

**Aus der Klinik für Innere Medizin I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert**

**Einfluss des Granulozyten-Kolonien-stimulierenden Faktors (G-CSF) auf frühe
Stadien hämatopoetischer Stammzellen: Untersuchungen differenzieller Gen- und
Proteinexpression in einer murinen embryonalen Stammzellkultur**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Carlo Andreas Huber
aus
Hof an der Saale

Lübeck 2013

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Stefan Peters

2. Berichterstatter/ Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Holger Hennig

Tag der mündlichen Prüfung:

14.05.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

14.05.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

„Der Gelehrte vergesse, was er getan hat, sobald es getan ist und denke stets nur an das, was er noch zu tun hat.“

Johann Gottlieb Fichte (1762-1814)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor und Granulozyten-Kolonien- stimulierender Faktor-Rezeptor	1
1.1.1 Historie	1
1.1.2 Funktionen des G-CSF	1
1.1.3 G-CSF-Rezeptor.....	2
1.1.4 Bedeutung des G-CSF für nicht-hämatopoetische Gewebe.....	3
1.2 Grundlagen der Hämatopoese	4
1.3 Stammzellen und die in-vitro Embryogenese	4
1.3.1 Eigenschaften von Stammzellen.....	4
1.3.2 Murine embryonale Stammzellen	5
1.3.3 In-vitro Kultivierung embryonaler Stammzellen	5
1.4 Die verschiedenen Phasen der primitiven und definitiven embryonalen Hämatopoese	6
1.4.1 Der Beginn der hämatopoetischen Entwicklung im murinen Embryo	6
1.4.2 In-vitro Modell der Hämatopoese	8
1.5 Oberflächenmarker, Gene und Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese	10
1.5.1 Oberflächenmarker der Hämatopoese.....	10
1.5.2 Gene und Genprodukte der Hämatopoese.....	12
1.6 Fragestellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Labormaterialien und Geräte.....	19
2.1.2 Chemikalien und biologisches Material	20
2.2 Methoden in der Zellkultur	24

2.2.1 Arbeiten in der Zellkultur.....	24
2.2.2 Vermehrung und Kryokonservierung der E14 ES-Zellen und der Feederzellen.....	24
2.2.3 Kultivierung der Stammzellen in der Zellkultur	25
2.2.3.1 Präkultivierung der Zellen.....	25
2.2.3.2 Setzen der <i>Hängenden Tropfen</i> und weitere Kultivierungsschritte	25
2.2.3.3 Zellernte	27
2.2.3.4 Stimulation mit Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor	27
2.2.4 Zellbiologische Methoden: Auftrennung mit MACS <i>Micro-Beads</i>	28
2.2.5 Zellbiologische Methoden: FACS	29
2.2.5.1 Prinzip der FACS-Technologie	29
2.2.5.2 Durchführung.....	30
2.2.6 Molekularbiologische Methoden: quantitative Real Time-PCR.....	31
2.2.6.1 Überblick.....	31
2.2.6.2 Funktionsweise der PCR.....	31
2.2.6.3 Funktionsweise der Taqman®-Real Time-PCR.....	32
2.2.6.4 Berechnung des relativen Genexpressions-Niveaus	33
2.2.6.5 RNS-Präparation.....	34
2.2.6.6 Reverse-Transkriptase Reaktion.....	35
2.2.6.7 Durchführung der Taqman-PCR.....	36
2.2.7 Biochemische Methoden: Zytokinarray.....	37
2.2.7.1 Prinzip der Proteinaufbereitung und Bestimmung.....	37
2.2.7.2 Durchführung.....	37
2.2.8 Statistik.....	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Regulation hämatopoetischer Gene unter G-CSF-Stimulation.....	39
3.2.1 Real Time-PCR des Gesamtpools der EBs.....	40
3.2.1.1 Verlauf der Regulation über 3 Messtage	40
3.2.1.2 Expressionsverlauf einzelner Gene.....	43
3.2.2 RT-PCR mit Auftrennung der Zellen durch MACS <i>Micro-Beads</i>	45
3.3 Ergebnisse der FACS-Messungen	49

3.3.1 FACS-Messungen ohne Auftrennung	49
3.3.2 FACS-Messungen nach Auftrennung durch MACS <i>Micro-Beads</i>	53
3.4 Zytokinarray	58
4 Diskussion	61
4.1 Einfluss von G-CSF auf die differenzielle Genexpression der EB-Zellen.....	61
4.1.1 Flk1	63
4.1.2 TAL1	64
4.1.3 HoxB4	65
4.1.4 Gata2, Pu.1 und Lmo2	66
4.1.5 Cyclin D1 und Gene der endothelialen und angiopoetischen Differenzierung...68	
4.2 Einfluss von G-CSF auf die differenzielle Proteinexpression der EB-Zellen.....	69
4.2.1 Nachweis der hämatopoetischen Stammzellentwicklung in den EBs	69
4.2.2 Vergleich der Proteinexpression zwischen den Gruppen	72
4.3 Methodische Überlegungen	73
4.4 Ausblick.....	76
5 Zusammenfassung	79
6 Literaturverzeichnis.....	81
7 Anhang.....	95
7.1 G-CSF-Rezeptor.....	95
7.2 Übersicht untersuchter Gene, Genprodukte und Oberflächenmarker	96
7.2.1 wichtige Oberflächenproteine als Marker der ES-Zellentwicklung.....	96
7.2.2 Übersicht der untersuchten Gene und ihrer entwicklungspezifischen Funktion	97
7.3 Auflistung aller Versuchsreihen mit den entsprechenden Messwerten.....	100
7.3.1 RT-PCR ohne Auftrennung.....	100
7.3.2 RT-PCR mit Auftrennung der Zellen durch MACS <i>Micro-Beads</i>	102
7.3.3 FACS-Messungen ohne Auftrennung	103
7.3.4 FACS-Messungen mit Auftrennung der Zellen durch MACS <i>Micro-Beads</i>	104
7.3.5 Zytokinarray Tag 3 der EB-Entwicklung.....	105
8. Danksagung	107
9. Lebenslauf	109

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Regionen der Entstehung hämatopoetischer Stammzellen in der murinen Embryonalentwicklung
- Abb. 2: zeitliche Entwicklung hämatopoetischer Zellen in der *Embryoid Body*-Kultivierung
- Abb. 3: Expression charakteristischer Oberflächenmarker in der frühen Hämatopoese
- Abb. 4: charakteristische Genexpression in den Stadien der frühen Hämatopoese
- Abb. 5: Kultivierung von ES-Zellen in *Hängenden Tropfen* in der Zellkultur
- Abb. 6: Dot-Plot einer FACS-Messung
- Abb. 7: Zyklen-Verlauf einer PCR Messung
- Abb. 8: hämatopoetische Genexpression, Tag 3 der EB-Entwicklung
- Abb. 9: hämatopoetische Genexpression, Tag 6 der EB-Entwicklung
- Abb. 10: hämatopoetische Genexpression, Tag 6+5 der EB-Entwicklung
- Abb. 11: Verlauf der Genexpression über drei Messtage in Einzeldarstellung
- Abb. 12: RT-PCR nach Sca1-Auftrennung der Zellen, Sca1-Positivfraktionen
- Abb. 13: RT-PCR nach Sca1-Auftrennung der Zellen, Sca1-Negativfraktionen
- Abb. 14: RT-PCR nach Sca1-Auftrennung der Zellen, G-CSF Versuchsgruppe
- Abb. 15: RT-PCR nach Sca1-Auftrennung der Zellen, Kontrollgruppe
- Abb. 16: differenzielle Proteinexpression, Tag 3 der EB-Entwicklung
- Abb. 17: differenzielle Proteinexpression, Tag 6 der EB-Entwicklung
- Abb. 18: differenzielle Proteinexpression, Tag 6+5 der EB-Entwicklung
- Abb. 19: FACS-Messungen nach Sca1-Auftrennung der Zellen, Sca1-Positivfraktionen
- Abb. 20: FACS-Messungen nach Sca1-Auftrennung der Zellen, Sca1-Negativfraktionen
- Abb. 21: FACS-Messungen nach Sca1-Auftrennung der Zellen, G-CSF Versuchsgruppe
- Abb. 22: FACS-Messungen nach Sca1-Auftrennung der Zellen, Kontrollgruppe
- Abb. 23: Membranen des Zytokinarrays

Abb. I (Anhang): G-CSF-Rezeptor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zuordnung der Ratio der differentiellen Genexpression zu definitionsgemäßen Maßzahlen der Hoch- und Runterregulation
Tabelle I (Anhang):	Darstellung der in den FACS-Messungen untersuchten Oberflächenproteine
Tabelle II (Anhang):	Darstellung der in den RT-PCR-Messungen untersuchten Gene und ihrer entwicklungspezifischen Funktionen
Tabelle III (Anhang):	Messergebnisse der RT-PCR-Messungen des Gesamtpools an Zellen
Tabelle IV (Anhang):	Messergebnisse der RT-PCR-Messungen nach Sca1-Auftrennung der Zellen
Tabelle V (Anhang):	Messergebnisse der FACS-Messungen des Gesamtpools an Zellen
Tabelle VI (Anhang):	Messergebnisse der FACS-Messungen nach Sca1-Auftrennung der Zellen
Tabelle VII (Anhang):	Messergebnisse des Zytokinarray

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Actin
Abb.	Abbildung
AGM-Region	Aortogonadale Mesonephros-Region
BD	Becton Dickinson
BL-CFC	<i>Blast-Colony Forming Unit</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CCL2	Chemokin Ligand 2
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNS	komplementär DNS
c-kit	<i>stem cell growth factor receptor (CD117)</i>
def.	definitiv
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dsDNS	doppelsträngige DNS
DTT	1.4-Dithiothreitol
EB	<i>Embryoid Body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR1	<i>Early Growth Response Protein 1</i>
Epo	Erythropoietin
ERG	<i>Ets-Related Gene</i>
ERK	<i>Extra-Cellular Regulated Kinases</i>
ES-Zelle(n)	embryonale Stammzelle(n)
F	<i>Forward</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLI1	<i>Friend Leukemia Virus Integration 1</i>
Flk1	fetale Leberkinase 1
Flt-1	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>
G	Guanosin
G1	<i>gap1</i> - Phase des Zellzyklus
G-CSF	Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
G-CSF-R	G-CSF-Rezeptor
GI	<i>gene of interest</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
Hck	Hck-Protein
HoxB4	Homeobox Gen B4
HoxD3	Homeobox Gen D3
HPC(s)	<i>hematopoetic progenitor cell(s)</i> , (hämatopoetische Progenitorzellen)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC(s)	<i>hematopoetic stem cell(s)</i> , (hämatopoetische Stammzellen)
IFN- γ	Interferon gamma

IL	Interleukin
IG	Immunglobulin
IZM	Innere Zellmasse
JAK	Januskinase
k	Kilo (tausend)
KC	Kansas City Protein
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
kpb	kilo Basen Paaren
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
Lmo	<i>LIM-domain only-protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
lt	<i>long-term</i>
Lyn	Lyn-Protein
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAP-Kinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
min	Minuten
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNS	<i>messenger RNS</i>
MW	Mittelwert
N ₂	flüssiger Stickstoff
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
p.c.	post conceptionem
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PI ³ -Kinase	Proteinkinase ³
pr	primitiv
PSp	Paraaortale-Splanchnopleura
R	<i>Reverse</i>
ras	<i>rat sarcoma protein</i>
RT-PCR	Real Time [®] -Polymerase Kettenreaktion
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
Sca1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> (Stammzellfaktor)
Scl	<i>Stem cell leukemia gene</i>
Ship	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
Src	<i>Sarcoma protein</i>
ssDNS	einzelsträngige DNS
SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signalling</i>
sog.	sogenannt
StAbw	Standardabweichung
stat	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
st	<i>short-term</i>
t	Tag
T	Thymidin
TAL1	T-Zell akutes lymphozytisches Leukämie-Protein 1
Thy-1	Thymus Antigen 1
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor α
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem

VE-Cadherin

VEGF(-R)

vgl.

z.B.

vaskuloendotheliales Cadherin

Vascular Endothelial Growth Factor (-Receptor)

vgl.

zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor und Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor-Rezeptor

1.1.1 Historie

Anfang der 1980er-Jahre wurde ein Zytokin identifiziert, welches in einer murinen myelo-monozytischen Leukämiezelllinie (WEHI-3B) zu einer gerichteten und beschleunigten Ausdifferenzierung dieser Zellen zu neutrophilen Granulozyten führte (9, 94). Aufgrund dieser zuerst identifizierten Wirkung auf neutrophile Granulozyten und deren Vorläuferzellen, wurde das Zytokin als Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (G-CSF) bezeichnet.

In der Folge wurden der murine wie der humane G-CSF als Produkt des CSF-3 Gens beschrieben und als glykosyliertes Peptidhormon mit 174 Aminosäuren und 18 kilo Dalton Molekulargewicht charakterisiert (82, 136). Weiter wurden die verschiedenen Zelltypen identifiziert, welche G-CSF produzieren, darunter v.a. Endothelzellen und Stromazellen des Knochenmarks und ferner auch andere Zelltypen wie neuronale Gliazellen, Herzmuskelzellen und verschiedenen Immunzellen (1, 34, 109, 114).

Ende der 1980er Jahre wurde gezeigt, dass G-CSF, neben anderen hämatopoetischen Zytokinen wie u.a. Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Erythropoetin, in der normalen Physiologie der Blutbildung eine wichtige Rolle bezüglich der Rate und des Ausmaßes der Hämatopoese, primär für die myeloische Proliferation und Ausdifferenzierung, spielt (43). Wenige Jahre nach der Entdeckung wurden die murine und die humane G-CSF-Variante kloniert (91, 124) und als medizinische Präparate im klinischen Umfeld eingesetzt (siehe 1.1.2).

1.1.2 Funktionen des G-CSF

Im Rahmen der normalen Hämatopoese gilt über die Wirkung des G-CSF als gesichert, dass es die Differenzierung, die Proliferation, das Überleben und die Ausreifung neutrophiler Granulozyten und deren später Vorläuferzellen spezifisch, und auf die physiologische Blutbildung bezogen, nicht-redundant stimuliert (109). Des Weiteren ist die Überlebenszeit neutrophiler Granulozyten und ihrer Vorläuferzellen unter G-CSF-Supplementierung in-vitro wie in-vivo verlängert (109). Werden der G-CSF oder

der G-CSF-Rezeptor (G-CSF-R) im Knockout-Mausmodell ausgeschaltet, führt dies zu einer schweren kongenitalen Neutropenie und einem Ausbleiben des Anstiegs der Produktion neutrophiler Granulozyten in der akuten Phase der Immunantwort (2, 134). Von Patienten mit Mutationen des G-CSF-R ist bekannt, dass sie ebenfalls an einer schweren kongenitalen Neutropenie leiden und ein erhöhtes Risiko tragen, eine akute myeloische Leukämie zu entwickeln (137).

Eine weitere Funktion von G-CSF wurde bei den ersten klinischen Studien an Patienten entdeckt. Es wurde beobachtet, dass eine Administration von G-CSF zu einer Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks ins periphere Blut führt (35).

Seit mehr als 20 Jahren wird rekombinant hergestelltes, humanes G-CSF (Lenograstim®, Filgrastim®, Granozyte®, Perfilgrastim®) therapeutisch eingesetzt. Es wird zur Reduzierung der febrilen Neutropenie, die z.B. im Rahmen einer Chemotherapie, einer Knochenmarksaplasie oder aufgrund kongenitaler Defekte, wie der schweren kongenitalen Neutropenie, auftreten kann, eingesetzt (38). Weiterhin können die durch den G-CSF mobilisierten Stammzellen aus dem peripheren Blut durch Aphaese gewonnen und zur allogenen und autologen Stammzelltransplantation eingesetzt werden (35). Insbesondere die Mechanismen der Wirkung von G-CSF auf die wenig differenzierten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.1.3 G-CSF-Rezeptor

1986 wurde erstmals der zu G-CSF entsprechende Rezeptor beschrieben und als Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor-Rezeptor (G-CSF-R) benannt. Seine Expression wurde zunächst auf Zellen des hämatopoetischen Systems untersucht und nachgewiesen, darunter auf neutrophilen Granulozyten, sämtlichen bekannten Vorläuferzellen des blutbildenden Systems einschließlich der hämatopoetischen Stammzellen (20, 78, 80) sowie auf den embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die aus der Inneren Zellmasse (IZM) der 3,5 Tage alten murinen Blastozyste isoliert werden (vgl. Kapitel 1.4) (78). Allerdings hat sich in jüngerer Zeit gezeigt, dass eine deutlich größere Bandbreite von Zellen den G-CSF-R exprimieren, darunter Endothelzellen, Zellen der Plazenta, Neuronen, aktivierte T-Lymphozyten sowie einige nicht-hämatopoetische Tumorzelllinien (90, 109).

Der G-CSF-R aktiviert zum einen den JAK/Stat-Signalweg (JAK: Januskinasen, Stat: Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription), welcher ein in eukaryotischen Zellen hochkonservierter Signalweg ist, der Zellwachstum, Differenzierung und programmierten Zelltod reguliert (109). Zum anderen werden in der intrazellulären Signaltransduktion der ras/MAP-Kinasen-Signalweg (ras: rat sarcoma; MAP: *Mitogen Activated Protein*) und der Proteinkinase γ 3-Signalweg (PI γ 3-Kinase) aktiviert. MAP-Kinasen stellen ebenfalls evolutionär konservierte Elemente in der eukaryotischen Zellregulation da, die an Genexpression, Mitose, Differenzierung, Proliferation und Zellüberleben beteiligt sind. Die genaue Bedeutung der einzelnen Signalwege und ihres Zusammenspiels untereinander ist noch nicht hinreichend verstanden (52). Eine Übersicht der intrazellulär durch die Aktivierung des G-CSF-R ausgelösten Signalkaskaden gibt Abb. I (Anhang).

1.1.4 Bedeutung des G-CSF für nicht-hämatopoetische Gewebe

Die Identifizierung der Bedeutung von G-CSF für Gewebe und Zellen außerhalb des blutbildenden Systems hat in den letzten 5 Jahren das Bild der Wirkung von G-CSF nachhaltig verändert. Der G-CSF-R ist auf Neuronen des Gehirns und Rückenmarks vorhanden, wobei G-CSF hauptsächlich als neurotrophischer Faktor wirkt (114). Weiter konnte eine wichtige Rolle des G-CSF bei der embryonalen Neurogenese und Gehirnentwicklung gezeigt werden (62). Nach Schlaganfällen kommt es unter Vermittlung von G-CSF zu einer Mobilisierung von Stammzellen des Knochenmarks ins periphere Blut, die dann an der Regeneration des ischämischen Schädigungsorts im Gehirn beteiligt sind (123). Zudem hat G-CSF im geschädigten Gehirngewebe selbst eine anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkung (122). Aufgrund seiner nachgewiesenen neuroregenerativen Wirkung wird G-CSF in klinischen Studien für Schlaganfallpatienten und neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. bei der experimentellen Behandlung der amyotrophe Lateralsklerose erprobt (147). Für die embryonale Entwicklung von Kardiomyozyten wurde in-vivo belegt, dass G-CSF eine entscheidende Wirkung für deren Entwicklung und Wachstum hat (25, 119). Der in diesen Studien gezeigte regenerations- und differenzierungsfördernde Effekt auf Stammzellebene konnte bisher noch nicht für die Ebene früher, wenig differenzierter hämatopoetischer Stammzellen gezeigt werden (83, 109), was Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.2 Grundlagen der Hämatopoese

Die Hämatopoese stellt ein hierarchisches Modell aus Stamm-, Progenitor-, und Endzellen der hämatopoetischen Differenzierung dar. Aus den hämatopoetischen Stammzellen, die in spezialisierten Nischen des Knochenmarks vorliegen, entwickeln sich durch differenzielle Zellteilung* die Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Zelllinien. Diese entwickeln wiederum in einem durch Zytokine streng regulierten Prozess die einzelnen Endprodukte der Blutbildung. Täglich werden ca. 10^{11-12} Blutzellen (89) neu gebildet um ein gleichbleibendes Niveau an Blutzellen im Blutkreislauf zu ermöglichen. Dieses Gleichgewicht aus Blutzellbildung und -verbrauch wird als Homöostase oder *steady state* des blutbildenden Systems bezeichnet.

Die adulten hämatopoetischen Stammzellen in Knochenmark und peripherem Blut, wo physiologisch nur sehr wenige vorhanden sind, befinden sich in der Regel im Ruhezustand, also der Go-Phase des Zellzyklus (13) und werden in zwei Populationen unterteilt. Die sog. *long-term self-renewing hematopoietic stem cells* (lt-HSCs) stehen an der Spitze der hämatopoetischen Pyramide und sind zur lebenslangen Selbsterneuerung und -erhaltung befähigt. Davon werden die nachgeordneten, reiferen sog. *short term self-renewing hematopoietic stem cells* (st-HSCs) abgegrenzt, die für einen Zeitraum von 6 Wochen alle Zellen der Hämatopoese bilden, also vollständiges Differenzierungspotential besitzen, danach aber ihr Regenerationspotential verbraucht haben (116). Dieser Prozess kann durch das in-vivo ähnliche System der in-vitro Kultivierung und Differenzierung embryonaler Stammzellen, wie in dieser Arbeit angewendet, erfolgreich nachgebildet werden (44).

1.3 Stammzellen und die in-vitro Embryogenese

1.3.1 Eigenschaften von Stammzellen

Stammzellen sind durch die Eigenschaft charakterisiert, sich durch differenzielle Zellteilung selbst erneuern zu können und sich in verschiedene, spezialisierte Zellarten entwickeln zu können. Sie werden entsprechend ihres Differenzierungspotentials beschrieben, wobei totipotente Stammzellen einen vollständigen Fötus ausbilden können und pluripotente Stammzellen alle Zellen der 3 Keimblätter, jedoch keine Gameten,

* Der früher gebräuchliche Terminus der ‚asymmetrischen Zellteilung‘ wird in der vorliegenden Arbeit durch den rezenteren Terminus der ‚differentiellen Zellteilung‘ ersetzt, der verschiedene physiologische Möglichkeiten der Stammzellproliferation- und Differenzierung umfasst;

entwickeln können. Die weiter spezialisierten Stammzellen sind dann zunehmend auf die verschiedenen Keimblätter, Gewebetypen und Zelltypen spezialisiert, so dass z.B. hämatopoetische Stammzellen der Charakterisierung lt-HSC alle Zelltypen der Hämatopoese bilden können. Viele spezialisierte Stammzellen besitzen aber erhebliche Plastizität und können durch mediator- und umweltbedingte Umprogrammierung eine vielfältigere Differenzierungspotenz wiedererlangen, was mit dem Konzept der *induzierten Pluripotenz* beschrieben wird (42, 105, 128, 143).

1.3.2 Murine embryonale Stammzellen

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der Inneren Zellmasse (IZM) der murinen Blastozyste in der frühen Embryonalentwicklung an Tag 3.5 isoliert und stellen pluripotente Stammzellen dar, die zur Bildung aller Zelltypen der 3 verschiedenen Keimblätter befähigt sind (78). Sie lassen sich unter Bewahrung ihrer Pluripotenz unter definierten Kultivierungsbedingungen ohne Einschränkung vermehren (7) und sind daher gut zur Erforschung der Eigenschaften und Regulationsmechanismen von Zellen, Zellverbänden und Geweben der 3 Keimblätter geeignet (24, 76).

1.3.3 In-vitro Kultivierung embryonaler Stammzellen

1985 gelang es Doetschman et al. erstmals ein in-vitro Modell der murinen Embryogenese zu entwickeln, welches auch die dreidimensionale Nachbildung der initialen Embryonalentwicklung berücksichtigte (21). Die ES-Zellen werden bei diesem Verfahren zur Anzucht zunächst in sog. *Hängenden Tropfen* angesetzt (vgl. 2.2.3). In den ersten Tagen bildet sich eine Endodermis um die IZM, welche wichtige Überlebens- und Differenzierungssignale an diese aussendet. Im weiteren Verlauf entwickeln sich aus den Zellen der IZM das Ektoderm und etwas später die Zellen des Mesoderm, welche dann zwischen Endo- und Ektoderm liegen (7). Morphologisch ähneln die Zellaggregate nach 3-7 Tagen denen eines 6-8 Tage alten Embryos im Eizylinder-Stadium und werden als *Embryoid Bodies* (EBs) bezeichnet. An den Tagen 8-10 der Kultivierung entwickeln ungefähr die Hälfte der Aggregate große zystische Strukturen mit Expression von α -Fetoprotein und Transferrin, wie sie vergleichsweise im Postimplantations-Embryo gefunden werden (21). Aus einer Mehrzahl dieser zystischen Strukturen entwickeln sich in der Folge Aggregate ausgereifter Zellen, wobei ca. 30% davon jeweils Myokard- und Blutzellen darstellen und sich der Rest auf Zellen aller Keimblätter erstreckt (7, 21, 57).

Die Bedeutung und das Potential der in-vitro Differenzierung von ES-Zellen wurden in der Folge weiter untersucht und definiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Stammzellen in den EBs sämtliche Schritte der fetalen Blutbildung nachvollzieht und aus der in-vitro Zellkultur alle Blutzellen entwickelt werden können (16, 74). Die in-vitro Kultivierung der ES-Zellen ist für die Untersuchung genetischer Zusammenhänge und Regulationsmechanismen der murinen Hämatopoese gut geeignet. So konnte Prella et al. nachweisen, dass die murinen ES-Zellen, wenn sie in einen frühen Embryo eingebracht werden, wieder vollständig in die Embryogenese integriert werden können, sie dort zur Bildung aller Keimblätter beitragen und diese Funktionen auch nach umfangreicher Genmanipulation beibehalten (104). Auch der Einfluss von Zytokinen auf die Hämatopoese wurde anhand des ES-Zellmodells umfangreich studiert (132). In-vitro gezüchtete hämatopoetische Stammzellen konnten experimentell bereits für Stammzelltransplantationen im Mausmodell eingesetzt werden (16, 74, 77).

1.4 Die verschiedenen Phasen der primitiven und definitiven embryonalen Hämatopoese

1.4.1 Der Beginn der hämatopoetischen Entwicklung im murinen Embryo

Während der murinen Embryogenese können zeitlich und örtlich unterschiedliche Phasen definiert werden, zu welchen die primitive und, später, definitive Hämatopoese stattfinden (Abb. 1). Die erste Phase der Hämatopoese ist im Dottersack lokalisiert, wobei ab Tag 2-4 post-conceptionem (p.c.) der Hämangioblast und wenig später primitive hämatopoetische Stammzellen identifiziert werden können, sowie ab Tag 7 p.c. reife Blutzellkolonien (56). Die Blutzellkolonien bestehen aus einer angioblastischen Zellschicht, die Gefäßzellen hervorbringt und einer Schicht hämatopoetischer Stammzellen, aus denen v.a. primitive Erythrozyten, Makrophagen, aber keine Granulozyten oder Lymphozyten hervorgehen (5, 55, 56). Die primitiven hämatopoetischen Stammzellen bilden nicht nur primitive Zellen in der initialen Hämatopoese, sondern haben auch das Potential der Bildung definitiver Zellen der myelo-lymphatischen Reihe (100). Es wurde gezeigt, dass ein Teil der hämatopoetischen Stammzellen aus dem Dottersack über das periphere Blut in die fetale Leber einwandert, um dort den Pool hämatopoetischer Stammzellen der definitiven Blutbildung zu bilden (siehe Abb. 1) (79, 85).

Der Beginn der definitiven Hämatopoese ist intraembryonal lokalisiert, wobei ab Tag 10-11 p.c. die ersten reifen Blutzellen entstehen. Die für die Ausbildung der definitiven, lebenslang erhalten bleibenden Stammzellen zuständige Region ist das Flk1-exprimierende (fetale Leberkinase 1) dorsolaterale Mesoderm des primitiven Streifens (46). Mittlerweile ist bekannt, dass sich dort bereits vor dem Auftreten der Hämatopoese im Dottersack Hämangioblasten nachweisen lassen (59). Bei dem Hämangioblasten handelt es sich um eine Stammzellpopulation, aus welcher Endothelzellen und alle Blutzelllinien gebildet werden können. Er stellt also den gemeinsamen Ausgangspunkt für die Entwicklung hämatopoetischer und endothelialer Zellen dar (12, 22, 78, 95, 135, 141).

Die Orte der definitiven Hämatopoese sind zunächst die Paraaortale-Splanchnopleura (PSp) an den Tagen 9-10 p.c. sowie die Aortogonadale Mesonephros-Region (AGM-Region) an den Tagen 10-11 p.c., wobei beide Regionen dem Mesoderm des primitiven Streifens angehören und eng benachbart lokalisiert sind. Danach verlagert sich die Blutbildung in Leber, Milz und schließlich auf Lebenszeit ins Knochenmark. Obwohl in der fetalen Leber hämatopoetische Stammzellen aus dem Dottersack nachgewiesen werden, geht man davon aus, dass nur die Stammzellen aus dem mesodermalen primitiven Streifen die lt-HSCs bilden, die zur lebenslangen Selbsterneuerung befähigt sind (85).

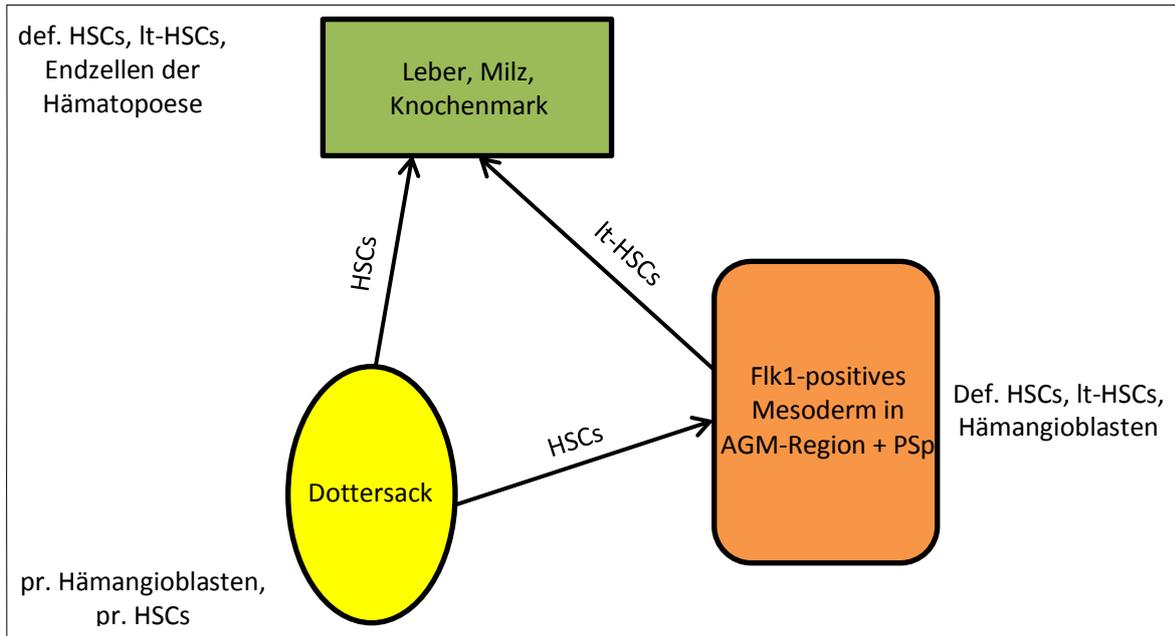


Abb. 1: Darstellung der verschiedenen Phasen der primitiven und definitiven Hämatopoese und ihrer Lokalisation im murinen Embryo. Die erste Phase der primitiven Hämatopoese findet im murinen Dottersack statt. Hier werden primitive (pr.) Hämangioblasten und hämatopoetische Stammzellen (HSCs) mit definitivem (def.) lymphomyeloiden Potential gebildet. HSCs, die im Dottersack entstehen, migrieren von dort in die späteren Regionen der Hämatopoese (Leber, Milz, Knochenmark), respektive in das Flk1⁺-positive Mesoderm (AGM-Region: Aortogonadale-Mesonephros-Region; PSp: parietale Splanchnopleura). Im Flk1-positiven Mesoderm haben die It-HSCs ihren Ursprung, welche dann zu den Orten der definitiven Hämatopoese (transient: Leber, Milz; definitiv, lebenslang: Knochenmark) migrieren (5, 56, 63, 85, 100).

1.4.2 In-vitro Modell der Hämatopoese

Die in-vitro ES-Zellkultur ist ein geeignetes System, um die murine embryonale Hämatopoese in-vivo ähnlich nachzubilden. Die Meilensteine der Hämatopoese, bis hin zum Auftreten aller Endzellen der Blutentwicklung, werden durch die Zellkultur unter definierten Kulturbedingungen vollständig nachvollzogen (30). Der zeitliche Ablauf des Auftretens hämatopoetischer Zellen in der murinen in-vitro Kultur (vgl. 1.3.3) ist in Abb. 2 gezeigt. An Tag 2 der EB-Entwicklung ist das Endoderm und die davon umschlossene IZM ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt findet in den EB-Zellen auch die Entwicklung des in-vitro Äquivalents des Hämangioblasten, der sog. *blast colony forming cell* (BL-CFC), im Flk1-positivem Mesoderm statt (28, 51, 96).

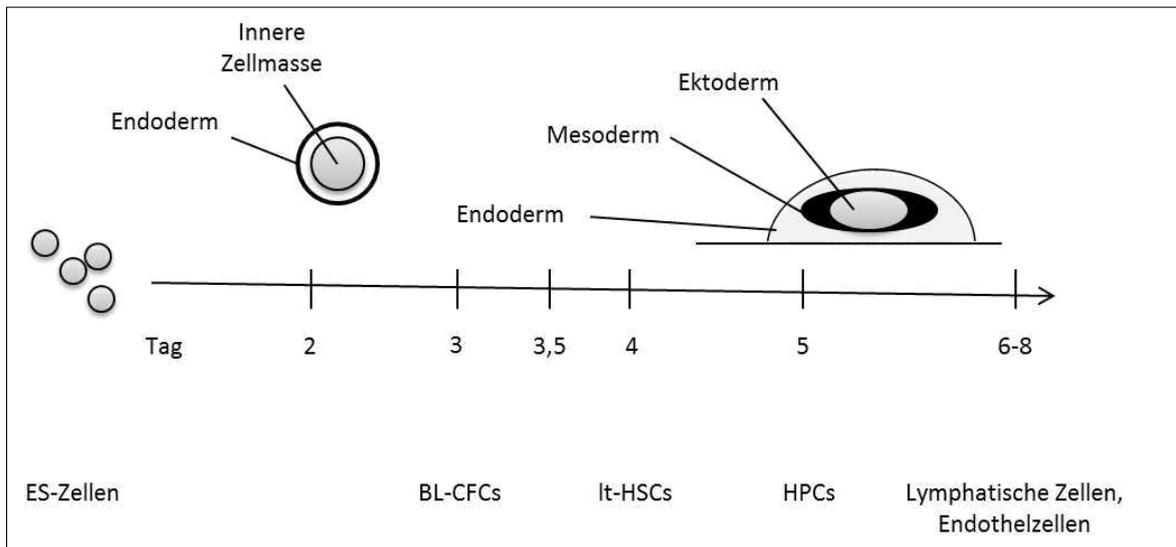


Abb. 2: ES-Zellentwicklung und erstes Auftreten von hämatopoetischen Zellen in EBs in den ersten Tagen der murinen Embryogenese im in-vitro Modell. Die Entwicklung der in den *Hängenden Tropfen* kultivierten ES-Zellen vollzieht die räumliche Organisation des Embryos nach (21), wobei alle 3 Keimblätter gebildet werden. Auf zellulärer Ebene werden sequentiell die *blast colony forming cells* (BL-CFCs) als die in-vitro Äquivalente der Hämangioblasten, lt-HSCs, hämatopoetische Progenitorzellen (HPCs) sowie lymphatische Zellen und Endothelzellen gebildet [modifizierte Abb. nach Keller (56) und Fleischmann und Hescheler (31)].

