rekonstitution bewerkstelligen kann, erhielten wir eine LT-HSZ in  $1 \times 10^5$  ESZ-HZ, respektive Eine in 8330 CD41hi ckit+ CD34- Zellen. Neuste Berechnungsmethoden postulieren allerdings, dass mehr als eine HSZ für die vollständige Rekonstitution

nötig ist (single-hit Poisson model [SHPM] vs. multiCell Poisson models [C>1PMs]; Bonnefoix und Callanan, 2010). Demnach wäre die tatsächliche HSZ Frequenz wahrscheinlich bis zu fünf Mal höher als die im „*limiting dilution assay*“ ermittelte. Mit derart niedrigen Zelldosen konnte bisher keine andere Arbeitsgruppe signifikanten Langzeitchimärismus erreichen. Beispielsweise konnten H. Ema und Kollegen mit  $1,5 \times 10^6$  CD41+ckit+ pro Maus transplantierten ESZ-HZ lediglich einen mittleren Chimärismus von ~3% im PB 16w pTx erreichen. Trotz der ~70fach höheren Subpopulation als in unserem  $1 \times 10^5$ -OP9-Transplantat erreichten sie damit nur ~7.5% unserer mittleren Chimärismusrate (Matsumoto *et al.*, 2009). Auch die von Daley und Kollegen transplantierte CD41+CD34- Subpopulation war ~40-120fach größer als unsere CD41hi ckit+ CD34- Subpopulation im  $1 \times 10^5$ -OP9-Transplantat, die erreichten Chimärismuswerte (4.3%- 91%, Mittelwert nicht angegeben) konnten eine gleichwertige Steigerung aber nicht aufweisen (McKinney-Freeman *et al.*, 2009). Transplantationen unserer Expansionsansätze aus der AFT024-Kokultur und der STFV-S-Suspensionskultur erreichten ebenfalls einen deutlichen Langzeitchimärismus, der 24w pTx in der STFV-S-Kohorte einen signifikanten Chimärismus im PB von durchschnittlich 65% ausmachte. Dies entsprach einem vierfach höheren Langzeitchimärismus als in der verglichenen OP9-Kohorte und damit wahrscheinlich auch einem ca. vierfach höheren LT-HSZ-Gehalt der STFV-S-Expansion. Für die ermittelten CD41hi ckit+ CD34-Frequenzen in den Transplantaten ließ sich erstmals eine Korrelation zwischen ihrer Frequenz und den erreichten Langzeitchimärismen aufzeigen (Tab. 6.3, Abb. 6.28D). Eine weitere Steigerung der ESZ-HSZ-Frequenz in unserm neuen Differenzierungs- und Expansionssystem erwarten wir uns bei der Verwendung von ESZ-Linien aus anderen genetischen Hintergründen. CCE sind aus dem 129S6/SvEv-Hintergrund, für diesen Mausstamm wurde immunphänotypisch gezeigt, dass er einen wesentlich geringeren HSZ-Pool aufweist als vergleichbare Wildtypstämme (Papathanasiou *et al.*, 2010). Daher nehmen wir an, dass diese geringere HSZ-Rate genetisch vorprogrammiert ist und wahrscheinlich auch das HSZ-Differenzierungs- und Expansionspotenzial der CCE reduziert. Auch die bisher oft geschilderte Nebenwirkung der verminderten Lymphopoese bei HOXB4-Überexpression (Kyba *et al.*, 2002; Pilat *et al.*, 2005b; Chan *et al.*, 2008) konnte ebenfalls durch unser Differenzierungs- und Expansionsprotokoll mit dem moderat hoch HOXB4 exprimierenden #8 vermieden werden, ein Erfolg der bisher nur gelegentlich im adulten System gezeigt werden konnte (Antonchuk *et al.*, 2002). Allerdings konnte unser GFP-Reporter nur in einer kleinen Subpopulation der CD3+ Fraktion gemessen werden, da es zur beschriebenen Abschaltung („*silencing*“) des Vektors in den lymphoiden Zellen kommt (Cherry *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005b; Chan *et al.*, 2008). Auch wenn wir bis dato keinen weiteren Chimärismusbeweis in den GFP-negativen Lymphozyten erbracht haben, ist es unwahrscheinlich, dass die Lymphozyten selektiv von wiederhergestellten endogenen HSPZ produziert worden sind, denn nahezu alle CD11b+ Zellen stammten vom Transplantat. Allerdings führte die anhaltende HOXB4-Überexpression auch hier zu einer gesteigerten

Myelopoese. Daher ist es unser Anliegen eine dauerhafte Transgenexpression im rekonstituierten Empfänger in Zukunft durch Tet-regulierbare HOXB4-Expression zu vermeiden. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass unser optimiertes Differenzierungsprotokoll zur Entwicklung signifikanter Mengen an reifen HSPZ führt, die nach Transplantation in immunkompetente Empfänger nicht abgestoßen werden und Langzeit-Multilinenrepopulation organisieren.

Von einem Langzeitengraftment transplanteder HSZ wird im Mausmodell ausgegangen, wenn im PB ca. 16-18 Wochen pTx ein stabiler Chimärismus vorliegt. Auch in unseren Transplantationsexperimenten konnten wir einen signifikanten Chimärismus zu diesem Zeitpunkt im PB der Empfänger nachweisen. Auffällig in allen Gruppen der immunkompetenten Empfänger, die mit ESZ-HZ d10 transplantiert wurden, war jedoch eine erhöhte Sterblichkeitsrate ca. fünf Monate nach Tx. Während 16-18 Wochen pTx nur sehr wenige Tiere erkrankt waren, erhöhte sich die Sterberate ab ca. 20 Wochen pTx deutlich. Alle Tiere mit Krankheitsanzeichen wurden aus dem Versuch genommen, sie wiesen jedoch noch einen signifikanten Multilinenchimärismus im PB auf, in Einzelfällen konnte eine akute Anämie diagnostiziert werden. Mehrere im Nachfolgenden genannte Gründe scheinen möglich zu sein.

G. Keller und Kollegen zeigten, dass während der EB-Differenzierung zeitlich getrennt zwei Flk1-Populationen entstehen, die Frühe (d2,5) spiegelt dabei eher die Dottersack-Hämatopoese wieder, die Späte (d3,5) das hämatopoetische Programm der para-aortischen Splanchnopleura-Region/AGM. ESZ-HZ die aus der späteren Flk1-Population hervorgegangen sind regulieren endogen Hoxb4 hoch und besitzen ein starkes myeloides und lymphoides aber nur begrenztes erythroides Potenzial (Irion *et al.*, 2010). Wir vermuten, dass eine ektopische Expression von HOXB4 über einem bestimmten Schwellenwert das Auswachsen der späteren Flk1-Population begünstigen könnte und darüber zu einer Verschiebung zur myeloiden auf Kosten der erythroiden Entwicklung, wie von uns *in vitro* gezeigt worden war (Pilat *et al.*, 2005b), führen könnte. Eventuell erklärt daher ein selektiver Wachstumsvorteil von HOXB4 hochexpressierenden Klonen *in vivo* nach fünf Monaten das Wegbrechen der Erythropoese.

Für adulte HSZ-Populationen wurde neben den LT-HSZ und ST-HSZ kürzlich noch eine intermediäre HSZ-Population beschrieben, die „*Intermediate Term*“-HSZ (IT-HSZ), welche ein Engraftment bis zu maximal acht Monaten sicherten, und *in vivo* durch den Verlust ihnen abstammender myeloischer oder erythroider Zellen ab ca. vier Monaten pTx definiert wurden (Benveniste *et al.*, 2010). Wirkliches Langzeitengraftment kann somit nicht schon 16-18 Wochen pTx sondern erst nach ca. 6-8 Monaten pTx bestätigt werden. Je nachdem in welchem Verhältnis dann IT-HSZ zu LT-HSZ im Transplantat vorliegen, überleben mehr oder weniger Tiere den verlängerten Beobachtungszeitraum.

## 7.5 Die HOXB4-Überexpression wird im EB nicht benötigt, ist aber für die ESZ-HZ-Expansion essentiell

HOXB4 ist für die *in vitro* Differenzierung und Expansion von ESZ-HSZ essentiell und es vermittelt *in vivo* ein besseres Engraftment (Kyba *et al.*, 2002; Pilat *et al.*, 2005b; Chan *et al.*, 2008). Aber in welchem Zeit- und Dosisfenster wird die HOXB4-Überexpression *in vitro* und *in vivo* benötigt?