Zwischen Tag 3 und Tag 5 der EB-Entwicklung bilden sich in-vitro die drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm vollständig heraus. In dieser Zeit entstehen in der Kultur erstmals zahlreiche neue Zelltypen (Abb. 2). Von besonderem Interesse ist, dass zwischen Tag 3 und 4 der Entwicklung erstmals lt-HSCs (siehe 1.2) gebildet werden, welche ins Knochenmark des adulten Organismus migrieren (vgl. Abb. 1) und dort lebenslang zu einem großen Teil den Pool hämatopoetischer Stammzellen ausbilden (56, 57). Die regelgerechte Nachbildung der Entwicklung der lt-HSCs in der in-vitro Kultivierung wurde von Kennedy et al. bestätigt (59). Weitere in der Zellkultur an den Tagen 4 und 5 gebildete Zellen sind hämatopoetische Progenitorzellen, Angioblasten, primitive und definitive Erythrozyten, lymphatische Zellen und Endothelzellen (Abb. 2) (56, 57).

Der beschriebene Prozess der zeitlich dichten Entwicklung des hämatopoetischen Systems in der embryonalen Entwicklung ist ein streng regulierter Prozess. Die verschiedenen Zelltypen weisen eine differenzielle Expression von Oberflächenproteinen auf, die mit Differenzierungsstand und Reifegrad der Zellen und Stammzellen korreliert ist. Zudem ist der Prozess der Initiation hämatopoetischer Stammzellentwicklung durch die sequentielle Expression einiger Schlüsselgene reguliert. Daher wird der in diesem

Abschnitt beschriebene Prozess der frühen hämatopoetischen Entwicklung im nächsten Teil ausführlich hinsichtlich seiner differenziellen molekularbiologischen Charakteristika beschrieben.

1.5 Oberflächenmarker, Gene und Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese

1.5.1 Oberflächenmarker der Hämatopoese

ES-Zellen und hämatopoetische Stammzellen können durch ihr Expressionsmuster verschiedener Oberflächenproteine bezüglich ihrer Reife und ihres Differenzierungsgrades unterschieden werden. Die frühe Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen in den EBs, wie in der physiologischen Embryogenese, zeigt eine sequentielle Expression charakteristischer Oberflächenproteine, die den spezifischen Reifestatus der Zellen widerspiegeln. Im Folgenden werden die entscheidenden Marker der hämatopoetischen Entwicklung dargestellt [vgl. Abb.3 und Tabelle I (Anhang)].

CD34

CD34 ist ein Glykoprotein, welches auf verschiedenen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird. CD34 spielt bereits ab dem frühen Stadium des embryonalen Hämangioblasten eine wichtige Rolle, wobei CD34-defiziente Mäuse eine stark verzögerte und geschwächte Gefäß- und Blutzellentwicklung zeigen (11). Funktionell ist die CD34-Expression in der frühen embryonalen hämatopoetischen Entwicklung aber noch nicht charakterisiert (36). Ogawa et al. haben gezeigt, dass alle hämatopoetischen Stammzellen der fetalen Blutbildung CD34-positiv sind (97). CD34 ist als Marker hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen beschrieben und wird dort zusammen mit Sca1 und CD117 exprimiert (Abb. 3) (88, 110). Ferner wurde gezeigt, dass sich im adulten Organismus eine CD34-positive Gruppe hämatopoetischer Stammzellen mit einer charakteristisch hohen Zellzyklusaktivität von einer ruhenden, CD34-negativen Population abgrenzen lässt (36).

CD90

CD90 (Synonym: Thy-1: Thymus Antigen 1) wurde zunächst als Differenzierungsantigen auf unreifen Progenitorzellen der myeloischen und erythroiden Zelllinien gefunden, welches während der weiteren Ausreifung verloren geht (86). Christensen et al. identifizierten CD90 als frühen Marker von Stammzellen (vgl. Abb. 3), der mit deren Selbsterneuerungsfähigkeit korreliert ist (13). Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, die ihre CD90-Expression verlieren und eine verstärkte Expression an

CD135 aufweisen, sind durch eine verminderte Selbsterneuerungsfähigkeit charakterisiert. Die entscheidende Bedeutung für die Selbsterneuerungsfähigkeit wurde auch dahingehend bestätigt, dass alle lt-HSCs des adulten Knochenmarks CD90-positiv sind (13).

CD117

CD117 (Synonym: *c-kit: stem cell growth factor receptor*) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, dessen Ligand der Stammzellsfaktor ist. Während der hämatopoetischen Entwicklung ist er auf frühen Stamm- und Progenitorzellen, zusammen mit u.a. Sca1, CD133 und CD34 (vgl. Abb. 3), exprimiert, während er auf reiferen Zellen herunterreguliert wird (95, 111). Snodgrass et al. beschrieben die Bedeutung der Expression von *c-kit* in einer in-vitro embryonalen Stammzellkultur zu Beginn der hämatopoetischen Induktion (121), was von Ling et al. bestätigt wurde (71). Die Expression von CD117 spielt eine entscheidende Rolle für Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung von Stammzellen (118), was auch in experimentellen Transplantationsstudien bestätigt werden konnte (92).

CD133

Die Expression von CD133 ist auf hämatopoetischen, endothelialen und neuronalen Stammzellen beschrieben, darunter den frühen hämatopoetischen Stammzellen der Embryonalentwicklung in Koexpression mit Sca1 und CD117 (vgl. Abb. 3) (32, 139). Im adulten Organismus wird CD133 als Marker für die Isolation hämatopoetischer Stammzellen, zusammen v.a. mit CD34, genutzt. Eine Ausdifferenzierung hämatopoetischer Zellen ist von einer Runterregulation von CD133 begleitet (139).

CD13

CD13 ist ein wichtiger Marker myeloischer Differenzierung. Bis zu dem Level hämatopoetischer Stammzellen des Reifegrades lt-HSCs ist CD13 nicht relevant exprimiert. Für hämatopoetische Progenitorzellen und die weiter differenzierten Zellen der myeloischen Differenzierung wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen liegt eine CD13-Expression vor (10, 107). Damit kann CD13 als korrelativer Marker hämatopoetischer Ausdifferenzierung in der embryonalen Stammzellkultur verwendet werden (57).

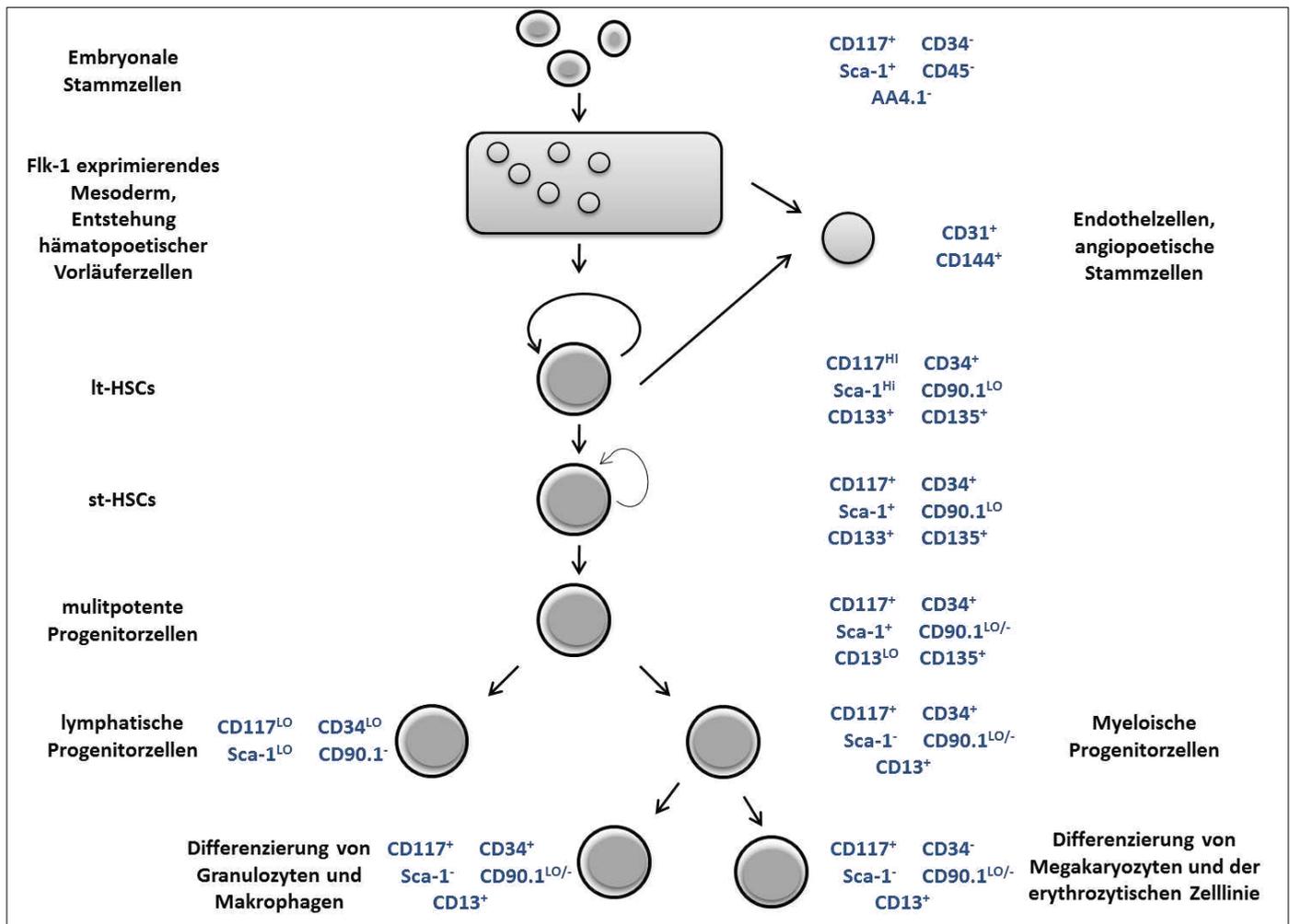


Abb. 3: Expression spezifischer Oberflächenmarker während der Hämatoese in *Embryoid Bodies* im in-vitro Modell. Die kultivierten embryonalen Stammzellen differenzieren alle drei Keimblätter aus, darunter das Mesoderm. Das Flk1-positive Mesoderm des primitiven Streifens bringt die hämatoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hervor, darunter die *long term self-renewing hematopoietic stem cells* (lt-HSCs) und die *short term self-renewing hematopoietic stem cells* (st-HSCs). Auf jeder Stufe der hierarchisch organisierten hämatoetischen Entwicklung werden jeweils spezifische Oberflächenproteine exprimiert. Abkürzungen: ‚+‘: Protein auf mittlerem Level exprimiert; ‚-‘: Protein nicht exprimiert; ‚hi‘: Protein auf hohem Niveau exprimiert; ‚lo‘: Protein auf niedrigem Niveau exprimiert; Sca1: *stem cell antigen 1*; ‚CD117‘: Stammzellfaktor-Rezeptor (c-kit); ‚flt3‘: *fms-like tyrosine kinase receptor-3* (CD135); ‚AA4.1‘: CD93. Abb. modifiziert nach Ling et al. (72), Christensen et al. (13) und Seita et al. (116).

1.5.2 Gene und Genprodukte der Hämatoese

Die Expression der beschriebenen Marker wird durch diverse Gene und daraus resultierender Genprodukte reguliert. Ihre spezifische Regulation und Expression ist für die verschiedenen Stufen der hämatoetischen Stammzellentwicklung beschrieben [vgl. Abb. 4 und Tabelle II (Anhang)].

HoxB4

HoxB4 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor der Stammzellfunktion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen und weist eine hohe Spezifität der Expression für hämatopoetisches Gewebe auf (48). HoxB4 fördert die hämatopoetische Stammzellregeneration, d.h. eine Erhaltung des Stammzellpools um auf einen Stimulus, z.B. durch ein Zytokin, mit einer maximalen proliferativen Antwort reagieren zu können sowie um den Stammzellpool ein Leben lang zu erhalten (4). HoxB4-defiziente Mäuse weisen verminderte Zahlen hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen auf, können auf proliferative Stimuli nur unzureichend mit einer Steigerung der Zellsynthese hämatopoetischer Zellen reagieren und haben eine reduzierte Zellularität in hämatopoetischen Organen wie Milz und Knochenmark (8). Hämatopoetische Stammzellen, die aus der murinen Embryonalentwicklung isoliert wurden, sind nur dann für eine langfristig erfolgreiche Knochenmark- und Blutstammzellspende geeignet, wenn sie eine hohe HoxB4-Expression aufweisen (77). Es ist mittlerweile experimentell gelungen, in-vitro gezüchtete hämatopoetische Stammzellen, welche ein hohes Niveau an HoxB4-Expression aufweisen, für die lebenslange Knochenmarkspende Knochenmark-eradizierter Mäuse einzusetzen (16).

TAL1

TAL1 (T-Zell akutes lymphozytisches Leukämie-Protein 1; Synonym Scl: *Stem cell leukemia gene*) hat zu Beginn der embryonalen Hämatopoese eine entscheidende Funktion für die Bildung des Hämangioblasten und weiter der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. TAL1-defiziente Mäuse können keine Blutzellen bilden und zeigen eine komplette Blockierung der Hämatopoese (146). Weiterhin ist bekannt, dass mesodermales Gewebe nur unter TAL1-Expression zur Hämatopoese befähigt ist (103, 146). Dabei wird das Flk1-exprimierende Mesoderm (vgl. Flk1) unter Vermittlung von TAL1 zur Entwicklung des Hämangioblasten und der weiteren hämatopoetischen Stammzellen angeregt (73). Eine gesteigerte Expression von TAL1 führt dabei auch zu einer vermehrten Produktion hämatopoetischer Vorläufer- und Effektorzellen. Adulte und fetale hämatopoetische Stammzellen selbst, welche eine erhöhte oder erniedrigte TAL1-Expression aufweisen, zeigen in in-vitro Versuchen allerdings kein verändertes Proliferations-, Differenzierungs- und Wiederbesiedlungspotential (84). Damit kann von einem eher gewebe- als zellspezifischen Effekt von TAL1 ausgegangen werden. Die TAL1-Expression ist für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen charakteristisch und wird in der Differenzierung der ES-Zellen zu Endzellen des blutbildenden Systems auf diesen Stufen transient exprimiert (23).

Flk1

Flk1 ist in der embryonalen Entwicklung einer der ersten molekularen Marker des Beginns hämatopoetischer Entwicklung sowie der Angio- und Vaskulogenese. In der Entwicklung der EBs (siehe 1.3.3) wurde gezeigt, dass ausschließlich das Flk1-positive proximo-laterale Mesoderm Zellen mit definitivem hämatopoetischen Potential hervorbringen kann (95). Diese Region entspricht dem primitiven Streifen in der murinen Embryogenese, welcher entsprechend eine hohe Flk1-Expression aufweist und als Ursprungsort der Hämangioblastenbildung gilt (vgl. 1.4). Das in-vitro Äquivalent des Hämangioblasten, die BL-CFC, zeigt gleichfalls ein hohes Maß an Flk1-Expression. In einem Methylcellulose-Assay mit BL-CFCs konnte gezeigt werden, dass sich aus den BL-CFCs Blastenkolonien mit vaskulärem und hämatopoetischem Differenzierungspotential entwickeln (28, 59). Das Expressionsmuster von Flk1 war Mitte der 1990er-Jahre damit auch der erste molekulare Hinweis auf die enge Verzahnung von Vaskulo- und Hämatopoese. Flk1-defiziente Mäuse können keine frühen Blutinseln und keine organisierten Gefäßstrukturen bilden (117). Für die Expression von Flk1 in EBs gilt, dass an Tag 4 der Entwicklung 50% der EB-Zellen Flk1-positiv sind sowie annähernd sämtliche Zellen der Hämatopoese, wohingegen an Tag 12 nur noch ca. 5% der hämatopoetischen Zellen Flk1-positiv sind (51, 78). Dies weist auf die hervorgehobene Bedeutung von Flk1 während der frühen Stadien der Embryogenese hin.

Pu.1

Pu.1 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Zellforschung in der Hämatologie in den letzten 20 Jahren von besonderer Bedeutung war. Zum einen weil seine Expression auf hämatopoetisches Gewebe beschränkt ist (45) und zum anderen, weil ihm spezifische Funktionen in der Entwicklung hämatopoetischer Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen und Reifegrade zugeordnet werden. Pu.1 bestimmt als Transkriptionsfaktor die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen sowie der Endzellen der myelo-lymphatischen Reihe. Pu.1-defiziente hämatopoetische Stammzellen können sich in-vitro nicht weiter in hämatopoetische Progenitorzellen differenzieren und können somit auch nicht als langfristig regenerierende Stammzellen im Knochenmark dienen (49). Dabei ist Pu.1 auch entscheidend für das sog. *homing* und das Langzeitwiederbesiedlungspotential hämatopoetischer Stammzellen bei der Knochenmarkstransplantation (37). Pu.1 wird auf der Stufe hämatopoetischer Stammzellen (vgl. Abb. 4) am stärksten exprimiert, ist aber in der Folge für das Differenzierungs- und Proliferationspotential der reiferen myelo-lymphatischen Progenitorzellen nicht weniger wichtig, wobei das Maß der

Pu.1-Expression die hämatopoetische Linienentscheidung zwischen lymphatischer und myeloischer Reihe beeinflusst. Z.B. führen hohe Pu.1-Spiegel zur Entwicklung der Progenitorzellen zu Makrophagen und niedrigere Spiegel zur Entwicklung der Progenitorzellen zu Granulozyten und B-Zellen (15). Weiterhin von Bedeutung ist, dass Pu.1-defiziente hämatopoetische Zellen keine Reaktion auf Stimulation mit G-CSF zeigen und Pu.1 damit eines der entscheidenden Transkriptionsfaktoren in der Endstrecke der G-CSF-Regulation ist (18).

Gata2

Gata2 ist ein wichtiger Regulationsfaktor, der an der primitiven und definitiven Hämatopoese beteiligt ist. Dabei sind wichtige regulatorische Netzwerke mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Gata-1, Lmo2 oder TAL1 bekannt (39, 40). In hämatopoetischen Zellen aus der fetalen Leber und der AGM-Region, die durch Zellisolation von Flk1-, CD34-, c-kit- und CD34-positiven Zellen gewonnen wurden, zeigt sich eine sehr hohe Expression von Gata2 (87). Gata2-defiziente Mäuse sind nicht zur Blutbildung befähigt (130). Als entscheidende Funktion in der frühen hämatopoetischen Entwicklung ist gesichert, dass Gata2 als *gatekeeper* fungiert, um die Immaturität hämatopoetischer Vorläuferzellen zu erhalten. Seine Herunterregulation ist die Voraussetzung für die weitere Ausdifferenzierung der Zellen in reife Blutzellen (88). Die Expression von Gata2 ist für die Produktion und Expansion früher hämatopoetischer Stammzellen unverzichtbar, was für die AGM-Region auch örtlich nachgewiesen werden konnte (69).

Lmo2, Lmo4

Lmo2 ist ein Transkriptionsfaktor der Hämatopoese. In der Embryogenese ist Lmo2 für den Beginn der primitiven Erythropoese im Dottersack wichtig, sodass Lmo2-defiziente Embryos an Tag 9 der Entwicklung wegen ausbleibender Erythropoese sterben (142). In den weiteren Phasen der frühen embryonalen Hämatopoese ist Lmo2 im Komplex mit Gata-1 und TAL1 an der hämatopoetischen Stammzellregulation beteiligt (39). Das Lmo2-Protein wird in verschiedenen T-Zelleukämien gefunden. So wurde gezeigt, dass der Lmo2-, ERG-, FLI1-Komplex an der Entstehung der T-Zell akuten lymphatischen Leukämie beteiligt ist (98). Über Lmo4 ist bisher bekannt, dass es in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert wird. Für die frühe hämatopoetische Entwicklung konnte bis jetzt aber keine entscheidende Funktion zugeordnet werden (39, 60).

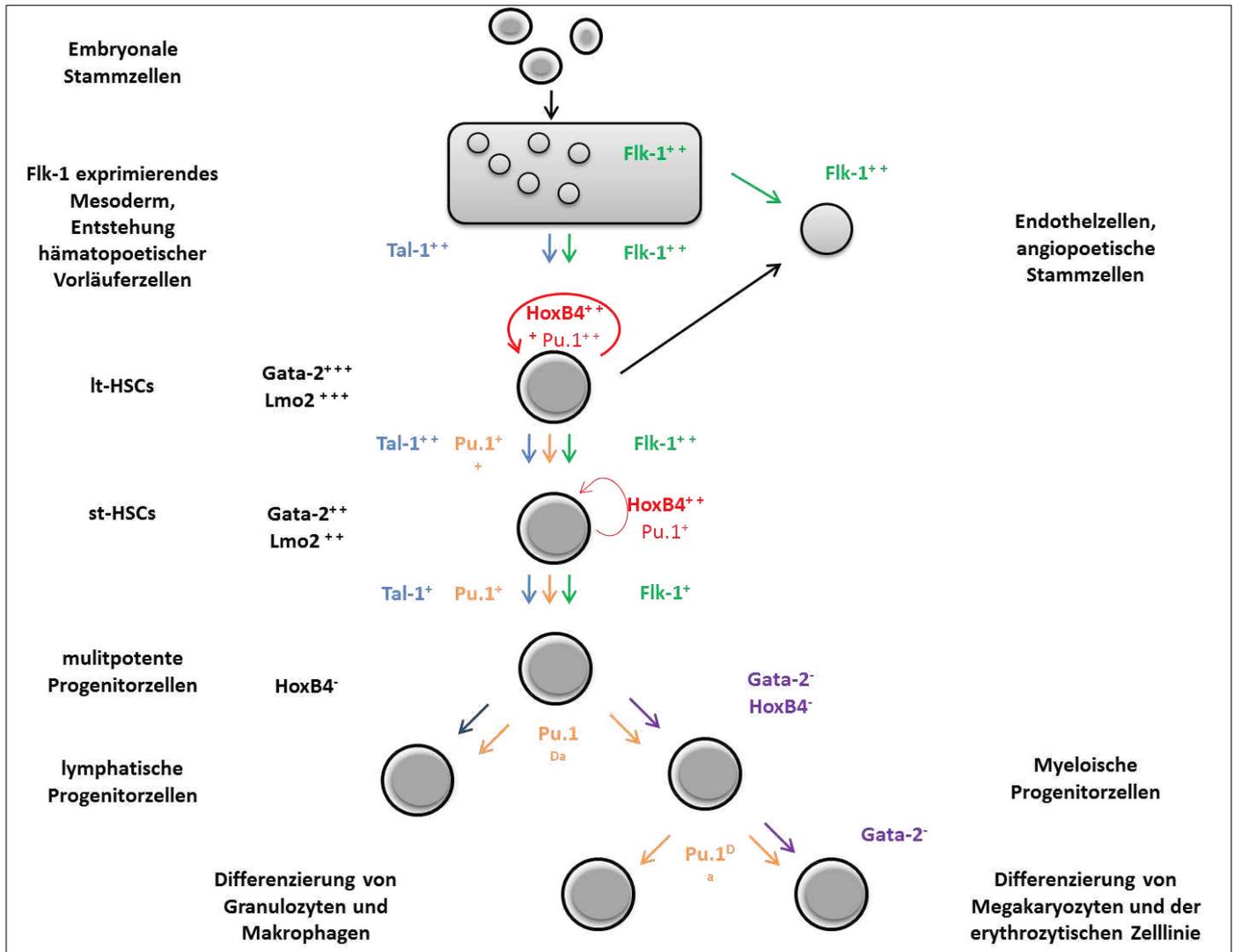


Abb. 4: Darstellung der sequentiellen Genexpression in den jeweiligen Schritten der Hämatopoese in *Embryoid Bodies* im in-vitro Modell. Die kultivierten embryonalen Stammzellen differenzieren alle drei Keimblätter aus, darunter das Mesoderm. Das Flk1-positive Mesoderm des primitiven Streifens bringt dabei die hämatoopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hervor, darunter die *long term self-renewing hematopoietic stem cells* (It-HSCs) und die *short term self-renewing hematopoietic stem cells* (st-HSCs). Für die jeweiligen hierarchischen Stufen der Hämatopoese sind die entsprechend exprimierten oder nicht-exprimierten Gene gezeigt, die für die Differenzierung (Pfeile, bunt), Selbsterneuerung (Pfeile, Halbkreis-förmig, rot) und die Zellebene selbst (schwarz) von Bedeutung sind. Abkürzungen: ‚+‘: Gen exprimiert; ‚++‘: Gen auf hohem Niveau exprimiert; ‚+++‘: Gen auf sehr hohem Niveau exprimiert; ‚-‘: Gen nicht exprimiert; ‚Da‘: ‚Dosis-abhängig‘: die Höhe der Expression des Gens nimmt Einfluss auf die Differenzierung im Sinne der Linienentscheidung der Zellen. Abb. modifiziert nach Ling et al. (72). Nachweise: Flk1 (28, 51, 59, 78, 95), TAL1 (23, 73, 103, 146), HoxB4 (4, 8, 48), Gata2 (69, 87, 88, 130) und Pu.1 (15, 45, 49).

1.6 Fragestellung

Der Granulozyten-Kolonien-stimulierende Faktor wird seit über 20 Jahren in der hämatologischen Praxis für die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen und zur Behandlung der Chemotherapie-induzierten febrilen Neutropenie eingesetzt. Während sein differenzierungsfördernder Effekt auf neutrophile Granulozyten und Vorläuferzellen der myeloischen Reihe weitgehend verstanden ist, ist der Einfluss des G-CSF auf unterschiedliche Arten und Entwicklungsstufen von Stammzellen Gegenstand rezenter Forschung. Erst in jüngerer Zeit wurde deutlich, dass G-CSF einen verschiedenartigen Einfluss auf Stammzellen hat, welchem entscheidende physiologische Rollen zugeordnet werden können (119, 122, 123). Dabei ist bislang noch nicht untersucht worden, welche Rolle der G-CSF auf frühe hämatopoetische Stammzellen ausübt.

In dieser Arbeit wurde ein Effekt von G-CSF auf frühe, wenig differenzierte hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen untersucht. Als Untersuchungsmodell wurde eine murine embryonale Stammzellkultur gewählt, da in der frühen ES-Zellentwicklung das Vorhandensein von weiter ausdifferenzierten hämatopoetischen Zellen weitgehend ausgeschlossen werden kann, was beispielsweise in Zellisolaten aus dem adulten Knochenmark weit schlechter möglich wäre. Das Modell bot weiterhin den Vorteil einer guten Reproduzierbarkeit, der Möglichkeit der Bildung ausreichend großer Zellmengen für Untersuchungen auf systemischen Niveau und eine gute Vergleichbarkeit zu anderen Arbeiten, die dieses etablierte Modell der ES-Zellkultivierung hinsichtlich der hämatopoetischen Charakterisierung verwendeten.

Nachfolgend aufgeführte Ziele und Fragestellungen wurden für die Arbeit definiert:

- Können die hämatopoetischen Entwicklungsstadien in einer murinen ES-Zellkultur durch systemische Charakterisierung der differenziellen hämatopoetischen Gen- und Proteinexpression nachvollzogen werden?
- Kann ein Einfluss von G-CSF auf Regeneration, Differenzierung, Proliferation und Selbsterneuerung von Stamm- und Vorläuferzellen der frühen hämatopoetischen Entwicklung über Bestimmung der differenziellen hämatopoetischen Gen- und Proteinexpression nachgewiesen werden?
- Führt eine Stimulation mit G-CSF zu einer nachweisbar verstärkten Bildung früher hämatopoetischer Stammzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labormaterialien und Geräte

Material	Bezugsquelle
Einmalfilter (Porendurchmesser 220 nm)	Millipore Express
Einmalspritzen (2ml)	Becton Dickinson
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5ml; 1ml; 1,5ml ; 2ml)	Eppendorf
Erlenmeyer-Kolben	Schott
Falcon Röhrchen (15; 50ml)	Falcon
Kryobox	Falcon
Kryoröhrchen (2ml)	Nunc
Küvetten (5ml)	Eppendorf
MACS <i>Multi Stand Magnet</i>	Miltenyi Biotech
MACS <i>Separation Columns and Tubes</i>	Miltenyi Biotech
Messzylinder	Schott
Midi MACS Säulenhaltung-Magnet	Miltenyi Biotech
Mikrotiterplatte (96-Well)	Applied Biosystems
Neubauer-Zählkammer	Assistent
Objektträger (mit Deckgläsern)	Schütt, Menzel
Petrischalen	Falcon
Pipetten (10µl bis 50 ml)	Greiner bio-one
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotech
Zellkulturflasche	Nunc
Zellkulturschalen (6 und 32 Well)	Greiner bio-one
Zellschaber	Sarstedt
Geräte	Bezugsquelle
Akku-Pipetus	Hirschmann
BIO-Photometer	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus
Chemolumineszenz-Detektor	BioRad
Feinwaage	Scaltec
FACScan : Cytomics FC500	Beckman Coulter
Lichtmikroskop	Zeiss
Mixerplatte ('Rocky-Mixerplatte')	Heraeus Sepatech
Photometer	Eppendorf
Taqman-PCR-Gerät (ABI PRISM™ 7000)	Applied Biosystems
Thermocycler PCR-Express	Hybaid
Tischzentrifuge	Heraeus
Vortex-Gerät	Heidolph
Wasserbad	GFL
Werkbank	Gelaire
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus Sepatech

2.1.2 Chemikalien und biologisches Material

Reagenzien

Chemikalien	Bezugsquelle
5x <i>First Strand Buffer</i>	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	Gibco
Chloroform	Sigma
Collagenase IV	Gibco
SYBR Green	Eurogentec
dNTP (Desoxyribonukleotid-Triphosphat)	Amersham Biosciences
Dimethylsulfoxid	Sigma
DTT (1.4-Dithiothreitol)	Invitrogen
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Gibco
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum Gold (FKS Gold)	Sigma
Gelatine (Zellkultur getestet)	Gibco
Glutamin (L-Glutamin)	Gibco
Hot Gold Star (DNS Polymerase)	Sigma
Isopropanol	Sigma
<i>Leukemia Inducible Factor</i> (LIF ESGRO®)	Chemikon
Magnesiumchlorid (50mM)	Eurogentec
Mitomycin C	Medac
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	Gibco
Random Hexamers 50 μ M 5nmoles	AppliedBiosystems
RNase-freies Wasser	Gibco/ Invitrogen
RNasin® RNase-Inhibitor	Promega
TRIzol® Reagent	Invitrogen
Trypanblau	Sigma
Trypsin/ EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Gibco

Zytokine

Material	Bezugsquelle
rekombinantes G-CSF (murin)	Peptotec

Antikörper (FACS)

Antikörper	Bezugsquelle
CD 34 PE (Phycoerythrin) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science
CD 90.2 FITC (Fluoresceinisothiocyanat) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science
CD 13 (PE) <i>rat-anti-mouse</i>	BD Bio Science
CD 45 (FITC) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science
CD 117 (PE) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science
CD 133 (PE) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science
CD 135 (PE) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science
Isokontrolle IgG2 (PE) <i>rat- anti-mouse</i>	BD Bio Science

Isokontrolle IgG2 (FITC) *rat- anti-mouse*

BD Bio Science

Antikörper (MACS)

Anti-Sca1 *Micro-Bead Kit* (FITC):

- Anti-Sca1-FITC *antibody (mouse)*
- Anti-FITC *antibody* mit *Micro-Beads*

Miltenyi Biotech

Enzyme und Inhibitoren

Enzyme

Bezugsquelle

Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*-*Polymerase*)
M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*)-
Reverse Transkriptase

Amersham Biosciences

Invitrogen

Inhibitor

Bezugsquelle

Ribonuklease-Inhibitor (*RNSguard*)

Amersham Bioscience

Puffer und Lösungen

Material

Bezugsquelle

Phosphate Buffered Saline (PBS)
50 x Triacetat-EDTA-Puffer
(2M Tris-HCL (pH 8,0),
1M Essigsäure, 50mM EDTA)
Trypsin/EDTA-Lösung
(mit Verhältnis PBS zu Trypsin/EDTA: 9 zu 1)
FACScan Clean Stammlösung
RNS-Clean Stammlösung
MACS-Puffer
10X *Taqman buffer*

Sigma

Bio-Rad, Sigma

Sigma

Becton Dickinson (BD)

Hybaid

Miltenyi Biotech

Amersham

murine embryonale Stammzellen und Feederzellen

Zellen

Bezugsquelle

E14 ES-Zellen

freundlicherweise zur Verfügung
gestellt von Herrn Dr. Matthias
Müller, Med. Klinik II, Lübeck,
(ab 1999 Novartis, Basel)

Feederzellen

embryonale Fibroblasten,
Thromb-X, Herestraat 49,
3000 Leuven, Belgien

Oligonukleotide

Bezug über die Firma Metabion International AG, Konzentration der Stocklösung: 100pmol/µl

Bezeichnung	Nukleotid
β-Actin <i>Forward</i> (F) β-Actin <i>Reverse</i> (R)	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
Cyclin D1 F Cyclin D1 R	5'-GGC ACC TGG ATT GTT CTG TT-3' 5'-CAG CTT GCT AGG GAA CTT GG-3'
PU-1 F PU-1 R	5'-GAG AAC CAC TTC ACA GAG CT-3' 5'-TAC AGG CGA ATC TTT TTC TT-3'
Epo F Epo R	5'-GGA CAC CTA CTT GGT ATT GG-3' 5'-GAC GTT GTA GGC TGG AGT CC-3'
Flk1 F Flk1 R	5'-ATG CAC GGC ATC TGG GAA TC- 3' 5'-GCT ACT GTC CTG CAA GTT GCT GTC-3'
GATA2 F GATA2 R	5'-ATG GGT GGA ACA TAC TCT TG-3' 5'-TCT CCA AAC AAA CAC TCT CC-3'
HOX B-4 F HOX B-4 R	5'-TCA CAG AGC GAT TAC CTA CCC AGC-3' 5'-GGT AGA CGA CGG GCT CTT TGC-3'
LMO2 F LMO2 R	5'-GCT ACT TCC TGA AAG CCA TC-3' 5'-AGT CTC TCC TGC ACA ATT TC-3'
LMO4 F LMO4 R	5'-AGT CGA TTC CTG CAA GTG AG-3' 5'-TGA CCT CTC AGC AGA CCT TC-3'
GATA-1 F GATA-1 R	5'-TCA GCA CTG GCC TAC TAC AG-3' 5' TAA GCA CTG CCG GTG ACA GG-3'
Scl/TAL1 F Scl/TAL1 R	5'-TGC GTT TTA TTC GTT GTA TG-3' 5'-AAG CAG ATG AAC ACG AGC TA-3'
PECAM (CD31) F PECAM (CD31) F	5'-TGC AGG AGT CCT TCT CCA CT-3' 5'-ACG GTT TGA TTC CAC TTT GC-3'
CD144 F CD144 R	5'-ATT GAG ACA GAC CCC AAA CG-3' 5'-TTC TGG TTT TCT GGC AGC TT-3'
ERG F ERG R	5'-CAG TAG CCG CCT TGC TAA TC-3' 5'-TGC ACC TTG GTC ATG ATG TT-3'
EGR-1 F EGR-1 R	5'-GAC GAG TTA TCC CAG CCA AA-3' 5'-GGC AGA GGA AGA CGA TGA AG-3'
FLI F FLI R	5'-CAA CCA GCC AGT GAG AGT CA-3' 5'-GCC GTT CTT CTC ATC CAT GT-3'

HOX-D3 F
HOX-D3 R

5'-GTT ACC TGG AGC CTG AGA GC-3'
5'-GGC TGA TGA GGA GTG CTG TA-3'

Medium und Zusätze für die ES-Zellkultur

Standardmedium

Reagenz	Volumen/ Konzentration	Endkonzentration (in %)
DMEM	400ml	80 %
FKS Gold	100ml	20%

Zusätze:

Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) 100 x Stammlösung	5ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung	5ml
L-Glutamin (Stammlösung 200 mM)	5ml
β-Mercaptoethanol	0,1mM (Endkonzentration)
LIF	1500 Units/ml (nur für Präkultivierung, siehe 2.2.3.1)

Zytokinarray

Proteome Profiler™ Array, Mouse Cytokine Array Panel A (R&D Systems):

Mouse Cytokine Array Panel A

Array Buffer 4

Array Buffer 5

Array Buffer 6

Wash Buffer Concentrate

Antibody Detection Cocktail (Mouse Cytokine Array Panel A)

Streptavidin-HRP

4-Well Rectangular Multi-dish

Transparency Overlay Template 2.2 Methoden in der Zellkultur

2.2 Methoden in der Zellkultur

2.2.1 Arbeiten in der Zellkultur

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank durchgeführt. Verwendete Labormaterialien sowie die Werkbank selbst wurden vor der jeweiligen Verwendung mit 70%igem Ethanol gesäubert. Die Kultivierung der Zellen in Zellkulturflaschen und Petrischalen erfolgte im Brutschrank (5% Kohlenstoffdioxid (CO₂), 95% Luftfeuchtigkeit, 37°C).

2.2.2 Vermehrung und Kryokonservierung der E14 ES-Zellen und der Feederzellen

Die murinen E14 ES-Zellen wurden mit Standardmedium (siehe 2.1.2) unter Differenzierungshemmung mit dem *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) in einer Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert, bis sie zu 80% konfluent waren. Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um die Zellen vom Boden zu lösen. Nach Aufnehmen der Zellen in Standardmedium in ein 50ml Falcon-Röhrchen erfolgte eine Abzentrifugation mit 1000 U/min für 5 Minuten. Die Zellen wurden nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer erneut abzentrifugiert und mit Einfriermedium auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Je 1ml Zellsuspension (entsprechend 1×10^7 Zellen) wurde in Kryoröhrchen pipettiert, welche dann bei -80°C in einer Kryobox eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Die embryonalen Fibroblasten, die sog. *Feederzellen* wurden für einige Tage mit Standardmedium in einer Zellkulturflasche im Brutschrank kultiviert. Vor der Ernte wurden die Zellen mit Mitomycin C (Konzentration: 10µg/ml) für 2 Stunden behandelt, um eine weitere Proliferation der Zellen, bei erhalten bleibender Vitalität, zu unterdrücken. Anschließend wurden die Zellen, wie oben für die E14 ES-Zellen beschrieben, gezählt, in Kryoröhrchen aufgeteilt (Konzentration: 1×10^6 Zellen/ml Standardmedium) und in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren.

2.2.3 Kultivierung der Stammzellen in der Zellkultur

2.2.3.1 Präkultivierung der Zellen

Zunächst wurden die Stammzellen unter einer LIF-vermittelten Differenzierungsinhibition für 3 Tage vermehrt. Hierzu wurde zunächst eine Zellkulturflasche für einige Stunden mit 0,1%iger, flüssiger Gelatine vorbehandelt. Nach Absaugen der Gelatine und vorsichtigem Auftauen der N₂-kryokonservierten Fibroblasten (Feederzellen) in Standardmedium wurden die Zellen nach Abzentrifugation bei 1300 U/min mit 15ml Standardmedium resuspendiert, in die Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert.

Ca. 5 Stunden später wurden die E14 ES-Zellen auf dieselbe Weise aufgetaut und ebenfalls in 15ml Standardmedium, nun unter Zugabe von 1500 Units LIF/ml Standardmedium, auf die adhärente Fibroblastenschicht in der Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden nun für 3-4 Tage im Brutschrank belassen, wobei jeden Tag ein Mediumwechsel erfolgte (jeweils 15 ml Standardmedium mit LIF).

2.2.3.2 Setzen der *Hängenden Tropfen* und weitere Kultivierungsschritte

Nach der Vorkultivierung erfolgte das Ansetzen der Zellen in *Hängenden Tropfen*. Nach Absaugen des Zellmediums (siehe 2.2.3.1) inklusive der nicht adhärenen Zellen und Zellbestandteile wurden die Zellen einmal mit 15ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und damit vom Boden der Zellflasche abgelöst. Die Zellen wurden dann zusammen mit 10ml Standardmedium in ein 50ml Falcon-Röhrchen aufgenommen und 5 Minuten bei 1300 U/min abzentrifugiert. Nach Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurden sie auf eine Konzentration von 4×10^4 Zellen/ml Standardmedium eingestellt.

Das Setzen der *Hängenden Tropfen* wurde dergestalt vollzogen, dass 64-72 Tropfen mit je 20µl Zellsuspension in den Deckel einer Petrischale gesetzt wurden, der Boden der Petrischale zur Bereitstellung eines feuchten Umgebungsmilieus vollständig mit PBS benetzt wurde (ca. 15ml pro Schale) und die Schalen dann für 3 Tage in den Brutschrank gegeben wurden (siehe Abb.5).

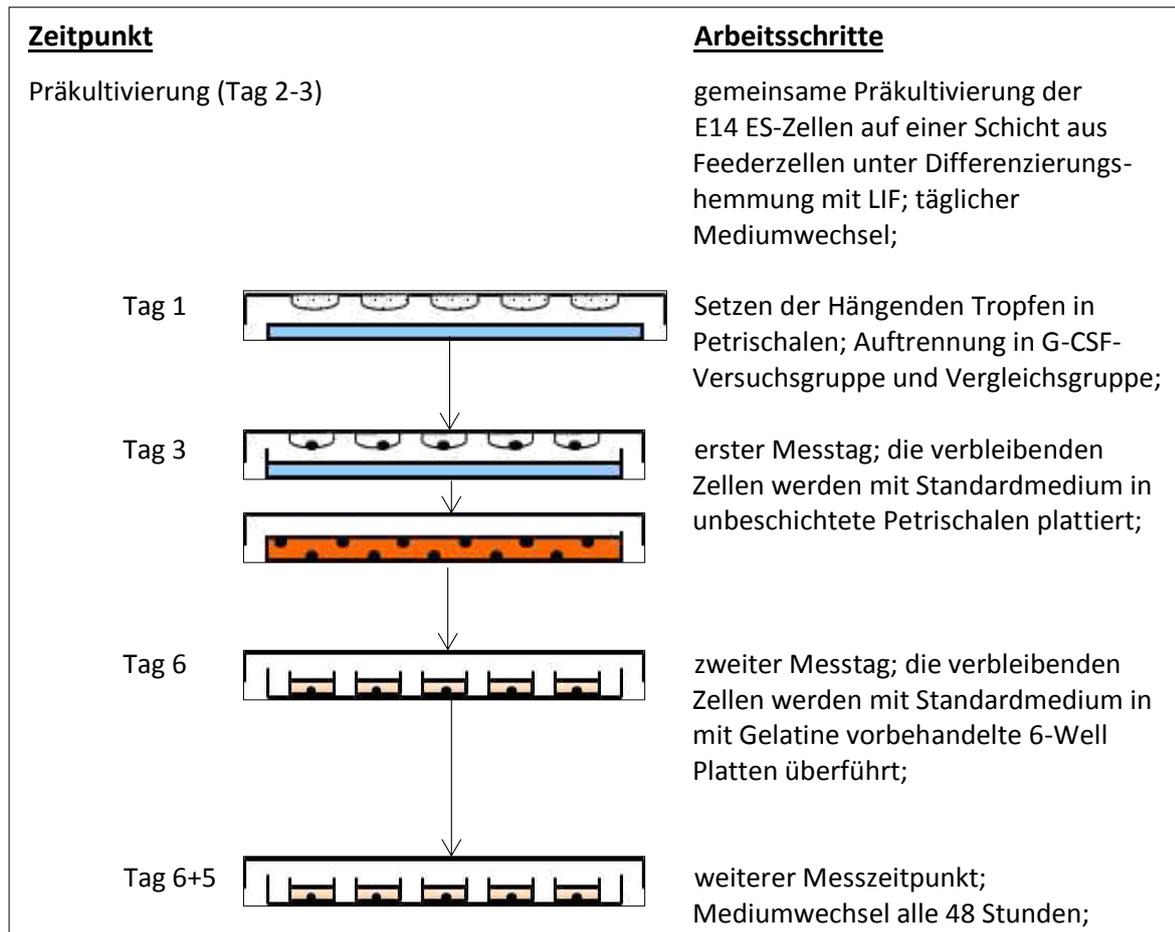


Abb. 5: Zeitliche Übersicht über die jeweils anfallenden Arbeitsschritte bei der Kultivierung der ES-Zellen. Die Abbildungen zeigen die Kultivierung der ES-Zellen in Petrischalen. An Tag 1 wurden die ES-Zellen als *Hängende Tropfen* in Zellmedium gesetzt und mit PBS am Boden der Schale befeuchtet (blau). Bis Tag 3 bildeten sich EBs in den *Hängenden Tropfen* aus, welche dann geerntet wurden oder mit Zellmedium in neue Petrischalen überführt wurden. An Tag 6 werden die Zellen wiederrum geerntet oder in mit Gelatine vorbehandelte 6-Well Platten überführt und bis Tag 6+5 weitergezüchtet [Abbildung modifiziert nach Fiedler (29)].

An Tag 3 wurden die Zellen nun erstmals geerntet, wobei die restlichen Zellen in neue Petrischalen überführt und weitergezüchtet wurden. Die Tropfen wurden dazu mit Zellsuspension aus dem Deckel der Petrischale mit 15ml Standardmedium abgewaschen und in einer neuen Petrischale aufgefangen. Die Zellen wurden dann für 3 weitere Tage inkubiert.

An Tag 6 erfolgte die Überführung in 6-Well Platten, die zuvor für 24 Stunden mit 0,1%iger Gelatine vorbehandelt wurden. Pro Well wurden 3ml Standardmedium und ca. 5-8 der nun sichtbaren Zellaggregate, den sog. *Embryoid Bodies* (EBs), aus den

Petrischalen eingesetzt. Die Zellen wurden anschließend unter Mediumwechsel alle 2 Tage für insgesamt 5 Tage weiter kultiviert (Tag 6+5[†]). Eine Weiterbeobachtung der Zellen unter Mediumwechsel fand zudem zu Zwecken der Kontrolle der erfolgreichen Bildung von mesodermalen Gewebezellen wie Blutzellen und Muskulatur statt.

2.2.3.3 Zellernte

Die Zellernte fand an den Tagen 3, 6 und 6+5 statt (vgl. Abb. 5). Die Ernte der Versuchs- und Kontrollgruppe erfolgte simultan. Die Zellen wurden zunächst in 50ml Falcon-Röhrchen überführt, 10 Minuten mit 1400 U/min abzentrifugiert und folgend mit CollagenaseIV-PBS-Lösung (Konzentration: 10µg/ml) voneinander gelöst. Um sie voneinander zu lösen, wurden die Zellen für mindestens eine Stunde in einem 37°C Wasserbad inkubiert und alle 10 Minuten mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert. Nun wurden die Zellen über einen Zellfilter gegeben (Porengröße 0,2µm), 10 Minuten bei 1400 U/min abzentrifugiert, in 1ml PBS gelöst und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen entweder für eine FACS-Messung (siehe 2.2.5), eine magnetische Auftrennung nach Sca1-Oberflächenprotein (siehe 2.2.4) oder eine Proteinaufreinigung und einen anschließenden Array direkt weiterverwendet (siehe 2.2.7), bzw. für eine spätere PCR-Messung (siehe 2.2.6) eingefroren. Hierzu wurden die Zellen noch einmal mit PBS gespült, 10 Minuten bei 1400 U/min abzentrifugiert und das Pellet in einem 15ml Falcon-Röhrchen in den -80°C Kühlschrank verbracht.

2.2.3.4 Stimulation mit Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor

Die Versuchsgruppe wurde ab dem Setzen der *Hängenden Tropfen* (Tag 1, vgl. Abb.5) durchgehend mit G-CSF stimuliert. Hierzu wurde der G-CSF in der Konzentration 50ng G-CSF/ml Standardmedium jeweils dem Standardmedium zugegeben. Die G-CSF Konzentration wurde entsprechend den am häufigsten in der Literatur beschriebenen Stimulationsschemata verwendet (17).

[†] Die Bezeichnung Tag 6+5 für Tag 11 der Embryonalentwicklung in der in-vitro Kultivierung embryonaler Stammzellen hat historische Gründe. In früheren Experimenten war Tag 6 der Entwicklung häufig der erste Messzeitpunkt. Zudem wurden, wie gleichfalls in der vorliegenden Arbeit, an Tag 6 die erfolgreich gezüchteten, sichtbaren EBs aus der Kultur entnommen und nur diese weitergezüchtet.

2.2.4 Zellbiologische Methoden: Auftrennung mit MACS *Micro-Beads*

Die in der Zellkultur geernteten und mit Collagenase IV voneinander gelösten Zellen (siehe 2.2.1) wurden für einige Versuche (siehe 3.2 und 3.3) an einer magnetischen Säule mit dem sog. MACS-Verfahren (MACS®-Technologie der Firma Milteny Biotech) spezifisch aufgetrennt. Hierbei wurden Antikörper gegen ein Oberflächenprotein von Stammzellen, in diesem Fall Sca1 (*stem cell antigen 1*), mit den Zellen inkubiert. Die Antikörper, die mit einem FITC-Rest konjugiert sind, wurden mit einem sekundären Antikörper, der gegen den FITC-Rest des primären Antikörpers gerichtet ist, wiederrum inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist dabei mit einer kleinen Magneteinheit, einem sog. *Micro-Bead*, gekoppelt. Die Zellen wurden nach Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper über einer Säule in einem starken Magnetfeld aufgetrennt. Folglich resultierten zwei voneinander getrennte Zellpopulationen, eine Sca1-positive Zellpopulation und eine Sca1-negative Zellpopulation. Die Aufarbeitung war im Detail wie folgt.

Zunächst wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen auf 40 μ l MACS-Puffer eingestellt und mit je 10 μ l Anti-Sca1-FITC Antikörpern pro 40 μ l Probenvolumen für 10 Minuten bei 4-8°C inkubiert[‡]. Den Proben wurden anschließend 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l Anti-FITC-*Micro-Beads* zugegeben. Nach der Inkubation von 15 Minuten bei 4-8°C wurden 600 μ l MACS-Puffer zugegeben, die Proben mit 1400 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand mit der Pipette abgenommen. Die Proben wurden in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert und konnten für die folgende Auftrennung verwendet werden.

Die Vorrichtung für die Auftrennung bestand aus einem starken Magneten (MACS® *Multi Stand*), der daran angebrachten Halterung für die Säule (Midi MACS® Säulenhalterung) und einer spritzenförmigen Säule (MACS® *Separation Columns and Tubes*), welche in der Halterung eingeklemmt wurde. Die Säule wurde nun zwei Mal mit 500 μ l MACS-Puffer gewaschen, die Probe in die Säule gegeben und die Säule nach Durchlaufen der Probe mit weiteren 1,5ml MACS-Puffer durchgespült. Der gesamte Durchfluss wurde in einem Gefäß unter der Säule aufgefangen (sog. Negativfraktion). Anschließend wurde die Säule vom Magneten entfernt, 500 μ l MACS-Puffer aufgegeben und der Säulensempel durch die Säule gedrückt. Hierbei wurde die sog. Positivfraktion aus dem Stempel ausgewaschen.

[‡] die in 2.2.4 angegebenen Mengenangaben beziehen sich auf ein Ausgangsvolumen von 40 μ l Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen; die Mengen wurden je nach Zellzahl linear adaptiert;

Beide Fraktionen wurden anschließend entweder einer FACS-Messung zugeführt (siehe 2.2.3) oder für eine RNS-Präparation (siehe 2.2.6.1) verwendet.

2.2.5 Zellbiologische Methoden: FACS

2.2.5.1 Prinzip der FACS-Technologie

Die *Fluorescence activated cell sorting*-Technologie (FACS) ermöglicht verschiedene, oberflächliche Zelleigenschaften in einem hohen Tempo (bis 2000 einzelner Zellen pro Sekunde) zu messen und die Zellen damit hinsichtlich ihres oberflächlichen Proteinexpressions-Schemas zu charakterisieren. Die Zellen werden dabei (Durchführung und Vorbereitung siehe 2.2.5.2) im FACS-Gerät in einer Mikrokapillare angesaugt, welche dann eine Sensoreinheit durchläuft. Dort wird ein Laserstrahl auf die Zellen, die in der Kapillare einzeln hintereinander liegen, gerichtet. Die von den Zellen gebrochene Emission des Laserstrahls wird von einem Detektor (*Photomultiplier*) der Sensoreinheit registriert.

Die Emission wird dabei vom Gerät in zwei Komponenten eingeteilt, das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) und das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*). Das Vorwärtsstreulicht beschreibt die Beugung des Laserlichtes in flachem Strahl über die Zelle und ist damit ein Maß für das Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht beschreibt die Brechung des Lichtes im rechten Winkel zur Zelle und ist ein Maß für die Granularität der Zelle, welche u.a. von der Größe und Struktur des Zellkerns sowie der Anzahl und Beschaffenheit der Vesikel und Granula abhängig ist. Die typische graphische Darstellung erfolgt im sog. dot-plot-Diagramm (siehe Abb.6), wobei x- und y-Achse dem *Forward Scatter* und dem *Sideward Scatter* entsprechen und jeder Punkt einer gemessenen Zelle entspricht (148).

Die FACS-Technologie bietet die Möglichkeit, an Zellen gebundene und mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Antikörper (z.B. PE, FITC) zu messen. Am gebräuchlichsten ist die Methode, um verschiedene Oberflächenmarker von Zellen, sog. *cluster of differentiation* (CD) zu markieren und damit den Anteil der Zellen mit einem bestimmten CD an der Gesamtzellzahl zu ermitteln (vgl. 2.2.5.2).

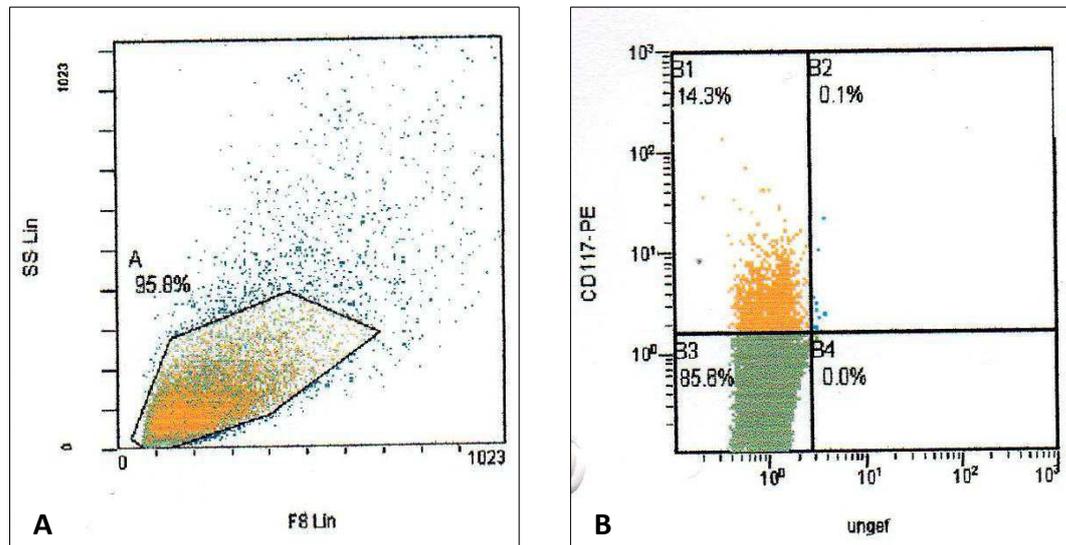


Abb. 6: Abb. 6A zeigt die durch das FACS-Gerät bestimmte Größe (x-Achse) und Granularität (y-Achse) der Zellen gegeneinander aufgetragen. Ein Punkt entspricht einer gemessenen Zelle. Durch die Auswahl eines *gates* (hier dargestellt als schwarzes Hexagon in Abb. 6A) werden nur Zellen mit ähnlicher Größe und Granularität in die Auswertung einbezogen (hier 95,8 % der gemessenen Zellen). Dies ermöglicht die Auswahl einer homogenen Zellpopulation und eine Reduktion von Artefakten. Abb. 6B zeigt eine Messung mit CD117-PE Antikörpern. Ab einer definierten Fluoreszenzschwelle (horizontale Linie) werden die einzeln gemessenen Zellen als für den Oberflächenmarker positiv registriert.

2.2.5.2 Durchführung

Nach der Zellernte (siehe 2.2.3.3) wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/500 μ l PBS pro Ansatz eingestellt und die murinen Antikörper hinzupipettiert (vgl. Tabelle 2). Folgende Ansätze wurden mit den jeweiligen Antikörpern in lichtverdunkelten, auf Eis stehenden 1,5ml Eppendorf-Gefäßen angesetzt (jeweils für die Versuchs- und Kontrollgruppe):

Antikörper	Volumen	Konzentration
Isotypenkontrolle IgG2-PE	5 μ l	Stocklösung 0,5mg/ml
Isotypenkontrolle IgG2-FITC	2 μ l	Stocklösung 0,5mg/ml
CD34-, CD13-, CD117-, CD133-, CD135-PE	5 μ l	Stocklösung 0,5mg/ml
CD90-, CD45-FITC	2 μ l	Stocklösung 0,5mg/ml

Dabei wurden die beiden Isotypenkontrollen IgG2-PE und -FITC, CD34 zusammen mit CD90 und CD45 zusammen mit CD13 in jeweils einem Ansatz zusammengeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit wurden die Ansätze mit 3000 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert und wiederum mit 3000 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Für die FACS-Messung wurden die Proben nach Abzentrifugation in 500µl *FACScan Clean Stammlösung* in einer FACS-Küvette resuspendiert und unmittelbar anschließend im FACS-Gerät gemessen. Die Analyse der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm CellQuest® der Firma Becton Dickinson.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden: quantitative Real Time-PCR

2.2.6.1 Überblick

Zur Messung der quantitativen Genexpression der Zellen wurde die Methode der Reverse-Transkriptase-Reaktion von mRNA (*messenger* RNA) mit anschließender Real Time-Polymerasen Kettenreaktion (RT-PCR[§]; siehe 2.2.6.3) angewendet. Aus der aus den Zellen isolierten RNA wurde in einem ersten Schritt mit der Reverse-Transkriptase-Reaktion stabilere komplementär-DNA (cDNA, einsträngig) erstellt, wobei hierbei die mRNA transkribiert wurde. Im zweiten Schritt erfolgte dann in der Real Time-PCR die quantitative Messung der Expression der zu untersuchenden Gene. Die Arbeiten zur PCR wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt, verwendete Materialien zuvor autoklaviert und die Arbeitsflächen mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Bei den Arbeitsschritten wurden die Proben stets mit Eis kühl gehalten.

2.2.6.2 Funktionsweise der PCR

Die Polymerasen Kettenreaktion (PCR) ist ein gängiges molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung der Expression von Genen. Die PCR besteht prinzipiell aus drei wesentlichen Schritten:

1. *Denaturierung*: Bei 94-96°C wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei einzelne Stränge getrennt. Dieser Schritt wird auch bei Vorliegen primär einzelsträngiger DNA

[§] Die Abkürzung RT-PCR wird in dieser Arbeit für die Real Time-PCR verwendet und nicht, wie auch möglich, für die Bezeichnung Reverse-Transkriptas-PCR;

- (ssDNS) angewendet, um unspezifische Bindungen und ein freies, einzelsträngiges Vorliegen der Primer** zu gewährleisten.
2. *Primerhybridisierung*: Bei einer nun niedrigeren Reaktionstemperatur (z.B. 55°C) lagern sich die Primer an die DNS an, was als *Primer-Annealing* bezeichnet wird.
 3. *Elongation (Amplifikation)*: Hier erfolgt die Synthese des jeweiligen Komplementärstrangs der DNS. Die im Reaktionsgemisch vorliegende DNS-abhängige DNS-Polymerase, welche den Einbau der komplementären DNS-Basen bewerkstelligt, benötigt die Primer als Starthilfe. Sie dockt am Primer an und synthetisiert den Doppelstrang der DNS in Richtung 5'-Ende des Einzelstrangs. Der Vorgang findet bei einer von der DNS-Polymerase abhängigen Temperatur statt, z.B. 72°C.

Der Zyklus findet in der Regel 25-40 Mal statt, wobei der zu vervielfältigende Genabschnitt exponentiell vermehrt wird. In der ersten Phase (*exponentielle Phase*) läuft die PCR-Reaktion dabei unter reichlichem Vorhandensein aller notwendigen Bestandteile im PCR-Reaktionsgemisch hoch spezifisch ab, so dass annähernd eine Verdopplung der DNS-Abschnitte pro Zyklus erreicht wird. In der anschließenden *linearen Phase* sind nicht mehr alle Komponenten der Reaktionslösung ausreichend vorhanden, so dass sich die Reaktion verlangsamt. In der letzten Phase, der *Plateauphase*, findet wegen des Verbrauchs der Bestandteile keine Reaktion mehr statt (vgl. 2.2.6.3, Abb. 7) (149).

2.2.6.3 Funktionsweise der Taqman®-Real Time-PCR

Die RT-PCR ermöglicht es, die Quantifizierung der Menge an synthetisierter DNS während den jeweiligen PCR-Zyklen vorzunehmen. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessung, wobei die Stärke der Fluoreszenz proportional zu den spezifisch amplifizierten DNS Abschnitten zunimmt. Für die von uns durchgeführte Taqman®-RT-PCR wurde SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Bei der spezifischen Bindung an doppelsträngige DNS wird der Farbstoff aktiviert und der resultierende DNS-SYBR-Green Komplex sendet ein Fluoreszenzsignal aus. Die Fluoreszenz der einzelnen Proben wird während der PCR im Taqman-Gerät mit einer Kamera gemessen. Die Messung der Fluoreszenzzunahme während der exponentiellen

** Primer stellen kurze DNS-Abschnitt von in der Regel 15-20 Basenpaaren dar, die den zu vervielfältigenden Bereich des gewünschten Gens auf der DNS auf je einer Seite, dem 3'-Ende oder dem 5'-Ende, begrenzen. Für einen zu untersuchenden Genabschnitt müssen entsprechend zwei Primer verwendet werden (vgl. 2.1.2).

Phase der PCR ermöglicht quantitative Aussagen über das Maß der vorhandenen cDNS und damit der ursprünglich vorhandenen mRNS. Tritt die Fluoreszenz erstmals über das Maß der Hintergrundfluoreszenz hinaus (*Threshold*), wird der Wert als C_T -Wert bezeichnet und gibt an, bei welcher Anzahl an Zyklen dies der Fall war (vgl. Abb. 7). Ein niedriger C_T -Wert bedeutet ein vergleichsweise hohes Level an Kopien eines Gens zu Anfang der Reaktion in der Probe und, umgekehrt, ein hoher C_T -Wert ein niedrigeres Level an Kopien eines Gens zu Anfang der Reaktion in der Probe.

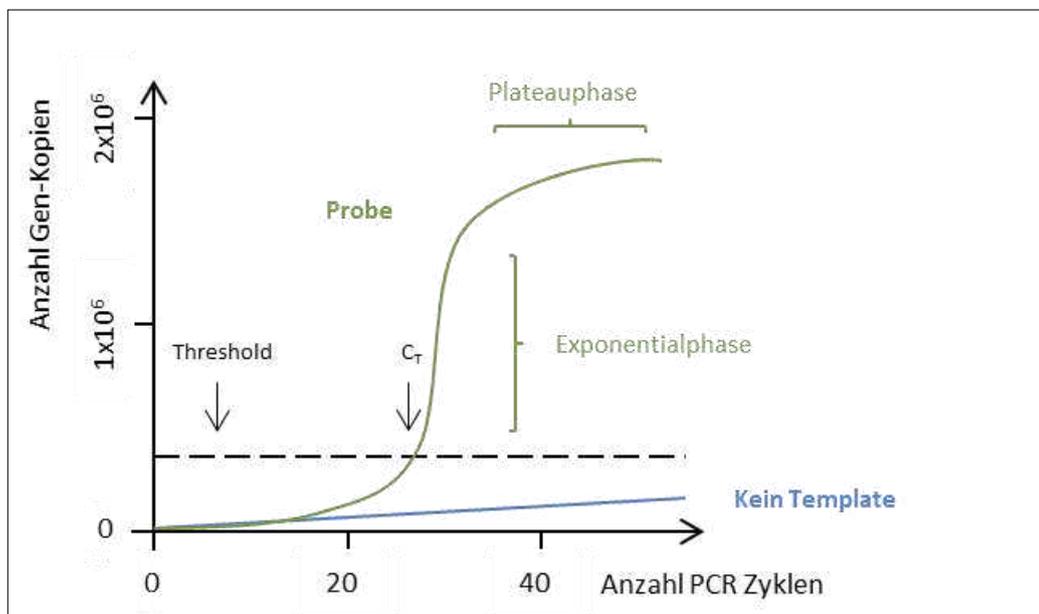


Abb. 7: Schematische Darstellung des Ablaufs einer RT-PCR. Aufgetragen sind die Parameter Anzahl an PCR Zyklen (x-Achse) und Anzahl der Gen-Kopien (y-Achse). Ist keine cDNS des zu untersuchenden Gens enthalten, tritt die Fluoreszenz nicht über das Maß der Hintergrundfluoreszenz hinaus ('kein Template'). Ist entsprechende cDNS vorhanden ('Probe') bezeichnet der C_T -Wert den Anzahl der PCR Zyklen, bei welchem die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfluoreszenz hinausgeht ('Threshold'). Nach Ablauf der PCR unter optimalen Reaktionsbedingungen ('Exponentialphase') tritt eine Verlangsamung und Anhalten der Reaktion durch Verbrauch der einzelnen Bestandteile ein ('Plateauphase').

2.2.6.4 Berechnung des relativen Genexpressions-Niveaus

Aus dem C_T -Wert kann keine absolute Zahl an Kopien errechnet werden, sondern die Anzahl an Zyklen bei Erreichen der Fluoreszenzschwelle wird auf ein in allen Zellen ubiquitär exprimiertes Gen, ein sog. *housekeeping gene*, bezogen, in unserem Fall β -Actin. Aus den C_T -Werten für zwei Proben (z.B. Versuchs- und Kontrollgruppe mit den dazugehörigen C_T -Werten für β -Actin) kann der relative Expressionsunterschied für das entsprechende Gen, ausgedrückt in der sog. Ratio berechnet werden (145). Die Ratio,

dargelegt für die Hochregulation des interessierenden Gens (GI, 'gene of interest') der Versuchsgruppe im Vergleich zum GI der Kontrollgruppe, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Ratio}_{(\text{Hochregulation})} = 2^{-[(C_{T(1)} - C_{T(V1)}) - (C_{T(2)} - C_{T(V2)})]}$$

$C_{T(1)}$: C_T -Wert des GI, Versuchsgruppe

$C_{T(V1)}$: C_T -Wert β -Actin bezogen auf das GI der Versuchsgruppe

$C_{T(2)}$: C_T -Wert des GI, Kontrollgruppe

$C_{T(V2)}$: C_T -Wert β -Actin bezogen auf das GI der Kontrollgruppe

Die Ratio, berechnet für die Runterregulation des GI der Versuchsgruppe im Vergleich zum GI der Kontrollgruppe wird berechnet durch:

$$\text{Ratio}_{(\text{Runterregulation})} = 2^{-[(C_{T(2)} - C_{T(V2)}) - (C_{T(1)} - C_{T(V1)})]}$$

2.2.6.5 RNS-Präparation

Die bei -80°C gelagerten Proben (siehe 2.2.3.3) wurden auf Eis aufgetaut und mit je 2ml TRIzol® resuspendiert. Die Proben wurden zur Phasentrennung mit je 400 μl Chloroform versetzt und mit 14.000 U/min für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nur die obere, wässrige Phase wurde zur weiteren Verarbeitung in ein neues 2ml Eppendorf-Gefäß gegeben, wobei genau darauf geachtet wurde, dass keine Bestandteile der anderen Phase (DNS, Phenol-Reste, etc.) mit aufgenommen wurden. Die Proben wurden anschließend mit je 1ml Isopropanol zum Ausfällen versehen, vorsichtig 10mal gegen den Deckel zum Mischen invertiert, bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen gelassen und anschließend mit 14.000 U/min für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten mit 14.000 U/min zentrifugiert. Die Proben wurden erneut abgekippt, wobei nun das Pellet sichtbar wurde. Nachdem die Proben bei Raumluft getrocknet waren (ca. 5 Minuten) wurde das jeweilige Pellet mit 20 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Probenkonzentration und die Probenreinheit wurden spektralphotometrisch gemessen, die Proben anschließend wieder bei -80°C eingefroren oder unmittelbar weiterverarbeitet.

Prinzip der spektralphotometrischen Messung:

Die spektralphotometrische Probenmessung wurde in einer Verdünnung von 1:50 vorgenommen, wobei 2µl der Probe mit 98µl Diluent (Tris/HCL 10mM) vermischt wurden. Nukleinsäuren haben bei einer Wellenlänge von 260nm ihr Absorptionsmaximum, während z.B. Proteine ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm haben. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde gemessen, wobei eine Extinktion von 1 bei 260nm Wellenlänge einer Konzentration von *40 µg einzelsträngiger Nukleinsäuren/ml Probe* entsprach. Verunreinigungen der Probe kamen generell betrachtet durch die Reagenzien und durch Zellproteine zustande. Das Maß für die Reinheit der Probe ergab sich aus dem Verhältnis der $\text{Extinktion}_{260\text{nm Wellenlänge}}/\text{Extinktion}_{280\text{nm Wellenlänge}}$, wobei ausschließlich Proben mit einem Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 als rein betrachtet wurden. Sämtliche Proben, die nicht diese Reinheit erreichten wurden verworfen.