Eine ektope HOXB4- oder CDX4-Expression zwischen Tag 4 und 6 der EB-Entwicklung soll zu einem höheren hämatopoetischen Potenzial der resultierenden ESZ-HZ führen (Kyba *et al.*, 2002; McKinney-Freeman *et al.*, 2008). Wir konnten dagegen zeigen, dass serumfrei generierte EB d6 Zellen unabhängig von ektope HOXB4-Expression ein vergleichbares hämatopoetische Potenzial besaßen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass HOXB4 während der EB-Differenzierung für das hämatopoetische Commitment nicht benötigt wird, vielleicht sogar kontraproduktiv ist. Wir konnten hier erstmals zeigen, dass während der EB-Differenzierung ein posttranskriptioneller Gegenregulationsmechanismus zur HOXB4-Überexpression aktiviert wird. Diese Gegensteuerung konnten wir zuerst während der serum- und serumfreien EB-Differenzierung des konstitutiv HOXB4-überexprimierenden #8 in einer graduellen Reduktion der GFP+ Zellpopulation messen. Da zu keinem Zeitpunkt vermehrte Apoptose messbar war, konnte ein potentielles „Aussterben“ GFP+ Zellen als Reduktionsursache ausgeschlossen werden. Zeitlich parallel zur Bildung der ersten Hämangioblasten (Flk1+, Abb. 6.11) ab EB d2,5 setzte die Reduktion des Anteils GFP+ Zellen in den Kulturen ein und setzte sich in beiden Ansätzen während der weiteren EB-Differenzierung fort. Die Reduktion war vermehrt in der stärker hämatopoetisch gepimten serumfreien EB-Differenzierung detektierbar. Die schnellere HOXB4-Gegenregulationskinetik unter serumfreien EB-Bedingungen führte bereits wieder zu einem Ansteigen des Anteils GFP+ Zellen ab EB d6, während sich im Serum-Ansatz die Reduktion noch bis zum EB d10 fortsetzte und erst ab der Expansionsphase rasch wieder anstieg (Abb. 6.36). Mit dem HOXB4-regulierbaren # F6 konnten wir ebenfalls beobachten, dass ein vor der EB-Differenzierung induzierter Ansatz ähnlich zur konstitutiven Kontrolle (#8) eine deutliche Reduktion GFP-positiver Zellen erfuhr (Abb. 6.37 A). Erfolgte die HOXB4 Induktion zum Zeitpunkt EB d2,5 oder auch EB d5 blieben die Kulturen 100% GFP+. Die zu diesen Zeitpunkten erzwungene HOXB4-Überexpression ließ eine Gegenregulation anscheinend nicht mehr zu. Aufgrund der in beiden Experimenten beobachteten Kinetiken der Anteile an GFP+ Zellen, konnten wir ein Ausschalten („*Silencing*“) des Transgens durch differenzierungsbedingte chromosomale Änderung am Insertionslocus ausschließen. Potentielles „*Silencing*“ müsste sonst aufgrund der Daten aus der Differenzierung des konstitutiven #8 bereits vor EB d2,5 eingesetzt haben, der Insertionslocus war aber für eine Transgeninduktion im #F6 an EBd 2,5 und EB d5 erreichbar. Eine Beendigung des angenommenen „*Silencings*“ zum Induktionszeitpunkt EB d2,5 würde wiederum die Progression der GFP-Reduktion im Differenzierungsexperiment des #8 nicht erklären. In der Maus ist HOXB4 erstmals ab ca. E10,5 im



hämatopoetischen Kompartiment aktiv, dem Zeitpunkt früher HSZ in AGM und Plazenta, primitivere Entwicklungsstufen exprimieren noch kein HOXB4 (Fleury *et al.*, 2010). Das *in vitro* Pendant zu E10, 5 ist ca. EB d6 (Abb. 3.2), daher nehmen wir an, dass auch *in vitro* erst zu diesem Zeitpunkt eine HOXB4-Expression für die weitere hämatopoetische Entwicklung nötig ist.

Trotz unterschiedlicher HOXB4-Induktion ließen sich in allen induzierten Ansätze relativ identische HSPZ-Subpopulationen generieren. Nur eine Expansion ohne HOXB-Überexpression konnte keine potente HSPZ-Fraktion generieren. Die Induktion von HOXB4 zwei Tage nach der EB-Dissoziation war noch ausreichend für eine adäquate Expansion, zeigte aber schon eine deutliche Reduktion der HSPZ-Gehalts, und wurde daher als spätmöglicher Induktionszeitpunkt eingestuft. Die EB d5 und EB d6 induzierten Zellen des #F6 konnten nach der 10tägigen Expansion eine annähernd gleich große CD41hi ckit+ CD34- Subpopulation etablieren. Doch für die erst EB d6 induzierten Zellen konnte bereits ein reduzierter CFU-GEMM-Gehalt nachgewiesen werden. Da in der serumfreien EB-Differenzierung des #8 bereits an EB d6 wieder ein Anteigen der GFP-Expression dokumentiert werden konnte, gehen wir davon aus, dass das maximale hämatopoetische Potenzial dieses Kultursystems genutzt wird wenn die HOXB4-Induktion an EB d5 erfolgt. Ob das *in vivo*-Potenzial der unterschiedlich induzierten Ansätze ebenfalls so große Ähnlichkeiten aufweisen wird, soll in kommenden Tx-Studien eruiert werden. Kyba *et al.* hatten 2002 gezeigt, dass sie mit Tet-on induzierter HOXB4-Überexpression homing- und engraftmentfähige ESZ-HSZ erzeugen konnten, die eine Langzeitrekonstitution *in vivo*, auch ohne weitere HOXB4-Expression vermitteln konnten. Dem entgegen stehen allerdings die Ergebnisse von Matsumoto *et al.*, 2009, wonach eine andauernde HOXB4-Expression doch nötig für das Langzeitengraftment sein soll. Eventuell vermittelte bei Kyba *et al.* eine Restexpression des Tet-Systems im nicht-induzierten Zustand *in vivo* das Langzeitengraftment (Matsumoto *et al.*, 2009). Auch wir arbeiten mit einem modifizierten Tet-on System, dass eine minimale Hintergrundaktivität nicht ausschließt, allerdings reichten diese Hintergrundaktivität *in vitro* nicht für eine adäquate Expansion generierter ESZ-HZ aus, die *in vivo* Evaluation steht noch aus.

## 7.6 Hämatopoetisch differenzierte iPS als neue Quelle für Zelltherapien?

Die Fähigkeit von pluripoteten Stammzellen, wie ESZ, sich dauerhaft selbst zu erneuern und dabei das Potenzial zu bewahren, sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu lassen, machte sie zu begerhtem „Ausgangsmaterial“ für den Einsatz in Zellersatztherapien. Dies gilt heute in noch größerem Maße, da seit wenigen Jahren pluripotente Stammzellen aus somatischen Zellen induziert werden können, und Arbeiten aus der Gruppe von Mickie Bhatia darauf hindeuten, dass es sogar möglich sein könnte, HSZ aus somatischen Zellen über „Transdifferenzierung“ zu erhalten, ohne den „Umweg“ über iPS Zellen

gehen zu müssen (Szabo *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass mittels der serumfreien EB-Differenzierung und der STFV-S-Expansion (red.O<sub>2</sub>) auch iPS-Klone zu hämatopoetischen Zellen und HSPZ differenziert werden können. Dennoch bleibt zurzeit fraglich, ob heutige iPS bzw. transdifferenzierte Zellen schon genügend Stabilität aufweisen um ESZ abzulösen. Kim *et al.* zeigten im Jahr 2010, dass nach momentanem Standard generierte iPS ein epigenetisches Gedächtnis besitzen (Methylierungsstatus), das dafür verantwortlich ist, dass iPS bevorzugt in Zellen gleichen Entwicklungsursprungs wie ihre Ausgangszelllinie differenzieren. Zudem besteht bei linienfremder Differenzierung die Möglichkeit, dass es nach gezielter Differenzierung und Tx zu Umdifferenzierungen unbekanntes Ausmaßes kommen könnte. Generierte pluripotente Stammzellen, die hingegen durch somatischen Kerntransfer in entkernte Eizellen erzeugt worden sind, besitzen einen ESZ-ähnlicheren epigenetischen Status und sind damit zur Zeit die bessere Alternative für den Ersatz von ESZ (Kim *et al.*, 2010). Doch ihr deutlich höherer Generierungsaufwand und ethische Beschränkung spricht dagegen sie für *in vitro* Versuche der Grundlagenforschung einzusetzen (Kim *et al.*, 2010), hier bleiben etablierte ESZ-Linien vorerst die erste Wahl.

## 7.7 Ausblick

Eine sichere stammzellbasierte Gen- und Zelltherapie erfordert die Verwendung von sehr gut charakterisierten, pluripotenten Stammzell-Klonen als Ausgangsmaterial. Denn polyklonale Ansätze, wie beispielsweise die HOXB4-transduzierten EB d6 Zellen von der Arbeitsgruppe um G.Q.Daley, bergen immer das Risiko des onkogenen Auswachsens von Klonen, sowie einer variablen Expressionshöhe des Transgens. Insertionsmutagenese sowie onkogenes Verhalten sollten aber weder vor, während noch nach der gezielten Differenzierung auftreten, und des Weiteren ist eine definierbare Expressionshöhe des Transgens unumgänglich. Eine weitere Anforderung ist, dass diese Zellen vom Empfänger angenommen werden müssen, weder GvHD noch HVG noch NKZ-vermittelte Abstoßung dürfen auftreten. Die transplantierten Zellen müssen Homing, Engraftment und eine lebenslange Rekonstitution gewährleisten, zusammen mit einer natürlichen, balancierten Differenzierung in die verschiedenen Zelltypen des Blutes. Die von uns etablierten ESZ-Klone mit ihrer definierten HOXB4-Überexpression lassen sich mit unseren effizienten und robusten *in vitro* Differenzierungsprotokollen zu potenten ESZ-HSZ differenzieren. Zusätzlich werden diese ESZ-HSZ nicht länger durch NKZ *in vitro* und *in vivo* lysiert, und erzielen deshalb einen signifikanten Langzeit-Multilinienchimärismus in immunkompetenten Empfängern. Damit wurden Voraussetzungen geschaffen die für die gezielte Korrektur einer hämatopoetischen Erkrankung, durch die Tx genetisch modifizierter HSZ, eingesetzt werden können. Im Zuge der voranschreitenden

---

Verbesserung der iPS-Technologie wäre damit ein potentes Protokoll auch für einzelpatientengenaue Therapien zur Hand. Es bleiben jedoch noch einige offene Fragen, die künftig beantwortet werden müssen:

1. Das in der Arbeit gezeigte HSPZ-Potenzial der serumfreien STFV-Kultur *in vitro* muss in Transplantationsstudien *in vivo* auf Langzeit-Multiliniengraftmentpotenzial hin validiert werden. Erste Experimente laufen und können bisher ein Engraftment in immunkompetenten Empfänger-mäusen belegen.