2.2.6.6 Reverse-Transkriptase Reaktion

Nach der RNS-Präparation der Proben (siehe 2.2.6.1) erfolgte die Erstellung der einsträngigen cDNS aus der mRNA mit der Methode der Reversen-Transkriptase-Reaktion. Die Proben, die während der Arbeitsschritte auf Eis kühl stehen, wurden mit RNase-freiem H₂O auf eine Konzentration von 1µg Nukleinsäure/10µl H₂O verdünnt und je 30µl einer Probe in ein für den PCR-Cycler geeignetes 0,5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Denaturierung der Nukleinsäuren erfolgte der erste Inkubationsschritt im PCR-Cycler für 5 Minuten bei 65°C. Die Proben wurden anschließend wieder auf Eis gestellt und mit jeweils 30µl Mastermix für die reverse Transkription (siehe unten) vermischt. Die Proben wurden nun im PCR-Cycler für 1 Stunde bei 37°C zur Synthese sowie sofort anschließend für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden wieder auf Eis abgekühlt und in der folgenden Taqman-RT-PCR verarbeitet.

Mastermix Reverse Transkription (Volumenangabe für ein Ausgangsvolumen von 30µl Probensuspension mit 3µg Nukleinsäure):

- 12µl 5xPuffer (5x *First Strand Buffer*)
- 3µl *RNS-Guard* (RNasin® RNase-Inhibitor)
- 3µl dNTPs
- 3µl pd(N₆)Primer (Random Hexamers 50µM 5nmoles)
- 6µl DTT (0,1M DTT)
- 3µl reverse Transkriptase (*M-MLV Reverse Transcriptase*)

2.2.6.7 Durchführung der Taqman-PCR

Die verschiedenen Primer für die Taqman-PCR sind in 2.1.2 aufgeführt und wurden mit Unterstützung des Computerprogrammes Primer 3® (Whitehead Institute Biomedical Research) errechnet. Für die Auswahl der Primer waren folgende Parameter entscheidend:

- Länge der Primer liegt zwischen 20 und 30 Basenpaaren;
- Schmelztemperatur und die damit zusammenhängende Annealing-Temperatur sind für beide Primer möglichst identisch;
- Die berechnete Annealingtemperatur $[(T_A = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 2) (125)]$ mit T_A : Annealingtemperatur, G: Guanosin, C: Cytosin, A: Adenin, T: Thyminidyl sollte unterhalb der optimalen Synthesetemperatur der DNS liegen (72°C);
- Die zu generierenden DNS-Abschnitte sind maximal 700 Basenpaare lang;

Die PCR wurde im Taqman®-PCR-Gerät (ABI Prism® 7000 Detection System) durchgeführt. Die Proben wurden in 96-Well Platten pipettiert, wobei alle zu bestimmenden Proben jeweils in doppelten Ansätzen gemessen wurden. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2,5µl	Probe
2,5µl	10xTaqman buffer
1,75µl	MgCl ₂ (50mM)
1µl	dNTP Mix (5mM)
0,75µl	diluted SYBR Green
0,125µl	Hot Gold Star (DNS-Polymerase)
2,5µl	Primer Forward (10mM)
2,5µl	Primer Reverse (10mM)
12,5µl	H ₂ O

Folgende Temperatur-Schritte zur Durchführung der PCR wurden im ABI PRISM™ 7000 zur automatischen Abfolge programmiert:

1. 50°C für 2 Minuten (RealTime-Reaktion, einmalig);
2. 95°C für 10 Minuten (für die Aktivierung der *hotstart*-Polymerase, einmalig);
3. 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) gefolgt von 60 Sekunden bei 60°C (Annealing und Elongation); 40 Zyklen;

Die in der Durchführung genannten Schritte (2.2.6.5-2.2.6.7) wurden für jeden Erntetag in voneinander getrennten Versuchsansätzen doppelt durchgeführt. Aus dem Mittelwert wurde dann die Berechnung des Genexpressionsniveaus durchgeführt (2.2.6.4).

2.2.7 Biochemische Methoden: Zytokinarray

2.2.7.1 Prinzip der Proteinaufbereitung und Bestimmung

Zur Messung der relativen Zytokinexpression wurde der Zytokinarray 'Proteome Profiler™, Mouse Cytokine Array Panel A' (R&D Systems) verwendet. Der Array besteht aus einer Nitrozellulose-Membran, in welcher Fangantikörper (sog. *capture antibodies*), die die jeweiligen Zytokin-Antikörper-Komplexe spezifisch binden, aufgebracht sind. Die zu untersuchenden Proben wurden in verschiedenen Schritten verdünnt und mit einem Mix aus biotinylierten Detektier-Antikörpern (sog. *detection antibodies*) inkubiert. Folgend wurden die Zytokin-Detektier-Antikörper-Komplexe mit den spezifischen Fangantikörpern auf der Arraymembran spezifisch für das jeweilige Zytokin gebunden. Nach einem Waschschrift zur Entfernung nicht gebundenen Materials wurden Streptavidin-HRP (HRP: *Horseradish peroxidase*) und chemoluminiszierendes Detektionsreagenz aufgegeben, so dass auf jedem Zytokinspot Licht, proportional zur Menge gebundenen Zytokins, produziert wurde.

2.2.7.2 Durchführung

Die Proben wurden nach der Ernte (siehe 2.2.3.3) kurz in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bis zur Aufbereitung bei -80°C eingefroren. Zur Proteinbestimmung aus den Proben wurden 500µl *Array Buffer 4*, 980µl *Array Buffer 5* und 15µl des Antikörper-Cocktails (*Antibody Detection Cocktail*) den Proben zugegeben und das Gemisch eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden jeweils 2ml *Array Buffer 6* und jeweils eine Arraymembran in je ein Well der 4-Well-Platten (*4-Well Rectangular Multi-dish*) gegeben und eine Stunde auf einer Rocky-Mixerplatte inkubiert. Anschließend wurde der Puffer von den Wells abgesaugt, der Proben-Antikörper-Mix auf die Arraymembran aufgegeben und das Ganze auf einer Rocky-Mixerplatte über eine Nacht im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Arraymembranen zunächst in je eine Petrischale mit 20ml Waschpuffer gegeben, 20 Minuten auf einer Rocky-Mixerplatte bei Raumtemperatur belassen und der Waschpuffer anschließend abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal hintereinander ausgeführt, wobei jeweils neue 4-Well-Platten verwendet wurden. In jedes Well wurde dann

1,5ml Streptavidin-HRP, welches zuvor 1:2000 mit *Array Buffer 5* verdünnt wurde, gegeben. Die Arraymembranen wurden nach dem Waschen abgetropft, seitlich auf Papier abgesaugt, in die Wells mit Streptavidin-HRP gegeben und für 30 Minuten auf einer Mixerplatte inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift wiederrum drei Mal durchgeführt. Die Arraymembranen wurden nun im Biorad Chemolumineszenz-Detektor gemessen.

2.2.8 Statistik

Für die Analyse der FACS-Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und zur statistischen Auswertung der nicht-parametrische Wilcoxon Rangsummentest (Mann-Whitney U-Test) zum Vergleich zweier voneinander unabhängiger Gruppen durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Für die PCR-Daten wurde der Mittelwert aus der berechneten Ratio der einzelnen Versuche, welche wiederrum in 2-3 Einzelmessungen bestimmt wurden, gebildet (siehe 2.2.6.4). Die Ratio ist ein Maß für den relativen Genexpressionsunterschied zweier Gruppen, wobei die Berechnung auf der ΔC_T -Kalkulationsmethode (144, 145) basiert. Für die statistische Auswertung wurde der nicht-parametrische Wilcoxon Rangsummentest verwendet, wobei die ΔC_T -Werte aus den einzelnen Messreihen für die beiden voneinander unabhängigen Gruppen verglichen wurden (145). P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Es erfolgte zudem die Berechnung der Standardabweichung der Ratio. Die Berechnungen erfolgten mit SPSS 20 (IBM SPSS Statistics, New York, USA), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Regulation hämatopoetischer Gene unter G-CSF-Stimulation

Für die hämatopoetische Entwicklung und Funktion von Stammzellen sind zahlreiche entscheidende Gene identifiziert, die auf Proliferation, Differenzierung, Selbsterneuerung und Regeneration von Stammzellen Einfluss nehmen [siehe 1.5 und Tabellen I und II (Anhang)]. Um einen Einfluss des zu untersuchenden G-CSF auf Gene der Hämatopoese und Stammzellentwicklung festzustellen, stellt die quantitative Genexpressionsanalyse anhand einer RT-PCR (vgl. 2.2.6) eine geeignete und sensitive Methode dar. Wie in Abschnitt 2.2.6.4 beschrieben, werden die Ergebnisse der RT-PCR in einer Ratio angegeben, wobei die Ratio ein Maß für das Verhältnis der Genexpression zweier verschiedener Versuchsansätze ist, in unserem Fall das Verhältnis der Genregulation der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe (Ratio der Hochregulation) bzw. das Verhältnis von Kontrollgruppe zu Versuchsgruppe (Ratio der Runterregulation). Für die Zusammenfassung und graphische Darstellung der gemessenen Genregulation wurde eine Zuordnung der Ratio eines Gens (Mittelwert) zu einer definierten Maßzahl für die Hoch- bzw. Runterregulation vorgenommen (siehe Tabelle 1) (115).

Tabelle 1: Zuordnung der aus der Real Time-PCR berechneten Ratio (siehe 2.2.6.4) eines Gens zu einer definierten Maßzahl für das Verhältnis der Genregulation von G-CSF-stimulierter Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe:

Ratio des betreffenden Gens	zugeordnete Maßzahl
<i>Hochregulation:</i>	
2,0-3,5	1
3,51-5,0	2
≥5,01	3
<i>Runterregulation:</i>	
2,0-3,5	-1
3,51-5	-2
≥5,01	-3

3.2.1 Real Time-PCR des Gesamtpools der EBs

Folgend werden die Ergebnisse der RT-PCR, welche mit dem Gesamtpool der geernteten Zellen an den Tagen 3, 6 und 6+5 angefertigt wurden, dargestellt (vgl. 2.2.6). Für die einzelnen Gene wurde der Mittelwert der Ratio aus den einzelnen Versuchen mit Standardabweichung berechnet und der entsprechenden Maßzahl (siehe Tabelle 1) zugeordnet. Sämtliche Ergebnisse mit Ratio der einzelnen Gene über die Messtage, Mittelwerten, Standardabweichungen und P-Werten (vgl. 2.2.8) sind in Tabelle III (7.3.1, Anhang) aufgeführt.

3.2.1.1 Verlauf der Regulation über 3 Messtage

Die Abbildungen 8-10 zeigen eine Zusammenfassung der Genregulation aus vier jeweils voneinander unabhängigen Versuchen für Tag 3 (Abb. 8), Tag 6 (Abb. 9) und Tag 6+5 (Abb. 10) der EB-Entwicklung für den Gesamtpool der geernteten Zellen, dargestellt anhand der Maßzahlen der Hoch- und Runterregulation (Tabelle 1).

An Tag 3 der EB-Entwicklung lässt sich in der G-CSF-stimulierten Gruppe eine Hochregulation verschiedener Gene und Transkriptionsfaktoren der hämatopoetischen und endothelialen Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen, darunter Flk1, Pu.1, HoxB4, Gata2, TAL1 oder PECAM. Beachtenswerter Weise ist das Gen Cyclin D1, welches in Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation steht, an Tag 3, wie an den anderen Messtagen, nicht in der Regulation zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe messbar verschieden. Betreffend der gemessenen Regulationsunterschiede von Genen der hämatopoetischen Entwicklung im Vergleich zu Genen, die der endothelialen und angiopoetischen Entwicklung attribuiert werden (z.B. PECAM, EGR1, ERG), lässt sich ein stärkerer Effekt von G-CSF auf die erst genannten Gene feststellen.

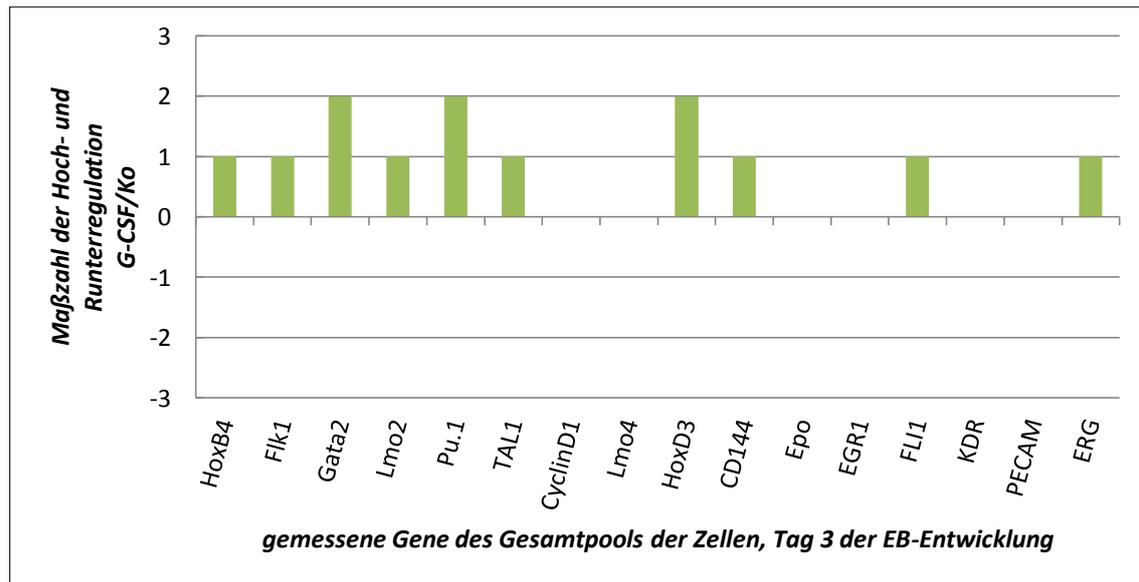


Abb. 8: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 3 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für die G-CSF-stimulierte Gruppe zur Kontrollgruppe (n=4). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Es ist eine stärkere Expression von Genen der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung wie u.a. HoxB4, Flk1, Pu.1 und Gata2 zu beobachten. Es zeigen sich kein Unterschied in der Regulation des Zellzyklusgens CyclinD1 sowie ein uneinheitliches Bild bei Genen der Endothelzellentwicklung und Angiogenese (EGR1, KDR, PECAM, ERG).

Die nächsten Messungen charakterisieren das Verhältnis der Genregulation zwischen G-CSF-stimulierter Versuchs- und Kontrollgruppe an Tag 6 der EB-Entwicklung (Abb. 9). Interessanterweise sind zu diesem Entwicklungs- bzw. Messzeitpunkt bis auf ein Gen (KDR) keine Unterschiede in der Genregulation zwischen G-CSF-stimulierter Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe sichtbar, die sich in einer geänderten Maßzahl für Hoch- oder Runterregulation niedergeschlagen haben.

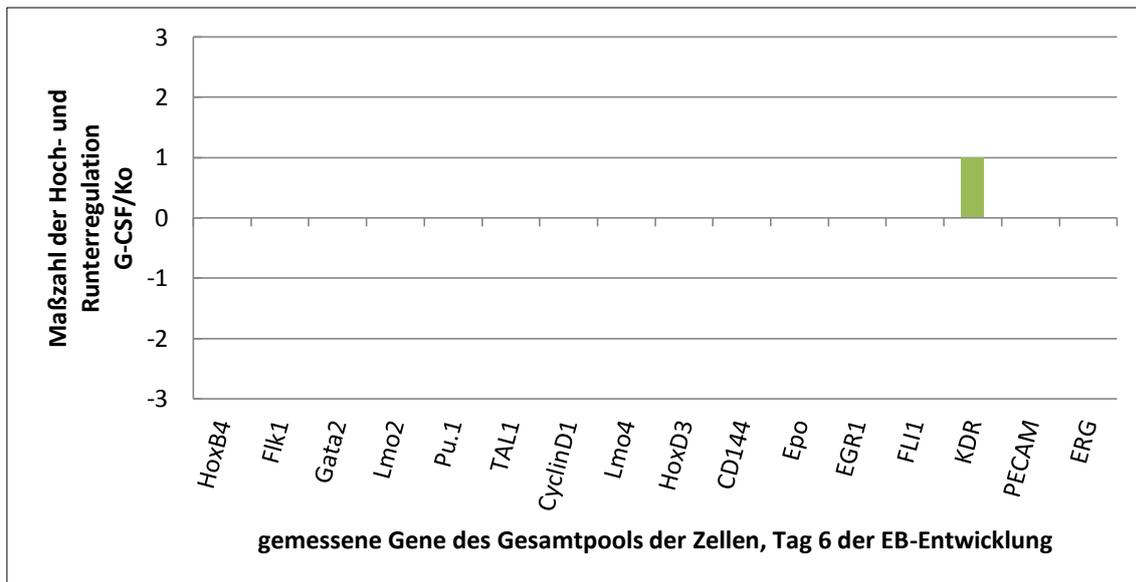


Abb. 9: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 6 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für die G-CSF-stimulierte Gruppe zur Kontrollgruppe (n=4). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Die an Tag 3 beobachtete stärkere Expression von Genen der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung wie u.a. HoxB4, Flk1, Pu.1 und Gata2 (vgl. Abb. 8) ist an Tag 6 nicht zu beobachten. Es zeigen sich weiterhin kein Unterschied in der Regulation des Zellzyklusgens CyclinD1 sowie mit der Ausnahme KDR auch keine Regulationsunterschiede für Gene der Angiopoese und Endothelzellentwicklung (FLI1, PECAM, etc).

An Tag 6+5 der EB-Entwicklung zeigt sich ein vergleichbares Bild zu Tag 6 der EB-Entwicklung. Während mit HoxB4 und Pu.1 zwei Gene der Hämatopoese und Stammzellentwicklung in der G-CSF-stimulierten Gruppe relativ niedriger exprimiert sind, zeigen sich für die weiter untersuchten Gene keine Regulationsunterschiede, die sich in einer geänderten Maßzahl der Hoch- oder Runterregulation niedergeschlagen haben (Abb. 10).

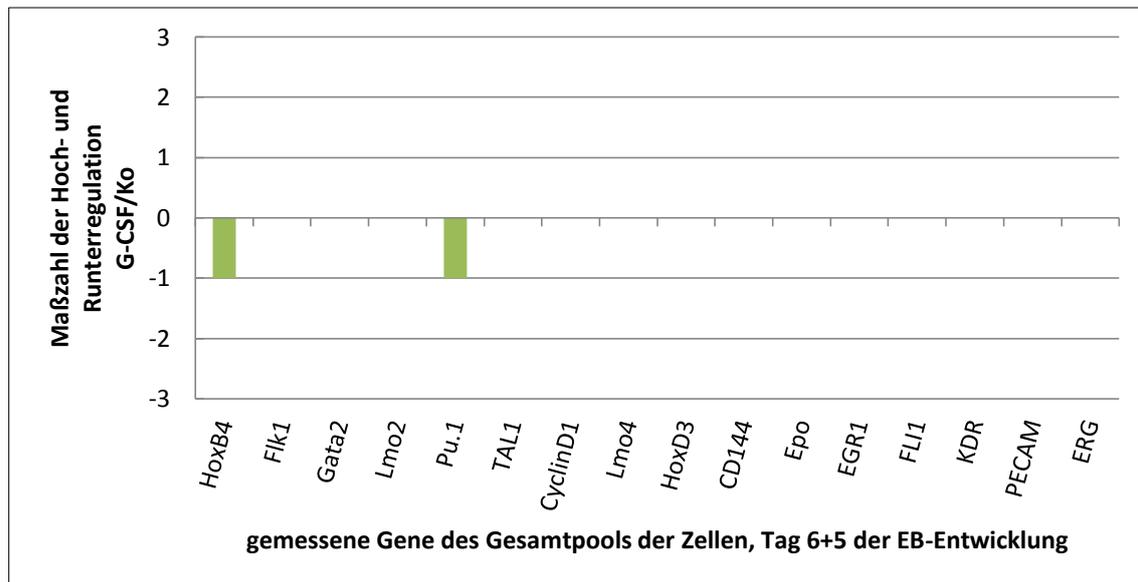


Abb. 10: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 6+5 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für die G-CSF-stimulierte Gruppe zur Kontrollgruppe (n=4). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Es ist eine relative Runterregulation der Gene HoxB4 und Pu.1 in der G-CSF-stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Weiter zeigen sich wie an Tag 6 der Entwicklung (Abb. 9) keine weiteren Regulationsunterschiede in der relativen Genexpression zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

3.2.1.2 Expressionsverlauf einzelner Gene

Zur Veranschaulichung der relativen sequentiellen Regulationsentwicklung der Gene im Vergleich von Stimulations- und Kontrollgruppe über die drei Messtage hinweg, werden in Abb. 11 die Werte der Ratio aus den vier voneinander unabhängigen Versuchen über die drei Messzeitpunkte für einige interessierende Gene aufgetragen. Zu beachten ist, dass die halblogarithmische Auftragung zu einer graphischen „Stauchung“ der Ergebnisse führt.

Für bestimmte untersuchte Gene der Stammzellendifferenzierung -und entwicklung wie Flk1, Pu.1 und HoxB4 (Abb. 11A) zeigt sich in der Mehrzahl der Versuche eine Hochregulation an Tag 3 und eine tendenzielle Runterregulation an Tag 6+5. Dieser Regulationsverlauf ist auch bei den Verläufen der vier Einzelmessungen bei den genannten Genen sichtbar. Andere untersuchte Gene wie Cyclin D1 (Gen der Zellzyklusregulation), Lmo4 oder ERG (angiopoetische Entwicklung) zeigen zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe an den verschiedenen Erntetagen auch innerhalb der einzelnen Versuche keine Unterschiede in der Genregulation (Abb. 11B).

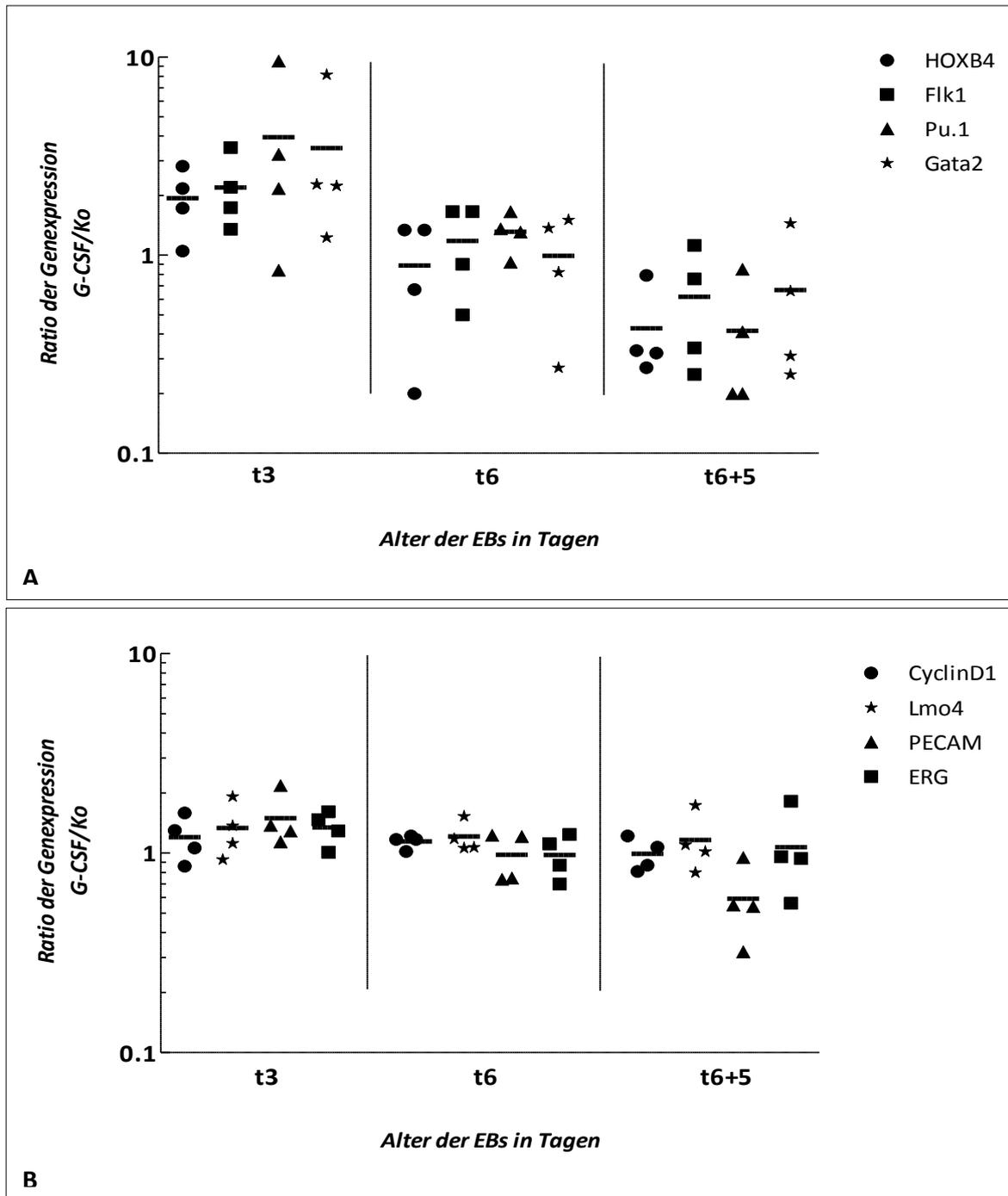


Abb. 11: Die in den Abb. 8-10 gezeigte Zusammenfassung der Genregulation in den EBs ist hier für verschiedene Gene in die Einzelexperimente und in den zeitlichen Verlauf der Erntezeitpunkte (Tag 3, 6, 6+5) für die Ratio der Genregulation (vgl. 2.2.6.4) aufgeschlüsselt. Aufgetragen ist das Alter der EBs zu den Erntezeitpunkten gegen die Ratio der Versuchs- zur Kontrollgruppe für die jeweiligen Gene (n=4) mit den Mittelwerten (Querstriche). HoxB4, Flk1, Pu.1 und Gata2 sind Gene der hämatopoetischen Entwicklung und Stammzellendifferenzierung und zeigen an Tag 3 eine erhöhte relative Expression in der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe (Abb. 11A). An Tag 6 der Entwicklung lässt sich kein signifikanter Regulationsunterschied feststellen, während an Tag 6+5 eine relative Runterregulation von HoxB4 und Pu.1 in der Versuchsgruppe beobachtet wird. Abb. 11B zeigt mit CyclinD1 (Funktion in der Zellzyklusregulation), Lmo4 (u.a. neuronale Entwicklung), PECAM und ERG (Angiopoese und Endothelzellentwicklung) Gene, für die an den drei Messtagen kein relevanter Regulationsunterschied unter dem Einfluss von G-CSF zu beobachten ist.

Ihre Regulation scheint durch die Gabe von G-CSF in der Zellkultur also weder direkt noch indirekt beeinflusst zu werden.

Einige Gene, wie hier für PECAM (CD31, Endothelzellmarker in der frühen EB-Entwicklung) dargestellt, zeigen eine ähnliche Tendenz wie die in Abb. 11A diskutierten Gene Flk1, Pu.1 oder HoxB4, nämlich eine mäßige, relative Hochregulation unter Einfluss von G-CSF an Tag 3 und eine relativ niedrigere Expression an Tag 6 und Tag 6+5. Der Effekt hat sich aber nicht in einer geänderten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation des Gens niedergeschlagen (vgl. Abb. 8-10).

3.2.2 RT-PCR mit Auftrennung der Zellen durch MACS *Micro-Beads*

Für die weitergehende Untersuchung und Analyse der gemessenen Regulationsunterschiede hämatopoetischer Gene in der RT-PCR aus dem gesamten Pool an Zellen an Tag 3 der EB-Entwicklung (Abb. 8, 11A), wurde vor den RT-PCR-Messungen eine Auftrennung der an Tag 3 geernteten Zellen nach dem Stammzellmarker Sca1 mit dem MACS-Verfahren durchgeführt (vgl. 2.2.4). Je 200 Petrischalen mit G-CSF und ohne G-CSF-Supplementierung wurden kultiviert und an Tag 3 der EB-Entwicklung geerntet (siehe 2.2.3.3). Anschließend erfolgte eine Auftrennung mit MACS *Micro-Beads* nach dem Sca1-Oberflächenprotein (siehe 2.2.4). Es resultierten vier Fraktionen, wobei im Weiteren die Sca1-positiven Zellfraktionen als *Positivfraktionen* bezeichnet werden und die restlichen, nicht Sca1-positiven Zellfraktionen, als *Negativfraktionen* bezeichnet werden. Die vier Fraktionen in der Übersicht sind:

- Positivfraktion, G-CSF-stimulierte Versuchsgruppe
- Positivfraktion, Kontrollgruppe
- Negativfraktion, G-CSF-stimulierte Versuchsgruppe
- Negativfraktion, Kontrollgruppe

Die vier an Tag 3 geernteten Untergruppen wurden jeweils einer RT-PCR unterzogen und die Ratio und die zugeordneten Maßzahlen der Hoch- und Runterregulation analog den PCR-Messungen des Gesamtpools an Zellen berechnet (vgl. 3.2.1). Das Verhältnis der Genregulation mit der Darstellung der zugeordneten Maßzahlen (siehe Tabelle 1) für die Ratio der vier verschiedenen Untergruppen im Vergleich wird in den Abb. 12-15 gezeigt.

Entscheidender Teil der Betrachtung der Subgruppen ist der Vergleich der beiden Sca1-Stammzell-purifizierten Gruppen von G-CSF-stimulierter Gruppe und Kontrollgruppe (Abb.12). Für die genetische Regulation der Sca1-Positivfraktion der G-CSF-stimulierten Gruppe im Vergleich zur Sca1-Positivfraktion der Vergleichsgruppe zeigt sich ein Bild, welches die Messungen im Gesamtpool der Zellen (Abb. 8) widerspiegelt. Während kein Unterschied in der Genregulation bei dem Zellzyklusgen Cyclin D1 beobachtet wird, werden Gene der endothelialen Entwicklung und Angiogenese wie PECAM, ERG und EGR1 und andere Gene wie Lmo4 oder Epo ebenfalls wenig oder nicht durch die G-CSF-Stimulation beeinflusst. Bei den untersuchten Genen der Stammzellentwicklung – und differenzierung wie HoxB4, Pu.1, Flk1 oder TAL1 (vgl. Abb. 4) zeigen die Messungen eine deutlich stärkere Genexpression in der G-CSF-stimulierten Gruppe (Abb. 12). Beachtenswerter Weise findet sich kein Unterschied in der genetischen Regulation zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe für die Sca1-positiven Zellen für das Gen Gata2 und nur ein geringer Unterschied für Lmo2 (Abb. 12).

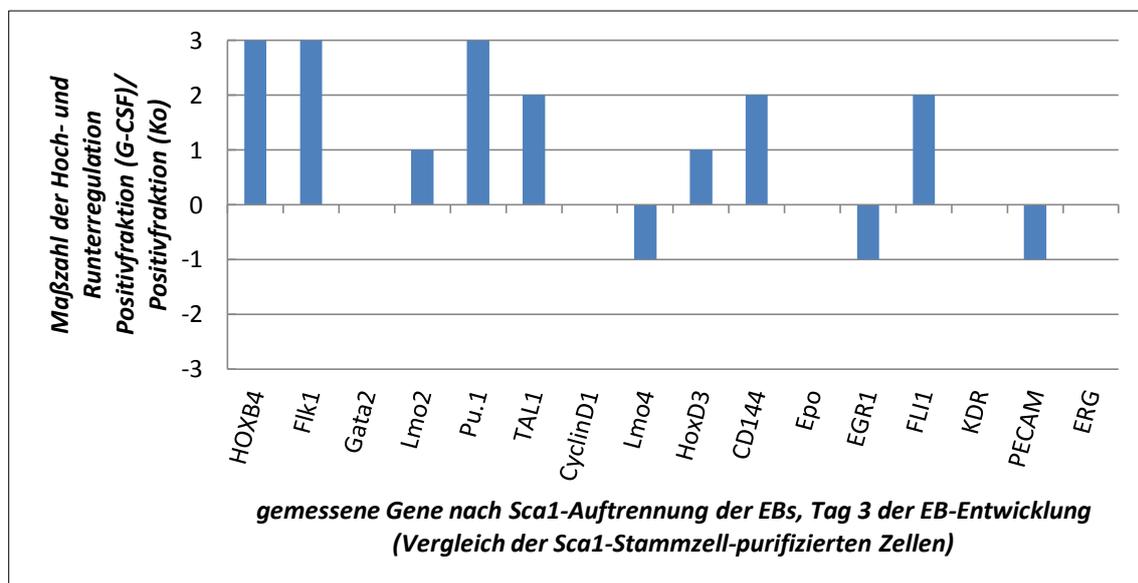


Abb. 12: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 3 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für G-CSF-stimulierte Gruppe zur Kontrollgruppe für den Pool an Sca1-positiven Zellen nach Auftrennung mit MACS *Micro-Beads* (vgl. 2.2.4) (n=1). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Unter G-CSF Stimulation ist eine stärkere Expression von Genen der Stammzellentwicklung wie u.a. HoxB4, Flk1 und TAL1 zu beobachten. Hämatopoetische Gene wie Pu.1 und Lmo2 sind ebenfalls stärker exprimiert, nicht jedoch Gata2. Es zeigen sich kein Unterschied in der Regulation des Zellzyklusgens CyclinD1 sowie ein uneinheitliches Bild bei Genen der Endothelzellentwicklung und Angiogenese (EGR1, KDR, PECAM, ERG).

Abb. 13 zeigt das Verhältnis der Genregulation aus den Negativfraktionen zwischen G-CSF-stimulierter Gruppe und Kontrollgruppe. Während Cyclin D1 und Lmo4 wiederum keine oder nur geringe Unterschiede in der Genregulation aufweisen, zeigen die Messungen eine deutliche relative Runterregulation fast aller untersuchten Gene in der Negativfraktion der G-CSF-stimulierten Gruppe im Vergleich zur Negativfraktion der Kontrollgruppe an.

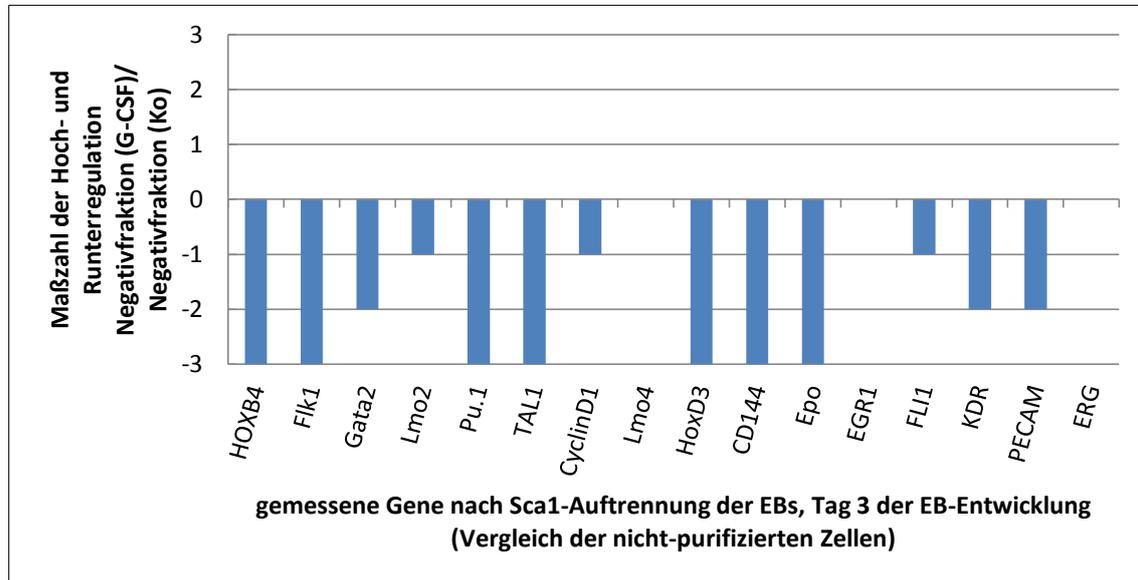


Abb. 13: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 3 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für G-CSF-stimulierte Gruppe zur Kontrollgruppe für den Pool an Sca1-negativen Zellen nach Auftrennung mit MACS *Micro-Beads* (vgl. 2.2.4) (n=1). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Unter G-CSF Stimulation ist eine verminderte relative Expression fast aller untersuchten Gene in dem Pool an Sca1-negativen Zellen zu beobachten.

Im Vergleich der Positiv- und Negativfraktionen der G-CSF-stimulierten Gruppe (Abb. 14) zeigt sich zunächst, dass in der Sca1-positiven Fraktion das Zellzyklusgen Cyclin D1 ebenfalls deutlich hochreguliert ist. Die Gene der Stammzellentwicklung –und differenzierung wie TAL1, Flk1, Gata2, Pu.1 und HoxB4 sind deutlich in der Stammzellfraktion hochreguliert. Für die Gene der endothelialen und angiopoetischen Entwicklung (PECAM, EGR1) lässt sich kein relativer Unterschied in der Genregulation zwischen den Gruppen feststellen.

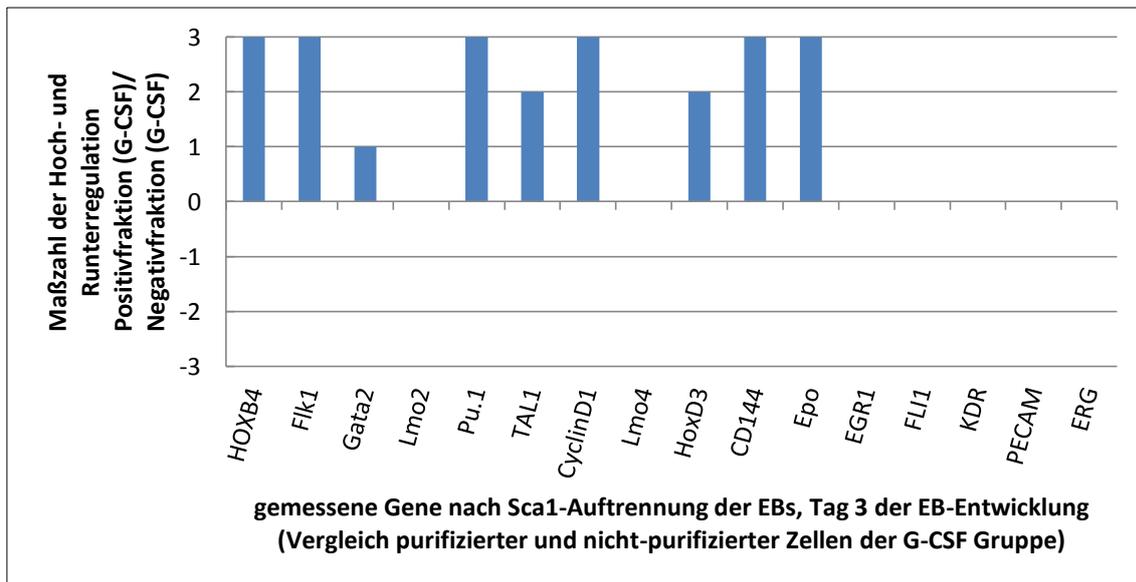


Abb. 14: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 3 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für die Sca1-Positivfraktion zur Sca1-Negativfraktion der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe nach Auftrennung mit MACS *Micro-Beads* (vgl. 2.2.4) (n=1). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Es zeigt sich im Vergleich von Sca1-positiver Zellfraktion zur negativen Fraktion, dass das Zellzyklusgen CyclinD1 relativ deutlich stärker exprimiert wird. Gene der Stammzellentwicklung und Hämatopoese wie u.a. HoxB4, Flk1, Gata2, Pu.1 und TAL1 sind ebenfalls deutlich stärker in der Positivfraktion exprimiert. Für Gene der Angiopoese und Endothelzellentwicklung (PECAM, KDR, ERG, EGR1) lässt sich kein Regulationsunterschied beobachten.

Im Vergleich der Positivfraktion zur Negativfraktion der Kontrollgruppe (Abb. 15) zeigt sich ein vergleichbares Bild wie bei der Betrachtung der Negativfraktionen aus stimulierter Versuchsgruppe und Vergleichsgruppe (Abb.13). Während, wie für die Stammzellebene erwartet, das Zellzyklusgen Cyclin D1 in der Sca1-Positivfraktion hochreguliert ist, wird für die meisten anderen Gene von Interesse eine Runterregulation in der Positivfraktion der Kontrollgruppe im Vergleich zur Negativfraktion beobachtet.

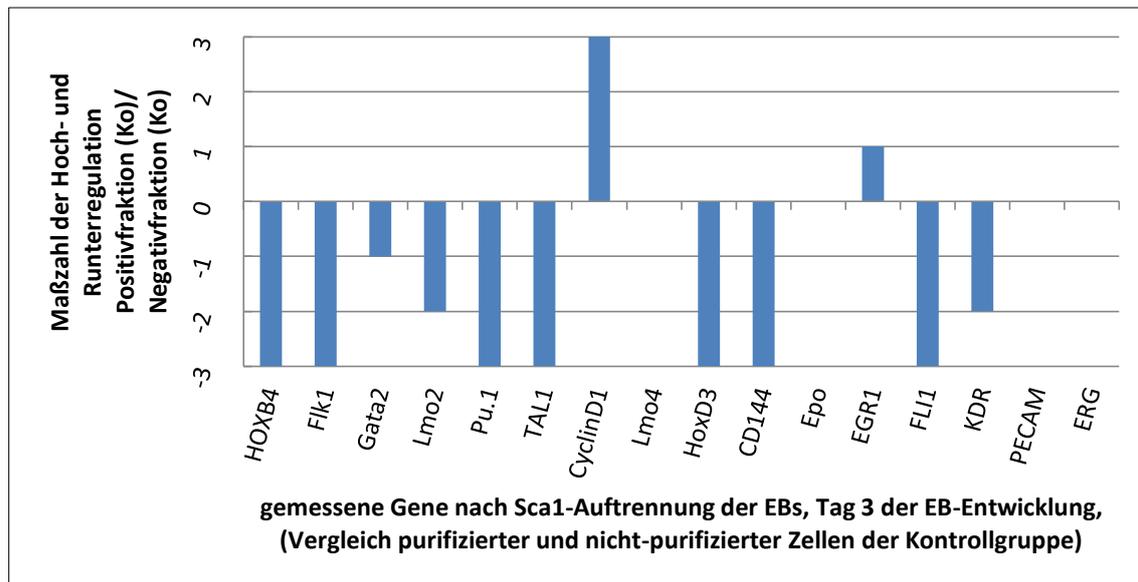


Abb. 15: Darstellung der relativen Expressionsunterschiede typischer Gene der Hämatopoese, der Angiogenese und des Zellzyklus an Tag 3 der EB-Entwicklung anhand der aus der RT-PCR bestimmten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation (siehe Tabelle 1), aufgetragen für die Sca1-Positivfraktion zur Sca1-Negativfraktion der nicht-stimulierten Kontrollgruppe nach Auftrennung mit MACS *Micro-Beads* (vgl. 2.2.4) ($n=1$). Werten der Ratio von 1 bis 3 kann eine Hochregulation des Gens in der G-CSF-stimulierten Gruppe zugeschrieben werden, Werten von -1 bis -3 eine Runterregulation. Es zeigt sich im Vergleich von Sca1-positiver Zellfraktion zur negativen Fraktion, dass das Zellzyklusgen *CyclinD1* relativ deutlich stärker exprimiert wird. Gene der Stammzellentwicklung und Hämatopoese wie u.a. *HoxB4*, *Flk1*, *Gata2*, *Pu.1* und *TAL1* zeigen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Versuchsgruppe (vgl. Abb. 13) eine deutliche relative Runterregulation. Für die untersuchten Gene der Angiopoese und Endothelzellentwicklung (*EGR1*, *KDR*, *PECAM*, *ERG*) zeigt sich ein gemischtes Bild von Hoch- und Runterregulation.

3.3 Ergebnisse der FACS-Messungen

3.3.1 FACS-Messungen ohne Auftrennung

Für die Entwicklung und Differenzierung von Stammzellen und hämatopoetischen Stammzellen sind einige Oberflächenmarker charakterisiert, die spezifische Indikatoren für den Entwicklungs- und Reifungsgrad darstellen und mit dem Status in der hierarchischen Zellentwicklungspyramide korreliert sind [siehe 1.5, Abb.3 und Tabelle I (Anhang)]. Mittels der FACS-Technologie kann der Anteil der Zellen mit einem bestimmten, markierten Oberflächenprotein mittels Bindung eines spezifischen Antikörpers bestimmt werden.

Für die Versuche kamen folgende Antikörper gegen Oberflächenproteine zum Einsatz:

- CD34 (Stammzellmarker, Marker der Angio- und Hämatopoese)
- CD90 (Stammzellmarker, Marker der Selbsterneuerungsfähigkeit)
- CD117 (früher Stammzellmarker)
- CD133 (Marker embryonaler und adulter Stammzellen)
- CD135 (Marker hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen verschiedener Entwicklungsstufen)
- CD13 (Marker der myeloischen Differenzierung)
- CD45 (Expression auf hämatopoetischen Progenitorzellen und Immunzellen)

In einem ersten Schritt wurden FACS-Messungen des Gesamtpools der geernteten Zellen durchgeführt (siehe 2.2.3.3 und 2.2.5). Für die jeweiligen, oben genannten Oberflächenmarker wurde der Anteil der positiven Zellen mit diesem Marker an der Gesamtzellzahl bestimmt. Durch die beiden mit den Antikörpern gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe PE und FITC (vgl. 2.2.5) konnten CD34 und CD90 sowie CD13 und CD45 jeweils simultan bestimmt werden, so dass hier auch eine Fraktion aus für jeweils beide Antikörper positiven Zellen bestimmt wurde. Im Verlauf der RT-PCR-Versuche und deren Auswertung (vgl. 3.2) zeigten sich zu den frühen Zeitpunkten Tag 3 und Tag 6 der EB-Entwicklung Regulationsunterschiede auf genetischer Ebene (Abb. 8, 9). Um einen möglichen Effekt der differentiellen Genregulation auf Proteinebene zu detektieren, wurden für diese frühen Zeitpunkte jeweils fünf voneinander unabhängige Versuche durchgeführt [Abb. 16,17; Tabelle V (Anhang)] sowie drei weitere für Tag 6+5 [Abb. 18; Tabelle V (Anhang)].

Die Ergebnisse zeigen an Tag 3 (siehe Abb. 16) bereits eine Detektion aller untersuchten Antikörper. Das Niveau der Antikörper CD34, CD90 und CD135 liegt dabei auf einem Niveau von bis zu 1% der gemessenen Zellen. Für CD45 und den myeloischen Marker CD13 liegt ein erwartet sehr geringes Expressionsniveau von 0,1- 0,3% vor, was für eine Abwesenheit differenzierterer hämatopoetischer Zellen, wie z.B. hämatopoetischer Progenitorzellen, spricht (Abb. 16, vgl. Abb. 3). Mit CD117 ist ein früher Stammzellmarker mit anteilig knapp 5% auf dem höchsten Niveau aller untersuchten Oberflächenmarker exprimiert. CD133 als Stammzellmarker verschiedener embryonaler und adulter Stammzellen zeigt ein jeweils anteiliges Expressionsniveau von ungefähr 4% am Pool der Zellen. Im Vergleich der G-CSF-stimulierten Zellen zu den Zellen der Kontrollgruppe zeigt

sich kein signifikanter Expressionsunterschied der untersuchten Marker. Die beiden am stärksten exprimierten Marker CD117 und CD133 sind bei beiden Gruppen auf dem gleichen Niveau exprimiert. Für die anderen Marker, deren absolute Expression im Gesamtpool der gemessenen Zellen nur sehr gering ist, lässt sich für diesen Messtag keine Aussage zu einem Expressionsunterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe treffen.

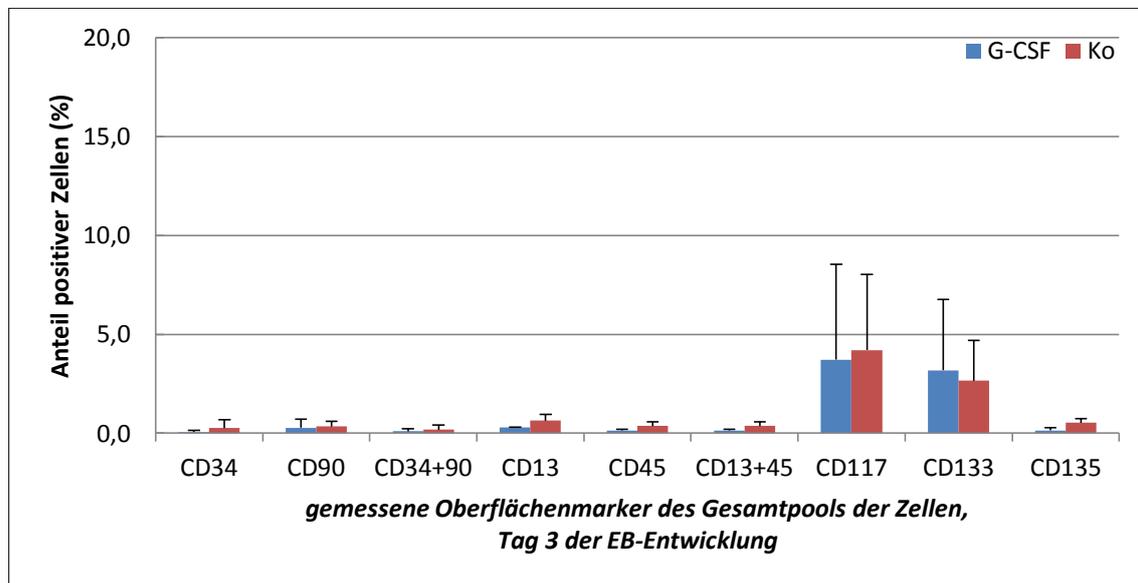


Abb. 16: Darstellung der Expression der gemessenen Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung. Aufgetragen sind die Mittelwerte des Anteils für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) aus den Messungen der einzelnen Antikörper an Tag 3 der EB-Entwicklung (n=5) mit Standardabweichungen. Zu dem frühen Entwicklungszeitpunkt sind die frühen Stammzellmarker CD117 und CD133 in einem relevanten Anteil von bis zu 5% positiver Zellen exprimiert. Die anderen Marker (früher) hämatopoetischer Entwicklung wie CD34, CD90 und CD135 sind auf einem Niveau bis 0,5% positiver Zellen nur gering ausgeprägt.

Die Messungen an Tag 6 der EB-Entwicklung zeigen (Abb. 17), dass der Anteil der für die verschiedenen Marker positiven Zellen, mit der Ausnahme von CD133, im Vergleich zu Tag 3 deutlich gestiegen ist. Die Stammzellmarker CD34 und CD90 sind nun auf einem Niveau von 1-2% positiver Zellen exprimiert, wobei hier in den Versuchen die Tendenz festzustellen ist, dass der Anteil der CD34 positiven Zellen in der G-CSF-stimulierten Gruppe höher ist als in der Vergleichsgruppe. Für CD90 und CD45 zeigt sich eine Expression von ungefähr 0,5% positiver Zellen, wobei keine Tendenz zwischen den beiden Gruppen sichtbar ist. CD117 ist auch an Tag 6 der prozentual am stärksten exprimierte Marker, wobei tendenziell eine stärkere Expression in der G-CSF-stimulierten Gruppe vorhanden ist, die aber nicht signifikant ist. CD133 ist an diesem

Messtag weniger exprimiert als an Tag 3 und zeigt keine Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen. CD135 ist an Tag 6 deutlich stärker exprimiert als an Tag 3 und zeigt eine leichte, nicht signifikante Tendenz, in der Kontrollgruppe stärker exprimiert zu sein. Der myeloische und hämatopoetische Differenzierung anzeigende Marker CD13 ist an Tag 6 deutlich stärker exprimiert als an Tag 3 und ist ein Hinweis auf die stattfindende Entwicklung hämatopoetischer Vorläuferzellen in den EBs. Die Expression von CD13 ist in der G-CSF Gruppe stärker ausgeprägt, was dafür spricht, dass hämatopoetische Progenitorzellen der myeloischen Differenzierung schon zu diesem frühen Zeitpunkt in größerem Maße vorhanden sind, als ohne Stimulation mit G-CSF.

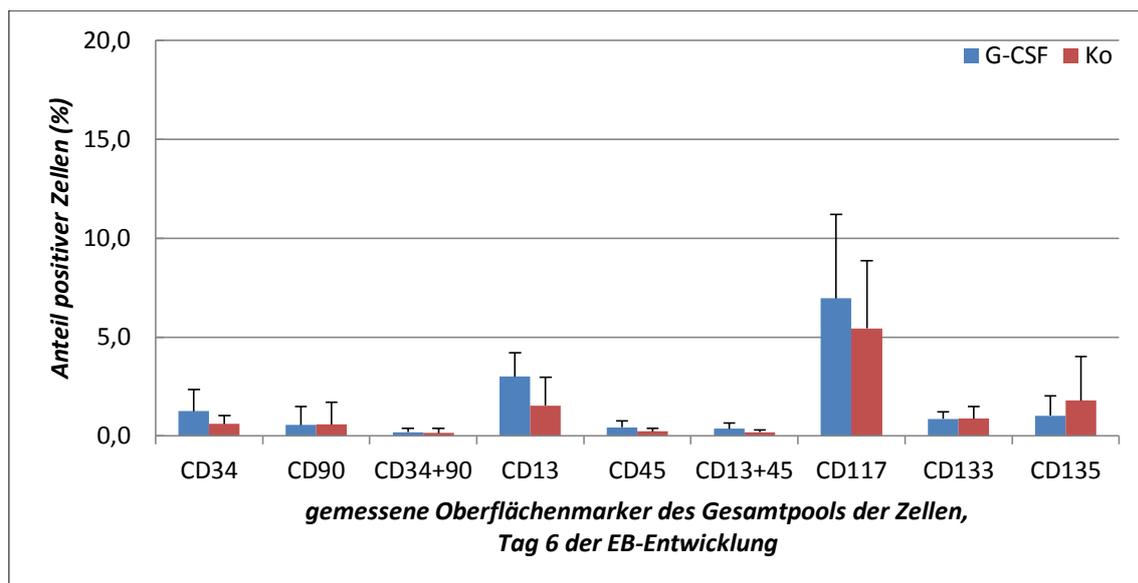


Abb. 17: Darstellung der Expression der gemessenen Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung. Aufgetragen sind die Mittelwerte des Anteils für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) aus den Messungen der einzelnen Antikörper an Tag 6 (n=5) mit Standardabweichungen. Im Vergleich zu Tag 3 (Abb. 16) findet eine anteilige Zunahme der Expression der untersuchten Marker mit der Ausnahme von CD133 statt. Die relevante Expression von CD13 von bis zu 4% positiver Zellen zeigt die beginnende Entwicklung hämatopoetischer Progenitor- und Effektorzellen in der Kultur an, wobei z.B. der hämatopoetische Marker CD45 weiterhin nur schwach exprimiert ist. Der Stammzellmarker CD117 ist wie an Tag 3 in beiden Gruppen am stärksten exprimiert.

An Tag 6+5 (Abb. 18) steigt der prozentuale Anteil aller untersuchten Marker im Vergleich zum Messpunkt Tag 6 erneut an. Für Marker von Stammzellen und hämatopoetischen Stammzellen wie CD34, CD90 und CD133 zeigt sich kein Unterschied im Niveau der Expression zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Wie erwartet, ist das Niveau des myeloischen Markers CD13 erneut deutlich im Vergleich zu Tag 6 gestiegen und ist neben CD117 der am stärksten exprimierte Marker. Auch CD45 ist erstmals in einem deutlichen Anteil an Zellen nachweisbar. Auffällig ist, dass gut über die Hälfte der

CD45 positiven Zellen gleichzeitig auch CD13 exprimieren (siehe CD13 und CD45, Abb. 18). CD135 ist an Tag 6+5 wie an Tag 6 und Tag 3 in der Kontrollgruppe leicht stärker exprimiert.

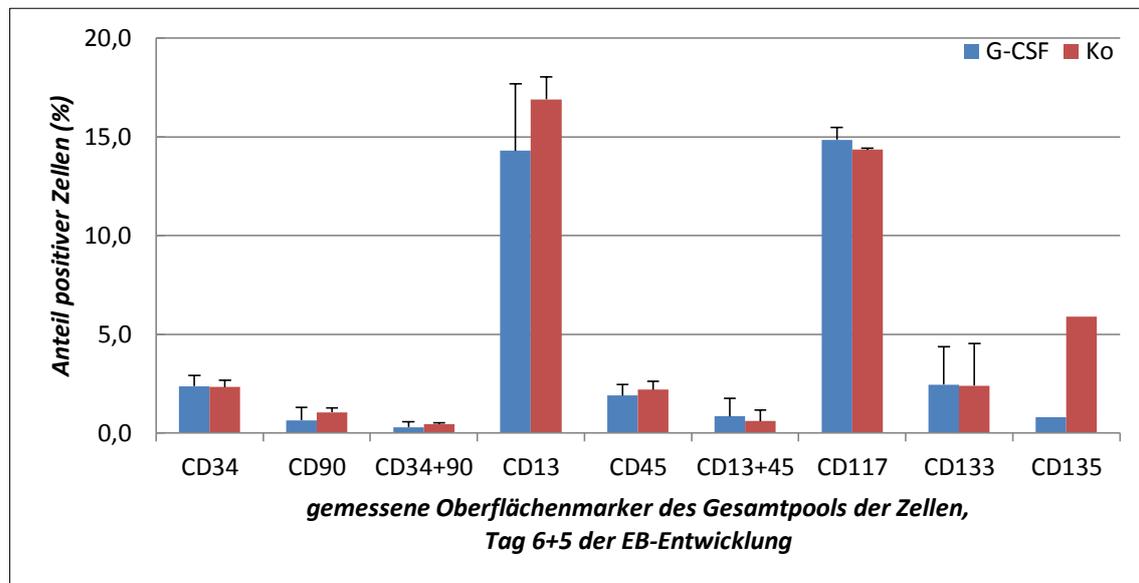


Abb. 18: Darstellung der Expression der gemessenen Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung. Aufgetragen sind die Mittelwerte des Anteils für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) aus den Messungen der einzelnen Antikörper an Tag 6+5 (n=3, für CD135: n=1) mit Standardabweichungen. Im Vergleich zu den Messtagen t3 und t6 (Abb. 16, 17) zeigt sich eine weitere, anteilige Zunahme aller untersuchten Marker. Der starke Anstieg des Markers CD13 zeigt die stattfindende hämatopoetische Entwicklung und Differenzierung in den EBs an. Auch der hämatopoetische Marker CD45 ist zu diesem Zeitpunkt erstmals relevant exprimiert.

3.3.2 FACS-Messungen nach Auftrennung durch MACS *Micro-Beads*

Für eine weitergehende Untersuchung und Analyse der Ergebnisse wurde analog den RT-PCR-Messungen (siehe 3.2.2) der Gesamtpool an geernteten Zellen (siehe 2.2.3.3) vor den FACS-Messungen einer Auftrennung nach dem Sca1-Oberflächenprotein mit MACS *Micro-Beads* an Magnetsäulen unterzogen (siehe 2.2.4). Es resultierten vier Fraktionen, wobei im weiteren die Sca1-positiven Zellfraktionen als *Positivfraktionen* bezeichnet werden und die restlichen, nicht Sca1-positiven Zellfraktionen, als *Negativfraktionen* bezeichnet werden. Die vier Fraktionen in der Übersicht sind:

- Positivfraktion, G-CSF-stimuliert
- Positivfraktion, Kontrollgruppe
- Negativfraktion, G-CSF-stimuliert

- Negativfraktion, Kontrollgruppe

Für die beiden voneinander unabhängigen Versuche wurden jeweils 2 x 200 Petrischalen für die G-CSF Gruppe und die Kontrollgruppe angesetzt und an Tag 3 der EB-Entwicklung geerntet (siehe 2.2.3.2 und 2.2.3.3). Für die Messungen standen für die Sca1-positiven Fraktionen absolute Zellzahlen (Zählung in Neubauer-Zählkammer) von ca. 150.000-250.000 Zellen zur Verfügung. Für die Messungen wurden daher die Antikörper-Zahl und damit die Anzahl der Ansätze auf je fünf pro Fraktion reduziert (Isotypenkontrolle, CD34+90, CD117, CD133, CD135).

Entscheidender Teil der Betrachtung der Subgruppen ist der Vergleich der beiden Sca1-Stammzell-purifizierten Gruppen von G-CSF-stimulierter Gruppe und Kontrollgruppe (Abb. 19). Der Vergleich der Sca1-positiven Fraktionen von G-CSF-stimulierter Fraktion und Kontrollfraktion zeigt zunächst, dass die betrachteten Oberflächenmarker CD34, CD90, CD117, CD133 und CD135 in beiden Gruppen auf einem höheren Niveau exprimiert sind, als im Gesamtpool der Zellen (vgl. Abb. 16). Für die G-CSF-stimulierte Gruppe zeigt sich ein vergleichsweise ähnliches Bild wie in der G-CSF-stimulierten Gruppe im Gesamtpool der Zellen. Der frühe Stammzellmarker CD117 ist auf dem höchsten Niveau exprimiert, während die anderen untersuchten Oberflächenproteine CD34, CD90, CD133 und CD135 auf einem Niveau von 2-4% am Pool der Sca1-positiven Zellen exprimiert sind. Hervorzuheben ist, dass der im Gesamtpool der Zellen an Tag 3 kaum nachweisbare Marker CD135 im Pool der Sca1-positiven Zellen in der G-CSF-stimulierten Gruppe deutlich nachweisbar exprimiert ist. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede zur G-CSF-stimulierten Gruppe, der Marker CD117 ist in der G-CSF-stimulierten Gruppe aber tendenziell in einer größeren Anzahl an Zellen exprimiert, als in der Kontrollgruppe.

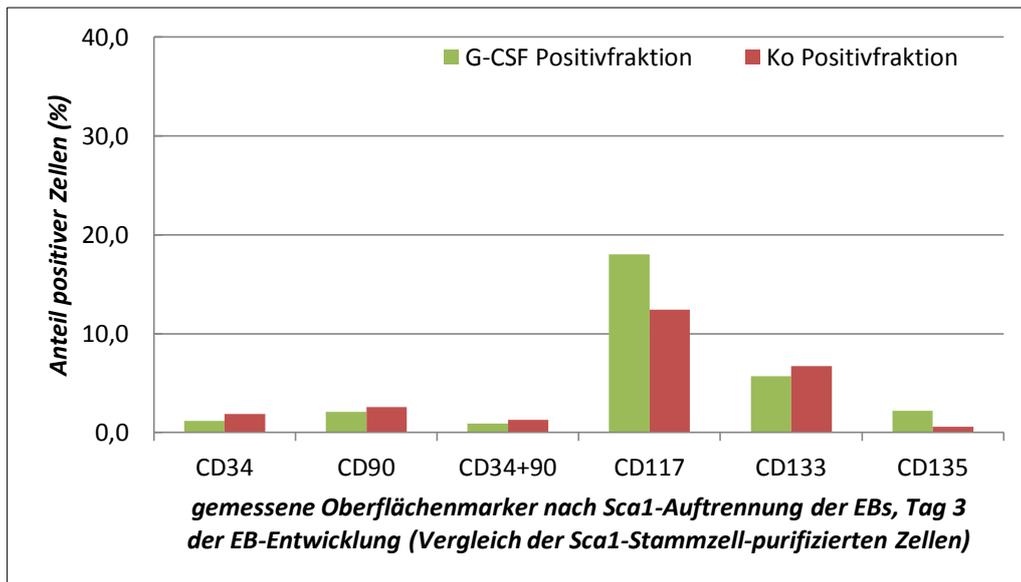


Abb. 19: Darstellung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung nach magnetischer Auftrennung der Zellen nach Sca1-Oberflächenprotein an Tag 3 der EB-Entwicklung. Aufgetragen ist der Anteil der für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) für die Sca1-positive Fraktion der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe und der Sca1-positiven Fraktion der Kontrollgruppe im Vergleich (n=1). Alle untersuchten Oberflächenmarker können zu dem frühen Entwicklungszeitpunkt nachgewiesen werden, wobei die frühen Stammzellmarker CD117 und CD133 am stärksten exprimiert sind. Unterschiede in der Expression lassen sich in der Tendenz in einem höheren Anteil CD117-positiver Zellen in der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe erkennen sowie für CD135.

Im Vergleich der beiden Negativfraktionen (Abb. 20) zeigt sich analog den Messungen aus dem Gesamtpool an Zellen (Abb. 19) die stärkste Expression der Marker CD117 und CD133 und eine nachweisbare, geringere Expression der anderen untersuchten Marker CD34, CD90 und CD135. Auffällig ist, dass auch die Sca1-negative Fraktion ein deutlich höheres Grundniveau an Markerexpression zeigt, als dies im Gesamtpool der Zellen zu beobachten war. Insgesamt ist für die Marker CD34 und CD133 eine höhere Expression in der Kontrollgruppe im Vergleich zur G-CSF-stimulierten Gruppe zu beobachten sowie in der Tendenz auch für den Marker CD117.

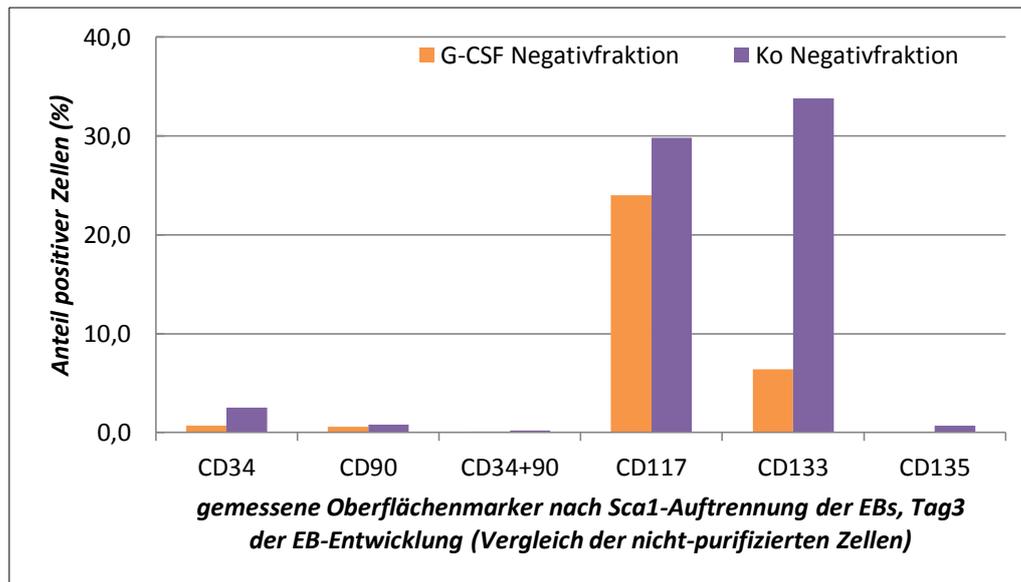


Abb. 20: Darstellung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung nach magnetischer Auftrennung der Zellen nach Sca1-Oberflächenprotein an Tag 3 der EB-Entwicklung. Aufgetragen ist der Anteil der für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) für die Sca1-negative Fraktion der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe und der Sca1-positiven Fraktion der Kontrollgruppe im Vergleich (n=1). Die frühen Stammzellmarker CD117 und CD133 sind in beiden Gruppen am stärksten ausgeprägt, wobei die Kontrollgruppe ein sehr hohes Maß an Expression beider Marker anzeigt. In der Versuchsgruppe ist CD117 ebenfalls auf einem hohen Niveau exprimiert, CD133 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einem deutlich niedrigeren Niveau. Die anderen untersuchten hämatopoetischen Marker wie CD34, CD90 und CD135 sind zu dem frühen Zeitpunkt auf einem niedrigen Niveau nachweisbar.

Im Vergleich der G-CSF-stimulierten Positivfraktion zur G-CSF-stimulierten Negativfraktion (Abb. 21) lässt sich erneut (vgl. Abb. 19) die stärkste Expression für die Marker CD117 und CD133 beobachten. Für diese beiden Marker zeigt sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Expression. Für die Expression der Marker CD34, CD90 und CD135, wie für die gleichzeitige Expression von CD34 und CD90, lässt sich eine leichte Tendenz absehen, dass diese Marker stärker auf Sca1-positiven Zellen als auf Sca-negativen Zellen exprimiert werden (vgl. auch Abb. 19).

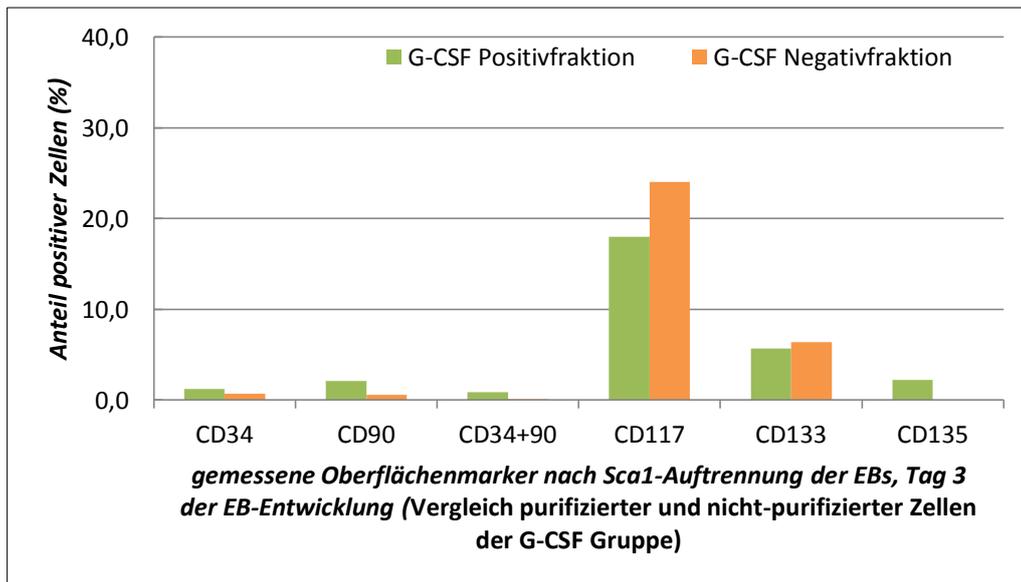


Abb. 21: Darstellung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung nach magnetischer Auftrennung der Zellen nach Sca1-Oberflächenprotein an Tag 3 der EB-Entwicklung. Aufgetragen ist der Anteil der für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) für die Sca1-positive Fraktion zur Sca1-negativen Fraktion der G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe im Vergleich (n=1). Die frühen Stammzellmarker CD117 und CD133 sind in beiden Gruppen wiederum am stärksten ausgeprägt, wobei die Negativfraktion ein tendenziell höheres Expressionsniveau für CD117 zeigt. Für die frühen Marker hämatopoetischer Differenzierung (CD34, CD90, CD135) lässt sich eine Expression auf niedrigem Niveau feststellen, die in der Sca1-Positivfraktion im Vergleich stärker ausgeprägt ist.