2. Neben der Etablierung einer serum- und kokulturfreien Differenzierung und Expansion für Zelltherapieanwendungen konnten wir auch zeigen, dass eine signifikante Expansion AGM-HSZ-ähnlicher ESZ-HSZ durch die Kokultivierung der ESZ-HZ auf Stromazellen der entwicklungsphysiologisch aufeinanderfolgenden hämatopoetischen Nischen fetale Leber (AFT024) und Knochenmark (OP9) möglich war. Es ist wahrscheinlich, dass sich dieses Generierungspotenzial noch verstärken lässt wenn diese physiologische Kokultivierungsreihe bereits eine Stufe früher begonnen wird und zwar auf Stromazellen der AGM-Region, deren stammzellunterstützendes Potenzial bereits gezeigt werden konnte (Nishikawa *et al.*, 2001; Oostendorp *et al.*, 2002; Gordon-Keylock *et al.*, 2010).

3. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass HOXB4 während der EB-Differenzierung nicht benötigt wird, spätestens am zweiten Expansionstag aber induziert werden sollte um eine adäquate hämatopoetische Entwicklung und ESZ-HSPZ-Expansion zu gewährleisten. Neben diesem definierten *in vitro*-Zeitfenster für die HOXB4-Überexpression konnten wir bereits in früheren Arbeiten ein Schwellenlevel für die Expressionshöhe von HOXB4 definieren, die für ein erfolgreiches Engraftment benötigt wird (Klump *et al.*, 2005; Pilat *et al.*, 2005a). In weiteren Untersuchungen soll mittels ESZ-HZ des Tet-on regulierbaren HOXB4 #F6 (die HOXB4-Expression über dem benötigten Schwellenlevel wurde bereits gezeigt), nach serumfreier EB-Differenzierung und 10tägigen STFV-Suspensionexpansion, das Zeitfenster einer *in vivo*-HOXB4-Überexpression eruiert werden, dass für ein stabiles Langzeit-Multiliniengraftment mindestens erforderlich ist. So könnte dann das durch fortgesetzt hohe HOXB4-Überexpression auftretende Differenzierungsungleichgewicht (Schiedlmeier *et al.*, 2003; Pilat *et al.*, 2005b) verhindert werden.

4. Wir konnten zeigen, dass sowohl die Differenzierung als auch die Expansion der ESZ-HZ vom umgebenden Sauerstoffpartialdruck abhängig ist. Reduzierte Sauerstofflevel forcieren die hämatopoetische Entwicklung im EB, begünstigen die serumfreie Expansion, sowie generell längere Kulturphasen. In zukünftigen Experimenten wollen wir die Auswirkungen einer in den hypoxischen Bereich (3%-0,1% [v/v]); wie er in der Osteoblasten-Stammzellnische im KM vorherrscht) verschobenen Kulturbedingung auf diese Parameter untersuchen.

5. Eine mechanistische Aufklärung der erreichten MHC-I-Kompetenz der ESZ-HZ soll die gezielte Immunkompetenz standardisierbar machen und die Möglichkeit eines verbreiteten Einsatzes schaffen. Weiterhin sollen die ESZ-HZ auf mögliche eigene NKZ, die engraftmentunterstützend in immunkompetenten Empfängern fungieren könnten (Murphy *et al.*, 1992a; Murphy *et al.*, 1992b; Murphy *et al.*, 1993; Ruggeri *et al.*, 2002), untersucht werden.

6. Der Vergleichbarkeit halber werden die oben genannten Fragestellungen nach wie vor mit CCE und ihnen abgeleiteten HOXB4-Klonen ausgeführt und in 129S6/SvEv-Mäuse transplantiert. Zeitversetzt soll aber auch eine Übertragung in einen anderen genetischen Hintergrund, wie beispielsweise C57/Bl6, erfolgen, um die Limitierungen der geringen HSZ-Frequenz von 129S6/SvEv (Papathanasiou *et al.*, 2010) auszuschalten.

7. Wir konnten ein phänotypische Ausreifung der ESZ-HZ besonders unter STFV-SF-Expansionsbedingungen aufzeigen, sowie indirekt funktionell die Ausreifung der ESH-HZ aus den Doppelkokultivierungen aufgrund ihrer Expansionsfähigkeit in STIF und STIF-A5, Zytokinbedingungen die zur Expansion adulter HSZ etabliert worden waren (Zhang und Lodish, 2005; Zhang *et al.*, 2008a). Ein weiterer funktioneller Reifungsnachweis ist der bereits im EB-Differenzierungssystem gezeigte Expressionswechsel von embryonalen Globinen ( $\epsilon_y$ ,  $\beta H0$ ,  $\beta H1$ ) zu adulten Globinen ( $\beta_{maj}$ ,  $\beta_{min}$ ) (Lindenbaum und Grosveld, 1990). Über RT-PCR-Analysen genomener RNS-Proben aus unseren Differenzierungs- und Expansionsansätzen sollen die erythroiden Reifungszustände charakterisiert werden und darüber weiterer funktioneller Aufschluss über den Reifungsfortschritt der Kulturen gewonnen werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abramovich C, Pineault N, Ohta H, Humphries RK.** 2005. Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion. *Ann N Y Acad Sci* 1044:109-116.
- Aizawa S, Tavassoli M.** 1988. Molecular basis of the recognition of intravenously transplanted hemopoietic cells by bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3180-3183.
- Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL.** 2000a. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 12:144-150.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL.** 2000b. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
- Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, Imaizumi T.** 2003. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 83:65-73.
- Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, Dieterlen-Lievre F.** 2003. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* 130:5437-5444.
- Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, Dubart-Kupperschmitt A, Fichelson S.** 2003. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 9:1423-1427.
- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK.** 2001. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol* 29:1125-1134.
- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK.** 2002. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109:39-45.
- Ashman LK.** 1999. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1037-1051.
- Bach LA, Headey SJ, Norton RS.** 2005. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab* 16:228-234.
- Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K.** 2001. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 97:139-146.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D.** 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Parker VP, Suggs S, Skrine JD, Merewether LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jacobsen F, Xie C,**

- Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse J, Garcia A, Xu W, Del Castillo J, Biron J, Cole S, Hu MC-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Rosselman RA.** 1994. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77:1117-1124.
- Bashamboo A, Taylor AH, Samuel K, Panthier JJ, Whetton AD, Forrester LM.** 2006. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway. *J Cell Sci* 119:3039-3046.
- Baum C, Schambach A, Bohne J, Galla M.** 2006. Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther* 13:1050-1063.
- Beddington RS, Robertson EJ.** 1989. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105:733-737.
- Belfiore A.** 2007. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des* 13:671-686.
- Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove NN.** 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* 6:48-58.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP.** 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189-220.
- Bishop AE, Buttery LD, Polak JM.** 2002. Embryonic stem cells. *J Pathol* 197:424-429.
- Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet D.** 1991. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 349:329-331.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL.** 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534-537.
- Bjornsson JM, Larsson N, Brun AC, Magnusson M, Andersson E, Lundstrom P, Larsson J, Repetowska E, Ehinger M, Humphries RK, Karlsson S.** 2003. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Mol Cell Biol* 23:3872-3883.
- Blanchard F, Duplomb L, Rahe S, Vusio P, Hoflack B, Jacques Y, Godard A.** 1999. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction. *J Biol Chem* 274:24685-24693.
- Bonde S, Dowden AM, Chan KM, Tabayoyong WB, Zavazava N.** 2008. HOXB4 but not BMP4 confers self-renewal properties to ES-derived hematopoietic progenitor cells. *Transplantation* 86:1803-1809.
- Bonifer C, Faust N, Geiger H, Muller AM.** 1998. Developmental changes in the differentiation capacity of haematopoietic stem cells. *Immunol Today* 19:236-241.
- Bonnefoix T, Callanan M.** 2010. Accurate hematopoietic stem cell frequency estimates by fitting multicell Poisson models substituting to the single-hit Poisson model in limiting dilution transplantation assays. *Blood* 116:2472-2475.

- Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE.** 1997. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* 90:2282-2292.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E.** 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
- Brecher G, Neben S, Yee M, Bullis J, Cronkite EP.** 1988. Pluripotent stem cells with normal or reduced self renewal survive lethal irradiation. *Exp Hematol* 16:627-630.
- Brun AC, Fan X, Bjornsson 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.
- Bucher O, Wartenberg H.** 1992. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. *Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto* 11. Auflage.
- Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM.** 1983. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 131:1531-1538.
- Burgers HF, Schelshorn DW, Wagner W, Kuschinsky W, Maurer MH.** 2008. Acute anoxia stimulates proliferation in adult neural stem cells from the rat brain. *Exp Brain Res* 188:33-43.
- Buske C, Humphries RK.** 2000. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* 71:301-308.
- Callus BA, Mathey-Prevot B.** 1998. Interleukin-3-induced activation of the JAK/STAT pathway is prolonged by proteasome inhibitors. *Blood* 91:3182-3192.
- Cannistra SA, Vellenga E, Groshek P, Rambaldi A, Griffin JD.** 1988. Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and interleukin 3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor-dependent mechanism. *Blood* 71:672-676.
- Carlyle JR, Michie AM, Cho SK, Zuniga-Pflucker JC.** 1998. Natural killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny. *J Immunol* 160:744-753.
- Cerwenka A, Lanier LL.** 2001. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181:158-169.
- Challier C, Cocault L, Berthier R, Binart N, Dusanter-Fourt I, Uzan G, Souyri M.** 2002. The cytoplasmic domain of Mpl receptor transduces exclusive signals in embryonic and fetal hematopoietic cells. *Blood* 100:2063-2070.
- Chan KM, Bonde S, Klump H, Zavazava N.** 2008. Hematopoiesis and immunity of HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor cells. *Blood* 111:2953-2961.
- Chapman TL, Bjorkman PJ.** 1998. Characterization of a murine cytomegalovirus class I major histocompatibility complex (MHC) homolog: comparison to MHC molecules and to the human cytomegalovirus MHC homolog. *J Virol* 72:460-466.

- Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z.** 2004. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 9:349-358.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY.** 2006. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:534-544.
- Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT.** 1996. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13158-13163.
- Cherry SR, Biniszkiewicz D, van Parijs L, Baltimore D, Jaenisch R.** 2000. Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 20:7419-7426.
- Chicha L, Feki A, Boni A, Irion O, Hovatta O, Jaconi M.** 2011. Human Pluripotent Stem Cells Differentiated in Fully Defined Medium Generate Hematopoietic CD34 and CD34 Progenitors with Distinct Characteristics. *PLoS One* 6:e14733.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G.** 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732.
- Chou S, Lodish HF.** 2010. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7799-7804.
- Christensen JL, Weissman IL.** 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14541-14546.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH.** 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133:157-165.
- Coelho MJ, Fernandes MH.** 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21:1095-1102.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** 1997. Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ.** 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271:736-741.
- Criado M, Lindstrom JM, Anderson CG, Dennert G.** 1985. Cytotoxic granules from killer cells: specificity of granules and insertion of channels of defined size into target membranes. *J Immunol* 135:4245-4251.
- Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL.** 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J* 17:4735-4743.
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I.** 1996. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86:907-916.



- Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ.** 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22:770-778.
- Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW.** 2002. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng* 78:442-453.
- Danos O, Mulligan RC.** 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6460-6464.
- de Bruijn MF, Ma X, Robin C, Ottersbach K, Sanchez MJ, Dzierzak E.** 2002. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* 16:673-683.
- de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E.** 2000. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J* 19:2465-2474.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al.** 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369:533-538.
- del Val M, Hengel H, Hacker H, Hartlaub U, Ruppert T, Lucin P, Koszinowski UH.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med* 176:729-738.
- Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE.** 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:421-439.
- Deutsch VR, Tomer A.** 2006. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 134:453-466.
- Diefenbach A, Raulet DH.** 2002. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol Rev* 188:9-21.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R.** 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45.
- Donnelly ML, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, ten Dam E, Gani D, Ryan MD.** 2001. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol* 82:1027-1041.
- Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O, Reisner Y, Benvenisty N.** 2006. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 24:221-229.
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N.** 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9864-9869.

- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.** 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-8471.
- Eaves CJ, Cashman JD, Eaves AC.** 1991. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. *Methods in Cell Science* 13:55-61.
- Ema H, Nakauchi H.** 2000. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95:2284-2288.
- Eming SA, Krieg T.** 2006. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Invest Dermatol Symp Proc* 11:79-86.
- Era T, Takahashi T, Sakai K, Kawamura K, Nakano T.** 1997. Thrombopoietin enhances proliferation and differentiation of murine yolk sac erythroid progenitors. *Blood* 89:1207-1213.
- Evans MJ, Kaufman MH.** 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Fandrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B.** 2002. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8:171-178.
- Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, Davis-Poynter NJ.** 1997. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 386:510-514.
- Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V.** 2003. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 130:4217-4227.
- Firth SM, Baxter RC.** 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23:824-854.
- Fleury M, Petit-Cocault L, Clay D, Souyri M.** 2010. Mpl receptor defect leads to earlier appearance of hematopoietic cells/hematopoietic stem cells in the Aorta-Gonad-Mesonephros region, with increased apoptosis. *Int J Dev Biol* 54:1067-1074.
- Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF.** 1956. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177:452-454.
- Forsyth NR, Kay A, Hampson K, Downing A, Talbot R, McWhir J.** 2008. Transcriptome alterations due to physiological normoxic (2% O<sub>2</sub>) culture of human embryonic stem cells. *Regen Med* 3:817-833.
- Forsyth NR, Musio A, Vezzoni P, Simpson AH, Noble BS, McWhir J.** 2006. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning Stem Cells* 8:16-23.
- Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K.** 2002. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest* 110:389-394.

- Gadient RA, Patterson PH.** 1999. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 17:127-137.
- Galandrini R, Cernetti C, Albi N, Dembech C, Terenzi A, Grignani F, Velardi A.** 1991. Interleukin-6 is constitutively produced by human CTL clones and is required to maintain their cytolytic function. *Cell Immunol* 138:11-23.
- Garcia-Porrero JA, Godin IE, Dieterlen-Lievre F.** 1995. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 192:425-435.
- Garcia-Porrero JA, Manaia A, Jimeno J, Lasky LL, Dieterlen-Lievre F, Godin IE.** 1998. Antigenic profiles of endothelial and hemopoietic lineages in murine intraembryonic hemogenic sites. *Dev Comp Immunol* 22:303-319.
- Gearing DP.** 1993. The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv Immunol* 53:31-58.
- Gehring WJ, Affolter M, Burglin T.** 1994. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 63:487-526.
- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK.** 2005. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8:365-375.
- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N.** 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417:954-958.
- Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr., Patterson C.** 1996. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 137:2262-2268.
- Godin I, Garcia-Porrero JA, Dieterlen-Lievre F, Cumano A.** 1999. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* 190:43-52.
- Gordon-Keylock SA, Jackson M, Huang C, Samuel K, Axton RA, Oostendorp RA, Taylor H, Wilson J, Forrester LM.** 2010. Induction of hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells by an AGM-derived stromal cell line is not further enhanced by overexpression of HOXB4. *Stem Cells Dev* 19:1687-1698.
- Gossen M, Bujard H.** 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Gray AM, Mason AJ.** 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247:1328-1330.
- Gromme M, Neefjes J.** 2002. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39:181-202.
- Guan K, Rohwedel J, Wobus AM.** 1999. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30:211-226.

- Guvakova MA.** 2007. Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:890-909.
- Hackney JA, Charbord P, Brunk BP, Stoeckert CJ, Lemischka IR, Moore KA.** 2002. A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13061-13066.
- Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, Kastelein R, Hudak S, Wagner J, Mattson J, et al.** 1994. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368:643-648.
- Hardin J, MacLeod S, Grigorieva I, Chang R, Barlogie B, Xiao H, Epstein J.** 1994. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 84:3063-3070.
- Hardy CL, Minguell JJ.** 1993. Cellular interactions in hemopoietic progenitor cell homing: a review. *Scanning Microsc* 7:333-341.
- Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schuller U, Dani I, Denkhaus D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD, Schilling K, Pietsch T.** 2005. Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* 166:1153-1162.
- Hato T, Tabata M, Oike Y.** 2008. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 18:6-14.
- Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S.** 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193:1005-1014.
- Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD.** 1998. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125:1457-1468.
- Heimfeld S, Hudak S, Weissman I, Rennick D.** 1991. The in vitro response of phenotypically defined mouse stem cells and myeloerythroid progenitors to single or multiple growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9902-9906.
- Heinz N, Schambach A, Galla M, Maetzig T, Baum C, Loew R, Schiedlmeier B.** 2010. Retroviral and transposon-based tet-regulated All-In-One vectors with reduced background expression and improved dynamic range. *Hum Gene Ther.*
- Heise MT, Connick M, Virgin HWt.** 1998. Murine cytomegalovirus inhibits interferon gamma-induced antigen presentation to CD4 T cells by macrophages via regulation of expression of major histocompatibility complex class II-associated genes. *J Exp Med* 187:1037-1046.
- Helgason CD, Sauvageau G, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK.** 1996. Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood* 87:2740-2749.
- Henkart PA, Sitkovsky MV.** 1994. Cytotoxic lymphocytes. Two ways to kill target cells. *Curr Biol* 4:923-925.
- Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH.** 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16:216-229.

- Heyworth CM, Dexter TM, Kan O, Whetton AD.** 1990. The role of hemopoietic growth factors in self-renewal and differentiation of IL-3-dependent multipotential stem cells. *Growth Factors* 2:197-211.
- Hirano T.** 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al.** 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
- Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM.** 2009. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 113:5444-5455.
- Huang Y, Rezzoug F, Xu H, Chilton PM, Schanie CL, Fugier-Vivier I, Ildstad ST.** 2005. NK cells play a critical role in the regulation of class I-deficient hemopoietic stem cell engraftment: evidence for NK tolerance correlates with receptor editing. *J Immunol* 175:3753-3761.
- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR.** 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251-1256.
- Huynh H, Iizuka S, Kaba M, Kirak O, Zheng J, Lodish HF, Zhang CC.** 2008. Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 26:1628-1635.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG.** 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20:761-787.
- Ikebuchi K, Ihle JN, Hirai Y, Wong GG, Clark SC, Ogawa M.** 1988. Synergistic factors for stem cell proliferation: further studies of the target stem cells and the mechanism of stimulation by interleukin-1, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 72:2007-2014.
- 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 U S A* 89:1502-1506.
- Inamdar M, Koch T, Rapoport R, Dixon JT, Probolus JA, Cram E, Bautch VL.** 1997. Yolk sac-derived murine macrophage cell line has a counterpart during ES cell differentiation. *Dev Dyn* 210:487-497.
- Ingram DA, Krier TR, Mead LE, McGuire C, Prater DN, Bhavsar J, Saadatzaheh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Li F, Yoder MC, Haneline LS.** 2007. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells* 25:297-304.
- Irion S, Clarke RL, Luche H, Kim I, Morrison SJ, Fehling HJ, Keller GM.** 2010. Temporal specification of blood progenitors from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Development* 137:2829-2839.
- Ito T, Tajima F, Ogawa M.** 2000. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 28:1269-1273.

- Iwasaki A, Medzhitov R.** 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295.
- Jacobs R, Pawlak CR, Mikeska E, Meyer-Olson D, Martin M, Heijnen CJ, Schedlowski M, Schmidt RE.** 2001. Systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients differ from healthy controls in their cytokine pattern after stress exposure. *Rheumatology (Oxford)* 40:868-875.
- Jacobsen SE, Okkenhaug C, Myklebust J, Veiby OP, Lyman SD.** 1995. The FLT3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: synergistic interactions with interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J Exp Med* 181:1357-1363.
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB.** 2007. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2:35.
- Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, Bollerot K, Pouget C, de Bruijn M.** 2005. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol* 33:1029-1040.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.** 2005. *Immuno Biology: The immune system in health and disease*. 6th edition.
- Jarvis MA, Nelson JA.** 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* 5:403-407.
- Jones JI, Clemmons DR.** 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
- Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G.** 1997. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124:2039-2048.
- Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K.** 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458:771-775.
- Karre K.** 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55:221-228.
- Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R.** 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-678.
- Kaushansky K.** 2005. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* 1044:139-141.
- Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE.** 1999. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 13:687-698.
- Kawahara Y, Manabe T, Matsumoto M, Kajiume T, Matsumoto M, Yuge L.** 2009. LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *PLoS One* 4:e6343.
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV.** 1993. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13:473-486.

- Keller GM.** 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 7:862-869.
- Keller GM, Johnson GR, Phillips RA.** 1983. Hemopoiesis in spleen and bone marrow cultures. *J Cell Physiol* 116:7-15.
- Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG.** 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28:619-637.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ.** 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121:1109-1121.
- Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H.** 1975a. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5:117-121.
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H.** 1975b. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5:112-117.
- Kim H, Choi JY, Lee JM, Park YS, Suh H, Song HR, Jo SA, Jo I.** 2008. Dexamethasone increases angiopoietin-1 and quiescent hematopoietic stem cells: a novel mechanism of dexamethasone-induced hematoprotection. *FEBS Lett* 582:3509-3514.
- Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Scholer HR.** 2009. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461:649-643.
- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ.** 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467:285-290.
- Kimura H, Ishibashi T, Uchida T, Maruyama Y, Friese P, Burstein SA.** 1990. Interleukin 6 is a differentiation factor for human megakaryocytes in vitro. *Eur J Immunol* 20:1927-1931.
- Kirito K, Kaushansky K.** 2005. Thrombopoietin stimulates vascular endothelial cell growth factor (VEGF) production in hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 4:1729-1731.
- Kishimoto T.** 1994. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* 12 Suppl 1:37-44; discussion 44-35.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S.** 1994. Cytokine signal transduction. *Cell* 76:253-262.
- Klump H, Schiedlmeier B, Baum C.** 2005. Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold. *Ann N Y Acad Sci* 1044:6-15.
- Klump H, Schiedlmeier B, Vogt B, Ryan M, Ostertag W, Baum C.** 2001. Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy. *Gene Ther* 8:811-817.

- Kofidis T, deBruin JL, Tanaka M, Zwierzchowiecka M, Weissman I, Fedoseyeva E, Haverich A, Robbins RC.** 2005. They are not stealthy in the heart: embryonic stem cells trigger cell infiltration, humoral and T-lymphocyte-based host immune response. *Eur J Cardiothorac Surg* 28:461-466.
- Krebs P, Moresco EMY, Beutler B.** 2010. Record for ganymede, updated Jul 27, 2010. MUTAGENETIX (TM), B. Beutler and colleagues, Department of Genetics, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA.
- Krilleke D, Ng YS, Shima DT.** 2009. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: a structure-function study. *Biochem Soc Trans* 37:1201-1206.
- Kros 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.
- Kros J, Sauvageau G.** 2000. AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. *Oncogene* 19:5134-5141.
- Krumlauf R.** 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191-201.
- Kubota A, Kubota S, Farrell HE, Davis-Poynter N, Takei F.** 1999. Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144. *Cell Immunol* 191:145-151.
- Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H.** 2003. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 18:699-711.
- Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J, Medvinsky A.** 2002. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129:4891-4899.
- Kustikova OS, Baum C, Fehse B.** 2008. Retroviral integration site analysis in hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol* 430:255-267.
- Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ.** 2002. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109:29-37.
- Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ.** 2003. Development of hematopoietic repopulating cells from embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365:114-129.
- Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G.** 2009. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457:892-895.
- Lanier LL.** 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
- Lanier LL, Spits H, Phillips JH.** 1992. The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol Today* 13:392-395.



- Lawrence HJ, Largman C.** 1992. Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood* 80:2445-2453.
- Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C.** 1996. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 14:281-291.
- Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H.** 1999. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 284:67-81.
- Lee SB, Kim JJ, Kim TW, Kim BS, Lee MS, Yoo YD.** 2010. Serum deprivation-induced reactive oxygen species production is mediated by Romo1. *Apoptosis* 15:204-218.
- Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J.** 1997. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* 272:6311-6317.
- Lengerke C, Grauer M, Niebuhr NI, Riedt T, Kanz L, Park IH, Daley GQ.** 2009. Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1176:219-227.
- Lengerke C, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yates F, Wang Y, Bansal D, Daley GQ.** 2007. The cdx-hox pathway in hematopoietic stem cell formation from embryonic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1106:197-208.
- Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, Jang IH, Maouche-Chretien L, McKinney-Freeman S, Davidson AJ, Hammerschmidt M, Rentzsch F, Green JB, Zon LI, Daley GQ.** 2008. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell* 2:72-82.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.** 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.
- Levine M, Hoey T.** 1988. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55:537-540.
- Li J, Xia Y, Kuter DJ.** 1999. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. *Br J Haematol* 106:345-356.
- Lindenbaum MH, Grosveld F.** 1990. An in vitro globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev* 4:2075-2085.
- Lindquist JA, Hammerling GJ, Trowsdale J.** 2001. ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. *Faseb J* 15:1448-1450.
- Ljunggren HG, Karre K.** 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162:1745-1759.
- Ljunggren HG, Karre K.** 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244.
- London L, Perussia B, Trinchieri G.** 1986. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol* 137:3845-3854.

- Luskey BD, Rosenblatt M, Zsebo K, Williams DA.** 1992. Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* 80:396-402.
- Lyman SD, Brasel K, Rousseau AM, Williams DE.** 1994. The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem Cells* 12 Suppl 1:99-107; discussion 108-110.
- Lyman SD, Jacobsen SE.** 1998. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91:1101-1134.
- Lyman SD, James L, Escobar S, Downey H, de Vries P, Brasel K, Stocking K, Beckmann MP, Copeland NG, Cleveland LS, et al.** 1995. Identification of soluble and membrane-bound isoforms of the murine flt3 ligand generated by alternative splicing of mRNAs. *Oncogene* 10:149-157.
- Manyak CL, Norton GP, Lobe CG, Bleackley RC, Gershenfeld HK, Weissman IL, Kumar V, Sigal NH, Koo GC.** 1989. IL-2 induces expression of serine protease enzymes and genes in natural killer and nonspecific T killer cells. *J Immunol* 142:3707-3713.
- Marcucci R, Romano M.** 2008. Thrombopoietin and its splicing variants: structure and functions in thrombopoiesis and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1782:427-432.
- Marti HH, Risau W.** 1998. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15809-15814.
- Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F.** 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265.
- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, et al.** 1990. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 63:203-211.
- Martin GR.** 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634-7638.
- Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H.** 2009. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS One* 4:e4820.
- Maximow A.** 1909. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica*.
- McClanahan T, Dalrymple S, Barkett M, Lee F.** 1993. Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during in vitro development of hematopoietic cells. *Blood* 81:2903-2915.
- McCubrey JA, Steelman LS, Mayo MW, Algate PA, Dellow RA, Kaleko M.** 1991. Growth-promoting effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hematopoietic cells: overexpression of introduced IGF-1 receptor abrogates interleukin-3 dependency of murine factor-dependent cells by a ligand-dependent mechanism. *Blood* 78:921-929.

- McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ.** 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489-3497.
- McKinney-Freeman SL, Lengerke C, Jang IH, Schmitt S, Wang Y, Philitas M, Shea J, Daley GQ.** 2008. Modulation of murine embryonic stem cell-derived CD41+c-kit+ hematopoietic progenitors by ectopic expression of Cdx genes. *Blood* 111:4944-4953.
- McKinney-Freeman SL, Naveiras O, Yates F, Loewer S, Philitas M, Curran M, Park PJ, Daley GQ.** 2009. Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood* 114:268-278.
- McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D.** 1997. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 89:65-71.
- Medvinsky A, Dzierzak E.** 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86:897-906.
- Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA.** 1993. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364:64-67.
- Metcalf D.** 1984. Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications. "Elsevier" Amsterdam, New York:1-17.
- Metcalf D.** 1989. Actions and interactions of G-CSF, LIF, and IL-6 on normal and leukemic murine cells. *Leukemia* 3:349-355.
- Metcalf D.** 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111:485-491.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR.** 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782.
- Mikkola H.** 2009. ESAM: adding to the hematopoietic toolbox. *Blood* 113:2871-2872.
- Mikkola HK, Gekas C, Orkin SH, Dieterlen-Lievre F.** 2005. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol* 33:1048-1054.
- Mikkola HK, Orkin SH.** 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133:3733-3744.
- Moore KA, Ema H, Lemischka IR.** 1997a. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89:4337-4347.
- Moore KA, Pytowski B, Witte L, Hicklin D, Lemischka IR.** 1997b. Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4011-4016.
- Moore MA.** 1995. Hematopoietic reconstruction: new approaches. *Clin Cancer Res* 1:3-9.

- Moore MA, Metcalf D.** 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18:279-296.
- Moretti P, Simmons P, Thomas P, Haylock D, Rathjen P, Vadas M, D'Andrea R.** 1994. Identification of homeobox genes expressed in human haemopoietic progenitor cells. *Gene* 144:213-219.
- Morita S, Kojima T, Kitamura T.** 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7:1063-1066.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL.** 1995. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10302-10306.
- Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E.** 1994. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1:291-301.
- Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS.** 2000. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* 10:989-992.
- Murphy WJ, Bennett M, Kumar V, Longo DL.** 1992a. Donor-type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 148:2953-2960.
- Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL.** 1992b. Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood* 80:670-677.
- Murphy WJ, Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL.** 1993. Natural killer cells and bone marrow transplantation. *J Natl Cancer Inst* 85:1475-1482.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S.** 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26:101-106.
- Nakano T, Kodama H, Honjo T.** 1994. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265:1098-1101.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D.** 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Nishikawa M, Tahara T, Hinohara A, Miyajima A, Nakahata T, Shimosaka A.** 2001. Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 938:109-116.
- Nishikawa S, Jakt LM, Era T.** 2007. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:502-507.
- Nitert MD, Chisalita SI, Olsson K, Bornfeldt KE, Arnqvist HJ.** 2005. IGF-I/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 229:31-37.