Im Vergleich der Positivfraktion zur Negativfraktion der Kontrollgruppe (Abb. 22) zeigt sich wie für die G-CSF-stimulierte Gruppe (Abb. 21), dass die frühen Stammzellmarker CD117 und CD133 am stärksten exprimiert sind. Hier zeigt sich eine stärkere Expression für beide Marker in der Negativfraktion. CD90 und die CD34-CD90 Koexpression sind wie in der G-CSF Versuchsgruppe stärker in der Sca1-positiven Fraktion exprimiert.

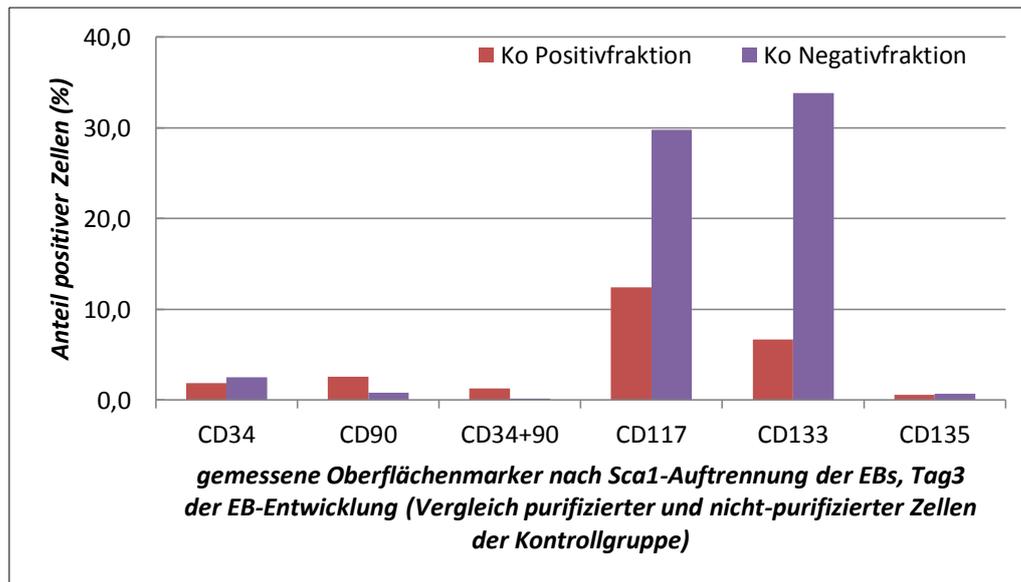


Abb. 22: Darstellung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker der hämatopoetischen Differenzierung und Stammzellentwicklung nach magnetischer Auftrennung der Zellen nach Sca1-Oberflächenprotein an Tag 3 der EB-Entwicklung. Aufgetragen ist der Anteil der für den jeweiligen Antikörper positiver Zellen zur Gesamtzellzahl (in Prozent) für die Sca1-positive Fraktion zur Sca1-negativen Fraktion der nicht-stimulierten Kontrollgruppe im Vergleich (n=1). Die frühen Stammzellmarker CD117 und CD133 sind in beiden Gruppen wiederum am stärksten ausgeprägt, wobei die Negativfraktion ein höheres Expressionsniveau für CD117 und CD133 zeigt. Für die frühen Marker hämatopoetischer Differenzierung (CD34, CD90, CD135) lässt sich eine Expression auf niedrigem Niveau feststellen, wobei im Gegensatz zur G-CSF-stimulierten Versuchsgruppe (vgl. Abb. 12C) keine Tendenz eines unterschiedlichen Expressionsniveaus festzustellen ist.

3.4 Zytokinarray

Für Messtag 3 der EB-Entwicklung wurden für die G-CSF-stimulierte Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe je ein Proteinarray zur Detektion der endogenen Produktion verschiedener Zytokine durchgeführt (siehe 2.2.7). Die Ergebnisse wurden durch visuelle Inspektion und Beurteilung ausgewertet. Die auszuwertenden Membranen sind in Abb. 23 gezeigt. Tabelle VII (Anhang) zeigt die vollständigen Ergebnisse der Auswertung für die beiden Gruppen.

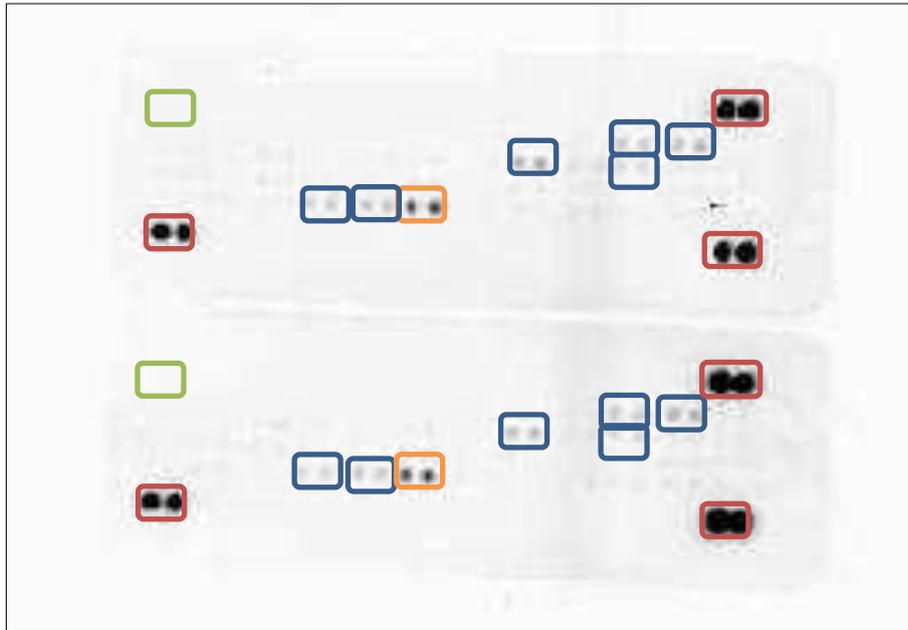


Abb. 23: Ergebnisse der Zytokinarray Messungen. Die mit und ohne G-CSF-Supplementierung kultivierten ES-Zellen (siehe 2.2.3) wurden an Tag 3 der Entwicklung geerntet und für einen Zytokinarray aufbereitet (siehe 2.2.7). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch visuelle Inspektion. Die obere Platte zeigt die G-CSF-stimulierte Gruppe, die untere Platte die Kontrollgruppe. Eine zunehmende Schwärzung der Platte entspricht einem gesteigerten Expressionslevel des entsprechenden Proteins. Die roten Umrandungen zeigen die Positivkontrollen, die grünen Umrandungen die Negativkontrollen. Eine relevante endogene Expression wurde für CD54 (oranges Kästchen) sowie für IL-1 α , KC, CCL2, TNF- α , TIMP-1 und IFN- γ gefunden (blaue Kästchen; IL-1 α : Interleukin 1 α , KC: Kansas City Protein, CCL2: Chemokin Ligand 2, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , TIMP-1: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1*, IFN- γ : Interferon γ). Eine mögliche endogene G-CSF Produktion wurde mit dem Array auch erfasst und fiel negativ aus. Eine vollständige Übersicht zeigt Tabelle VII (Anhang).

Die Ergebnisse zeigen, dass alle 3 Positivkontrollen der Membranen deutlich positiv waren und die jeweils eine Negativkontrolle negativ war. Im weiteren war für uns vor allem von Interesse, ob Zytokine durch den Einfluss von G-CSF exprimiert worden sind, die möglicherweise die Ergebnisse von RT-PCR (siehe 3.2) oder FACS-Messungen (siehe 3.3) bedingen und damit indirekt ausgelöste Effekte von G-CSF darstellen würden. Bei der Auswertung fällt zunächst auf, dass die Mehrzahl der untersuchten Zytokine nicht detektiert wurde. Zudem sind die Ergebnisse dieses Versuches dergestalt, dass für keines der untersuchten Zytokine eine zwischen den beiden untersuchten Gruppen unterschiedliche Zytokinexpression gemessen wurde. Zusammenfassend wurden Zytokine, welche mit immunologischen Vorgängen und Entzündungsprozessen assoziiert sind, wie Tumornekrose Faktor alpha (TNF- α), Interleukin IL-1 α , Interferon gamma (IFN- γ), CCL2 (Chemokin-Ligand 2) und CD54, auf geringem bis mittlerem Niveau gemessen. Der Hauptbefund des Zytokinarrays ist die an Tag 3 der EB-Entwicklung nicht

stattfindende, endogene Produktion von G-CSF sowie die fehlende Detektion eines Regulationsunterschiedes eines spezifischen Zyoktins.

4 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Fragestellung, inwieweit ein Einfluss des Granulozyten-Kolonien-stimulierenden Faktors (G-CSF) auf frühe Stadien hämatopoetischer Stammzellentwicklung vorliegt. Experimentell wurde ein murines, embryonales in-vitro Stammzellsystem, welches die frühe Stammzellentwicklung und alle Schritte der Hämatopoese in-vivo ähnlich abbildet (21, 57), gewählt. Neben dem visuellen Nachweis der erfolgreichen Bildung hämatopoetischer Zellen und anderer mesodermaler Zellen (z.B. kontrahierender Muskelzellen) in dem verwendeten Stammzellsystem, wie in dieser Arbeit nachvollzogen, konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die Wertigkeit des Modells u.a. in kompetitiven Transplantationsassays gezeigt werden (101, 102).

Zur Untersuchung des Einflusses von G-CSF auf die frühe hämatopoetische Differenzierung wurden Messungen des Genexpressions-Niveaus von Genen der hämatopoetischen Entwicklung, der Stammzellentwicklung und -differenzierung und Genen der angiopoetischen und endothelialen Entwicklung durchgeführt. Um aus dem Gesamtpool an geernteten Zellen eine größere Fraktion mit Stammzelleigenschaften zu extrahieren, wurden in zusätzlichen Versuchen die Zellen vor den PCR-Messungen nach dem Sca1-Oberflächenprotein aufgetrennt. Zur weiteren qualitativen und quantitativen Charakterisierung der kultivierten Zellen wurden Messungen von typischen Oberflächenmarkern im FACS durchgeführt, die mit der Stammzellentwicklung und der hämatopoetischen und endothelialen Entwicklung korreliert sind. Auch hier wurde anschließend eine zusätzliche Charakterisierung der Zellen nach Purifizierung nach Sca1-Oberflächenprotein durchgeführt. Effekte, die in den PCR-Messungen und in den FACS-Messungen unter Stimulation mit G-CSF an Tag 3 der EB-Entwicklung zu beobachten waren, sollten zuletzt mittels eines Zytokinarrays hinsichtlich ihrer direkten oder indirekten, durch Zytokin-Vermittlung zustande kommenden, Natur abgegrenzt werden. Auch sollte hierdurch ein frühes endogenes Vorliegen von G-CSF untersucht werden.

4.1 Einfluss von G-CSF auf die differenzielle Genexpression der EB-Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkte der EB-Entwicklung, Tag 3, 6 und 6+5, stellen hinsichtlich des Entwicklungsstandes der Hämatopoese in der ES-Zellkultur sehr unterschiedliche Stadien dar. An Tag 3 sind die Vorläuferzellen der primitiven und

definitiven Hämatopoese, die Hämangioblasten respektive BL-CFCs, bereits entwickelt. Zudem sind die primitiven wie definitiven Stammzellen der Hämatopoese, die It-HSCs, bereits in ihrer Entwicklung begriffen (vgl. Abb. 2) (57). Auch die Angioblasten, die Stammzellen der Gefäß- und Endothelbildung, können zu diesem Zeitpunkt schon identifiziert werden. Die Untersuchungen an Tag 3 dieser Arbeit beziehen sich also auf die hämatopoetische Regulation in einem Stadium, in welchem die interessierenden, unreifen hämatopoetischen Stammzellen in einem beträchtlichen Anteil, und ohne das zusätzliche Vorkommen daraus entstehender differenzierterer Zellen, vorliegen.

Bis Tag 6 der EB-Entwicklung entwickeln sich dann hämatopoetische Progenitorzellen, lymphatische Zellen und Endothelzellen (vgl. Abb. 2) (55, 78). Damit liegen zu diesem Zeitpunkt Zellen mit einer beträchtlichen Weiterdifferenzierung im Vergleich zu Tag 3 der EB-Entwicklung vor. Die Ergebnisse der FACS-Messungen spiegeln diese Entwicklung auch mit der deutlich höheren Expression des myeloischen Markers CD13 und der frühen hämatopoetischen Differenzierungsmarker CD45, CD34 und CD90 an Tag 6 im Vergleich zu Tag 3 wieder (vgl. Abb. 16-18; 4.2.1).

An Tag 6+5 der EB-Entwicklung liegen in der Zellkultur alle Zellen hämatopoetischer Differenzierung vor (57). Das Verhältnis aus Stamm- und Progenitorzellen zu Effektorzellen verschiebt sich bei einer Weiterkultivierung dann immer weiter zu dem Verhältnis im adulten Organismus, welche durch den Rückgang der unreifen hämatopoetischen Stammzellen auf ein Niveau im zehntel Promille-Bereich gekennzeichnet ist (129). Die Weiterkultivierung des verwendeten Systems einer ES-Zellkultur bis an Tag 6+30 der EB-Entwicklung und deren differenzielle Charakterisierung zu späteren Zeitpunkten, wurde in anderen Arbeiten unserer Gruppe untersucht (115) und war nicht Teil dieser Arbeit.

Eine für die hier vorgenommenen Untersuchungen wichtige Grundannahme beruht auf der Forderung, dass entscheidende Gene der frühen hämatopoetischen Stammzellentwicklung eine möglichst weitgehende Spezifität für die hämatopoetische Entwicklung aufweisen sollen. Ivanova et al. und Ramalho-Santos et al. haben hierzu im Jahr 2002 in umfangreichen Arbeiten die Genexpression für embryonale, neuronale und hämatopoetische Stammzellen charakterisiert (48, 106). Dabei wurden zum einen hochkonservierte regulatorische Mechanismen beschrieben, welche sich in einer Expression dieser Gene in allen drei untersuchten Stammzellarten niederschlug, darunter z.B. das in dieser Arbeit untersuchte Zellzyklusgen Cyclin D1. Daneben wurden zahlreiche Gene beschrieben, deren Anreicherung spezifisch in einem der drei Stammzellarten beobachtet

werden kann. Bezüglich hämatopoetischer Stammzellen betrifft dies unter anderem Flk2, Gata2, Pu.1, Lmo2, TAL1/Scl und CD34 (106), welche entscheidender Teil dieser Arbeit sind. Die Bedeutung dieser Arbeiten für die Entwicklung der vorliegenden Fragestellungen lag darin, dass neben der im einzelnen beschriebenen Bedeutung der Gene für die jeweiligen hämatopoetischen Entwicklungsschritte (siehe 1.5.2), die Bedeutung und Signifikanz der untersuchten Gene auch in explorativen, systemischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, wie sie die vorliegende Arbeit ebenfalls darstellt. Folgend werden die Ergebnisse für die wichtigsten untersuchten Gene einzeln diskutiert und die Relevanz einer veränderten Expression zu den entsprechenden Entwicklungszeitpunkten, Tag 3, 6 und 6+5, hinsichtlich der Genfunktionen in der Entwicklung wie der Bedeutung eines Einflusses des G-CSF, erläutert.

4.1.1 Flk1

Während die genauen Mechanismen der Induktion hämatopoetischer Entwicklung im Mesoderm des primitiven Streifens und der weiteren Ausreifung zu Hämangioblasten und hämatopoetischen Stammzellen noch nicht ausreichend hinsichtlich des Einflusses der einzelnen Faktoren verstanden sind (47), so hat sich die Expression und genetische Regulation von Flk1 als unabdingbar für diesen Prozess gezeigt. Man geht davon aus, dass nur Flk1-positives Mesoderm hämatopoetische Stammzellen hervorbringen kann (28, 51, 117), was auch für eine embryonale Stammzellkultur in-vitro zu Beginn der hämatopoetischen Entwicklung in EBs gezeigt werden konnte (51). Die weitere Ausdifferenzierung, mit Spezifizierung der myeloischen oder lymphatischen Linie hin zu den Effektorzellen der hämatopoetischen Entwicklung, ist von einer Herunterregulation der Flk1-Expression begleitet (51).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen an Tag 3 der EB-Entwicklung eine Hochregulation von Flk1 im Gesamtpool der Zellen (Abb. 8, 11A) in der G-CSF-stimulierten Gruppe. Dies deutet darauf hin, dass unter Stimulation mit G-CSF der Pool an mesodermalen Stammzellen, die zu hämatopoetisch-endothelialen Vorläuferzellen induziert werden, größer ist, bzw. allgemeiner zu diesem Zeitpunkt bereits umfangreichere hämatopoetische Differenzierung stattgefunden hat, als in der Kontrollgruppe. Eine Ausprägung dieses Befundes in der weiteren Entwicklung, z.B. in Form einer höheren Expression von Stammzellmarkern wie CD117 an Tag 3 (Abb. 16) oder von anderen Markern hämatopoetischer Entwicklung wie CD34, CD90 oder CD135 an den folgenden Messtag Tag 6 und Tag 6+5 (Abb. 13, 14), konnte nur in einer Tendenz für CD117 und

einer mäßigen Tendenz für CD13 an Tag 6 der EB-Entwicklung beobachtet werden (Abb. 17). Ursache für diese Befunde kann insbesondere das allgemein noch niedrige Niveau an Proteinexpression an Tag 3 und Tag 6 sein, welches einen entsprechenden Effekt eventuell nicht ausreichend darstellen würde (Abb. 16, 17; 4.2). Weiter ist zu vermuten, dass sich ein Effekt der verstärkten Flk1-Expression erst dann in einer relevant gesteigerten Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen niederschlagen würde, wenn nicht mehr uneingeschränkte Wachstumsressourcen zur Verfügung stehen (78). Das Ergebnis der gesteigerten Flk1-Expression unter Stimulation mit G-CSF wurde für die Sca1-positive Zellfraktion an Tag 3 der EB-Entwicklung bestätigt und war auf einem noch deutlich ausgeprägteren Niveau messbar (Abb. 12). Damit legen die Ergebnisse für Flk1 einen Effekt des G-CSF auf eine verstärkte hämatopoetische Induktion mesodermaler Stammzellen zu frühen Entwicklungszeitpunkten nahe.

An Tag 6+5 der EB-Entwicklung wird eine leichte Herunterregulation von Flk1 in der G-CSF-stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Abb. 11A). Die niedrigere Ausprägung von Flk1, wie sie für diesen Zeitpunkt der EB-Entwicklung in einer ES-Zellkultur als Zeichen stattfindender hämatopoetischer Ausreifung von Kabrun et al. vorbeschrieben ist (51), korreliert damit indirekt mit dem bekannten Einfluss von G-CSF auf eine vermehrte und beschleunigte Ausdifferenzierung hämatopoetischer Zellen.

4.1.2 TAL1

TAL1 (Scl) besitzt zu Flk1 partielle Gemeinsamkeiten in seiner Rolle in der frühen Hämatopoese (siehe Abb. 4). Seine Expression ist für die Initiation der Hämatopoese im Mesoderm ebenfalls unverzichtbar (103). Die Expression ist am stärksten mit den hämatopoetischen Differenzierungsstadien der frühen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen korreliert (vgl. Abb. 4) (23). Mikkola et al. untersuchten in einer in-vitro ES-Zellkultur, dass eine gesteigerte TAL1-Expression mit einer verstärkten Blutinselbildung einhergeht (84). Notabler Weise ist die Expression von TAL1 für die Ausdifferenzierung in die myeloische oder lymphatische Reihe verzichtbar, was seine spezifische Rolle in der frühen Hämatopoese auf Stammzellebene unterstreicht (84).

An Tag 3 der EB-Entwicklung lässt sich eine gesteigerte Expression von TAL1 in der G-CSF-stimulierten Gruppe beobachten (Abb. 8). Dies ist zusammen mit der vermehrten Expression von Flk1 an diesem Tag (siehe 4.2.1) ein Indiz, dass G-CSF einen fördernden Einfluss auf hämatopoetische Stammzellentwicklung zu einem sehr frühen Zeitpunkt

aufweist. Auch auf Ebene der Sca1-aufgeinigten Zellen lässt sich eine deutlich stärkere Expression von TAL1 in der G-CSF-stimulierten Gruppe beobachten (Abb. 12), was wiederum die Hypothese unterstützt, dass G-CSF die frühe, mesodermale, hämatopoetische Stammzellentwicklung fördert.

In der weiteren Entwicklung, den Tagen 6 und 6+5, ist kein Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen feststellbar (Abb. 9, 10). Das im Gegensatz zu der Herunterregulation von Flk1 an Tag 6+5 keine Herunterregulation von TAL1 in der G-CSF-stimulierten Gruppe stattfindet, ist im Rahmen der nicht-obligaten TAL1-Expression für die, jetzt weit stärker in der Zellkultur vorliegenden, differenzierteren hämatopoetischen Zellen von Zhang et al. beschrieben worden (146).

4.1.3 HoxB4

HoxB4 ist in der Embryonalentwicklung ein für die hämatopoetische Stammzellregeneration zentrales Gen (vgl. Abb. 4). Es ist sowohl für die in-vitro Expansion wie für die Transplantationsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen von zentraler Bedeutung (4, 118, 126). Seine Rolle wurde spezieller für die Fähigkeit Sca1- und CD117-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen gezeigt, die nur unter HoxB4-Expression mit maximaler Effektivität auf proliferative Stimuli reagieren können (8). Beachtenswerter Weise ist die Bildung hämatopoetischer Stammzellen im embryonalen Mesoderm selbst, im Gegensatz zu Flk1 oder TAL1 (vgl. 4.1.1, 4.1.2), aber nicht von HoxB4 abhängig (8).

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich zu dem frühen Entwicklungszeitpunkt Tag 3 eine Hochregulation von HoxB4 unter G-CSF Stimulation (Abb. 8, 11A). Bei der Untersuchung der Sca1-positiven Stammzellen zeigte sich in der G-CSF-stimulierten Gruppe zusätzlich eine ausgeprägte Hochregulation von HoxB4 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 12). Diese Befunde deuten in der Zusammenschau an, dass G-CSF einen regenerationsfördernden Effekt auf hämatopoetische Stammzellen ausüben kann. Dieser Befund reiht sich ein in Forschungsarbeiten von u.a. Metcalf et al. (83) und Schneider et al. (114), die ebenfalls eine stammzellerhaltende Wirkung des polyfunktionalen G-CSF auf hämatopoetische Stammzellen wie neuronale Stammzellen beschrieben haben.

Für die folgenden Messtage ist für Tag 6 kein Regulationsunterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 9) und an Tag 6+5 eine Herunterregulation von HoxB4 in der

G-CSF-stimulierten Gruppe festzustellen (Abb. 10). Wenn auch die von Tag 3 zu Tag 6+5 sehr verschieden vorliegenden Zellzusammensetzungen und Differenzierungsstadien einen direkten Vergleich der beiden Messtage hinsichtlich der Aussage einschränken (vgl. Abb. 2), so ist der Befund der Herunterregulation von HoxB4 an Tag 6+5 in der G-CSF-stimulierten Gruppe auffällig. Zu diesem Zeitpunkt liegen bereits zahlreiche hämatopoetisch differenzierte Progenitorzellen sowie Zellen der myeloischen Reihe vor, welche unter dem proliferativen Stimulus G-CSF deutlich beschleunigt ausdifferenzieren (109). In der weiteren Ausdifferenzierung im Rahmen der normalen Hämatopoese wird HoxB4 physiologischer Weise herunterreguliert (vgl. Abb. 4), welches mit der Herunterregulation an Tag 6+5 in der G-CSF-stimulierten Gruppe korreliert, eine Beobachtung, die u.a. von Brun et al. für die murine Hämatopoese vorbeschrieben ist (8).

4.1.4 Gata2, Pu.1 und Lmo2

Wie in Abb. 4 gezeigt, sind Gata2, Pu.1 und Lmo2 drei weitere Faktoren, die in der initialen Phase der Hämatopoese von zentraler Bedeutung sind. Gata2 ist dabei als Faktor identifiziert worden, der zum einen in enger regulatorischer Beziehung zu Flk1 steht (47), zum anderen auf dem Level der hämatopoetischen Stammzellen hochreguliert ist und dabei, neben HoxB4, als *gatekeeper* für deren Immaturität fungiert (88). Diese Funktion wurde auch in embryonalen Stammzellkulturen und hier lokal-spezifisch in der Entstehung und Initiation der embryonalen Hämatopoese in der mesodermalen Mesonephros-Region gezeigt (69, 87, 88). Mikkola et al. zeigten, dass die Herunterregulation von Gata2 eine Voraussetzung für die weitere Ausdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen darstellt (88).

In unseren Versuchen zeigt sich für Gata2 die neben Pu.1 und HoxD3 stärkste Hochregulation in der G-CSF-stimulierten Gruppe (Abb. 8). Dies deutet darauf hin, dass Gata2 als weiterer Faktor der Stammzellerhaltung unter Einfluss von G-CSF verstärkt exprimiert wird. Allerdings zeigt der Vergleich der Sca1-aufgetrennten Zellen der G-CSF-stimulierten Gruppe zur Kontrollgruppe (Abb.12), dass der Effekt auf dieser Ebene, im Gegensatz zu den vorgehend besprochenen Genen Flk1, TAL1 und HoxB4, nicht reproduziert werden konnte. Für die G-CSF-stimulierte Gruppe konnte im Vergleich der Sca1-positiven Fraktion zur Negativfraktion aber eine deutlich höhere Gata2 Expression in der Stammzellfraktion gezeigt werden (Abb. 14). Im weiteren Verlauf der Messtage wurde kein Unterschied in der Regulation zwischen G-CSF-stimulierter Gruppe und Vergleichsgruppe identifiziert, was wiederum dem deutlich gestiegenen Vorliegen

differenzierterer Zellen, welche physiologisch kein oder nur wenig Gata2 exprimieren, geschuldet sein kann (Abb. 9, 10). Dies ist auch durch Befunde von Minegishi et al. gedeckt, der die entscheidende Funktion von Gata2 zu Beginn der embryonalen Hämatopoese zum Zeitpunkt der hämatopoetischen Initiation im Mesoderm beschrieben hat (88).

Pu.1 ist hinsichtlich seiner Polyfunktionalität ein besonders bemerkenswerter Faktor. Auf Ebene der frühen hämatopoetischen Stammzellentwicklung ist er, zusammen mit HoxB4, essentiell für deren Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit (37, 49). Im Gegensatz zu den anderen bisher diskutierten Faktoren ist er jedoch auch entscheidend in der weiteren Entwicklung, u.a. für die Linienentscheidung der hämatopoetischen Progenitorzellen und für die hämatopoetische Differenzierung zu den einzelnen Effektorzellen, dosisabhängig beteiligt (vgl. Abb. 4) (45, 53).

Bei unseren Messungen zeigt sich Pu.1 an Tag 3 der EB-Entwicklung neben Gata2 und HoxD3 als das am stärksten hochregulierte Gen in der G-CSF-stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 8, 11A). Dieser Effekt konnte experimentell auch für das Level der Sca1-aufgetrennten Stammzellen reproduziert werden (Abb. 12). In der Literatur wird der gemischte Effekt einer erhöhten Expression von Pu.1 auf die hämatopoetische Stammzellerhaltung wie -differenzierung zu frühen Entwicklungszeitpunkten derzeit kontrovers diskutiert (49). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen für Pu.1 nahe, dass G-CSF zu einem sehr frühen Zeitpunkt der hämatopoetischen Entwicklung einen fördernden Einfluss auf die Stammzellregeneration und -differenzierung nimmt und Pu.1 ein hierfür relevanter Faktor ist (37, 49).

Die Expression des Faktors Lmo2 ist in der murinen Hämatopoese auf früher Stammzellebene von Bedeutung (Abb. 4). Dabei wird ein Zusammenspiel insbesondere mit TAL1 angenommen (39, 142). Seine Bedeutung in der weiteren hämatopoetischen Differenzierung ist noch nicht verstanden (142). Eine gleichgerichtete Regulation von Lmo2 mit TAL1 kann durch unsere Daten gut nachvollzogen werden. An Tag 3 der EB-Entwicklung ist eine Hochregulation von Lmo2 in der G-CSF-stimulierten Gruppe zu beobachten und korreliert mit der Hochregulation von TAL1 zu diesem Entwicklungszeitpunkt (Abb. 8). Da Lmo2 vor allem für die frühe Stammzellentwicklung von Bedeutung ist (Abb. 4) (99, 142), ist die Expression auf vergleichbarem Niveau in den beiden Gruppen an den folgenden Tagen nachvollziehbar (Abb. 9, 10).

4.1.5 Cyclin D1 und Gene der endothelialen und angiopoetischen Differenzierung

Bezüglich der weiterhin untersuchten Gene werden im Folgenden noch das Zellzyklusgen Cyclin D1 und Gene der endothelialen und angiopoetischen Differenzierung, PECAM (CD31) und EGR1 diskutiert.

Cyclin D1 ist ein Gen der Zellregulation und Zellteilung, für welches keine spezifische Rolle in der frühen Stammzellentwicklung beschrieben ist (3, 127). In unseren Messreihen zeigt sich die Expression von Cyclin D1 durchgehend auf dem gleichen Niveau in den jeweiligen Gruppen an allen Messtagen exprimiert (Abb. 8-10, 11B). Wie erwartet, ist das Expressionsniveau auf Stammzellebene, wie die Messungen der Sca1-positiven Zellen zeigen, im Vergleich deutlich erhöht (Abb. 14, 15). Ein fehlender spezifischer Einfluss von hämatopoetischen Faktoren auf die Regulation von Cyclin D1 wurde auch von Ling et al. und Roberts et al. beschrieben (71, 109).

Aufgrund der engen Verzahnung der frühen Hämatopoese mit der frühen Endothelzellentwicklung und Angiopoese wurden in dieser Arbeit regulatorisch wichtige Gene dieser Prozesse mit untersucht. Exemplarisch sollen davon PECAM (CD31) und EGR1 besprochen werden. Für PECAM wurde zuerst seine Rolle in der frühen Endothelzellentwicklung und Angiopoese in Experimenten mit ES-Zellkulturen identifiziert (19, 70). Auch wurde die Expression und Funktion von PECAM in der embryonalen ES-Zellentwicklung für die Initiation von Endothelzellentwicklung und Angiopoese von Li et al. bestätigt (67). Für PECAM zeigt sich bei unseren Messungen ein uneinheitliches Niveau an Genexpression. Im Gesamtpool der Zellen ist in der Tendenz eine Hochregulation an Tag 3 der EB-Entwicklung in der G-CSF-stimulierten Gruppe festzustellen (Abb. 11B), die sich jedoch nicht in einer geänderten Maßzahl der Hoch- und Runterregulation niederschlägt (Abb. 8). An Tag 6+5 zeigt sich eine Runterregulation in der G-CSF Gruppe, die aber wiederum nicht signifikant ist (Abb. 10, 11B).

Für EGR1, einem Protein, welches sehr früh in der embryonalen Angiogenese exprimiert ist (26, 61), zeigt sich durchgehend kein Regulationsunterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Dies gilt für den Gesamtpool an Zellen für alle Messzeitpunkte (Abb. 8-10), wie für die Zellen nach Sca1-Auftrennung an Tag 3 der EB-Entwicklung (Abb. 12).

Die Befunde für PECAM und EGR1 zeigen zusammen mit den Ergebnissen der anderen Gene der endothelialen und angiopoetischen Entwicklung, FLI1, KDR und ERG

(Abb. 8-10), kein eindeutiges Bild hinsichtlich eines regulatorischen Einflusses durch eine Stimulation mit G-CSF. Ein solcher Effekt wurde in verschiedenen Untersuchungen bisher nicht beschrieben (83, 109) und lässt sich aus den vorliegenden Daten auch nicht ableiten.

Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien dieser Arbeit zeigen in der Zusammenschau einen deutlichen Einfluss des G-CSF auf Gene, die besonders früh in hämatopoetischer Initiation und Differenzierung im embryonalen Mesoderm entscheidend sind (Flk1, TAL1, HoxB4, Gata2), aber keinen Einfluss auf Gene, die eher der angiopoetisch-endothelialen Entwicklung zugeordnet werden (PECAM, Erg1). Dabei zeigt sich die endotheliale und angiopoetische Entwicklung zu frühen Entwicklungszeitpunkten auch von anderen Zytokinen, wie beispielsweise VEGF, nicht beeinflusst (115). Insgesamt kann die seit kurzem beschriebene Rolle von G-CSF als polyfunktional agierendem Zytokin, welches die Regeneration, Differenzierung, Proliferation und Selbsterneuerung von Stamm- und Vorläuferzellen der frühen hämatopoetischen Entwicklung fördernd beeinflusst (83), durch unsere Daten gut nachvollzogen werden.

4.2 Einfluss von G-CSF auf die differenzielle Proteinexpression der EB-Zellen

Neben den Untersuchungen der vergleichenden Genexpression in der embryonalen Stammzellkultur wurde die Ausprägung charakteristischer Oberflächenproteine in FACS-Messungen untersucht. Mit diesem Vorgehen wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollte die Expression von Oberflächenmarkern, welche mit der hämatopoetischen Stammzellentwicklung korreliert sind, untersucht werden um die Wertigkeit und Berechtigung des Modells hinsichtlich der physiologischen Nachbildung der frühen Hämatopoese zu bestätigen. Zum anderen wurde untersucht, ob sich möglicherweise schon zu diesen sehr frühen Zeitpunkten der EB-Entwicklung phänotypische Unterschiede, im Sinne einer unterschiedlich ausgeprägten Expression an Oberflächenmarkern, unter dem Einfluss von G-CSF feststellen lassen und mit den Befunden der PCR-Messungen in dieser Arbeit korreliert werden können.