- Ogawa M, Clark SC.** 1988. Synergistic interaction between interleukin-6 and interleukin-3 in support of stem cell proliferation in culture. *Blood Cells* 14:329-337.
- Oostendorp RA, Harvey KN, Kusadasi N, de Bruijn MF, Saris C, Ploemacher RE, Medvinsky AL, Dzierzak EA.** 2002. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood* 99:1183-1189.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M.** 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292-15297.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H.** 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273:242-245.
- Ottersbach K, Dzierzak E.** 2005. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8:377-387.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G.** 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126:5073-5084.
- Papathanasiou P, Attema JL, Karsunky H, Xu J, Smale ST, Weissman IL.** 2009. Evaluation of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells with CD150. *Stem Cells* 27:2498-2508.
- Papathanasiou P, Tunningly R, Pattabiraman DR, Ye P, Gonda TJ, Whittle B, Hamilton AE, Cridland SO, Lourie R, Perkins AC.** 2010. A recessive screen for genes regulating hematopoietic stem cells. *Blood*.
- Papayannopoulou T, Craddock C.** 1997. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. *Acta Haematol* 97:97-104.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD.** 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5431-5436.
- Pattengale PK.** 1994. Tumours of the lymphohaematopoietic system. *IARC Sci Publ*:651-670.
- Paulsson K, Wang P.** 2003. Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1641:1-12.
- Pavelic J, Radakovic B, Pavelic K.** 2007. Insulin-like growth factor 2 and its receptors (IGF 1R and IGF 2R/mannose 6-phosphate) in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 105:727-735.
- Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, Kouskoff V.** 2008. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* 135:1525-1535.
- Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL.** 1990. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 141:344-352.

- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T.** 1999. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283:845-848.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Philippou A, Maridaki M, Halapas A, Koutsilieris M.** 2007. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In Vivo* 21:45-54.
- Phillips DJ, McFarlane JR, Hearn MT, de Kretser DM.** 1997. Inhibin, activin and follistatin bind preferentially to the transformed species of alpha 2-macroglobulin. *J Endocrinol* 155:65-71.
- Pilat S, Carotta S, Schiedlmeier B, Kamino K, Mairhofer A, Schmidt M, von Kalle C, Steinlein P, Ostertag W, Baum C, Beug H, Klump H.** 2005a. Hematopoietic Repopulation, In Vivo, with Genetically Defined Clones Derived from HOXB4 Expressing ES-Cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2005 106: Abstract 196.*
- Pilat S, Carotta S, Schiedlmeier B, Kamino K, Mairhofer A, Will E, Modlich U, Steinlein P, Ostertag W, Baum C, Beug H, Klump H.** 2005b. HOXB4 enforces equivalent fates of ES-cell-derived and adult hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12101-12106.
- Rabenstein DL.** 2002. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 19:312-331.
- Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KD, Fehling HJ, Keller G, Simon MC.** 2004. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development* 131:4623-4634.
- Raulet DH.** 2006. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol* 18:145-150.
- Reber L, Da Silva CA, Frossard N.** 2006. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 533:327-340.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ.** 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359:550-551.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL.** 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.
- Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, Lux CT, Francis CS, Chan DN, Conway S, Orkin SH, Yoder MC, Mikkola HK.** 2008. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell* 2:252-263.
- Rideout WM, 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R.** 2002. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109:17-27.
- Risau W, Flamme I.** 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.

- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M.** 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323:445-448.
- Robertson NJ, Brook FA, Gardner RL, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ.** 2007. Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20920-20925.
- Robinson CJ, Stringer SE.** 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114:853-865.
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO.** 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12:2099-2108.
- Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM.** 2001. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol In Vitro* 15:741-753.
- Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK.** 2005. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol* 33:131-143.
- Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA.** 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:2173-2182.
- Rotwein P.** 1999. Human growth disorders: molecular genetics of the growth hormone-insulin-like growth factor I axis. *Acta Paediatr Suppl* 88:148-151; discussion 152.
- Rotwein P, Hall LJ.** 1990. Evolution of insulin-like growth factor II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. *DNA Cell Biol* 9:725-735.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A.** 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097-2100.
- Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, Aversa F, Martelli MF, Velardi A.** 2008. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 40:84-90.
- Russo VC, Schutt BS, Andaloro E, Ymer SI, Hoeflich A, Ranke MB, Bach LA, Werther GA.** 2005. Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology* 146:4445-4455.
- Ryan MD, Drew J.** 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polypeptide. *Embo J* 13:928-933.
- Ryan MD, King AM, Thomas GP.** 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* 72 (Pt 11):2727-2732.
- Sabin F.** 1920. Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contribut. Embryol.* 9:213 -262.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P.** 2007. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28:20-47.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd.ed., vols. 1,2, and 3, Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratories Version 05/07.
- Sandberg-Nordqvist AC, Stahlbom PA, Lake M, Sara VR.** 1992. Characterization of two cDNAs encoding insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the human fetal brain. *Brain Res Mol Brain Res* 12:275-277.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M.** 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265:687-695.
- Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H.** 1996. Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res* 733:9-14.
- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence HJ, Humphries RK.** 1994. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12223-12227.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK.** 1995. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9:1753-1765.
- Schiedlmeier B, Klump H, Will E, Arman-Kalcek G, Li Z, Wang Z, Rimek A, Friel J, Baum C, Ostertag W.** 2003. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood* 101:1759-1768.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16952-16957.
- Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR.** 1991. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev* 5:728-740.
- Scholer HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P.** 1989. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *Embo J* 8:2543-2550.
- Schuller AG, Zwarthoff EC, Drop SL.** 1993. Gene expression of the six insulin-like growth factor binding proteins in the mouse conceptus during mid- and late gestation. *Endocrinology* 132:2544-2550.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
- Sies H.** 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In Oxidative Stress, ed. SIES, H. *Academic Press*:pp. 1-8.



- Sies H.** 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* 25:1058-1071.
- Sies H.** 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69:965-968.
- Sies H, Cadenas E.** 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311:617-631.
- Sieweke MH, Graf T.** 1998. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8:545-551.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D.** 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-690.
- Solter D, Knowles BB.** 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5565-5569.
- Srivastava AS, Kaushal S, Mishra R, Lane TA, Carrier E.** 2006. Dexamethasone facilitates erythropoiesis in murine embryonic stem cells differentiating into hematopoietic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 346:508-516.
- Srivastava AS, Nedelcu E, Esmaeli-Azad B, Mishra R, Carrier E.** 2007. Thrombopoietin enhances generation of CD34+ cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:1456-1461.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K.** 2002. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2:573-583.
- Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM.** 1989. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74:1563-1570.
- Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ.** 1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3584-3588.
- Suzuki A, Nakano T.** 2001. Development of hematopoietic cells from embryonic stem cells. *Int J Hematol* 73:1-5.
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F.** 1999. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 29:1743-1751.
- Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, Levadoux-Martin M, Bhatia M.** 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468:521-526.
- Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ.** 1990. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8736-8740.

- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y.** 2009. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab* 10:178-188.
- Tabayoyong WB, Salas JG, Bonde S, Zavazava N.** 2009. HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived Lin-c-kit+ and Lin-Sca-1+ hematopoietic progenitors express H60 and are targeted by NK cells. *J Immunol* 183:5449-5457.
- Taga T.** 1996. Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* 67:1-10.
- Taga T, Kishimoto T.** 1992. Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb J* 6:3387-3396.
- Takahashi K, Yamanaka S.** 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tan P, Kropshofer H, Mandelboim O, Bulbuc N, Hammerling GJ, Momburg F.** 2002. Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J Immunol* 168:1950-1960.
- Taoudi S, Gonneau C, Moore K, Sheridan JM, Blackburn CC, Taylor E, Medvinsky A.** 2008. Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell* 3:99-108.
- Taylor E, Taoudi S, Medvinsky A.** 2010. Hematopoietic stem cell activity in the aorta-gonad-mesonephros region enhances after mid-day 11 of mouse development. *Int J Dev Biol* 54:1055-1060.
- Thomas KR, Capecchi MR.** 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK.** 1999. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* 94:2605-2612.
- Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS.** 2004. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* 32:1000-1009.
- Till JE, McCulloch EA.** 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-222.
- Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FH, Williams DA.** 1992. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7350-7354.

- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD.** 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3:778-784.
- Torok-Storb B.** 1988. Cellular interactions. *Blood* 72:373-385.
- Unger C, Karner E, Treschow A, Stellan B, Fellidin U, Concha H, Wendel M, Hovatta O, Aints A, Ahrlund-Richter L, Dilber MS.** 2008. Lentiviral-mediated HoxB4 expression in human embryonic stem cells initiates early hematopoiesis in a dose-dependent manner but does not promote myeloid differentiation. *Stem Cells* 26:2455-2466.
- Varela-Nieto I, Hartl M, Gorospe I, Leon Y.** 2007. Anti-apoptotic actions of insulin-like growth factors: lessons from development and implications in neoplastic cell transformation. *Curr Pharm Des* 13:687-703.
- Verfaillie CM.** 2002. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol* 3:314-317.
- Vogiagis D, Fry RC, Sandeman RM, Salamonsen LA.** 1997. Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. *J Reprod Fertil* 109:279-288.
- Voigt S, Mesci A, Ettinger J, Fine JH, Chen P, Chou W, Carlyle JR.** 2007. Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity* 26:617-627.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
- Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P.** 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292:740-743.
- Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Nakagawa H, Tamaki K.** 2001. Interferon-gamma-induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus. *Dermatology* 202:239-245.
- Wang J, Zhao HP, Lin G, Xie CQ, Nie DS, Wang QR, Lu GX.** 2005a. In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by co-culture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. *Cell Biol Int* 29:654-661.
- Wang Y, Yates F, Naveiras O, Ernst P, Daley GQ.** 2005b. Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19081-19086.
- Warlich E, Kuehle J, Cantz T, Brugman MH, Maetzig T, Galla M, Filipczyk AA, Halle S, Klump H, Scholer HR, Baum C, Schroeder T, Schambach A.** 2011. Lentiviral Vector Design and Imaging Approaches to Visualize the Early Stages of Cellular Reprogramming. *Mol Ther*.
- Weigent DA, Stanton GJ, Johnson HM.** 1983. Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon. *Infect Immun* 41:992-997.
- Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E, Kanz L, Mohle R.** 2007. Effect of FLT3 inhibition on normal hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1106:190-196.

- Weiss MJ, Orkin SH.** 1996. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest* 97:591-595.
- Will E, Speidel D, Wang Z, Ghiaur G, Rimek A, Schiedlmeier B, Williams DA, Baum C, Ostertag W, Klump H.** 2006. HOXB4 inhibits cell growth in a dose-dependent manner and sensitizes cells towards extrinsic cues. *Cell Cycle* 5:14-22.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM.** 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-687.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL.** 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9:2105-2116.
- Wobus AM.** 2001. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 22:149-164.
- Wobus AM, Guan K, Pich U.** 2001. In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. *Methods Mol Biol* 158:263-286.
- Wong PM, Chung SW, Chui DH, Eaves CJ.** 1986. Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3851-3854.
- Xu MJ, Matsuoka S, Yang FC, Ebihara Y, Manabe A, Tanaka R, Eguchi M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K.** 2001. Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* 97:2016-2022.
- Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Mansson R, Sigvardsson M, Jacobsen SE.** 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105:2717-2723.
- Yao H, Liu B, Wang X, Lan Y, Hou N, Yang X, Mao N.** 2007. Identification of high proliferative potential precursors with hemangioblastic activity in the mouse aorta-gonad- mesonephros region. *Stem Cells* 25:1423-1430.
- Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J.** 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49:1015-1026.
- Yoder MC, Hiatt K, Mukherjee P.** 1997. In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6776-6780.
- Yoder MC, Papaioannou VE, Breitfeld PP, Williams DA.** 1994. Murine yolk sac endoderm- and mesoderm-derived cell lines support in vitro growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood* 83:2436-2443.
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S.** 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345:442-444.

- Yu SF, von Ruden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Ruther U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E.** 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3194-3198.
- Yung YP, Welte K.** 1985. Murine mast cell growth factor. *Methods Enzymol* 116:553-563.
- Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A.** 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6:363-369.
- Zambidis ET, Sinka L, Tavian M, Jokubaitis V, Park TS, Simmons P, Peault B.** 2007. Emergence of human angiohematopoietic cells in normal development and from cultured embryonic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1106:223-232.
- Zeigler FC, de Sauvage F, Widmer HR, Keller GA, Donahue C, Schreiber RD, Malloy B, Hass P, Eaton D, Matthews W.** 1994. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 84:4045-4052.
- Zeng L, Dai J, Ying K, Zhao E, Jin W, Ye Y, Dai J, Xu J, Xie Y, Mao Y.** 2003. Identification of a novel human angiopoietin-like gene expressed mainly in heart. *J Hum Genet* 48:159-162.
- Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, Lodish HF.** 2006a. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12:240-245.
- Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF.** 2008a. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 111:3415-3423.
- Zhang CC, Lodish HF.** 2004. Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood* 103:2513-2521.
- Zhang CC, Lodish HF.** 2005. Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion. *Blood* 105:4314-4320.
- Zhang P, Li J, Tan Z, Wang C, Liu T, Chen L, Yong J, Jiang W, Sun X, Du L, Ding M, Deng H.** 2008b. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 111:1933-1941.
- Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM.** 2006b. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281:15694-15700.
- Zhang XB, Beard BC, Beebe K, Storer B, Humphries RK, Kiem HP.** 2006c. Differential effects of HOXB4 on nonhuman primate short- and long-term repopulating cells. *PLoS Med* 3:e173.
- Zhang XB, Beard BC, Trobridge GD, Wood BL, Sale GE, Sud R, Humphries RK, Kiem HP.** 2008c. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest* 118:1502-1510.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203-214.

**Zhuge J, Cederbaum AI.** 2006. Serum deprivation-induced HepG2 cell death is potentiated by CYP2E1. *Free Radic Biol Med* 40:63-74.

**Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, Farrell H, Rawlinson W, Koszinowski UH.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 6:57-66.

**Zon LI.** 2008. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* 453:306-313.

## 9.1 Abkürzungsverzeichnis

3D	3-dimensional
-	negativ oder Bindestrich
+	positiv
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
1°R	primäre Rezipienten
2°R	sekundäre Rezipienten
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ActivinR1A	Activin Rezeptor Typ 1A
aFGF	saurer Fibroblasten Wachstumsfaktor (acidic fibroblast growth factor)
AK	Antikörper
Angptl5	Angiopoietinähnlicher Faktor 5 (angiopoietin like 5)
ANT-K	Antennapedia-Komplex
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
BFU-E	zerberstende, (multizentrische) kolonieformierende Einheit-Erythroid (blast forming unit erythroid)
BiP	Immunoglobulin bindendes Protein
BMP	Knochenmorphogenes Protein (bone morphogenic protein)
BMPR1A	BMP-Rezeptor Typ 1A
bp	Basenpaare
BX-K	Bithorax-Komplex
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Differenzierungskomplex, Oberflächenprotein (Cluster of Differentiation)
CFU	kolonieformierende Einheit (colony forming unit)
CFU-G	CFU-Granulozyt
CFU-GEMM	CFU-Granulozyt-Erythrozyt-Monozyt-Megakaryozyt
CFU-GM	CFU-Granulozyt-Monozyt
CFU-M	CFU-Monozyt
CFU-S	CFU-Milz ( CFU- spleen)
CIAP	alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (calf intestine alkaline phosphatase)
CLP	gemeinsamer lymphoider Vorläufer (common lymphoid progenitor)
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratmeter
CMP	gemeinsamer myeloider Vorläufer (common myeloid progenitor)
CTE	konstitutives Transportelement
d	Tag (day)
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
DEX	Dexamethason
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleotide acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOX	Doxycyclin
dt	deutsch

EB	embryonales Körperchen/Zellkugel (embryoid body)
EPOCH	EB-abgeleitet, passagiert auf OP9, ektope Expression von CDX4 und HOXB4 (G.Q.Daley)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERp57	Thiolreduktase
ESZ	embryonale Stammzellen
ESZ-HSPZ	hämatopoetische Stammzellen- und Progenitorzellen abgeleitet von embryonalen Stammzellen
ESZ-HSZ	hämatopoetische Stammzellen abgeleitet von embryonalen Stammzellen
ESZ-HZ	hämatopoetische Zellen abgeleitet von Embryonalen Stammzellen
EtOH	Ethanol
EVS	Einvektorsystem
FACS	durchflusszytometrische Analyse (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fetales Kälber-Serum (fetal calf serum)
FG	Feldgröße
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FGF-R	FGF-Rezeptor
FHA	Feldabstand
Flk1/KDR	Gefäßendothel-Wachstumsfaktorenrezeptor 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)
Flt	<i>FMS</i> -ähnliche Tyrosinkinase ( <i>FMS</i> -like tyrosinekinase)
FMDV-2A	Maul- und Klauenseuche-Virus Esterase-Sequenz
G	Gauge (Außendurchmessermaß von Kanülen)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GOI	Gen von Interesse
GVHD	Transplantat <i>versus</i> Empfänger-Krankheit (graft versus host disease)
Gy	Gray (Strahlendosisseinheit)
h	Stunde(n) oder human
HA	Hämagglutinin-Markierung
hESZ	humane embryonale Stammzellen
Hgb	Hämoglobin
HLA	humanes Lymphozytenantigen
<i>HOXB4</i>	Homöoboxgen B4
hPGK	humaner Phosphoglycerat-Kinase-Promotor
HPZ	hämatopoetische Progenitorzellen (Vorläuferzellen)
HSPZ	hämatopoetische Stamm- und Progenitorenzellen (Vorläuferzellen)
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
HVG	Empfänger <i>versus</i> Transplantat (host versus graft)
HZ	hämatopoetische Zellen
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor)
IGFBP-2	Insulinähnlichen Wachstumsfaktor bindendes Protein 2 (Insulin-like growth factor binding protein 2)
IGFBP-R	IGFBP-Rezeptor
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco Medium (Iscove's modified Dulbecco's medium)
IT-HSZ	Intermediär-Selbsterneuernde, hämatopoetische Stammzellen (Intermediate-term hematopoietic stem cells)
JAK/STAT	Janus-Kinase/Signal Transduzierer und Transkriptionaktivatoren (Signal transducers and activators of transcription).
kbp	Kilo-Basenpaare