4.2.1 Nachweis der hämatopoetischen Stammzellentwicklung in den EBs

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die beginnende hämatopoetische Entwicklung in einer in-vitro ES-Zellkultur durch die Bestimmung der Abfolge der Expression typischer Oberflächenmarker nachzuverfolgen (Abb. 16-18). Zusätzlich wurde eine erfolgreiche Blutzellentwicklung fortlaufend mikroskopisch kontrolliert und auch jeweils

auf die Entwicklung kontrahierender Muskelzellen als Nachweis regelgerechter mesodermaler Entwicklung geachtet. Untersuchungen der Expression von Oberflächenmarkern zur hämatopoetischen Charakterisierung embryonaler Stammzellentwicklung wurden vorher unter anderem in Arbeiten von Schmitt et al. (113) und Ling et al. (71) vorgenommen.

An Tag 3 der EB-Entwicklung lassen sich mit CD117 und CD133 bereits Marker, welche mit hämatopoetischer Stammzellentwicklung korreliert sind, auf einem relevanten Niveau nachweisen (Abb. 16). CD117 gehört zu den am frühesten exprimierten Rezeptoren zum Zeitpunkt der hämatopoetischen mesodermalen Induktion, was experimentell auch für die Ebene der in-vitro Kultivierung embryonaler Stammzellen gezeigt wurde (121). Die CD117-Expression hämatopoetischer Stammzellen ist entscheidend mit deren Fähigkeit zu Selbsterneuerung, Proliferation und Ausdifferenzierung korreliert (118). Die Regulation der CD117-Expression ist dabei von TAL1, dessen Rolle ebenfalls in der sehr frühen hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung liegt (siehe 4.2.2), abhängig (64).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass CD117 im Gegensatz zu spezifischeren hämatopoetischen Markern wie CD34, CD45 CD90 und CD135 bereits in einem relevanten Anteil an EB-Zellen zu dem frühen Entwicklungszeitpunkt Tag 3 exprimiert ist (Abb. 16). Dies weist darauf hin, dass um Tag 3 der EB-Entwicklung in-vitro tatsächlich das Auftreten erster hämatopoetischer Stammzellinduktion vorliegt, ohne dass weiter differenzierte hämatopoetische Zellen in der Kultur vorliegen. Dieser Befund ist insbesondere wichtig, um die Ergebnisse der Genexpressionsstudien dieser Arbeit einzuordnen (vgl. Abb. 8, 9), da somit weitestgehend Effekte auf hämatopoetischer Stammzellebene, insbesondere an Tag 3 der EB-Entwicklung, untersucht werden konnten.

An Tag 3 und Tag 6 der EB-Entwicklung sind CD117 und Sca1 am stärksten auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (vgl. Abb. 3) (71). An Tag 6 der EB-Entwicklung fällt sowohl eine tendenziell stärkere Expression von CD117 als auch von CD13 in der G-CSF-stimulierten Gruppe auf (Abb. 17). Dies kann ein phänotypischer Hinweis sein, die die Befunde der verstärkten Expression von Genen der Stammzellproliferation,- differenzierung -und erhaltung wie Flk1, HoxB4, Pu.1 oder TAL1 an Tag 3 widerspiegeln (vgl. Abb. 8, 11A). Das stärkere Vorliegen des Stammzellmarkers CD117, wie des myeloische Differenzierung anzeigenden Markers CD13, weist darauf hin, dass G-CSF für die Regeneration und Proliferation früher hämatopoetischer Stammzellen möglicherweise essentiell ist, wobei sich dieser Effekt

dann zu dem Zeitpunkt Tag 6 schon in einem größeren Pool an Zellen der hämatopoetischen Differenzierung, gemessen an verstärkter CD13-Expression, niederschlägt (Abb. 17). Ebenfalls zeigt sich im Vergleich der G-CSF-stimulierten Gruppe zur Kontrollgruppe beim Vergleich auf Stammzellebene nach Auftrennung nach Sca1-Oberflächenprotein, dass in der G-CSF-stimulierten Gruppe ein höheres Expressionsniveau für CD117 zu finden ist, als in der Kontrollgruppe (Abb. 19).

CD133 ist ein Marker verschiedener Stammzelltypen, darunter hämatopoetischer Stammzellen, wenn auch seine genaue Funktion noch unverstanden ist (120, 139). Neben CD117 ist CD133 deutlich am stärksten in der EB-Kultur an Tag 3 der Entwicklung exprimiert (Abb. 16). Seine Expression ist an Tag 3 und im weiteren Verlauf nicht zwischen den beiden Gruppen verschieden (Abb. 16-18). Dies kann in Zusammenhang mit der weitgehenden Spezifität der G-CSF-Wirkung auf hämatopoetische Entwicklung und Differenzierung stehen, wobei ein ursächlicher Zusammenhang außerhalb der Reichweite der in dieser Studie erhobenen Daten liegt.

Die anderen an Tag 3 untersuchten Marker (CD34, 45, 90, 135) sind auf einem Niveau von anteilig bis zu 1% positiver Zellen exprimiert, was zu diesem Messzeitpunkt Befunden von Ling et al. entspricht (71). Erwähnenswerter Weise ist der myeloische Marker CD13 an Tag 3 der EB-Entwicklung ebenfalls nur marginal nachweisbar (Abb. 16), was wiederum für die Abwesenheit differenzierterer hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen in der Zellkultur spricht.

An Tag 6 der EB-Entwicklung, an welchem wie beschrieben viele weiter differenzierte hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen vorliegen (vgl. Abb.2), erweitert sich das Spektrum exprimierter Marker wie in der Literatur u.a. von Keller et al. beschrieben (55). CD117 ist dabei weiterhin der am stärksten exprimierte Marker (Abb. 17), was mit den Entwicklungsstadien der hauptsächlich vorliegenden hämatopoetischen Stammzellen korreliert (vgl. Abb. 2, 3). Zudem sind nun erstmals die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD34, 45, 90 und 135 in einem relevanten Anteil exprimiert (Abb. 17). Dies spiegelt das Vorliegen hämatopoetischer Stammzellen des Stadiums der lt-HSCs und st-HSCs wider (vgl. Abb. 3) (13). Der Marker CD13 ist an diesem Tag mit einem Anteil von ca. 5% an positiven Zellen exprimiert (Abb. 17). Dieser Befund, der das Vorliegen differenzierterer hämatopoetischer Progenitorzellen anzeigt (107), war für die Untersuchung der Fragestellung dahingehend entscheidend, dass die Auftrennungsversuche nach Sca1 für Tag 3 der EB-Entwicklung durchgeführt wurden und nicht für Tag 6.

An Tag 6+5 der EB-Entwicklung liegen die Zellen erneut in weiterer Ausdifferenzierung und größerer differenzieller Heterogenität vor (vgl. Abb. 2, 3). Dies äußert sich in einer Zunahme fast aller untersuchten Marker im Vergleich zu Tag 6 (Abb. 18) und ist auch so von Ling et al. für CD117, CD45 und CD135 vorbeschrieben worden (71). Wie erwartet steigt die Expression von CD13 am deutlichsten an, was die anteilmäßige Verschiebung des Vorherrschens weniger differenzierter Zellen an Tag 3 zu dem stärkeren Vorliegen hämatopoetisch differenzierter Progenitorzellen an Tag 6+5 widerspiegelt. Es ist auch eine weitere Zunahme von CD117 festzustellen, welcher physiologisch als Marker auch in der weiteren hämatopoetischen Differenzierung vorhanden bleibt (vgl. Abb. 3, 16-18) (71, 116).

Insgesamt bestätigen die Befunde für Tag 3, 6 und 6+5 der EB-Entwicklung damit, dass die Methode der FACS-Messung typischer Oberflächenmarker geeignet und sensitiv ist, das Auftreten hämatopoetischer Entwicklung in dem in-vitro System embryonaler ES-Zellkultivierung nachzuverfolgen.

4.2.2 Vergleich der Proteinexpression zwischen den Gruppen

Im Vergleich der G-CSF-stimulierten Gruppe zur Kontrollgruppe konnte an den Messtagen 3, 6 und 6+5 der EB-Entwicklung kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression festgestellt werden [Abb. 16-18, Tabelle V, VI (Anhang)].

An Tag 3 ist das Gesamtniveau der Expression noch sehr gering, so dass hier auf phänotypischer Ebene ein signifikanter Unterschied in der Marker-Expression nur durch einen sehr ausgeprägten Zytokineffekt deutlich werden würde. Es ist weiterhin zu vermuten, dass sich der Effekt von G-CSF in den Untersuchungen der differenziellen Genexpression für Tag 3 (siehe 4.2) möglicherweise auch deshalb nicht auf Proteinebene niederschlägt, da die Stammzellregulation immer durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren beeinflusst wird (44, 54). Arbeiten von Heyworth et al. und Kaur-Bollinger et al. legen nahe, dass Zytokine wie G-CSF möglicherweise die Stammzellregulation dahingehend beeinflussen, dass die Stammzellen auf einen zusätzlichen Stimulus mit einer maximalen proliferativen Antwort reagieren können (43, 54). Solche Effekte, die sich beispielsweise in geänderten Genexpressionsmustern niederschlagen, wären dann auf systemischer Ebene, wie sie diese Untersuchung darstellt, mit dem Regime einer Monostimulation deutlich schwieriger darzustellen.

Die Ergebnisse aus den Versuchen nach Sca1-Purifizierung des Zellpools an Tag 3 weisen ebenfalls auf keine signifikante Tendenz bezüglich eines Expressionsunterschiedes hämatopoetischer Proteine zwischen den beiden Gruppen hin (Abb. 19-22). Es zeigt sich aber, dass beide Gruppen für CD117 die stärkste Koexpression mit Sca1 aufweisen (Abb. 19), was für die frühe hämatopoetische Stammzellendifferenzierung postuliert wird (vgl. Abb. 3) (13, 48).

An den folgenden Tagen 6 und 6+5 der EB-Entwicklung lassen sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenmarker-Expression zwischen den beiden Gruppen feststellen. An diesen Tagen liegen deutlich weiter differenzierte Zellen als an Tag 3 vor. Da in der Entwicklung zu Tag 6 und Tag 6+5 weiterhin optimale Wachstumsbedingungen vorliegen, bleibt fraglich, ob sich der Effekt von G-CSF auf die genetische Regulation hämatopoetischer Stammzellen zu diesen Zeitpunkten auch in messbar veränderten Zusammensetzungen des hämatopoetischen Zellpools niederschlagen würde. Möglicherweise führt G-CSF erst bei suboptimalen Bedingungen zu einer anteilmäßig vermehrten Regeneration, Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (83, 109).

Wie in Abschnitt 4.2.1 erläutert, sind die Expressionsbestimmungen von Oberflächenproteinen im FACS sehr gut geeignet festzustellen, ob die Meilensteine der Hämatopoese regelgerecht in der embryonalen Entwicklung in-vitro nachvollzogen werden. Für die Detektion feiner Regulationsunterschiede unter Zytokinstimulation, wie sie die RT-PCR auf genetischer Ebene leisten kann, bleibt die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden aber wichtig, da feine Veränderungen des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen auf der Proteinebene ganzer, intakter Zellen so noch nicht sicher nachgewiesen werden konnten.

4.3 Methodische Überlegungen

Das in-vitro System muriner ES-Zellkultivierung in *Embryoid Bodies*, wie von Doetschmann etabliert (21, 78, 113), stellt ein wichtiges System der in-vivo ähnlichen in-vitro Nachbildung der frühen Embryogenese dar (104, 132). Es ermöglicht eine unter definierten Bedingungen wiederholbare Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die Stammzellentwicklung –und differenzierung (71, 84, 113).

Der Ausgangspunkt zu der vorliegenden Fragestellung war, ob G-CSF neben der bekannten differenzierungsfördernden Wirkung auf hämatopoetische Zellen der

myeloischen Reihe und auf hämatopoetische Progenitorzellen, auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Stammzellentwicklung zu sehr frühen Zeitpunkten der Hämatopoese ausübt. Für die Wahl der zur Beantwortung dieser Fragestellung geeigneten Methode wäre es möglich gewesen, die Untersuchungen an aus dem Knochenmark adulter Mäuse isolierter lt-HSCs, welche in der Embryonalentwicklung ab Tag 3-5 (siehe Abb. 2) entstehen und dann lebenslang nach Migration ins Knochenmark (siehe Abb. 1) als definitive Stammzellen der Hämatopoese fungieren, durchzuführen (13). Eine Auftrennung der hämatopoetischen Zellen und der Versuch der Isolierung von Stammzellen, wie z.B. der lt-HSCs, ist zwar ein gängiges Verfahren, es existieren aber innerhalb dieser Zellen sowohl viele Untergruppen mit teilweise konträren Eigenschaften (138), als auch immer ein nicht bekannter, beträchtlicher Anteil schon weiter differenzierter Zellen in der Zellkultur. Entscheidend war die Überlegung, dass die lt-HSCs im Knochenmark immer nur vereinzelt vorliegen und nur eine Zelle von ca. 10^4 als lt-HSC zu bezeichnen ist und zudem eine schon weitere Ausdifferenzierung der lt-HSCs zu st-HSCs eines nicht bekannten Anteils in Knochenmarkisolaten vorliegt (129).

Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit ein System embryonaler Stammzellen verwendet. Dieses ermöglichte es zu den frühen Messzeitpunkten, insbesondere an Tag 3 der EB-Entwicklung, dass keine weiter differenzierten Stammzellen der hämatopoetischen Linie in der Zellkultur vorhanden sind. Dies zeigt sich konkret u.a. in dem Fehlen des myeloischen Markers CD13 und anderer Marker hämatopoetischer Differenzierung wie CD34, CD90 oder CD135 an Messtag 3 (siehe Abb. 16 und Abschnitt 4.2) und dem dazu kontrastreichen Auftreten der CD13-Expression an Tag 6 der Entwicklung (siehe Abb. 17). Zudem wird die für eine explorative Untersuchung auf systemischen Level benötigte hohe Anzahl an interessierenden frühen hämatopoetischen Stammzellen durch dieses System effizient und effektiv produziert (55, 57).

Ein weiterer Vorteil liegt in der Art der Zellkultur, der Nachformung der embryonalen Entwicklung in *Embryoid Bodies* (siehe 2.2.3). Für dieses etablierte System kann von einem in-vivo ähnlichen in-vitro System ausgegangen werden (57), welches ein hohes Maß an Vergleichbarkeit zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sowie eine sehr gute Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen, voneinander unabhängigen Versuchen gewährleistet. Trotz der inhärenten Variabilität des biologischen Systems der embryonalen ES-Zellkulturen zeigen u.a. Arbeiten von Dang et al. und Mansergh et al., dass die in-vitro Zellkulturen sehr gut für Untersuchungen zu genetischen

Regulationsmechanismen geeignet sind, gerade wenn für die Untersuchungen große Zellzahlen benötigt werden oder wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, eine explorative, hypothesen-generierende Untersuchung zu Zusammenhängen genetischer Regulation durchgeführt werden soll (17, 75).

Die Ereignisse und Entwicklungen zu Beginn der embryonalen Entwicklung verlaufen in einem hohen Tempo und mit einer großen Ereignisdichte. Bei der experimentellen Durchführung wurde daher darauf geachtet, dass die einzelnen Schritte in der Zellkultur mit Präkultivierung, Setzen der *Hängenden Tropfen*, Ernte und den diversen Messungen (siehe 2.2.3) auch an stets denselben Tageszeiten durchgeführt wurden. Allerdings wird in dieser Arbeit der Unterschied zwischen zwei Gruppen vergleichsweise untersucht, so dass systemische Fehler hier weniger ins Gewicht fallen würden. In der vorliegenden Arbeit ist es aber beispielsweise in den PCR-Messungen des Gesamtpools an Zellen gelungen, Genregulationsunterschiede, die sich im Mittelwert auf Gruppenebene zeigen (Abb. 8-10), auch im Verlauf über die drei Messtage in den jeweiligen Einzelversuchen (Abb. 11A, B) und zusätzlich auf Ebene aufgereinigter Stammzellen (Abb. 12) nachzuverfolgen.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten sind zwei Befunde aus den Auftrennungsversuchen nach Sca1-Oberflächenprotein auffällig. Es zeigt sich in den RT-PCR-Messungen eine vergleichsweise hohe relative Genexpression in der Sca1-Negativfraktion der Kontrollgruppe im Vergleich zur Negativfraktion der G-CSF-stimulierten Gruppe (Abb. 13), sowie im Vergleich zur Sca1-Positivfraktion der Kontrollgruppe (Abb. 15). Ein ähnlicher Befund zeigt sich bei den FACS-Messungen, bei welchen wiederum die Sca1-Negativfraktion ein hohes Niveau an Expression fast aller gemessenen Marker aufweist, die nicht durch die Betrachtung der Messungen des Gesamtpools geernteter Zellen nachvollzogen werden können (Abb. 20, 22, 16-18). Das Expressionsniveau ist in der Sca1-Negativfraktion deutlich höher als in der Gruppe der Sca1-positiven Zellen der Kontrollgruppe oder der Sca1-positiven Zellen der G-CSF-stimulierten Gruppe (Abb. 19, 21).

In der Überprüfung der experimentellen Bedingungen, wie u.a. der eingesetzten Zellzahlen pro Ansatz, der verwendeten Antikörper, etc. konnten keine Ursachen, die in der methodischen Durchführung begründet sein könnten, gefunden werden. Wenn auch der Vergleich der Sca1-purifizierten Zellen der entscheidende Teil der Analyse ist, bleiben genannte Beobachtung dennoch nachdenkenswert. Da in dem Auftrennungsprotokoll (vgl. 2.2.4) selbst verschiedene Antikörper verwendet werden,

kann vermutet werden, dass es hier zu einer nicht genügenden Aufreinigung der Proben nach der Prozedur für die Durchflussfraktionen (Negativfraktionen) gekommen sein kann, welches sich in RT-PCR wie in den FACS-Messungen gleichgerichtet niedergeschlagen hat. Auch eine Veränderung der Zellintegrität kommt trotz der Kontrolle der Vitalität mit Trypanblau als mögliche Fehlerquelle in Betracht.

Insgesamt wurden in Abschnitt 4.2 daher mehrheitlich die Befunde der FACS-Messungen aus dem Gesamtpool geernteter Zellen (Abb. 16-18) und aus dem Vergleich der purifizierten Zellen (Abb. 19, 21) diskutiert, was gleichfalls für die PCR-Messungen gilt (Abschnitt 4.1; Abb. 12, 14).

4.4 Ausblick

Der in dieser Arbeit untersuchte Effekt von G-CSF auf die frühe hämatopoetische Entwicklung und auf die hämatopoetische Stammzellerhaltung, -differenzierung und -proliferation ist von herausstehendem, aktuellem Interesse. Von Seiten anderer Arbeitsgruppen wurden in den letzten fünf Jahren Ergebnisse publiziert, die einen regenerationsfördernden Effekt von G-CSF auf Ebene von neuronalen oder kardialen Stammzellen beschreiben. Entsprechend wird G-CSF in verschiedenen Stufen klinischer Studien beim ischämischen Schlaganfall, bei schwerer Sepsis oder bei schwerer Herzinsuffizienz nach Herzinfarkt eingesetzt (119, 122, 123). Obwohl das hämatopoetische System und hämatopoetische Stammzellen historisch zu den am meisten und längsten erforschten Gebieten der Stammzellforschung gehören, ist ein Effekt von G-CSF auf die Stammzellerhaltung früher, undifferenzierter hämatopoetischer Stammzellen noch nicht beschrieben worden. In dieser Arbeit konnte auf Ebene der entscheidenden Gene hämatopoetischer Stammzellregulation erstmals Hinweise auf einen solchen Effekt für G-CSF in einem definierten System einer murinen, embryonalen Stammzellkultur gezeigt werden. Für weitere Forschung ist daher sowohl die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse in ein in-vivo System von Bedeutung, als auch die Frage, in wieweit die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen für die hämatopoetische Stammzellphysiologie im adulten Organismus von Bedeutung sind (48, 106).

Die Identifizierung der Faktoren, unter denen embryonale, pluripotente Stammzellen in in-vitro Kultivierung den Prozess der Hämatopoese vollständig, effektiv und fortwährend nachbilden, ist ein weiterer Zweig aktueller hämatologischer Forschung. Hier bleibt in zukünftigen Forschungsarbeiten zu klären, ob die Stimulation der in-vitro Kultur embryonaler Stammzellen mit anderen Zytokinen wie z.B. IL3, IL6 oder SCF in

Kombination mit G-CSF, Effekte auf systemischer Ebene, wie in dieser Arbeit untersucht, sichtbar macht. Ferner steht die Verwendung dieser Erkenntnisse für die Weiterentwicklung der Methoden der autologen Stammzelltransplantation und des *tissue engineering* im Sinne der in-vitro Bildung transplantationsfähiger Blutbestandteile im Vordergrund.

Auch für die aktuelle Forschung hinsichtlich der Regulation hämatopoetischer Stammzellen in der Stammzellnische im adulten Knochenmark ergeben sich aus dieser Arbeit Anknüpfungspunkte hinsichtlich der Regenerationsfähigkeit der Stammzellen unter Einfluss des G-CSF. Ein direkter Gesichtspunkt für weitere Forschung ergibt sich aus der Frage, wie sich die unter G-CSF beobachtete genetische Regulation hämatopoetischer Entwicklung auf phänotypischer Ebene abbilden und nachweisen lassen kann. Die Isolation von Stammzellen aus dem embryonalen Mesoderm der aortogonadalen Mesonephrosregion zu Anbeginn der hämatopoetischen Induktion und die Charakterisierung ihres Proteinexpressions-Spektrums, wie ihres Wachstums- und Differenzierungsverhaltens, werden derzeit intensiv untersucht. Die Untersuchung eines Einflusses von G-CSF auf Zellen dieser Isolierungsqualität sind direkte Anknüpfungspunkte, die sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage nach dem Einfluss des Zytokins Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (G-CSF) auf die Entwicklung, Differenzierung, Erhaltung und Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen und daraus entstehenden hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Methodisch wurde die Hämatopoese durch das in-vivo ähnliche Modell der in-vitro Kultivierung muriner embryonaler E14-Stammzellen in *Embryoid Bodies* (EBs) nachgebildet. Unter definierten Kulturbedingungen kann in diesem Modell die murine Embryogenese in-vitro nachgebildet werden, wobei alle 3 Keimblätter regelgerecht entwickelt werden.

Die Stammzellen wurden mit oder ohne G-CSF-Supplementierung für insgesamt 11 Tage gezüchtet. An den Tagen 3, 6 und 6+5 (entspricht Tag 11) wurden die Zellen jeweils geerntet. Für die Analyse der genetischen Regulation unter dem Einfluss von G-CSF wurde die Methode der quantitativen Real Time-PCR gewählt. Zusätzlich wurden die geernteten Zellen in FACS-Messungen nach der Expression typischer Oberflächenmarker, die mit der hämatopoetischen Entwicklung korreliert sind, charakterisiert. In einem weiteren Schritt wurden die geernteten Zellen einer Auftrennung an magnetischen Säulen mit MACS *Micro-Beads* nach dem Vorhandensein des Sca1-Oberflächenproteins unterzogen und anschließend wiederum in PCR- und FACS-Messungen charakterisiert.

Die Ergebnisse der Arbeit weisen auf einen Einfluss von G-CSF auf die hämatopoetische Genregulation zu dem frühen Zeitpunkt Tag 3 der Stammzellentwicklung hin. Gene der hämatopoetischen Stammzellerhaltung, -differenzierung und -proliferation sind unter dem Einfluss von G-CSF verstärkt exprimiert, während für Gene des Zellzyklus und der endothelialen und angiopoetischen Entwicklung keine Regulationsunterschiede nachgewiesen wurden. Dieser Befund zeigt sich in der Analyse der gesamten Zellpopulation, wie auch im Vergleich der Sca1-purifizierten Stammzellen. Die FACS-Messungen zeigen, dass das verwendete Stammzellmodell die beginnende Hämatopoese im murinen Embryo erfolgreich nachbildet. Die typischen Marker der hämatopoetischen Entwicklung treten sequentiell auf den Zellen der EBs zu den einzelnen Erntetagen auf, wobei sich bereits auf Proteinebene in der Tendenz gezeigt hat, dass sich der hämatopoetische Stammzellpool unter G-CSF-Supplementierung schon an Tag 6 der Entwicklung nachweisbar vergrößert hat.

Die vorliegende Arbeit liefert damit Hinweise, dass G-CSF eine bisher nicht charakterisierte Wirkung auf Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung bereits sehr früher, wenig differenzierter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen hat.

6 Literaturverzeichnis

1. Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Körbling M. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996 Okt;88(8):2819–2825.
2. Basu S, Hodgson G, Zhang HH, Katz M, Quilici C, Dunn AR. „Emergency“ granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood* 2000 Juni;95(12):3725–3733.
3. Bienvenu F, Barré B, Giraud S, Avril S, Coqueret O. Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell* 2005 Apr;16(4):1850–1858.
4. Björnsson JM, Larsson N, Brun ACM, Magnusson M, Andersson E, Lundström P, Larsson J, Repetowska E, Ehinger M, Humphries RK, Karlsson S. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in *Hoxb3* and *Hoxb4*. *Mol. Cell. Biol.* 2003 Juni;23(11):3872–3883.
5. Bonifer C, Faust N, Geiger H, Müller AM. Developmental changes in the differentiation capacity of haematopoietic stem cells. *Immunol. Today* 1998 Mai;19(5):236–241.
6. Boudreau NJ, Varner JA. The homeobox transcription factor *Hox D3* promotes integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression and function during angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 2004 Feb;279(6):4862–4868.
7. Bradley A. Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1990 Dez;2(6):1013–1017.
8. Brun ACM, Björnsson JM, Magnusson M, Larsson N, Leveén P, Ehinger M, Nilsson E, Karlsson S. *Hoxb4*-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 2004 Juni;103(11):4126–4133.
9. Burgess AW, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int. J. Cancer* 1980 Nov;26(5):647–654.
10. Chen H, Kinzer CA, Paul WE. p161, a murine membrane protein expressed on mast cells and some macrophages, is mouse CD13/aminopeptidase N. *J. Immunol.* 1996 Sep;157(6):2593–2600.
11. Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Nov;93(23):13158–13163.

12. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998 Feb;125(4):725–732.
13. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Dez;98(25):14541–14546.
14. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002 Okt;299(1-2):35–55.
15. Dahl R, Simon MC. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol. Dis.* 2003 Okt;31(2):229–233.
16. Daley GQ. From embryos to embryoid bodies: generating blood from embryonic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003 Mai;996:122–131.
17. Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol. Bioeng.* 2002 Mai;78(4):442–453.
18. DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 1998 Aug;17(15):4456–4468.
19. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1997 Sep;151(3):671–677.
20. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991 Dez;78(11):2791–2808.
21. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985 Juni;87:27–45.
22. Dzierzak E, Medvinsky A, de Bruijn M. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol. Today* 1998 Mai;19(5):228–236.
23. Elefanty AG, Begley CG, Metcalf D, Barnett L, Köntgen F, Robb L. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ „knock-in“ strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Sep;95(20):11897–11902.

-
24.
Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981 Juli;292(5819):154–156.
25.
Evans T. Embryonic Stem Cells as a Model for Cardiac Development and Disease. *Drug Discov Today Dis Models* 2008;5(3):147–155.
26.
Fahmy RG, Dass CR, Sun L-Q, Chesterman CN, Khachigian LM. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat. Med.* 2003 Aug;9(8):1026–1032.
27.
Fahmy RG, Khachigian LM. Suppression of growth factor expression and human vascular smooth muscle cell growth by small interfering RNA targeting EGR-1. *J. Cell. Biochem.* 2007 Apr;100(6):1526–1535.
28.
Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 2003 Sep;130(17):4217–4227.
29.
Fiedler, A. Hämatopoetische Genexpression in murinen embryonalen Stammzellen unter Einfluss von Zytokinen. *Med. Diss. Lübeck* 2007;
30.
Filippi MD, Sainteny F. [Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells in mice: a model to study the biology of hematopoiesis]. *Transfus Clin Biol* 2001 Feb;8(1):6–16.
31.
Fleischmann, K, Hescheler, J. Stammzellen und ihr potentieller Einsatz für therapeutische Zwecke. *BioFokus* 2004;68:1–12.
32.
Florek M, Haase M, Marzesco A-M, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res.* 2005 Jan;319(1):15–26.
33.
Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW. Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001 Aug;25(8):1061–1066.
34.
Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Könecke C, Hansen W, Schmitt-Thomsen A, Hertenstein B, Buer J, Ganser A. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* 2003 Juli;102(2):734–739.

35. Fukuda M, Kojima S, Matsumoto K, Matsuyama T. Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in childhood neuroblastoma and non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 1992 März;80(3):327–331.
36. Furness SGB, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol. Res.* 2006;34(1):13–32.
37. Gangenahalli GU, Gupta P, Saluja D, Verma YK, Kishore V, Chandra R, Sharma RK, Ravindranath T. Stem cell fate specification: role of master regulatory switch transcription factor PU.1 in differential hematopoiesis. *Stem Cells Dev.* 2005 Apr;14(2):140–152.
38. Gómez Raposo C, Pinto Marín A, González Barón M. Colony-stimulating factors: clinical evidence for treatment and prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Clin Transl Oncol* 2006 Okt;8(10):729–734.
39. Hansson A, Zetterblad J, van Duren C, Axelson H, Jönsson J-I. The Lim-only protein LMO2 acts as a positive regulator of erythroid differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 Dez;364(3):675–681.
40. Herberth B, Minkó K, Csillag A, Jaffredo T, Madarász E. SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2005 Aug;23(5):449–463.
41. Hermiston ML, Zikherman J, Zhu JW. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol. Rev.* 2009 März;228(1):288–311.
42. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003 Nov;102(10):3483–3493.
43. Heyworth CM, Vallance SJ, Whetton AD, Dexter TM. The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J. Cell Sci. Suppl.* 1990;13:57–74.
44. Hole N. Embryonic stem cell-derived haematopoiesis. *Cells Tissues Organs (Print)* 1999;165(3-4):181–189
45. Hromas R, Orazi A, Neiman RS, Maki R, Van Beveran C, Moore J, Klemsz M. Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* 1993 Nov;82(10):2998–3004.

46. Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 2004 Dez;432(7017):625–630.
47. Ishitobi H, Wakamatsu A, Liu F, Azami T, Hamada M, Matsumoto K, Kataoka H, Kobayashi M, Choi K, Nishikawa S, Takahashi S, Ema M. Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development* 2011 Dez;138(24):5357–5368.
48. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science* 2002 Okt;298(5593):601–604.
49. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S-I, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T, Fenyus ML, Elf S, Chan S, Kastner P, Huettner CS, Murray R, Tenen DG, Akashi K. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 2005 Sep;106(5):1590–1600.
50. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett.* 2003 Apr;540(1-3):7–14.
51. Kabrun N, Bühring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 1997 Mai;124(10):2039–2048.
52. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Haro T, Kakumitsu H, Yoshie M, Yamamoto M, Takeda K, Matsuda T, Akira S, Ogawa K, Harada M. Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. *Stem Cells* 2005 Feb;23(2):252–263.
53. Kastner P, Chan S. PU.1: a crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008;40(1):22–27.
54. Kaur-Bollinger P, Gotze KS, Oostendorp RAJ. Role of secreted factors in the regulation of hematopoietic stem cells by the bone marrow microenvironment. *Front. Biosci.* 2012;17:876–891.
55. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell. Biol.* 1993 Jan;13(1):473–486.
56. Keller G, Lacaud G, Robertson S. Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp. Hematol.* 1999 Mai;27(5):777–787.
57. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995 Dez;7(6):862–869.

58. Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997 Apr;386(6624):488–493.
59. Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, Schwantz S, Keller G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 2007 Apr;109(7):2679–2687.
60. Kenny DA, Jurata LW, Saga Y, Gill GN. Identification and characterization of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Sep;95(19):11257–11262.
61. Khachigian LM. Early growth response-1: blocking angiogenesis by shooting the messenger. *Cell Cycle* 2004 Jan;3(1):10–11.
62. Kirsch F, Krüger C, Schneider A. The receptor for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is expressed in radial glia during development of the nervous system. *BMC Dev. Biol.* 2008;8:32.
63. Lacaud G, Robertson S, Palis J, Kennedy M, Keller G. Regulation of hemangioblast development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001 Juni;938:96–107; discussion 108.
64. Lécuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH, Hoang T. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 2002 Okt;100(7):2430–2440.
65. Lee R, Kertesz N, Joseph SB, Jegalian A, Wu H. Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis. *Blood* 2001 Sep;98(5):1408–1415.
66. Lee S-H, Bahn JH, Choi CK, Whitlock NC, English AE, Safe S, Baek SJ. ESE-1/EGR-1 pathway plays a role in tolfenamic acid-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2008 Dez;7(12):3739–3750.
67. Li ZJ, Wang ZZ, Zheng YZ, Xu B, Yang RC, Scadden DT, Han ZC. Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation. *J. Cell. Biochem.* 2005 Juni;95(3):559–570.
68. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev.* 1996 Jan;10(2):154–164.

69.
Ling K-W, Ottersbach K, van Hamburg JP, Oziemlak A, Tsai F-Y, Orkin SH, Ploemacher R, Hendriks RW, Dzierzak E. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 2004 Okt;200(7):871–882.
70.
Ling V, Luxenberg D, Wang J, Nickbarg E, Leenen PJ, Neben S, Kobayashi M. Structural identification of the hematopoietic progenitor antigen ER-MP12 as the vascular endothelial adhesion molecule PECAM-1 (CD31). *Eur. J. Immunol.* 1997 Feb;27(2):509–514.
71.
Ling V, Neben S. In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J. Cell. Physiol.* 1997 Apr;171(1):104–115.
72.
Löhn M, Mueller C, Langner J. Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leuk. Lymphoma* 2002 Feb;43(2):407–413.
73.
Lugus JJ, Park C, Choi K. Developmental relationship between hematopoietic and endothelial cells. *Immunol. Res.* 2005;32(1-3):57–74.
74.
Ma YD, Lugus JJ, Park C, Choi K. Differentiation of mouse embryonic stem cells into blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2008 Juli;Chapter 1:Unit 1F.4.
75.
Mansergh FC, Daly CS, Hurley AL, Wride MA, Hunter SM, Evans MJ. Gene expression profiles during early differentiation of mouse embryonic stem cells. *BMC Dev. Biol.* 2009;9:5.
76.
Martin GR. 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.* 1981 Dez;78(12):7634–7638.
77.
Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE* 2009;4(3):e4820.
78.
McClanahan T, Dalrymple S, Barkett M, Lee F. Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during in vitro development of hematopoietic cells. *Blood* 1993 Juni;81(11):2903–2915.
79.
McGrath KE, Palis J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp. Hematol.* 2005 Sep;33(9):1021–1028.
80.
McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997 Jan;89(1):65–71.