KIR	Immunglobulinähnliche Rezeptoren von Killerzellen (killer cell immunoglobulin-like receptors)
KL	ckit-Ligand
KM	Knochenmark
LEZ	lebende Einzelzellen
L-Gln	L-Glutamin
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LIFR- $\alpha$	LIF-Rezeptor-alpha
LM-PCR	ligationsvermittelte Polymerase-Kettenreaktion
LRP	linienrestringierte Progenitoren
LSK	Linienmarker negative (liniage negative), ckit+, Sca-1+ Zellen
LTC-IC	Langzeitkultur initiiierende Zelle (longterm-culture initiating cell)
LT-HSZ	Langzeit-selbsterneuernde hämatopoetische Stammzelle (long term self renewing hematopoietic stem cell)
LTR	lange terminale Wiederholungen (long terminal repeats)
M	molar
m	murin bzw. Maus
M.U.	Monitoreinheit
M2	Tet-Aktivator Version M2
MACS	magnetische Zellsortierung (magnetic-associated cell sorting)
mCMV	murines Cytomegalievirus (murine cytomeglovirus)
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MGF	Mastzellen-Wachstumsfaktor (mastcell growth factor)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
Mo-MuLV	Moloney murine leukemia virus
MPP	multipotente Vorläuferzelle (multipotential progenitor)
mRNS	Boten-RNS (messenger RNA)
MTG	Monothioglycerol
MV	Megavolt
n.O <sub>2</sub>	normales Sauerstoffniveau
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NKZ	Natürliche Killerzelle(n)
norm.O <sub>2</sub>	normales Sauerstoffniveau
pA	Polyadenylierungssignal
PB	Peripherblut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Blutplättchenabgeleiteter Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PE	Phytoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIGD	Plazenta-Wachstumsfaktor
PMT	Photovervielfältigerröhren (photo multiplier tubes)
pTx	post- (nach) Transplantation
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	reduzante Region
R1B/ALK4	Activinrezeptor Typ1
R2A	Activinrezeptor Typ2

RBZ	Rote Blutzellzahl
red.O <sub>2</sub>	reduziertes Sauerstoffniveau
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
RNA	ribonucleotide acid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
rtTA	reverser tetracyclinabhängiger Transaktivator
SCF	Stammzell-Faktor (stem cell factor)
SCF-R	SCF-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SIN	selbstinaktivierende Vektoren
SSEA-1	Stadien spezifisches embryonales Antigen-1 (stage-specific embryonic antigen-1)
STD-SF	Standard-serumfrei: SCF, IL3, IL6, Flt3L, IGF-1, DEX
STFV	SCF, TPO, Flt3L, VEGF
STFV-S	SCF, TPO, Flt3L, VEGF mit Serum (FCS)
STFV-SF	SCF, TPO, Flt3L, VEGF serumfrei (ohne FCS)
ST-HSZ	Kurzzeit-selbsterneuernde, hämatopoetische Stammzelle (short term self renewing hematopoietic stem cell)
T2	Minimalpromotorvariante
TAP	mit Antigenprozessierung assoziierter Transporter (transporter associated with antigen processing)
TD	Transduktion
TerR	Repressorprotein von TN10
Tet	Tetracyclin regulierbares System
TetO	Operatorsequenz von TN10
TetO7	Heptamere tetO Sequenz
Tet-off	Tet-System mit rtTA
Tet-on	Tet-System mit tTA
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth factor β)
TN10	Transposon 10
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TPO	Thrombopoietin
TPO-R	TPO-Rezeptor
tTA	tetracyclinabhängiger Transaktivator
Tx	Transplantation
TZZ	Thrombozytenzellzahl
U3	einzigartiges 3' Ende (unique 3' end)
U5	einzigartiges 5' Ende (unique 5' end)
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Gefäßendothel Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
w	Wochen
w/v	Gewicht pro Volumen
WBZ	Weißer Blutzellenzahl
wPRE	<i>woodchuck</i> posttranskriptional regulatives Element
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZVS	Zweivektorsystem
ψ	Verpackungssignal

## 9.2 Curriculum Vitae

### zur Person

---

Dietrich Armin Lesinski  
geb. 21.02.1979 (Blankenburg/Harz)

### Bildungsweg

---

06.2006-06.2011 **Promotion** in der Abteilung für experimentelle Hämatologie (Prof. Chr. Baum),  
Medizinische Hochschule Hannover

- Thema der **Dissertation**:  
HOXB4-vermittelte Herstellung und Expansion muriner hämatopoetischer  
Stammzellen *in vitro* zur dauerhaften Rekonstitution immunkompetenter Mäuse

11.2004-08.2005 **Diplomarbeit** am Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie, Hannover

- Thema der **Diplomarbeit**:  
Die genetische Kontrolle der Gehirnentwicklung bei *Foxb1/EphA7* mutanten Mäusen.  
(Supervisor: Dr. G. Alvarez-Boldado)

10.1999-09.2005 **Diplomstudium Biologie** TU Braunschweig

- Hauptfach: **Zoologie**
- Nebenfächer: **Zellbiologie, Pharmakologie/Toxikologie**

07.1997 Abitur

09.1991-07.1997 Gymnasium am Thie, Blankenburg/Harz

09.1985-09.1991 Rudolf-Claus-Oberschule, Blankenburg/Harz

### 9.3 Publikationsliste

#### Publikationen:

Manuskript zur Dissertation in Vorbereitung

**Schiedlmeier, B., Santos, A. C., 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16952-7.

#### Publizierte Abstracts/Konferenzbeteiligungen:

**Dietrich A. Lesinski, Niels Heinz, Cornelia Rudolph, Martijn Brugman, Christopher Baum, Hannes Klump, Bernhard Schiedlmeier;** HOXB4-mediated generation & expansion of hematopoietic stem cells capable of long-term engraftment in immunocompetent mice; COST Workshop on HOX and TALE Homeoproteins in Development and Disease; Vortrag B.Schiedlmeier, 7-11. November 2010 Haifa

**Dietrich A. Lesinski, Niels Heinz, Christopher Baum, Hannes Klump and Bernhard Schiedlmeier** Phenotypic characterization of hematopoietic stem cells from differentiating mouse embryonic stem cells expressing HOXB4; Poster; ESGCT/GSZ/DG-GT/ISCT Combined Meeting, 20.-25. November 2009, Hannover

**Dietrich A. Lesinski, Niels Heinz, Rainer Löw, Sandra Pilat, Sebastian Carotta, Hartmut Beug, Christopher Baum, Bernhard Schiedlmeier, and Hannes Klump** Ectopic HOXB4 expression enhances the development of earliest hematopoietic cells from differentiating mouse embryonic stem cells; Poster; ISSCR 7<sup>th</sup> annual meeting, 8.-11. Juli 2009, Barcelona

**Dietrich A. Lesinski, Niels Heinz, Christopher Baum, Bernhard Schiedlmeier and Hannes Klump** Generation of ES-cell derived hematopoietic stem and progenitor cells using a retroviral vector for Tet-regulated expression of HOXB4; Poster; Mechanisms of early differentiation-Summer School, 1.-5. September 2008, Barsinghausen

## 9.4 Danksagung

Mein Dank geht zuerst an Herrn Prof. Christopher Baum, dafür dass ich in seiner Abteilung promovieren durfte und er mir Arbeitsplatz- und mittel für meine Forschungen zur Verfügung gestellt hat. Außerdem danke ich ihm für die fruchtbaren wissenschaftlichen Gespräche, die hilfreichen Kommentare zum Manuskript und für die Übernahme des Referats meiner Dissertation.

Herrn Prof. Roland Jacobs danke ich für die Übernahme des Koreferats, die wissenschaftlichen Diskussionen und die netten Gespräche zwischendurch. Ihm und vor allem auch seiner Mitarbeiterin Sabine Buyny danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der NK-Zytotoxassays.

Bei Herrn Prof. Anaclet Ngezahayo bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie des Amtes als Prüfer.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Hannes Klump und Herrn Dr. Bernhard Schiedlmeier für die Initiation dieses interessanten Projektes und für die kompetente Einführung in die Welt der Hämatopoese und Stammzellbiologie. Ich bedanke mich für ihre Diskussionsbereitschaft, wissenschaftliche Betreuung und konstruktive Kritik am Manuskript.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen aus der Experimentellen Hämatologie für das angenehme Arbeitsklima, die vielzähligen Hilfestellungen und horizontenerweiternden Gespräche. Für die unterschiedlichsten methodischen Einarbeitungen, technischen Hilfestellungen, wissenschaftlichen Diskussionen oder Überlassung von Materialien möchte ich mich besonders bei PD.Dr. Zhixiong Li, Dr. Dr. Ute Modlich, Dr. Dr. Axel Schambach, Dr. Melanie Galla, Dr. Niels Heinz, Dr. Tobias Mätzig, Dr. Martijn Brugman, Dr. Birgitta Ehrnström, Maïke Stahlhut, Rena Struß, Cindy Elfers, Sabine Knöß, Johanna Krause, Thomas Neumann, Juliane Schott, Tamaryin Godinho, Rita Janz und Elke Wegerich bedanken.

Für die Finanzierung dieses Projektes bedanke ich mich bei der DFG und dem Exzellenzcluster Rebirth.

Bei Herrn Jörg Frühauf, Herrn Dr. Martin Werner und ihren Kollegen der Klinik für Strahlentherapie und Speziellen Onkologie (MHH) bedanke ich mich für die Bestrahlung meiner Versuchstiere.

Achja, und bei meinen Versuchstieren möchte ich mich natürlich auch bedanken, ohne sie wäre ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Und ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des zentralen Tierlabors der MHH für die Versorgung meiner Mäuse.

Für die gewissenhafte FACS-Sortierung meiner Zellen geht mein Dank an Herrn Dr. Matthias Ballmaier und seine Mitarbeiter Dr. Mathias Rhein und Christina Reimer aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, MHH.

Für die Durchführung der SKY-Analysen bedanke ich mich bei Frau Dr. Cornelia Rudolph und ihren Mitarbeitern der Abteilung für Molekular- und Zellpathologie, MHH.

Ein dickes Dankeschön an meine langjährige Freundin Dr. Wilma Rethage und an Dr. Nicole Marquardt für die Vertreibung des Stil- und Druckfehlerteufels aus meiner Dissertation.

Großen Dank auch an meine Familie und meine Freunde für ihre Unterstützung, Anteilnahme und Motivation während dieser doch oft durstigen Strecke. Oft blieb mir nicht mehr viel Zeit für Euch, Danke für Eurer Verständnis und anhaltende Zuneigung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Steffi, die mir mit ihrer Liebe, tatkräftigen Hilfe und ihrem Verständnis immer eine große Stütze während meiner Promotionszeit war.

Danke, dass es Dich gibt und Du mein bist! ♥Ich liebe Dich♥