81. McLaughlin F, Ludbrook VJ, Cox J, von Carlowitz I, Brown S, Randi AM. Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation. *Blood* 2001 Dez;98(12):3332–3339.
82. Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Cell* 1985 Nov;43(1):5–6.
83. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008 Jan;111(2):485–491.
84. Mikkola HKA, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, Orkin SH. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/TAL1 gene. *Nature* 2003 Jan;421(6922):547–551.
85. Mikkola HKA, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 2006 Okt;133(19):3733–3744.
86. Miller BA, Lipton JM, Linch DC, Burakoff SJ, Nathan DG. Thy-1 is a differentiation antigen that characterizes immature murine erythroid and myeloid hematopoietic progenitors. *J. Cell. Physiol.* 1985 Apr;123(1):25–32.
87. Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, Suzuki N, Kawauchi S, Zhou Y, Takahashi S, Hayashi N, Engel JD, Yamamoto M. The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* 1999 Juni;93(12):4196–4207.
88. Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, Hara T, Miyajima A, Nishikawa S-I, Yamamoto M. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* 2003 Aug;102(3):896–905.
89. Moore MA. Hematopoietic reconstruction: new approaches. *Clin. Cancer Res.* 1995 Jan;1(1):3–9.
90. Mroczko B, Szmitkowski M. Hematopoietic cytokines as tumor markers. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004;42(12):1347–1354.
91. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986 Feb;319(6052):415–418.
92. Nakauchi H, Sudo K, Ema H. Quantitative assessment of the stem cell self-renewal capacity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001 Juni;938:18–24; discussion 24–25.

93.
Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003 Juni;23(6):953–964.
94.
Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 1983 Juli;258(14):9017–9023.
95.
Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 1998 Mai;125(9):1747–1757.
96.
Nogueira MM, Mitjavila-Garcia MT, Le Pesteur F, Filippi MD, Vainchenker W, Dubart Kupperschmitt A, Sainteny F. Regulation of Id gene expression during embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 Sep;276(2):803–812.
97.
Ogawa M, Tajima F, Ito T, Sato T, Laver JH, Deguchi T. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001 Juni;938:139–145.
98.
Oram SH, Thoms JAI, Pridans C, Janes ME, Kinston SJ, Anand S, Landry J-R, Lock RB, Jayaraman P-S, Huntly BJ, Pimanda JE, Göttgens B. A previously unrecognized promoter of LMO2 forms part of a transcriptional regulatory circuit mediating LMO2 expression in a subset of T-acute lymphoblastic leukaemia patients. *Oncogene* 2010 Okt;29(43):5796–5808.
99.
Ottersbach K, Smith A, Wood A, Göttgens B. Ontogeny of haematopoiesis: recent advances and open questions. *Br. J. Haematol.* 2010 Feb;148(3):343–355.
100.
Perlingeiro RC, Kyba M, Daley GQ. Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development* 2001 Nov;128(22):4597–4604.
101.
Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp. Hematol.* 1995 Mai;23(5):461–469.
102.
Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 1996 Jan;87(1):30–37.

103.
Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/TAL1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 1996 Juli;86(1):47-57.
104.
Prelle K, Zink N, Wolf E. Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol* 2002 Juni;31(3):169-186.
105.
Quesenberry PJ, Abedi M, Aliotta J, Colvin G, Demers D, Dooner M, Greer D, Hebert H, Menon MK, Pimentel J, Paggioli D. Stem cell plasticity: an overview. *Blood Cells Mol. Dis.* 2004 Feb;32(1):1-4.
106.
Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. „Stemness“: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002 Okt;298(5593):597-600.
107.
Razak K, Newland AC. The significance of aminopeptidases and haematopoietic cell differentiation. *Blood Rev.* 1992 Dez;6(4):243-250.
108.
Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J.* 2006 Juni;20(8):1045-1054.
109.
Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 2005 März;23(1):33-41.
110.
Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp. Hematol.* 2005 Feb;33(2):131-143.
111.
Sampson M, Zhu Q-S, Corey SJ. Src kinases in G-CSF receptor signaling. *Front. Biosci.* 2007;12:1463-1474.
112.
Sato Y, Kanno S, Oda N, Abe M, Ito M, Shitara K, Shibuya M. Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000 Mai;902:201-205; discussion 205-207.
113.
Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev.* 1991 Mai;5(5):728-740.

114.
Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn H-G, Schäbitz W-R. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005 Aug;115(8):2083–2098.
115.
Seifert T, Stoelting S, Wagner T, Peters SO. Vasculogenic maturation of E14 embryonic stem cells with evidence of early vascular endothelial growth factor independency. *Differentiation* 2008 Okt;76(8):857–867.
116.
Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010 Dez;2(6):640–653.
117.
Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk1-deficient mice. *Nature* 1995 Juli;376(6535):62–66.
118.
Sharma S, Gurudutta GU, Satija NK, Pati S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, Singh VK, Tripathi RP. Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation. *Stem Cells Dev.* 2006 Dez;15(6):755–778.
119.
Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T, Yae K, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 2010 März;6(3):227–237.
120.
Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):715–719.
121.
Snodgrass HR, Schmitt RM, Bruyns E. Embryonic stem cells and in vitro hematopoiesis. *J. Cell. Biochem.* 1992 Juli;49(3):225–230.
122.
Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurol. Res.* 2009 März;31(2):167–172.
123.
Solaroglu I, Jadhav V, Zhang JH. Neuroprotective effect of granulocyte-colony stimulating factor. *Front. Biosci.* 2007;12:712–724.
124.
Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 1986 Apr;232(4746):61–65.

125.
Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. 1981. *Biotechnology* 1992;24:140–144.
126.
Tang Y, Chen J, Young NS. Expansion of haematopoietic stem cells from normal donors and bone marrow failure patients by recombinant *hoxb4*. *Br. J. Haematol.* 2009 Feb;144(4):603–612.
127.
Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci.* 2007 Mai;98(5):629–635.
128.
Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002 Apr;416(6880):542–545.
129.
Terskikh AV, Miyamoto T, Chang C, Diatchenko L, Weissman IL. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 2003 Juli;102(1):94–101.
130.
Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994 Sep;371(6494):221–226.
131.
Tse E, Smith AJH, Hunt S, Lavenir I, Forster A, Warren AJ, Grutz G, Feroni L, Carlton MBL, Colledge WH, Boehm T, Rabbitts TH. Null mutation of the *Lmo4* gene or a combined null mutation of the *Lmo1/Lmo3* genes causes perinatal lethality, and *Lmo4* controls neural tube development in mice. *Mol. Cell. Biol.* 2004 März;24(5):2063–2073.
132.
Uzan G, Prandini MH, Rosa JP, Berthier R. Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells: an in vitro model to study gene regulation during megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* 1996;14 Suppl 1:194–199.
133.
Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Juni;94(12):6273–6278.
134.
Walker F, Zhang H-H, Matthews V, Weinstock J, Nice EC, Ernst M, Rose-John S, Burgess AW. IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice. *Blood* 2008 Apr;111(8):3978–3985.
135.
Weiss MJ, Orkin SH. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J. Clin. Invest.* 1996 Feb;97(3):591–595.

136.
Welte K, Platzer E, Gabrilove JL, Lu L, Levi E, Polivka A, Mertelsmann R, Moore MA. Purification to apparent homogeneity and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Haematol Blood Transfus* 1985;29:398–401.
137.
Welte K, Zeidler C. Severe congenital neutropenia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2009 Apr;23(2):307–320.
138.
Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007 Juni;1106:64–75.
139.
Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* 2003 Dez;34(6):461–475.
140.
Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995 Okt;83(1):59–67.
141.
Xiong J-W. Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Dev. Dyn.* 2008 Mai;237(5):1218–1231.
142.
Yamada Y, Warren AJ, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbitts TH. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 März;95(7):3890–3895.
143.
Ying Q-L, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002 Apr;416(6880):545–548.
144.
Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:85.
145.
Yuan JS, Wang D, Stewart CN Jr. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J* 2008 Jan;3(1):112–123.
146.
Zhang Y, Payne KJ, Zhu Y, Price MA, Parrish YK, Zielinska E, Barsky LW, Crooks GM. SCL expression at critical points in human hematopoietic lineage commitment. *Stem Cells* 2005 Juli;23(6):852–860.
147.
Zhang Y, Wang L, Fu Y, Song H, Zhao H, Deng M, Zhang J, Fan D. Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating factor on amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2009 Dez;10(5-6):430–431.

148.
http://de.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_activated_cell_sorting (Tag des Zugriffs:
20.08.2010)

149.
<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion> (Tag des Zugriffs: 28.08.2010)

7 Anhang

7.1 G-CSF-Rezeptor

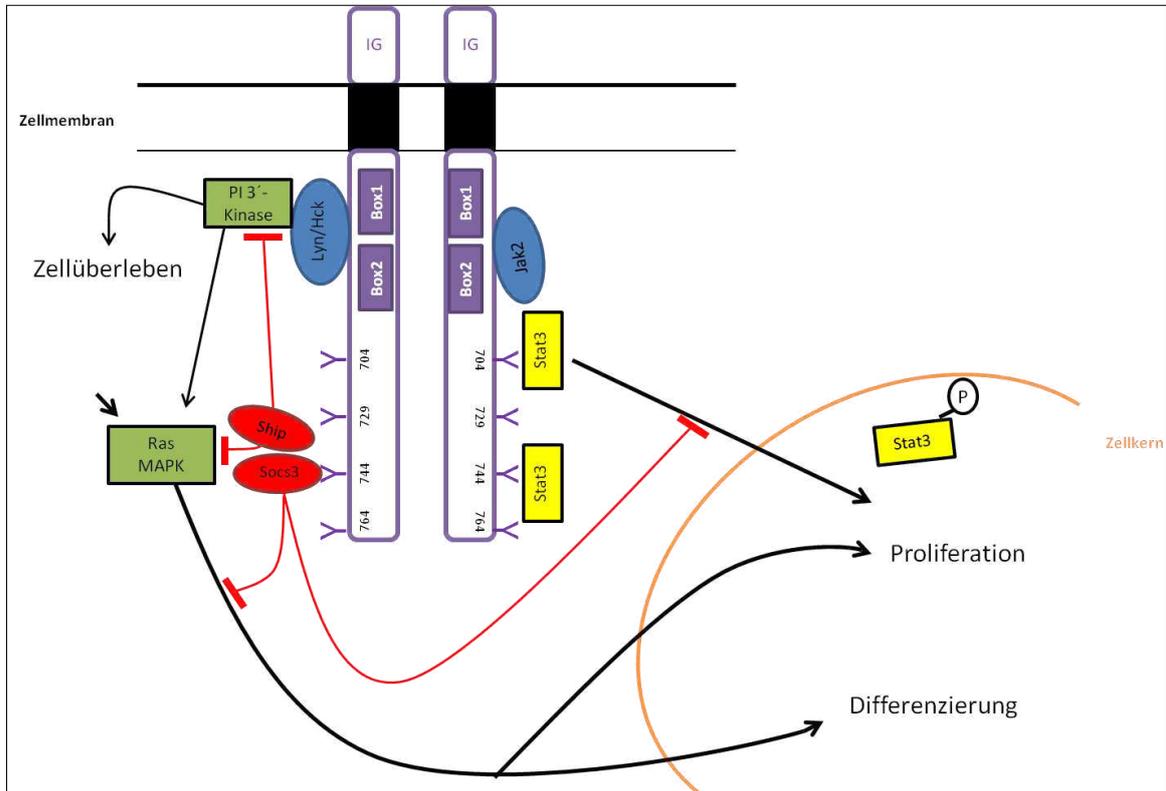


Abb. I: G-CSF-Rezeptor mit Signaltransduktionswegen; schwarze Pfeile stellen aktivierende Wege, rote Pfeile inhibitorische Wege dar; Bei Bindung von G-CSF an der Immunglobulin-domäne (IG) des Rezeptors kommt es durch Rezeptordimerisierung zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Dabei binden an die Box 1- und Box 2-Domänen des G-CSF-Rezeptors, der selbst keine intrinsische Kinasenaktivität besitzt, verschiedene Arten von Kinasen. Darunter sind Mitglieder der JAK-Tyrosin-Kinasen (JAK: Januskinase) wie Jak 2, und Mitglieder der Src-Kinasen Familie (Src: sarcoma) wie Lyn und Hck (Lyn-Protein Tyrosinkinase, Hck-Protein Tyrosinkinase). Unter den intrazellulären Signalwegen, die aktiviert werden, sind der JAK/Stat-Signalweg (Stat: Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription), der Proteinkinase3-Signalweg (PI³-Kinase) und der Ras/MAP-Kinasen Weg (Ras: rat sarcoma, MAP: Mitogen Activated Protein) dargestellt. Exemplarisch ist für den JAK/Stat-Signalweg die Phosphorylierung eines Stat3-Proteins, welches an einer der 4 charakteristischen Tyrosinreste-Bindungsstellen des Rezeptors (Y704, Y729, Y744, Y764) binden kann, durch JAK2 gezeigt. Das phosphorylierte Stat3-Protein (Stat3-P) aktiviert dann im Zellkern die Transkription entsprechender Zielgene. Simultan werden inhibitorische Signalwege und Proteine aktiviert, darunter über direkte Bindung an eine phosphorylierte Tyrosinrest-Bindungsstelle des Rezeptors (Y704, Y729, Y744 oder Y764) SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signalling), sowie indirekt Ship (SH2-containing inositol phosphatase). Die Rezeptoraktivierung setzt unterschiedliche, fein regulierte Signalkaskaden in Gang, welche entscheidende Zellfunktionen wie Differenzierung, Zellregeneration und Proliferation regulieren. Abb. modifiziert nach Roberts (109) und Sampson et al. (111).

7.2 Übersicht untersuchter Gene, Genprodukte und Oberflächenmarker

7.2.1 wichtige Oberflächenproteine als Marker der ES-Zellentwicklung

Tabelle I: Darstellung der in den FACS-Messungen (siehe 3.3) untersuchten Oberflächenproteine mit zelltypischer Expression und ihren bisher beschriebenen Funktionen.

Oberflächenprotein	exprimierende Zellen	Funktion
CD34	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (97);	transmembranöses Zell-Zell-Adhäsionsprotein (Sialomucin-Familie); eigentliche Funktion noch nicht identifiziert (36);
CD90 (Thy1)	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen; It-HSCs im adulten Knochenmark; erythroide und myeloide Vorläuferzellen; auch in nicht-hämatopoetischen Gewebe wie neuronalem Gliagewebe exprimiert (108);	Protein der Zelloberfläche, welches für die Zell-Zell-Interaktion wichtig ist und an der Regulation verschiedener Zellprozesse wie Proliferation, Inflammation, Differenzierung, Apoptose, etc. (108) beteiligt ist; Differenzierungsantigen der hämatopoetischer Stammzellen (13);
CD13 (Aminopeptidase M)	Hämatopoetische Progenitorzellen, Granulozyten, Monozyten, Endothel-Zellen (10, 107);	Marker der myeloischen Zelldifferenzierung; Membranprotein und Enzym, welches an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (72);
CD45	Hämatopoetische Progenitorzellen; Lymphozyten (95);	Protein-Tyrosin-Phosphatase, welche in hämatopoetischen Zellen und Lymphozyten über Kinasen der Src-Familie Zellprozesse wie Wachstum und Differenzierung reguliert (41);
CD117 (c-kit)	unterschiedlich starke Expression auf ES-Zellen, HPCs, HSCs (71, 121);	Rezeptor-Tyrosinkinase; Ligand: Stammzellfaktor (SCF); wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen (118); Protoonkogen;

CD133	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, andere Stammzellarten, darunter neuronale Stammzellen (139);	transmembranes Glykoprotein; wird bei der Stammzellenanreicherung nach Aphaese von Stammzellen aus dem Blut neben CD34 als adulter Stammzellmarker verwendet (32, 120);
CD135	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (13);	Flt-3 Rezeptor vom Tyrosinkinase Typ; Marker für Differenzierung und Selbsterneuerungsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen; Rezeptor-Stimulation wirkt synergistisch zu anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren in der hämatopoetischen Entwicklung, darunter dem G-CSF-Rezeptor (13);

7.2.2 Übersicht der untersuchten Gene und ihrer entwicklungspezifischen Funktion

Tabelle II: Übersicht der in den RT-PCR-Messungen untersuchten Gene, Genprodukte und ihrer entwicklungspezifischen Funktion in der frühen embryonalen, hämatopoetischen Entwicklung.

Gen	Genprodukt	Funktion
HoxB4 (Homeobox B4 Gen)	Transkriptionsfaktor mit einer Homeobox-DNS-bindenden Domäne;	Stammzellregeneration und –erhaltung (4, 8);
TAL1 (Scl) (T-Zell akutes lymphozytisches Leukämie-Protein 1; <i>Scl: stem cell leukemia gene</i>)	Transkriptionsfaktor	Expression für die Initiation der embryonalen Hämatopoese entscheidend (73, 146);
Gata2	Transkriptionsfaktor der Gata-Familie, welche an einem typischen Gata-Motiv der DNS bindet;	Transient auf den Stufen hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen exprimiert; weitere hämatopoetische Ausdifferenzierung wird von Runterregulation von Gata2 begleitet (87, 88);

VE-Cadherin (Vaskulo- Endotheliales Cadherin)	CD144, Glykoprotein der Zelloberfläche;	Zell-Adhäsionsprotein; besondere Bedeutung für die Endothelzell-Permeabilität; Genexpression entscheidend für die Strukturbildung sich neu entwickelnder Gefäße (133);
Flk1 (Fetale Leberkinase 1)	VEGF-R-2 (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>)	Flk1-exprimierendes Mesoderm ist Entstehungsort der definitiven Hämangioblasten und der definitiven It-HSCs (vgl. Abb. 1, 3 und 4); Rezeptor vermittelt zusammen mit VEGF-R-1 die VEGF Wirkung auf Zellwachstum- und differenzierung (112);
HoxD3 (Homeobox D3 Gen)	Transkriptionsfaktor (vgl. HoxB4)	Regulator der Angiogenese (6);
PECAM-1 (<i>Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molekul-1</i>)	CD31 (transmembranöses Zelladhäsionsmolekül)	Modulator der Zellmigration und Zell-Zell- Adhäsion; wichtige Rolle in der Angiogenese; Endothelzellmarker in der Vaskulo- und Angiogenese in der ES-Zellentwicklung (19, 50, 93);
Pu.1	Transkriptionsfaktor	Beteiligung an der Regulation der Differenzierung, Proliferation und Erhaltung der Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen; dosisabhängige Regulation der Linien-Spezifizierung hämatopoetischer Progenitorzellen (49);
Cyclin D1	Regulator der cdks 4 und 6 (cdk: <i>cyclin-dependent kinases</i>);	Regulation des Zellzyklus am Übergang der G1 in die S-Phase (G1: gap 1, S: Synthese) (14);
EGR1 (<i>early growth response protein 1</i>)	Protein des Zellnukleus, Transkriptionsfaktor;	Protein der Transkriptionskontrolle; auch als Tumorsuppressorgen identifiziert (66); früh in der Angiogenese exprimiert; nimmt dabei Schlüsselrolle in der Regulation mikrovaskulären Zellwachstums und der Neovaskulogenese über FGF-2 (<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>) ein (27, 61);

<p>FLI1 (<i>Friend Leukemia Virus Integration 1</i>)</p>	<p>Transkriptionsfaktor</p>	<p>früher Endothelzellmarker (33); im Komplex mit Lmo2 und ERG bei der Entstehung der T-Zell akuten lymphatischen Leukämie beteiligt (98);</p>
<p>ERG (<i>Ets-Related Gene</i>)</p>	<p>Transkriptionsfaktor</p>	<p>regulatorischer Komplex mit FLI1 und Lmo2 (siehe FLI1); Modulator der endothelialen Zelldifferenzierung (81);</p>
<p>Epo (Erythropoietin-Gen)</p>	<p>Erythropoietin (Epo)</p>	<p>hauptsächlicher Regulator der Erythrozytenproduktion (68); Epo hat keinen Einfluss auf die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (140); der Beginn der definitiven Hämatopoese in der fetalen Leber ist mit dem erstmaligen Auftreten von Epo im peripheren Blut korreliert und an das Vorhandensein des Epo-Rezeptors gebunden (65);</p>
<p>Lmo4 (<i>LIM-domain only 4-protein</i>)</p>	<p>Transkriptionsfaktor</p>	<p>Regulation hämatopoetischer und neuronaler Stammzellentwicklung (131);</p>
<p>Lmo2 (<i>LIM-domain only 2-protein</i>)</p>	<p>Transkriptionsfaktor</p>	<p>Regulator der embryonalen und definitiven hämatopoetischen Stammzellentwicklung; keine Bedeutung in reiferen hämatopoetischen Zellen (60);</p>

7.3 Auflistung aller Versuchsreihen mit den entsprechenden Messwerten

7.3.1 RT-PCR ohne Auftrennung

Tabelle III: Übersicht der in der RT-PCR gemessenen Gene mit dem Mittelwert (MW) der Ratio der Hochregulation (siehe Tabelle 1) aus den je vier Versuchen (für Epo n=2, kein p-Wert berechnet) an den Messtagen t3, t6 und t6+5 mit Standardabweichung und P-Werten (nicht-parametrischer Mann-Whitney U-Test) für den Gesamtpool der geernteten Zellen (siehe 2.2.6 und 3.2).

Gen		t3	t6	t6+5
Gata2	MW	3,95	0,99	0,67
	Standardabweichung (StAbw)	3,86	0,56	0,55
	P-Wert	0,06	0,89	0,34
Epo	MW	1,47	0,72	0,70
	StAbw	0,40	0,80	0,03
	P-Wert	-	-	-
HoxB4	MW	1,94	0,86	0,43
	StAbw	0,74	0,60	0,24
	P-Wert	0,03	0,69	0,20
Lmo2	MW	2,11	1,15	0,76
	StAbw	1,62	0,31	0,18
	P-Wert	0,34	0,89	0,69
CyclinD1	MW	1,20	1,14	0,99
	StAbw	0,32	0,09	0,19
	P-Wert	0,89	0,49	0,89
Pu.1	MW	3,48	1,31	0,41
	StAbw	3,15	0,37	0,31
	P-Wert	0,03	0,89	0,34
TAL1	MW	2,08	1,00	0,68
	StAbw	1,16	0,74	0,53
	P-Wert	0,11	0,89	0,69
Lmo4	MW	1,33	1,21	1,17
	StAbw	0,43	0,22	0,40
	P-Wert	0,49	0,69	1,00

Flk1	MW	2,20	1,18	0,62
	StAbw	0,93	0,58	0,40
	P-Wert	0,11	0,89	0,69
HoxD3	MW	3,74	1,05	0,59
	StAbw	3,22	0,73	0,40
	P-Wert	0,06	0,69	0,34
CD144	MW	2,38	0,79	0,78
	StAbw	0,64	0,55	0,53
	P-Wert	0,11	0,69	0,69
EGR1	MW	1,35	0,98	1,07
	StAbw	0,26	0,24	0,53
	P-Wert	0,89	1,00	0,89
FLI1	MW	2,58	0,79	0,68
	StAbw	1,05	0,44	0,23
	P-Wert	0,20	0,69	0,11
KDR	MW	1,77	2,38	0,69
	StAbw	0,67	2,91	0,36
	P-Wert	0,11	0,69	0,69
PECAM	MW	2,00	0,98	0,57
	StAbw	1,46	0,28	0,30
	P-Wert	0,69	0,34	0,69
ERG	MW	2,62	1,04	0,58
	StAbw	2,25	0,91	0,40
	P-Wert	0,20	0,88	0,34

7.3.2 RT-PCR mit Auftrennung der Zellen durch MACS *Micro-Beads*

Tabelle IV: Übersicht der in der RT-PCR gemessenen Gene mit dem Mittelwert (MW) der Ratio der Hochregulation (siehe Tabelle 1) nach Auftrennung der an Tag 3 geernteten Zellen nach Sca1-Oberflächenprotein.

Gen	Sca1- Positivfraktionen (G-CSF/Ko)	Sca1- Negativfraktionen (G-CSF/Ko)	G-CSF- stimulierte Gruppe (Sca1 +/ Sca1 -)	Kontrollgruppe (Sca1 +/Sca1 -)
Gata2	1,48	0,30	2,27	0,45
Epo	1,27	0,12	9,42	0,87
HoxB4	5,04	0,14	5,28	0,09
Lmo2	2,06	0,39	1,31	0,27
CyclinD1	0,59	0,35	8,91	5,36
Pu.1	9,25	0,04	8,09	0,03
TAL1	4,13	0,05	4,80	0,06
Lmo4	0,38	0,80	0,85	1,79
Flk1	29,89	0,01	35,30	0,02
HoxD3	2,96	0,09	4,15	0,12
CD144	4,02	0,06	10,47	0,15
EGR1	0,44	0,51	1,96	2,31
FLI1	4,00	0,43	1,27	0,14
KDR	-	0,19	-	0,27
PECAM	0,37	0,25	1,44	0,98
ERG	1,02	1,01	1,00	1,00

7.3.3 FACS-Messungen ohne Auftrennung

Tabelle V: Übersicht der in den FACS-Messungen bestimmten Oberflächenproteine als Anteil der für ein Protein positiven Zellen an dem Gesamtpool an Zellen für t3, t6 und t6+5 der EB-Entwicklung mit Mittelwert (in %), Standardabweichung (in %, absolut) und P-Wert (nicht-parametrischer Mann-Whitney U-Test).

Oberflächenprotein		d3-GCSF	d3-Ko	d6-GCSF	d6-Ko	d6+5-GCSF	d6+5-Ko
CD34	MW	0,06	0,27	1,25	0,62	2,37	2,33
	StAbw	0,09	0,42	1,09	0,43	0,55	0,35
	P-Wert	0,61		0,63		0,82	
CD90	MW	0,28	0,34	0,56	0,58	0,65	1,05
	StAbw	0,43	0,25	0,92	1,13	0,64	0,21
	P-Wert	0,75		0,67		-	
CD34+90	MW	0,10	0,18	0,20	0,15	0,30	0,45
	StAbw	0,12	0,24	0,18	0,24	0,28	0,07
	P-Wert	0,87		0,77		-	
CD13	MW	0,30	0,63	3,00	1,53	14,30	16,90
	StAbw	0,00	0,32	1,21	1,45	3,39	1,13
	P-Wert	0,06		0,27		-	
CD45	MW	0,13	0,37	0,43	0,23	1,90	2,20
	StAbw	0,06	0,21	0,32	0,15	0,57	0,42
	P-Wert	0,12		0,51		-	
CD13+45	MW	0,13	0,37	0,37	0,20	0,85	0,60
	StAbw	0,06	0,21	0,29	0,10	0,92	0,57
	P-Wert	0,12		0,64		-	
CD117	MW	3,72	4,20	6,96	5,44	14,85	14,35
	StAbw	4,82	3,84	4,24	3,43	0,64	0,07
	P-Wert	0,67		0,60		-	
CD133	MW	3,18	2,66	0,88	0,86	2,45	2,40
	StAbw	3,59	2,04	0,36	0,61	1,91	2,12
	P-Wert	0,92		1,00		-	

CD135	MW	0,13	0,53	1,03	1,80	0,8	6,9
	StAbw	0,15	0,21	1,01	2,21	-	-
	P-Wert	0,12		0,82		-	

7.3.4 FACS-Messungen mit Auftrennung der Zellen durch MACS *Micro-Beads*

Tabelle VI: Übersicht der in den FACS-Messungen bestimmten Oberflächenproteine als Anteil der für ein Protein positiven Zellen an den gemessenen Zellen (in %), nach Auftrennung der an Tag 3 geernteten Zellen nach Sca1-Oberflächenprotein.

Oberflächen- protein	Sca1- Positivfraktion (G-CSF)	Sca1- Negativfraktion (G-CSF)	Sca1- Positivfraktion (Ko)	Sca1- Negativfraktion (Ko)
	CD34	1,2	0,7	1,9
CD90	2,1	0,6	2,6	0,8
CD34+90	0,9	0,1	1,3	0,2
CD117	18,0	24,0	12,4	29,8
CD133	5,7	6,4	6,7	33,8
CD135	2,2	0,0	0,6	0,7

7.3.5 Zytokinarray Tag 3 der EB-Entwicklung

Tabelle VII: Darstellung der gemessenen Zytokinexpression in einem Versuchsansatz einer ES-Zellkultur an Tag 3 der EB-Entwicklung für G-CSF-stimulierte Versuchsgruppe und Kontrollgruppe (,-' : keine Expression; ,(+)': minimale, nachweisbare Expression; ,+' : niedrige Expression; ,++' : starke Expression; ,+++': sehr starke Expression):

Zytokin (mit Alternativbezeichnungen)	Expression G-CSF / Ko	Zytokin (mit Alternativbezeichnungen)	Expression G-CSF / Ko
Positivkontrolle	+++ / +++	Negativkontrolle	- / -
Positivkontrolle	+++ / +++	Positivkontrolle	+++ / +++
BLC (CXCL13/BCA-1)	- / -	C5a (Komplementfaktor 5a)	- / -
G-CSF	- / -	GM-CSF	(+) / (+)
I-309 (CCL1/TCA-3)	- / -	Eotaxin (CCL11)	- / -
sICAM-1 (CD54)	++ / ++	IFN- γ	+ / +
IL-1 α (IL-1F1)	+ / +	IL-1 β (IL-1F2)	- / -
IL-1ra (IL-1F3)	- / -	IL-2	- / -
IL-3	- / -	IL-4	- / -
IL-5	- / -	IL-6	- / -
IL-7	- / -	IL-10	- / -
IL-13	- / -	IL-12 p70	- / -
IL-16	- / -	IL-17	- / -
IL-23	- / -	IL-27	- / -
IP-10 (CXCL10/CRG-2)	- / -	I-TAC (CXCL11)	- / -
KC	+ / +	M-CSF	(+) / (+)
JE (CCL2/MCP-1)	+ / +	MCP-5 (CCL12)	- / -
MIG (CXCL9)	- / -	MIP-1 α (CCL3)	- / -
MIP-1 β (CCL4)	- / -	MIP-2	- / -
RANTES (CCL5)	- / -	SDF-1 (CXCL12)	- / -
TARC (CCL17)	- / -	TIMP-1	+ / +
TNF- α	+ / +	TREM-1	- / -

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. S. O. Peters danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, die Bereitstellung des Arbeitsumfeldes und die freundliche Unterstützung der Doktorarbeit.

Der Leitung der Medizinischen Klinik I, Herrn Prof. Dr. med. H. Lehnert und vormals Herrn Prof. Dr. med. T. Wagner danke ich, die Arbeit in der Klinik habe anfertigen zu dürfen.

Frau Dr. rer. nat. S. Stölting bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Sie stand während der ganzen Arbeit als Ratgeber und Freund zur Seite und hat mich durch ihre Art zu denken, nachhaltig an Wissenschaft und Forschung herangeführt. An der inhaltlichen Entwicklung der Arbeit und der Vorbereitung von Kongressbeiträgen hatte Sie durch ihr konstruktives Feedback einen großen Anteil an deren Gelingen. Ganz besonders möchte ich mich für die geduldige und genaue Durchsicht des Manuskriptes danken. Die offene, freundliche und unterstützende Wesensart von Frau Stölting hat die Zeit der Doktorarbeit für mich nachhaltig geprägt.

Frau H. Albrecht und Frau C. Kauderer möchte ich ganz nachdrücklich für die geduldige Einführung in die Laborarbeit, die Unterstützung bei der Durchführung der RT-PCR und die immer angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe, namentlich Leonie Holthausen, Henning Folkerts, Piotr Kuta, Anja Fiedler und Mareike Middeke möchte ich für die schöne Zeit und viele interessante und anregende Gespräche danken.

Meinen Freunden, die mich über die Studienzeit begleitet haben danke ich von Herzen.

Meinen engen Freunden Anna Göbel, Cédric, Christoph, Kari und Kathrin danke ich für die gemeinsame tolle Zeit in Lübeck sowie euch, Sigrid und Vera, für brillante Ideen und Gespräche zu den wirklich wichtigen Dingen im Leben.

Meiner Freundin Anna Engel gilt ein besonderer Dank für die emotionale Unterstützung während der Zeit. Sie hat immer an das erfolgreiche Gelingen der Arbeit geglaubt.

Meinen Eltern und meinen beiden Großmüttern danke ich für die fortwährende Unterstützung über all die Jahre, ohne die ich nicht bis hierhin gekommen wäre. Meinen Brüdern Jan und Philipp danke ich für die Begleitung auf meinem Lebensweg und für die gemeinsam erreichten Erfolge.

9. Lebenslauf



Persönliche Daten

Name, Vornamen	Huber, <u>Carlo</u> Andreas
Geburtsdatum	11. Dezember 1983
Geburtsort	Hof an der Saale
Familienstand	Ledig
E-Mail-Adresse	carlo.huber@medizin.uni-luebeck.de

Schulbildung

1990-1994	Christian-Wolfrum Grundschule Hof
1994-2003	Schiller-Gymnasium Hof und Jean-Paul-Gymnasium Hof
2003	Abitur

Wehrdienst

2003-2004	Generalmusikkorps der Bundeswehr, Siegburg/ Bonn
-----------	--

Hochschulbildung

2004-2011	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2006	Erstes Staatsexamen Medizin
2007-2010	Famulaturen in Innerer Medizin, Psychiatrie, Strahlenmedizin, Urologie und Chirurgie in Lübeck, Neustadt i.H., Hof und Muscat (Sultanat Oman)
2010	Praktikum bei der Weltgesundheitsorganisation WHO, Regionalbüro für Europa, Kopenhagen
2010-2011	Praktisches Jahr: - Chirurgie, UK-SH, Campus Lübeck (Prof. Dr. med. H.-P. Bruch) - Neurologie: National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queens Square, London

- Innere Medizin: DRK-Krankenhaus Ratzeburg (Dr. med. R. Preuss)

2011 Zweites Staatsexamen Medizin und ärztliche Approbation

Beruf

Ab 2011 Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Köln (Prof. Dr. med. G.R. Fink);
 2011-2013 Forschungsrotation als Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Neurophysiologie und Tiefe Hirnstimulation, DFG-geförderte KFO 219 (Prof. Dr. med. L. Timmermann);

Stipendien und Auszeichnungen

2001-2003 mehrfacher Bundespreisträger beim Wettbewerb „Jugend Musiziert“ ; Kammermusikaufnahmen für den bayrischen Rundfunk, München
 2003 Goldene Anstecknadel des Jean-Paul-Gymnasiums für außergewöhnliche musikalische Leistungen
 2005-2011 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
 2008-09 Promotionstipendium ‚Exzellenzmedizin‘ verliehen durch die Medizinische Fakultät der Universität zu Lübeck
 2009 ‚Masterclass Innere Medizin‘ der Medizinischen Klinik I am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Prof. Dr. med. H. Lehnert)

Dissertation

Experimentelle Arbeiten von 11/2007-12/2010 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. S.O. Peters und Frau Dr. rer. nat. S. Stölting zum Thema:

„Einfluss des Granulozyten-Kolonien-stimulierenden Faktors (G-CSF) auf frühe Stadien hämatopoetischer Stammzellen: Untersuchungen differenzieller Gen- und Proteinexpression in einer murinen embryonalen Stammzellkultur“.

Posterabstracts, Kongressbeiträge

Huber C, Peters SO, Wagner T, Lehnert H, Stoelting S. Effects on differentiation of early murine embryonic and hematopoietic stem cells under stimulation with Granulocyte Colony Stimulating Factor. J Stem Cells Regen Med. 2010 Okt; 6(2):75.

Peters SO, Seifert T, **Huber C**, Dombach P, Kuta P, Wagner T, Stoelting S. Haemangiopoietic stem cells and tumor angiogenesis. Anticancer Res. 2008 Okt;28(5C):3444–3445.

Huber C, Kauderer C, Albrecht T, Stölting S, Peters SO. Einfluss von G-CSF auf die Proliferation und Differenzierung von murinen hämatopoetischen Stammzellen. Lübecker Doktorandentag 2009, St.Petri, Lübeck